

**Regulation der Interleukin-10 Expression durch  
das atypische „Inhibitor von NF- $\kappa$ B“ Protein I $\kappa$ B $\zeta$**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Hörber, Sebastian**

**2016**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Schulze-Osthoff

2. Berichterstatterin: Professor Dr. J. Skokowa

3. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. H.-U. Simon

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Das Immunsystem .....</b>	<b>1</b>
1.1.1.	Aufbau und Funktionsweise des angeborenen Immunsystems .....	1
1.1.2.	Toll-like Rezeptoren .....	2
1.1.3.	Signalwege im angeborenen Immunsystem.....	3
<b>1.2.</b>	<b>Der Transkriptionsfaktor NF-<math>\kappa</math>B.....</b>	<b>4</b>
1.2.1.1.	Die NF- $\kappa$ B Proteinfamilie .....	5
1.2.1.2.	Aktivierung und Regulation von NF- $\kappa$ B .....	6
1.2.1.3.	Hierarchie der NF- $\kappa$ B-Zielgene.....	7
<b>1.3.</b>	<b>Das atypische I<math>\kappa</math>B Protein ‘Inhibitor of kappa B <math>\zeta</math>’ .....</b>	<b>9</b>
1.3.1.	Struktur und Funktion von I $\kappa$ B $\zeta$ .....	9
1.3.2.	Expression und molekulare Funktionsweise von I $\kappa$ B $\zeta$ .....	9
1.3.3.	Physiologische Relevanz von I $\kappa$ B $\zeta$ .....	11
<b>1.4.</b>	<b>Makrophagen: Herkunft und Funktionen .....</b>	<b>12</b>
1.4.1.	Aktivierung und Polarisierung von Makrophagen.....	15
<b>1.5.</b>	<b>Interleukine – Vermittler der Immunreaktion .....</b>	<b>18</b>
1.5.1.	Interleukin-10 .....	19
1.5.2.	Struktur und Funktion von Interleukin-10 .....	19
1.5.3.	Signalübertragung von Interleukin-10 .....	20
1.5.4.	Interleukin-10 Expression in Makrophagen.....	21
1.5.5.	Regulation der <i>Il10</i> Expression.....	22
1.5.6.	Interleukin-10 in der Pathogenese von Erkrankungen .....	23
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1.</b>	<b>Material.....</b>	<b>25</b>
2.1.1.	Hersteller .....	25
2.1.2.	Geräte, Systeme und Software .....	27
2.1.2.1.	Geräte .....	27
2.1.2.2.	Detektionssysteme .....	27
2.1.2.3.	Reinigungssysteme .....	28
2.1.2.4.	Software .....	28
2.1.3.	Reagenzien.....	29
2.1.3.1.	Chemikalien.....	29
2.1.3.2.	Enzyme und dazugehörige Kits .....	30
2.1.3.3.	Zytokine .....	31
2.1.3.4.	Antikörper .....	31
2.1.3.5.	Sonstige Reagenzien.....	32
2.1.4.	Oligonukleotide .....	33
2.1.4.1.	Oligonukleotide für qRT-PCR.....	33

2.1.4.2. Oligonukleotide für ChIP-Anwendungen .....	34
2.1.4.3. Oligonukleotide für Genotypisierungen .....	34
2.1.4.4. Oligonukleotide für Klonierungen.....	34
2.1.5. Plasmide.....	35
2.1.6. Lösungen und Puffer.....	37
2.1.7. Zelllinien und Bakterien .....	41
2.1.7.1. Stabile Zelllinien .....	41
2.1.7.2. Bakterien .....	42
<b>2.2. Methoden.....</b>	<b>42</b>
2.2.1. Molekularbiologische Methoden .....	42
2.2.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen .....	42
2.2.1.2. Umschreibung von Gesamt-RNA in cDNA .....	42
2.2.1.3. Quantitative <i>real time</i> -PCR (qRT-PCR).....	43
2.2.1.4. Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	43
2.2.1.5. DNA-Extraktion aus Agarose.....	44
2.2.1.6. DNA-Sequenzierung .....	44
2.2.1.7. Polymerase-Kettenreaktion .....	44
2.2.1.8. Klonierung von PCR-Fragmenten .....	44
2.2.1.9. Genotypisierung .....	45
2.2.1.10. Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien.....	45
2.2.1.11. Plasmidisolierung .....	46
2.2.1.12. Generierung von Luziferase Reportergenkonstrukten .....	46
2.2.1.13. Generierung der <i>pINDUCER20</i> Expressionsplasmide .....	46
2.2.2. Zellbiologische Methoden .....	47
2.2.2.1. Auftauen und Einfrieren von Zellen .....	47
2.2.2.2. Bestimmung der Zellzahl .....	47
2.2.2.3. Kultivierung von Zelllinien .....	47
2.2.2.4. Gewinnung von murinen embryonale Fibroblasten.....	48
2.2.2.5. Gewinnung von Peritonealmakrophagen.....	48
2.2.2.6. Generierung und Kultivierung knochenmarksabstammender Makrophagen .....	49
2.2.2.7. Produktion von Lentiviren und Transduktion.....	49
2.2.2.8. Generierung und Kultivierung von Raw264.7-TetOn-I $\kappa$ B $\zeta$ Zellen .....	50
2.2.2.9. Vorbehandlung und pro-inflammatorische Aktivierung von Makrophagen.....	50
2.2.2.10. Luziferase Reportergen Assay .....	50
2.2.3. Immunbiologische Methoden .....	51
2.2.3.1. Generierung von Proteinlysaten für Western Blot Analysen.....	51
2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	51
2.2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	51
2.2.3.4. Immuno-(Western) Blot .....	52
2.2.3.5. Bestimmung von Zytokin-Konzentrationen .....	52
2.2.3.6. Bestimmung von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie .....	52
2.2.3.7. Chromatinimmunpräzipitation.....	53
2.2.4. Statistische Auswertung.....	54
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>55</b>
3.1. Phänotypische Eigenschaften von <i>Nfkbiz<sup>ko/ko</sup></i> Mäusen .....	55
3.2. Etablierung eines Zellsystems zur Untersuchung der Funktionen von I $\kappa$ B $\zeta$ .....	57

3.2.1. Isolierung und Charakterisierung von Knochenmarksmakrophagen aus <i>Nfkbiz</i> <sup>wt/wt</sup> und <i>Nfkbiz</i> <sup>ko/ko</sup> Mäusen .....	58
3.2.2. KMM zeigen eine Stimulus-abhängige Expression von <i>Nfkbiz</i> .....	59
<b>3.3. IκBζ ist ein wichtiger Regulator der <i>Il10</i>/IL-10 Expression<sup>C</sup> .....</b>	<b>61</b>
3.3.1. <i>Nfkbiz</i> -defiziente Makrophagen und Fibroblasten zeigen verminderte <i>Il10</i> Genexpressionlevel nach TLR-Stimulation .....	61
3.3.2. Die Interleukin-10 Proteinexpression von <i>Nfkbiz</i> -defizienten Knochenmarksmakrophagen ist vermindert.....	65
3.3.3. Die Polarisierung der Makrophagen hat keinen Einfluss auf die Regulation der IL-10 Proteinsekretion .....	67
3.3.4. Raw264.7 Makrophagen als Modellsystem zur Untersuchung des Einflusses von IκBζ auf die <i>Il10</i> /IL-10 Expression .....	69
3.3.5. Überexpression von IκBζ induziert die <i>Il10</i> Genexpression.....	71
<b>3.4. IκBζ-reguliert den IL-10 Promotor<sup>D</sup> .....</b>	<b>73</b>
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>78</b>
<b>4.1. IκBζ reguliert die <i>Il10</i>/IL-10 Expression .....</b>	<b>79</b>
4.1.1. Etablierung eines Zellsystems zur Untersuchung der IκBζ-vermittelten Genexpression .....	79
4.1.2. <i>Il10</i> /IL-10 Genexpression ist von IκBζ abhängig .....	79
4.1.3. Mechanismus der Regulation.....	82
4.1.4. Physiologische Relevanz .....	84
4.1.4.1. Rolle der IL-10 Sekretion von Makrophagen in der Immunantwort .....	84
4.1.4.2. Weitere IL-10 produzierende Zellen .....	85
4.1.4.3. Von der molekularen zur systemischen Wirkung – Interleukin-10 im Rahmen von Erkrankungen .....	86
<b>4.2. Ausblick und offene Fragen.....</b>	<b>90</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>91</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>93</b>
<b>7 ERKLÄRUNGEN ZUM EIGENANTEIL .....</b>	<b>106</b>
<b>8 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>107</b>
<b>9 VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>108</b>
<b>10 DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>109</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>ABC</b>	<i>Activated B-cell</i>
<b>AK</b>	<i>Antikörper</i>
<b>APC</b>	<i>Allophycocyanin</i>
<b>APS</b>	<i>Ammoniumperoxodisulfat</i>
<b>ARD</b>	<i>Ankyrin repeat domain</i>
<b>ATP</b>	<i>Adenosintriphosphat</i>
<b>BAF60</b>	<i>BRG1/BRM-associated factor 60</i>
<b>BAFF</b>	<i>B cell activating factor of the TNF family</i>
<b>BCA</b>	<i>Bicinchoninic acid</i>
<b>Bcl-3</b>	<i>B-cell lymphoma 3</i>
<b>BRG1</b>	<i>Brahma-related gene 1</i>
<b>BRM</b>	<i>Brahma gene</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i>
<b>CBP</b>	<i>CREB-binding protein</i>
<b>CCL</b>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
<b>Ccl2</b>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
<b>CCR</b>	<i>CC Chemokine receptor</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i>
<b>cDNA</b>	<i>Copy DNA</i>
<b>Cebpd</b>	<i>CCAAT/enhancer-binding protein delta</i>
<b>ChIP</b>	<i>Chromatinimmunpräzipitation</i>
<b>CMP</b>	<i>Common myeloid progenitor</i>
<b>CRF2</b>	<i>Corticotropin-releasing factor 2</i>
<b>Csf2</b>	<i>Colony stimulating factor 2</i>
<b>Csf3</b>	<i>Colony stimulating factor 3</i>
<b>CSIF</b>	<i>Cytokine-synthesis inhibitory factor</i>
<b>CTL</b>	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
<b>CTP</b>	<i>Cytosintriphosphat</i>
<b>CXCL</b>	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>

---

<b>DAMP</b>	<i>Damage associated molecular pattern</i>
<b>DC</b>	<i>Dendritic cell</i>
<b>DC-SIGN</b>	<i>DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
<b>Dectin-1</b>	<i>Dendritic cell associated C-type lectin-1</i>
<b>Defb1</b>	<i>Defensin, beta 1</i>
<b>DLBCL</b>	<i>Diffuse large B cell lymphoma</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>Dox</b>	Doxycyclin
<b>DUSP1</b>	<i>Dual specificity protein phosphatase 1</i>
<b>Edn1</b>	<i>Endothelin 1</i>
<b>ERK</b>	<i>Extracellular-signal regulated kinases</i>
<b>Etc.</b>	<i>Et cetera</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
<b>FCS</b>	<i>Fetal calf serum</i>
<b>FUS-DDIT3</b>	<i>Fused in Sarcoma-DNA damage-inducible transcript 3</i>
<b>GATA3</b>	<i>GATA binding protein 3</i>
<b>GMP</b>	<i>Granulocyte-monocyte progenitors</i>
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>h</b>	Stunde
<b>hrs</b>	Stunden
<b>H3K4</b>	Histon 3 Lysin 4
<b>HEK</b>	Humane embryonale <i>Kidney</i> -Zellen
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HSS</b>	<i>Hypersensitive sites</i>
<b>ICAM-1</b>	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
<b>IFIT2</b>	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>IgG</b>	Immunglobulin G

---

<b>IKK</b>	I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase-Komplex
<b>IKs</b>	Immunkomplexe
<b>IL-1</b>	Interleukin-1
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukin-1 $\beta$
<b>IL-4</b>	Interleukin-4
<b>IL-6</b>	Interleukin-6
<b>IL-10</b>	Interleukin-10
<b>IL-12</b>	Interleukin-12
<b>IL-12p40</b>	Interleukin-12 p40
<b>IL-13</b>	Interleukin-13
<b>IL-17</b>	Interleukin-17
<b>IL-18</b>	Interleukin-18
<b>INAP</b>	<i>Interleukin-1 inducible nuclear ankyrin-repeat protein</i>
<b>iNOS</b>	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
<b>IP-10</b>	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
<b>IRAK1</b>	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>
<b>IRAK2</b>	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 2</i>
<b>IRAK4</b>	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 4</i>
<b>IRF</b>	<i>Interferon regulatory transcription factor</i>
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	<i>Inhibitor of <math>\kappa</math>B</i>
<b>I<math>\kappa</math>B<sub>NS</sub></b>	<i>Inhibitor of NF-kappa B NS</i>
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b>	<i>Inhibitor of NF-kappa B <math>\alpha</math></i>
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\beta</math></b>	<i>Inhibitor of NF-kappa B <math>\beta</math></i>
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\gamma</math></b>	<i>Inhibitor of NF-kappa B <math>\gamma</math></i>
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\zeta</math></b>	<i>Inhibitor of NF-kappa B <math>\zeta</math></i>
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\eta</math></b>	<i>Inhibitor of NF-kappa B <math>\eta</math></i>
<b>JAK1</b>	<i>Janus kinase 1</i>
<b>KMM</b>	Knochenmarksmakrophagen
<b>Ko</b>	<i>Knockout</i>
<b>LB</b>	<i>Lysogeny broth</i>

---

<b>Lcn2</b>	<i>Lipocalin 2</i>
<b>LPS</b>	<i>Lipopolysaccharid</i>
<b>LRR</b>	<i>Leucine-rich repeats</i>
<b>MAIL</b>	<i>molecule possessing ankyrin repeats induced by LPS</i>
<b>Mal</b>	<i>Myelin and lymphocyte</i>
<b>MAP</b>	<i>Microtubule-associated protein</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
<b>M-CSF</b>	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>MDP</b>	<i>Macrophage-DC precursor</i>
<b>MEF</b>	<i>Murine embryonale Fibroblasten</i>
<b>MHC</b>	<i>Major histocompatibility complex</i>
<b>min</b>	<i>Minute</i>
<b>MPS</b>	<i>Mononuclear phagocyte system</i>
<b>mTOR</b>	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
<b>MyD88</b>	<i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
<b>NEMO</b>	<i>NF-kappa-B essential modulator</i>
<b><i>Nfkbiz</i><sup>ko/ko</sup></b>	<i>Homozygoter Knockout für Nfkbiz</i>
<b><i>Nfkbiz</i><sup>wt/wt</sup></b>	<i>Homozygoter Wildtyp für Nfkbiz</i>
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear factor of kappa light chain enhancer of activated B-cells</i>
<b>NLR</b>	<i>NOD-like receptor</i>
<b>NLS</b>	<i>Nuclear localisation sequence</i>
<b>NOD</b>	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PBX1</b>	<i>Pre-B-cell leukemia transcription factor 1</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerasekettenreaktion</i>
<b>PE</b>	<i>Phycoerythrin</i>
<b>PGN</b>	<i>Peptidoglykan</i>
<b>PI(3)K</b>	<i>Phosphoinositid-3-Kinasen</i>

---

<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PM</b>	Peritonealmakrophagen
<b>PREP1</b>	<i>Pbx-regulating protein-1</i>
<b>PRR</b>	<i>Pathogen recognition receptor</i>
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative <i>real-time</i> PCR
<b>RES</b>	<i>Reticuloendothelial system</i>
<b>RHD</b>	Rel-homologe Domäne
<b>RIG-I</b>	<i>Retinoic acid inducible gene I</i>
<b>RLR</b>	<i>RIG-I-like receptors</i>
<b>rm</b>	Rekombinant
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>ROR<math>\alpha</math></b>	<i>Related orphan receptor <math>\alpha</math></i>
<b>ROR<math>\gamma</math></b>	<i>Related orphan receptor <math>\gamma</math></i>
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat
<b>SEM</b>	Standardabweichung vom Mittelwert
<b>SOCS3</b>	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
<b>STAT1</b>	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription 1</i>
<b>STAT3</b>	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription 3</i>
<b>StdAbw</b>	Standardabweichung
<b>SWI/SNF</b>	<i>SWItch/Sucrose NonFermentable</i>
<b>TAB2</b>	<i>TAK1-Binding Protein 2</i>
<b>TAB3</b>	<i>TAK1-Binding Protein 3</i>
<b>TAD</b>	<i>Trans-activating domain</i>
<b>TAE</b>	TrisAcetat-EDTA
<b>TAK1</b>	<i>Transforming growth factor beta-activated kinase 1</i>
<b>TAM</b>	Tumor assoziierte Makrophagen
<b>TBS</b>	<i>Tris-buffered saline</i>
<b>TBS-T</b>	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor beta</i>

<b>TICAM-2</b>	<i>TIR domain-containing adapter molecule 2</i>
<b>TIR</b>	<i>Toll/IL-1 receptor domain</i>
<b>TIRAP</b>	<i>Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math></i>
<b>TRAF4</b>	<i>TNF receptor-associated factor 4</i>
<b>TRAF6</b>	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
<b>TRAM</b>	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
<b>TRIF</b>	<i>TIR domain-containing adaptor protein-inducing IFN-<math>\beta</math></i>
<b>TTP</b>	<i>Thymidintriphosphat</i>
<b>TYK2</b>	<i>Tyrosine kinase 2</i>
<b>V</b>	<i>Volt</i>
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>wt</b>	<i>Wildtyp</i>
<b>Zym A</b>	<i>Zymosan A</i>

# 1 Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem im Menschen und im Tier hat die Aufgabe eindringende Krankheitserreger zu erkennen und zu beseitigen, um mögliche Gewebeschädigungen des Organismus zu verhindern. Man unterscheidet zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Das phylogenetisch ältere angeborene Immunsystem ermöglicht eine schnelle unspezifische Immunabwehr. Das erworbene Immunsystem hat sich sehr viel später entwickelt und zeichnet sich dadurch aus, dass für Pathogene eine hochspezifische Erkennung entwickelt wurde und diese Pathogene wiedererkannt werden können. Durch die Wiedererkennung (immunologisches Gedächtnis) werden Pathogene dann schneller beseitigt. Das Zusammenspiel beider Systeme ist erforderlich, um die hocheffiziente Immunabwehr höherer Lebewesen zu gewährleisten. In den folgenden Kapiteln werden zentrale Bestandteile und Funktionsweisen des angeborenen Immunsystems erläutert.

### 1.1.1. Aufbau und Funktionsweise des angeborenen Immunsystems

Die erste Verteidigungslinie des Organismus gegen Fremdkörper und Krankheitserreger bilden mechanische und physiologische Barrieren, die das Eindringen von Erregern verhindern oder erschweren sollen. Überwinden Erreger diese Barrieren, werden sie von Immunzellen erkannt, welche dann über Botenstoffe das angeborene Immunsystem aktivieren. Mit Hilfe von Immunzellen, hierunter vor allem dendritische Zellen, Gewebemakrophagen und Granulozyten im Zusammenspiel mit antimikrobiellen Substanzen, bekämpft der Organismus den eingedrungenen Erreger.<sup>1</sup> Wird der Erreger nicht erfolgreich beseitigt, wird das erworbene Immunsystem aktiviert. Das angeborene Immunsystem nimmt bei der Aktivierung des erworbenen Immunsystem eine Schlüsselrolle ein.<sup>2,3</sup> Dies wird über verschiedene Mechanismen reguliert. Unter anderem führt die Sekretion von Entzündungsmediatoren und die Antigenpräsentation von aufgenommenen Erregerfragmenten auf Haupthistokompatibilitäts-Komplexen („*major histocompatibility complex*“, MHC) von Antigenpräsentierenden Zellen zur Aktivierung weiterer Immunzellen. Die wichtigste Eigenschaft des angeborenen Immunsystems ist die schnelle Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (*PAMPs*,

*pathogen-associated molecular patterns*), die auf Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten zu finden sind. Die prominentesten Vertreter dieser PAMPs sind unter anderem die von bakteriellen Zellmembranen abstammenden Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane (PGN), Lipoteichonsäuren und verschiedene Nukleinsäurearten, wie zum Beispiel Doppelstrang-DNA, Einzel- und Doppelstrang-RNA oder unmethylierte CpG-Motive auf DNA-Bereichen.<sup>4</sup> Die Erkennung dieser Strukturen erfolgt über spezielle Mustererkennungsrezeptoren (*PRRs, pathogen recognition receptors*), bei denen man verschiedene Formen (I-III) unterscheidet.<sup>5</sup> I) Endozytierte Rezeptoren ermöglichen die PAMP-Erkennung durch Rezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen mit anschließender Aufnahme und Abbau der Erreger in Phagolysosomen. Die so gewonnenen Fragmente der Erreger können über MHC II auf der Zelloberfläche präsentiert werden.<sup>6</sup> II) Die sezernierten PRRs markieren Erreger auf deren Oberfläche und ermöglichen dadurch deren Erkennung.<sup>5</sup> III) Die Gruppe der signaltransferierenden Rezeptoren ist in der Lage die Information der Erregererkennung mit Hilfe von Signalübertragungskaskaden in direkt Transkriptions-vermittelte Effekte umzuwandeln, die hierbei vor allem zur Expression von Immunsystem-assoziierten Genen beitragen. Zu den bedeutendsten Vertreter dieser Rezeptorklasse zählen die Toll-like Rezeptoren (*TLRs, Toll-like receptors*).<sup>7</sup> Das folgende Kapitel erläutert die besondere Stellung der TLRs in der Immunantwort und beschreibt die molekulare Wirkungsweise dieser Rezeptoren.

### **1.1.2. Toll-like Rezeptoren**

Toll-like Rezeptoren (im Folgenden TLRs abgekürzt) sind Membranproteine, die eine Schlüsselfunktion im angeborenen Immunsystems einnehmen, indem sie maßgeblich an der Erkennung von PAMPs und bestimmten DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*) beteiligt sind.<sup>8</sup> Als einer der ersten wurde der Toll-like Rezeptor 4 identifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die TLR4-Aktivierung zur NF- $\kappa$ B-abhängigen Genexpression führt und somit erstmalig die Bedeutung der TLRs für die Immunantwort dargestellt werden.<sup>8</sup> Bis heute wurden insgesamt dreizehn verschiedene TLRs im Menschen identifiziert. Diese TLRs werden, abhängig vom Aktivierungsstatus, unterschiedlich stark auf Immunzellen exprimiert. Für jeden dieser TLRs existieren spezifische Liganden, die zur Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege führen.

Beispielhaft ist hier die Funktion des TLR4. Dieser Rezeptor erkennt Lipopolysaccharide (LPS) und führt durch nachgeschaltete Signalwege zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Weitere TLR-spezifische Liganden sind in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1:** Toll-*like* Rezeptoren und ihre Liganden. Modifiziert nach Akira und Takeda.<sup>9</sup>

Rezeptor	Ligand	Herkunft des Liganden
TLR1	Triacyllipopeptide lösliche Faktoren	Bakterien/Mykobakterien <sup>10</sup> <i>Neisseria meningitidis</i> <sup>11</sup>
TLR2	Lipoproteine/peptide Peptidoglykan Lipoteichonsäuren Glykolipide Zymosan	verschiedene Pathogene <sup>12</sup> grampositive Bakterien <sup>15, 16</sup> grampositive akterien <sup>13</sup> <i>Treponema Maltophilum</i> <sup>14</sup> Pilze <sup>15</sup>
TLR3	Doppelstrang-RNA	Viren <sup>16</sup>
TLR4	Lipopolysaccharide Taxol	gramnegative Bakterien <sup>17</sup> Pflanzen <sup>18</sup>
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Diacyllipopeptide Lipoteichonsäuren Zymosan	Mycoplasmen <sup>19</sup> grampositive Bakterien <sup>13</sup> Pilze <sup>15</sup>
TLR7	Einzelstrang-RNA	Viren <sup>20, 21</sup>
TLR8	Einzelstrang-RNA	Viren <sup>20</sup>
TLR9	CpG-DNA Motive	Bakterien und Viren <sup>22</sup>
TLR10	n.b.	n.b.
TLR11	n.b.	Uropathogene Bakterien <sup>23</sup>
TLR12	Profilin	<i>Toxoplasma gondii</i> <sup>24</sup>
TLR13	ribosomale-RNA	Bakterien <sup>25</sup>

TLR, Toll-*like* Rezeptor; n.b. nicht bekannt

### 1.1.3. Signalwege im angeborenen Immunsystem

Toll-*like* Rezeptoren sind die zentralen Komponenten der Pathogenerkennung der angeborenen Immunantwort. Die Signalvermittlung durch TLRs erfolgt über mindestens zwei verschiedene Wege: einen MyD88 (*Myeloid differentiation primary response*

gene 88) -abhängigen Weg, der zur Expression von Immunsystem-assoziierten Genen das Adaptorprotein MyD88 benötigt, und einen MyD88-unabhängigen Weg.<sup>9</sup> Der MyD88-abhängige Weg ist, mit der Ausnahme des TLR-3-Signalwegs, allen TLRs gemeinsam.<sup>26</sup> Nach Bindung ihrer Liganden führen die dadurch induzierten Signalkaskaden letztendlich zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B, wodurch unter anderem die Expression von proinflammatorischen Substanzen wie beispielsweise TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  ausgelöst wird (zusammengefasst in Akira und Takeda<sup>9</sup>). Ein weiterer Oberflächenrezeptor, der an der Pathogenerkennung beteiligt ist und nicht zur TLR-Familie gehört, ist Dectin-1. Dectin-1 gehört zur Familie der Lektin-Rezeptoren und ist entscheidend an der Erkennung und Abwehr von Pilzinfektionen beteiligt.<sup>27</sup> Die Bindung spezifischer Liganden führt zur Internalisierung von Dectin-1 mit anschließender Aktivierung des nachgeschalteten Dectin-1-Signalwegs.<sup>28,29</sup> Letztlich führt die Aktivierung dieses Signalwegs ebenfalls zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und der damit einhergehenden Expression proinflammatorischer Substanzen. Neben der direkten Aktivierung von NF- $\kappa$ B wird ebenfalls ein Zusammenspiel von TLRs und Dectin-1 bei der Erkennung spezieller Pathogene diskutiert.<sup>30</sup>

## 1.2. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B

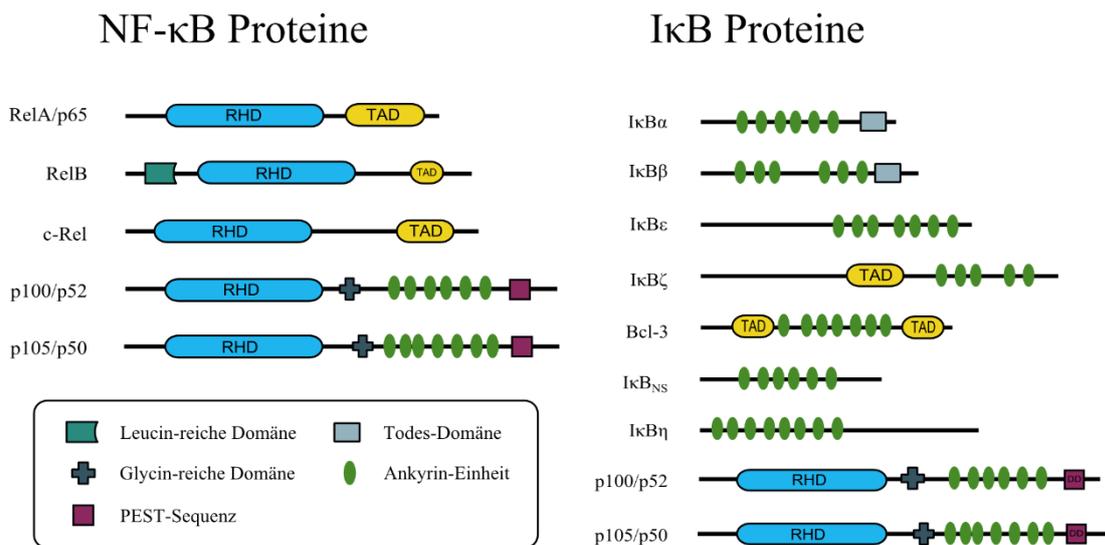
Im Jahr 1986 wurde NF- $\kappa$ B (*nuclear factor of kappa light chain enhancer of activated B-cells*) erstmals im Kern von reifen B-Lymphozyten gefunden, wo es an DNA-Motive im Promotor des Gens für die  $\kappa$ -Leichtkette der Immunglobuline bindet.<sup>31</sup> Seit dieser Entdeckung haben intensive Forschungen zahlreiche molekulare und physiologische Funktionen von NF- $\kappa$ B aufzeigen können.

NF- $\kappa$ B wird aber nicht nur in reifen B-Lymphozyten, sondern in nahezu allen Zelltypen des Immunsystems exprimiert und ist damit essentiell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des gesamten Immunsystems.<sup>32</sup> Damit ist es auch für die Aktivierung, den Erhalt und die Proliferation von fast allen Zellen des angeborenen Immunsystems unerlässlich.<sup>33</sup> Eine Fehlregulation des NF- $\kappa$ B Signalweges ist mit der Entstehung und dem Fortschreiten zahlreicher Pathologien im Menschen und im Tier assoziiert.

Besonders für (Auto-)Immunkrankheiten und Entzündungsreaktionen konnte eine Beteiligung von NF- $\kappa$ B hinreichend belegt werden.<sup>34-37</sup> Für NF- $\kappa$ B wurde in den letzten Jahren zusätzlich eine wichtige Rolle bei der malignen Transformation von verschiedenen Zelltypen und deren Progression gezeigt.<sup>35, 38</sup> In den vergangenen Jahrzehnten wurden daher zahlreiche Anstrengungen unternommen, um spezifische Inhibitoren für den NF- $\kappa$ B Signalweg zu identifizieren.<sup>39</sup>

### 1.2.1.1. Die NF- $\kappa$ B Proteinfamilie

Die Bezeichnung NF- $\kappa$ B steht stellvertretend für eine Proteinfamilie, die von fünf Mitgliedern gebildet wird: p50, p52, RelA/p65, RelB und c-Rel. Diese Proteine besitzen eine Rel-homologe Domäne (RHD), die eine Homo- oder Heterodimerisierung dieser Proteine ermöglicht. Zusätzlich erlaubt sie auch eine direkte Interaktion mit sogenannten  $\kappa$ B-Bindestellen in der DNA.



**Abbildung 1: Mitglieder der NF- $\kappa$ B und I $\kappa$ B Proteinfamilie**

Zu den NF- $\kappa$ B Proteinen zählen die Transkriptionsfaktoren p50, p52, p65/RelA, RelB und c-Rel, die durch eine Rel-homologe Domäne (RHD) charakterisiert sind. I $\kappa$ B Proteine sind gekennzeichnet durch Ankyrin-Wiederholungseinheiten und umfassen bisher neun Mitglieder. Darunter sind I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\zeta$ , BCL-3, I $\kappa$ B<sub>NS</sub> und I $\kappa$ B $\eta$ . Die Vorläuferproteine von p50 und p52, nämlich p105 und p100, besitzen aufgrund ihrer Ankyrin-Wiederholungseinheiten ebenfalls NF- $\kappa$ B-inhibitorische Aktivität. Modifiziert nach Hayden und Ghosh.<sup>40</sup>

Diese  $\kappa$ B-Bindestellen bestehen aus einem zehn Basen langen Abschnitt mit der Sequenz: 5'-GGGRNWYYCC-3' (G = Guanin, R = beliebiges Purin, N = Purin oder Pyrimidin, W = Adenin oder Thymin, Y = beliebiges Pyrimidin, C = Cytosin<sup>40</sup>). RelA, RelB und c-Rel tragen neben der RHD eine transaktivierende Domäne (TAD), die die direkte Aktivierung der Transkription der Zielgene von NF- $\kappa$ B ermöglicht. NF- $\kappa$ B Dimere, die eine TAD enthalten, können somit die Transkription aktivieren. Die Unterheiten p50 oder p52 besitzen keine TAD und sind daher nicht direkt an der Transkriptionsaktivierung beteiligt. Sie können allerdings auf die Transkriptionsaktivität der anderen Mitglieder der NF- $\kappa$ B Familie Einfluss nehmen, indem sie mit diesen um  $\kappa$ B-Bindestellen konkurrieren. Dadurch können sie indirekt die Transkription hemmen.<sup>33, 40</sup> NF- $\kappa$ B Proteine befinden sich im Zytosol, da ihre Kernlokalisationssequenz durch die Bindung von ‚Inhibitoren von  $\kappa$ B‘ (I $\kappa$ B) Proteine maskiert wird. Die Familie der I $\kappa$ B Proteine zählt mindestens neun Mitglieder, die jeweils durch das Vorhandensein von Ankyrin-Wiederholungseinheiten (*ankyrin repeat domain*, ARD) charakterisiert sind. Ankyrin-Wiederholungseinheiten sind Proteinstrukturmotive, die Protein-Protein Interaktionen vermitteln und im Falle der I $\kappa$ B Proteine Interaktionen untereinander als auch mit NF- $\kappa$ B Proteinen ermöglichen. Man unterscheidet zwei Gruppen von I $\kappa$ B Proteinen. Die klassischen I $\kappa$ B Proteine, zu denen I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  und I $\kappa$ B $\epsilon$  zählen, werden konstitutiv im Zytosol exprimiert und verhindern durch Bindung an NF- $\kappa$ B Dimere deren Translokation in den Zellkern. Im Gegensatz dazu werden die atypischen I $\kappa$ B Proteine erst nach NF- $\kappa$ B Aktivierung exprimiert und sind stets im Zellkern lokalisiert, wo sie zu NF- $\kappa$ B Dimeren rekrutiert werden und als Modulatoren der Transkription wirken. Zu dieser Gruppe gehören die Proteine Bcl-3, I $\kappa$ B $\zeta$ , I $\kappa$ B<sub>NS</sub> und das erst kürzlich entdeckte I $\kappa$ B $\eta$ .<sup>34, 40-42</sup>

### 1.2.1.2. Aktivierung und Regulation von NF- $\kappa$ B

Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalwegs erfolgt durch eine Vielzahl an löslichen Faktoren und spezifischen Liganden von Oberflächenrezeptoren. Wichtige Vertreter sind die bereits erwähnten TLRs sowie Mitglieder der TNF- und IL-1 Rezeptor-Familien. Neben diesen externen Aktivierungssignalen können zusätzlich auch intrazelluläre Ereignisse zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen. Diese Signalwege werden beispielsweise durch die Erkennung intrazellulärer Pathogene, DNA-Schäden oder reaktiver Sauerstoff-

Metabolite mittels der NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) und RIG-I-like (*retinoic acid-inducible gene 1*) Rezeptorfamilien (NLR und RLR) aktiviert. Für die ‚exogene‘ Aktivierung von NF- $\kappa$ B sind zwei alternative Aktivierungswege beschrieben: I) der kanonische und der II) nicht-kanonische Weg. I) Der kanonische oder klassische Signalweg führt zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B über Rezeptoren (zum Beispiel Mustererkennungs- oder Zytokinrezeptoren), die nach Bindung ihrer Liganden Signalkaskaden steuern, welche letztendlich die I $\kappa$ B-Kinase IKK $\beta$  aktivieren. Die aktive IKK $\beta$  phosphoryliert I $\kappa$ B Proteine, worunter der wichtigste Vertreter das I $\kappa$ B $\alpha$  ist. Der durch die Phosphorylierung induzierte proteasomale Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  führt zur Freilegung der Kernlokalisationssequenz von NF- $\kappa$ B. Dadurch wird die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern ermöglicht, was Voraussetzung für die NF- $\kappa$ B-vermittelten Effekte ist (zusammengefasst in Gilmore<sup>43</sup>). II) Der nicht-kanonische/alternative NF- $\kappa$ B Signalweg wird durch Mitglieder der TNF-Zytokin-Familie induziert und führt ebenfalls zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B.<sup>44</sup> Zusätzlich können die beteiligten Enzyme auch mit anderen Signalwegen interferieren, wie zum Beispiel mit den p53-, PI(3)K-Akt- und IRF-Signalwegen, wodurch diese Signalwege wiederum Einfluss auf die NF- $\kappa$ B-vermittelte Transkription nehmen können.<sup>45</sup>

### 1.2.1.3. Hierarchie der NF- $\kappa$ B-Zielgene

Immunzellen sind permanent wechselnden Reizen und unterschiedlichen Umgebungsbedingungen ausgesetzt. Deswegen benötigen Immunzellen Mechanismen mit denen sie auf diese Veränderungen reagieren können. Die NF- $\kappa$ B-vermittelte Genexpression ermöglicht die selektive Expression seiner Zielgene abhängig von Umwelteinflüssen und sich ändernden Reizen. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B nutzt dazu verschiedene Ebenen der Regulation.<sup>46</sup> Betrachtet man die Zielgene von NF- $\kappa$ B, unterscheidet man zwischen primären und sekundären NF- $\kappa$ B-abhängigen Zielgenen. Erstere werden nach Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B Signalwegs rasch exprimiert und sind alleine vom Vorhandensein von NF- $\kappa$ B Dimeren abhängig. Sekundäre Zielgene hingegen benötigen zusätzliche Signale.<sup>47</sup> Dazu gehören zum Beispiel transkriptionelle Co-Aktivatoren wie die atypischen „Inhibitor von  $\kappa$ B“ (I $\kappa$ B) Proteine. Diese atypischen I $\kappa$ B Proteine sind an der Regulation der NF- $\kappa$ B vermittelten Genexpression beteiligt.<sup>48</sup> Das in dieser Arbeit untersuchte Protein I $\kappa$ B $\zeta$  gehört zu diesen atypischen I $\kappa$ B Proteinen.

Sie werden in Makrophagen nach Antigenkontakt rasch exprimiert und modulieren die Transkription sekundärer Zielgene von NF- $\kappa$ B. Weitere atypische I $\kappa$ B Proteine sind Bcl-3, I $\kappa$ B<sub>NS</sub> und I $\kappa$ B $\eta$ .<sup>49</sup> Zusätzlich zu den NF- $\kappa$ B Proteinen und den modulatorisch wirkenden I $\kappa$ B Proteinen, kommt der Regulation der Genexpression durch die Chromatin-Struktur für die selektive Expression von NF- $\kappa$ B Zielgenen eine wichtige Rolle zu. Chromatin besteht aus DNA-Protein Komplexen, wobei das Nukleosom die Grundeinheit bildet. Es konnte gezeigt werden, dass NF- $\kappa$ B zeitlich verzögert an sekundäre Zielgene bindet. Im Gegensatz dazu wird die Expression von primären Zielgenen ohne zeitliche Verzögerung aktiviert.<sup>50</sup> Es bedarf daher eines Mechanismus, der die Zugänglichkeit an entsprechenden Zielgenen regulieren kann. Vor über zwanzig Jahren konnten Experimente zeigen, dass der SWI/SNF-Komplex Veränderungen an der Chromatin-Struktur katalysieren kann.<sup>51</sup> Diese Änderungen der Chromatin-Struktur, die durch den SWI/SNF Komplex katalysiert und als *Chromatin-Remodeling* bezeichnet werden, machen die genomische DNA besser zugänglich.<sup>52</sup> So konnte gezeigt werden, dass es für die Expression von sekundären NF- $\kappa$ B Zielgenen erst der Rekrutierung des SWI/SNF-Komplexes bedarf.<sup>53</sup> Dieser Mechanismus stellt somit eine weitere Regulationsebene für die selektive Transkription von NF- $\kappa$ B Zielgenen dar.<sup>53</sup> Eine weitere Möglichkeit um Einfluss auf das *Chromatin-Remodeling* und damit auf die Genexpression zu nehmen, stellen sogenannte Histonmodifikationen dar. Für NF- $\kappa$ B konnte gezeigt werden, dass die Promotorbereiche der primären Zielgene verstärkt Histon-Acetylierungen und H3K4-Trimethylierungen aufweisen, was denjenigen Genbereichen entspricht, die mit transkriptionsaktiven Genen assoziiert sind.<sup>53, 54</sup> Zusätzlich zu den genannten Mechanismen kann auch durch den Gehalt an CpG-Inseln im Promotorbereich darauf geschlossen werden, ob es sich um primäre oder sekundäre Zielgene handelt.<sup>55</sup> So ist ein hoher CpG-Gehalt mit einer geringeren Stabilität der Nukleosomeneinheit assoziiert und dadurch leichter für Transkriptionsfaktoren zugänglich.<sup>56</sup> Übereinstimmend damit konnte für Genbereiche mit geringem CpG-Gehalt die Abhängigkeit vom SWI/SNF-Komplex für die Transkriptionsinitiation gezeigt werden.<sup>54</sup> Folglich handelt es sich bei diesen Genen um sekundäre Zielgene von NF- $\kappa$ B.

Zusammenfassend ist NF- $\kappa$ B in der Lage die selektive Transkription seiner Zielgene durch die zuvor genannten Mechanismen zu steuern und damit Kontext-abhängig auf

verschiedenste Umwelteinflüsse und sich änderende äußere Reize Zelltyp- als auch Stimulus-abhängig reagieren zu können.

### 1.3. Das atypische IκB Protein ‘Inhibitor of kappa B ζ’

Der Inhibitor von NF-κB ζ (IκBζ) wurde erstmalig im Rahmen von mRNA-Analysen in verschiedenen Geweben der Maus gefunden.<sup>57</sup> Aufgrund seiner strukturellen Auffälligkeiten und der LPS-abhängigen Expression, wurde das Protein „*molecule possessing ankyrin repeats induced by LPS*“ (MAIL) genannt.<sup>57</sup> In einer unabhängigen Studie identifizierten Haruta *et al.* IκBζ in OP9 Stromazellen und nannten es aufgrund der IL-1β-abhängigen Expression „*interleukin-1 inducible nuclear ankyrin-repeat protein*“ (INAP).<sup>58</sup> Aktuell ist die Bezeichnung IκBζ üblich.<sup>59</sup>

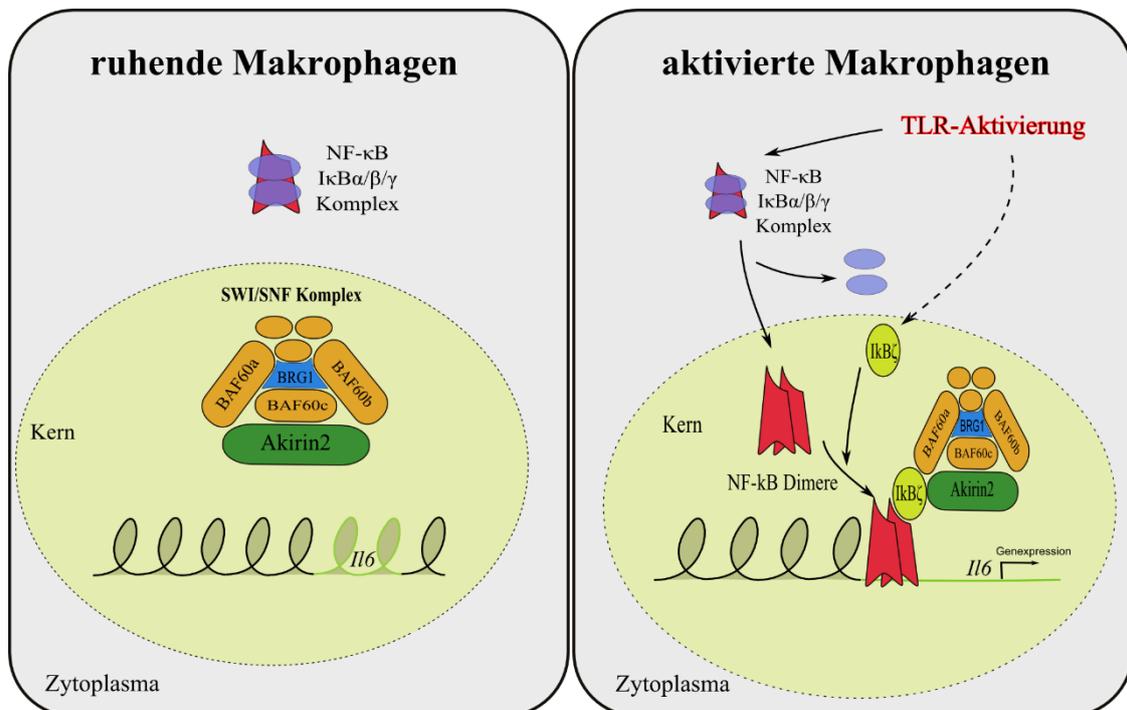
#### 1.3.1. Struktur und Funktion von IκBζ

IκBζ wird zu den IκB Proteinen gezählt, da es Sequenzhomologien mit anderen Mitgliedern der IκB Proteinfamilie aufweist.<sup>57, 58, 60</sup> Es besitzt an seinem C-terminalen Bereich sieben Ankyrin-Wiederholungseinheiten, die zu großen Teilen homolog zu denen von BCL-3 sind und Interaktionen mit p50:p50 Homodimeren ermöglichen.<sup>61, 62</sup> IκBζ besitzt außerdem eine Kernlokalisierungssequenz (NLS, *nuclear localisation sequence*; Aminosäuren 163-178) und eine Transaktivierungsdomäne (TAD; Aminosäuren 329-429).<sup>57, 58</sup> Als relevante murine Isoformen wurden folgende Proteine identifiziert: Zuerst wurde die IκBζ-L Isoform (728 Aminosäuren) identifiziert und anschließend die N-terminale verkürzte Isoform IκBζ-S (629 Aminosäuren) beschrieben.<sup>57</sup> Man geht davon aus, dass es sich bei der IκBζ-L Isoform um die dominante Form handelt.<sup>63</sup>

#### 1.3.2. Expression und molekulare Funktionsweise von IκBζ

In ruhenden nicht stimulierten Zellen wird IκBζ kaum exprimiert. Jedoch werden nach Kontakt mit pro-inflammatorischen Stimuli, die zur Aktivierung von NF-κB führen, in einer Vielzahl von Zelltypen erhöhte IκBζ Genexpressionslevel gemessen. Zu diesen Substanzen gehören IL-1β, LPS, PGN, Zymosan, unmethylierte CpG DNA-Motive und

einige weitere Substanzen.<sup>57, 58, 60, 61, 63-69</sup> Für die Expression von IL-6 konnte gezeigt werden, dass ein Komplex aus I $\kappa$ B $\zeta$ :p50:p50 an den *Il6* Promotor rekrutiert wird und die Transkription aktiviert.<sup>61, 68</sup> I $\kappa$ B $\zeta$ -Defizienz führte zu einer Reduktion der Expression von IL-6.<sup>61</sup> Weitere Gene, deren Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  aktiviert werden, sind unter anderem *Lcn2* (Lipocalin 2), *Csf2* (GM-CSF), *Csf3* (G-CSF), *Cebpd* (C/EBP $\delta$ ), und *Ccl2* (MCP-1).<sup>57, 61, 70-77</sup> I $\kappa$ B $\zeta$  hat auch inhibitorische Funktionen. So zum Beispiel hemmt es die Expression von *Tnfa* (kodiert für TNF- $\alpha$ ).<sup>62</sup> Um die Proteinexpression von I $\kappa$ B $\zeta$  zu induzieren, bedarf es weiterer Stimuli, da die *Nfkbiz* mRNA an ihrem 3'-untranslatierten Bereich instabile Elemente enthält und sie folglich ohne zusätzliche Faktoren rasch abgebaut wird.<sup>78</sup> Die posttranskriptionelle Stabilisierung der *Nfkbiz* mRNA ist daher notwendig, um die I $\kappa$ B $\zeta$  Proteinsynthese zu initiieren.<sup>79</sup>



**Abbildung 2: Chromatin-Remodeling durch I $\kappa$ B $\zeta$**

Die Induktion der Genexpression von NF- $\kappa$ B Zielgenen benötigt die Rekrutierung des SWI/SNF-Komplexes durch I $\kappa$ B $\zeta$ . Die Abbildung zeigt ein vereinfachtes Schema der Aktivierung des TLR-Signalweges, bei dem es einerseits zur Translokation von NF- $\kappa$ B Dimeren in den Zellkern kommt, andererseits zur Induktion der Expression von I $\kappa$ B $\zeta$ . Zusätzlich werden noch weitere Faktoren, wie Akirin2 und die am SWI/SNF Komplex beteiligten BAF60 Proteine, benötigt. Modifiziert nach Tartey *et al.*<sup>80</sup>

Für die Ausübung der Funktion von I $\kappa$ B $\zeta$  ist das Zusammenspiel mit NF- $\kappa$ B wichtig. Nach Antigenkontakt erfolgt in Immunzellen die schnelle NF- $\kappa$ B-abhängige Expression von I $\kappa$ B $\zeta$ . I $\kappa$ B $\zeta$  wird folglich den primären Zielgenen von NF- $\kappa$ B zugerechnet. Im nächsten Schritt wird I $\kappa$ B $\zeta$  über vorhandene Faktoren an die entsprechenden Bereiche seiner Zielgene rekrutiert und moduliert dort zusammen mit p50:p50 Dimeren deren Transkription. Die genauen Mechanismen der Transkriptionsaktivierung durch I $\kappa$ B $\zeta$  sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Weitere mechanistische Einflüsse von I $\kappa$ B $\zeta$  auf die Transkription zeigen allerdings, dass eine entscheidende Rolle der Chromatin-Zugänglichkeit der ausgewählten Zielgene von I $\kappa$ B $\zeta$  zukommt. Dazu wurden erste Studien über das Chromatin- und Nukleosom-*Remodeling* an bekannten I $\kappa$ B $\zeta$  Zielgenen durchgeführt. Es konnte darin gezeigt werden, dass I $\kappa$ B $\zeta$  die Tri-Methylierung des Histons 3 an Lysin 4 (H3K4) verstärkt und damit die Bildung von sogenannten Präinitiationskomplexen fördert.<sup>46, 81</sup> In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung konnte erstmals der genaue Mechanismus für dieses Chromatin-*Remodeling* beschrieben werden. So konnte gezeigt werden, dass I $\kappa$ B $\zeta$  entscheidend an der Rekrutierung des SWI/SNF-Komplexes an den p50:p50 Komplex beteiligt ist und somit das Chromatin-*Remodeling* initiiert (siehe Abbildung 2).<sup>80</sup> Im konkreten Fall konnte diese Interaktion für die TLR-, RIG-1- und *Listeria*-vermittelte Induktion entzündungsfördernder Gene gezeigt werden.<sup>80</sup>

### 1.3.3. Physiologische Relevanz von I $\kappa$ B $\zeta$

I $\kappa$ B $\zeta$ -defiziente Mäuse zeigen einen pro-inflammatorischen Phänotyp, wie er auch bei Autoimmunerkrankungen beobachtet werden kann. Periokulär entstehen in einem Zeitraum von wenigen Wochen nach der Geburt entzündliche Läsionen.<sup>82</sup> Der Verlust von I $\kappa$ B $\zeta$  führt hier zu einer starken chronischen Entzündung, die mit einer Infiltration von Immunzellen einhergeht.<sup>83</sup> Dermatitis-ähnliche Läsionen entwickeln sich zusätzlich im Verlauf im Gesicht und am Nacken.<sup>82</sup> I $\kappa$ B $\zeta$  spielt eine wichtige Rolle in Kerationzyten<sup>84</sup> und wird in einigen Schleimhautgeweben wie beispielsweise im Oberflächenepithel des Auges konstitutiv exprimiert.<sup>83</sup> Eine neuere Studie konnte zeigen, dass die periokulären Läsionen I $\kappa$ B $\zeta$ -defizienter Mäuse einer Sjögren-Syndrom ähnlichen Erkrankung entsprechen, die mit pathognomonischer Antikörper-Bildung einhergehen.<sup>85</sup> Zusätzlich besitzt I $\kappa$ B $\zeta$  auch in TH-17 Zellen eine Relevanz. Diese Zellen spielen eine

entscheidende Rolle für das erworbene Immunsystem. I $\kappa$ B $\zeta$ -Defizienz führt zu einer verminderten Entwicklung von TH-17 Zellen.<sup>86</sup> Ebenso konnte für NK-Zellen eine Abhängigkeit von I $\kappa$ B $\zeta$  gezeigt werden. Nach Kultivierung mit IL-12 oder IL-18 wird I $\kappa$ B $\zeta$  an den IFN $\gamma$ -kodierenden Genlocus in NK-Zellen rekrutiert.<sup>87</sup> Eine I $\kappa$ B $\zeta$ -Defizienz führt zu einer verminderten IFN- $\gamma$ -Sekretion von NK-Zellen.<sup>87</sup>

Die Rolle von I $\kappa$ B $\zeta$  bei der Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen konnte bisher nur für einzelne Tumorentitäten aufgeklärt werden. Eine Studie zeigte unter anderem, dass I $\kappa$ B $\zeta$  mit dem Kernfusions-Onkoprotein FUS-DDIT3 interagieren kann und dadurch die Entstehung von myxoiden Liposarkomen fördert.<sup>88</sup> Eine weitere Studie konnte aufzeigen, dass I $\kappa$ B $\zeta$  essentiell für das Zellüberleben eines aktivierten B-Zell-ähnlichen (ABC) Subtyps des diffus-großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) ist.<sup>89</sup> Diese Lymphomzellen zeigen eine konstitutive Aktivierung von NF- $\kappa$ B, die essentiell für das Überleben dieser Zellen ist. Ein *Knockdown* von I $\kappa$ B $\zeta$  *in vitro* wirkte sich toxisch auf diese Zellen aus.<sup>89</sup> Somit könnte I $\kappa$ B $\zeta$  ein mögliches Ziel einer pharmakologischen Behandlung dieser Tumorerkrankungen darstellen.

#### **1.4. Makrophagen: Herkunft und Funktionen**

Makrophagen sind eine heterogene Gruppe phagozytierender antigenpräsentierender Zellen, die in allen Organen und Geweben im Menschen und in Tieren vorkommen. Dabei handelt es sich um „Fremdkörper-aufnehmende“ Zellen, sogenannte Phagozyten, die in ihrer Funktion als Wächterzellen den Organismus vor eindringenden Krankheitserregern schützen und die Gewebemöostase aufrechterhalten.<sup>90</sup> Makrophagen nehmen eine Schlüsselrolle im angeborenen Immunsystem ein, indem sie pathogenassoziierte Strukturen erkennen und daraufhin mit einer gezielten Ausschüttung von Signalmolekülen reagieren. Dadurch sind sie sowohl an Entzündungsreaktionen im Rahmen der angeborenen Immunantwort, an der Aktivierung der erworbenen Immunantwort als auch an Wundheilungsprozessen beteiligt.<sup>91-95</sup>

Neben der Ausschüttung von Signalmolekülen sind Makrophagen auch direkt an der Beseitigung von Pathogenen beteiligt. Makrophagen sezernieren antimikrobielle Peptide, Proteaseinhibitoren, extrazelluläre Matrix-Proteasen, reaktive Sauerstoffmetabolite und

andere immunmodulatorische Stimuli.<sup>96</sup> Durch die Erkennung von PAMPs und DAMPs tragen Makrophagen dadurch maßgeblich zur Entfernung von eingewanderten Erregern bei. Des Weiteren haben Makrophagen die Eigenschaft, Fremdstoffe durch Phagozytose aufzunehmen und diese in spezialisierten Zellorganellen („Phagolysosomen“) abzubauen. Der Abbau aufgenommener Fremdkörper führt zu Protein-Fragmenten (Peptide), die an die MHC II-Komplexe gebunden werden und damit anderen Zellen präsentiert werden. Diese MHC II-Peptid-Komplexe führen nach Bindung von T-Zellen zu deren Aktivierung. Dadurch ist eine direkte Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunantwort ermöglicht.<sup>91, 97</sup>

Über die Herkunft von Makrophagen wurde lange Zeit diskutiert. Das erste Konzept eines sogenannten Retikuloendothelialen Systems (RES) wurde von Ludwig Aschoff vorgeschlagen.<sup>98</sup> Diesem System sind hauptsächlich phagozytierende Zellen zugeordnet, die in retikulärem Bindegewebe enthalten sind. Bei diesen Zellen handelt es sich um Monozyten und Makrophagen, die zu entzündetem Gewebe rekrutiert werden. In einem anderen, neueren Modell, dem sogenannten mononukleären Phagozyten System (MPS), wird davon ausgegangen, dass nicht nur entzündungsaktivierte Makrophagen von Monozyten abstammen, sondern auch jene Makrophagen, die unter normalen Bedingungen im Gewebe angesiedelt sind, sogenannte Gewebemakrophagen.<sup>99</sup> Es konnte gezeigt werden, dass beide Makrophagen-Arten von Knochenmarksmonozyten abstammen und sich aus Monoblasten via Promonozyten bilden.<sup>99</sup> Die neu entstandenen Monozyten können dann ins Blut übertreten und in Gewebe einwandern, wo sie sich zu verschiedenen Makrophagen-Subtypen weiterentwickeln. Man unterscheidet hauptsächlich zwischen nicht aktivierten Gewebemakrophagen und durch Entzündungsvorgänge aktivierte Makrophagen.<sup>94</sup> Gewebemakrophagen werden in allen Organen gefunden und sind maßgeblich an der Gewebemöostase beteiligt.

**Tabelle 2:** Unterschiedliches Vorkommen und spezielle Funktionen von Gewebemakrophagen. Modifiziert nach Davies *et al.*<sup>100</sup>

Gewebe	Zelltyp	Funktionen
Fettgewebe	Fettgewebemakrophagen	Kontrolle der Insulinsensitivität <sup>101</sup> und adaptiven Thermoregulation <sup>102</sup>
Blut	Monozyten	„Intravaskuläre Wächter“, Beseitigung von endothelialen Zellfragmenten <sup>103</sup>
Knochen	Osteoklasten	Mehrkernige Riesenzellen, resorbieren Knochensubstanz <sup>104</sup>
	Knochenmarksmakrophagen	Unterstützen die Erythropoese <sup>105, 106</sup> , halten hämatopoetische Stammzellen in ihren Stammzellnischen <sup>107</sup>
Zentralnervensystem	Mikroglia	Fördern das Überleben von Neuronen; erste Linie der Immunüberwachung im Gehirn; Entfernung von toten Neuronen; beteiligt am <i>Remodeling</i> von Synapsen <sup>108, 109</sup> ; entstehen aus Dottersackgewebe und werden unabhängig vom Knochenmark bei Entzündungen rekrutiert <sup>110-112</sup>
	Perivaskuläre/Meningeale Makrophagen	Immunüberwachung <sup>113</sup>
Gastrointestinaltrakt	Intestinale Makrophagen	Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase und Regulation der Immunantwort auf Kommensale <sup>114, 115</sup> ; von Monozyten abgeleitet <sup>114</sup>
Leber	Kupffer Zellen	Beseitigung von Mikroorganismen, gealterten Erythrozyten und Zellfragmenten aus dem Blut <sup>116, 117</sup> , pränataler Ursprung <sup>118</sup> , Erhaltung der Population unabhängig vom Knochenmark <sup>119</sup>
Lunge	Alveolarmakrophagen	Immunüberwachung der Lunge für inhalierte Pathogene <sup>120</sup> , homöostatische Regulation der Gewebefunktion <sup>121, 122</sup> , Beseitigung von Surfactant, pränataler Ursprung <sup>118</sup> , Erhaltung der Population bei Entzündung unabhängig vom Knochenmark <sup>123, 124</sup>
	Interstitielle Makrophagen	Regulieren die Reifung und/oder die Aktivierung von dendritischen Zellen <sup>125</sup>
Seröses Gewebe	Peritonealmakrophagen	Immunüberwachung und Regulierung der homöostatischen Umgebung <sup>126, 127</sup> , Entfernung von apoptotischen Zellen <sup>128</sup> , pränataler Ursprung <sup>118</sup> , Erhaltung der Population bei Entzündung unabhängig vom Knochenmark <sup>118, 129</sup>
Haut	Dermale Makrophagen	Immunüberwachung <sup>130</sup>
	Langerhans Zellen	Interaktion mit T-Lymphozyten <sup>131</sup> , Population entstammt dem Dottersackgewebe und/oder der fetalen Leber, erhält sich unabhängig vom Knochenmark <sup>132, 133</sup>
Milz	Marginalzonenmakrophagen	Immunüberwachung des Kreislaufs <sup>134</sup>
	Makrophagen der roten Pulpa	Beseitigung von Erythrozyten, Beteiligung am Eisenmetabolismus <sup>135</sup> , pränataler Ursprung <sup>118, 119</sup> , Erhaltung der Population bei Entzündung unabhängig vom Knochenmark <sup>123</sup>
	Makrophagen der weißen Pulpa	Beseitigung von apoptotischen Zellen in den Keimzentren der Milz <sup>136</sup>

In unterschiedlichen Geweben erfüllen die Makrophagen jeweils spezifische Funktionen (zusammengefasst in Davies *et al.*<sup>100</sup>, siehe Tabelle 2). In den letzten Jahren konnte allerdings in einigen Studien gezeigt werden, dass die Mehrheit der Gewebemakrophagen nicht von Monozyten im Blut entstammen, sondern sich bereits in der frühembryonalen Periode entwickeln und bis zum Erwachsenen hin im Ruhezustand als Gewebemakrophagen verbleiben.<sup>110, 137</sup>

#### **1.4.1. Aktivierung und Polarisierung von Makrophagen**

Makrophagen sind an einer Vielzahl physiologischer Reaktionen beteiligt, die ein hohes Maß an unterschiedlichen Funktionen erfordern. Ihre Aufgaben müssen daher genau reguliert und gesteuert werden. Die Beseitigung von Fremdkörpern im Zusammenspiel mit pro-inflammatorischen Substanzen im Gegensatz zu den Anforderungen an Wundheilungsprozesse, bei denen entzündungshemmende Substanzen benötigt werden, sind Beispiele für die entgegengesetzten Ansprüche, denen Makrophagen gerecht werden müssen. Die Fähigkeit von Makrophagen in unterschiedliche Phänotypen zu differenzieren, bezeichnet man als Polarisierung. Das Besondere hierbei ist, dass die unterschiedlichen Polarisierungen reversibel sind und Makrophagen kontextabhängig reagieren können. Auf diese Weise können die Polarisierungszustände im Rahmen einer generalisierten Entzündung entsprechend wechseln.<sup>95, 138, 139</sup> Die Polarisierung von Makrophagen ist im Wesentlichen abhängig von der lokalen Gewebeumgebung<sup>140</sup> und ihre Funktionen werden sowohl durch Rezeptorinteraktionen, als auch durch lokale Zytokine und Signalstoffe beeinflusst.<sup>141</sup> Zur Differenzierung von Makrophagenpopulationen unterscheidet man einerseits Makrophagen, die aktivierend auf das Immunsystem wirken und andererseits Makrophagen, die Immunreaktionen unterdrücken können.<sup>142</sup> Dabei werden für Makrophagen ebenfalls, wie bei den T-Helferzellen, zwei Polarisierungszustände beschrieben: der klassisch aktivierte (M1) Makrophagen-Phänotyp und der alternativ aktivierte (M2) Makrophagen-Phänotyp.<sup>94, 143</sup> Klassisch aktivierte (M1) Makrophagen sind Bestandteil der Immunantwort gegen eindringende Pathogene, wohingegen alternativ aktivierte (M2) Makrophagen an der Immunsuppression, an Wundheilungsprozessen und der Geweberegeneration beteiligt sind. Lipopolysaccharide (LPS) und Interferone (vor allem IFN- $\gamma$ ) polarisieren

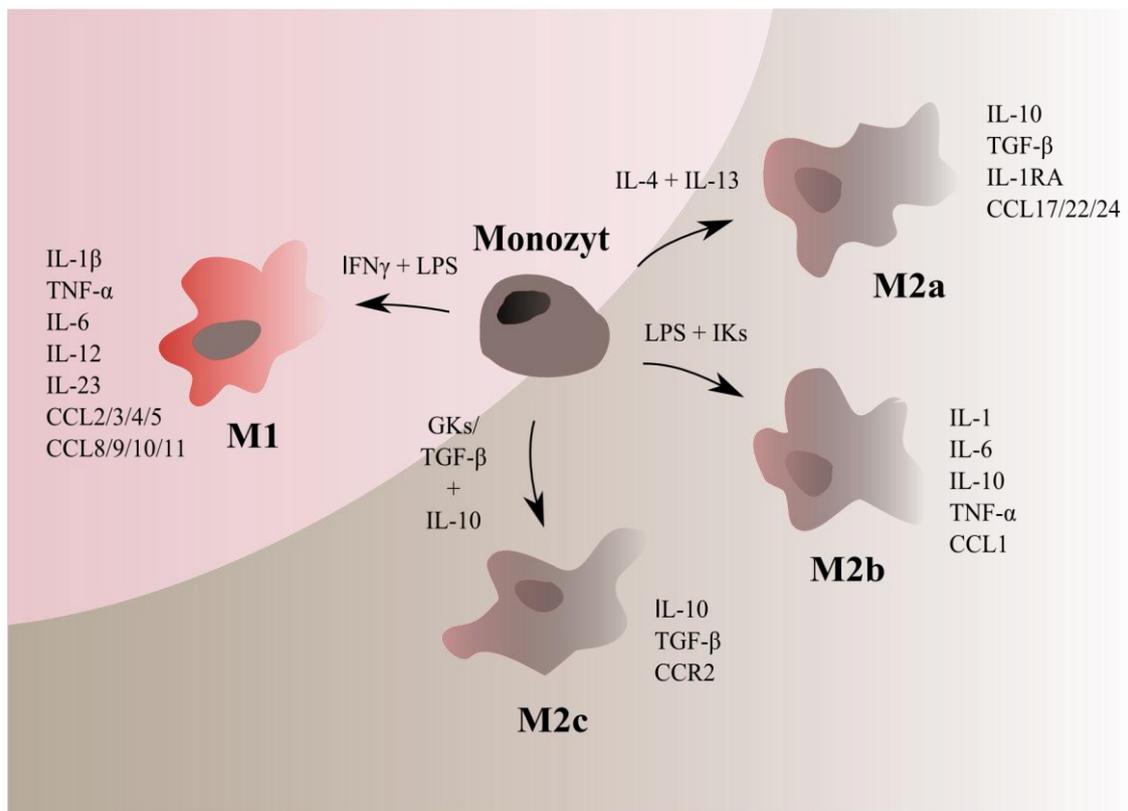
Makrophagen zum M1-Phänotyp. Dies führt dazu, dass diese Makrophagen unter anderem große Mengen an pro-inflammatorischen Substanzen freisetzen. Dazu zählen Zytokine, wie zum Beispiel IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6, Chemokine, die die Einwanderung von Monozyten und Neutrophilen steuern, Wachstumsfaktoren, und weitere Signalmoleküle, die die lokale Entzündungsreaktion verstärken und den Einstrom weiterer Entzündungszellen fördern (siehe Tabelle 3 und Abbildung 3).

**Tabelle 3:** Klassisch (M1) und alternativ (M2) aktivierte Makrophagen. Modifiziert nach Duluc *et al.*<sup>144</sup> und Hao *et al.*<sup>145</sup>

Polarisierung	M1	M2a	M2b	M2c	M2d/TAM
Aktivierung	IFN- $\gamma$ TNF- $\alpha$ LPS	IL-4 IL-13	IKs LPS LTR/IL-1R	IL-10 TGF- $\beta$ GKs	IL-6 LIF MCF
Expression	CD86 CD80 MHC II $\uparrow$ IL-1R I TLR2 TLR4 iNOS	CD163 MHC II SR CD206 $\uparrow$ (MR $\uparrow$ ) TGM2 $\uparrow$ DecoyR IL-1R II	CD86 MHC II	CD163 TLR1 TLR8	VEGF
Zytokine	TNF- $\alpha$ IL-1 $\beta$ IL-6 IL-12 IL-23	IL-10 TGF- $\beta$ IL-1RA	IL-1 IL-6 IL-10 TNF- $\alpha$	IL-10 TGF- $\beta$	IL-10 IL-12 TNF- $\alpha$ TGF- $\beta$
Chemokine	CCL4	CCL24	CCL1	CCR2	CXCL16

Abkürzungen: IKs, Immunkomplexe; GKs, Glukokortikoide; IL-1RA, IL-1 Rezeptor-Antagonist; LIF, Leukozyten-inhibierender Faktor; TGM2: Transglutaminase 2; MR (CD206), Mannose-Rezeptor; NO, Stickstoffmonoxid; iNOS, induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; SR, Scavenger Rezeptor; VEGF, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; LPS, Lipopolysaccharide, CCL, Chemokin (C-C Motiv) Ligand, TNF, Tumor-Nekrose-Faktor; CCR, Chemokin (C-C Motiv) Rezeptor; CXCL, Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand.

Allerdings kann die Beseitigung von eindringenden Pathogenen auch zu großflächigem Kollateralschaden durch die toxischen Substanzen und reaktiven Sauerstoffmetaboliten im entsprechenden Gewebe führen, sodass es zu einer unkontrollierten Immunantwort der Makrophagen kommen kann. Diese pathologisch erhöhte Immunantwort kann Auslöser zahlreicher (Auto-) Immunkrankheiten sein, wie es beispielsweise für Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis und multiple Sklerose beschrieben ist.<sup>146-148</sup>



### Abbildung 3: Makrophagen Aktivierung und Polarisierung

Makrophagen kommen in unterschiedlichen Aktivierungs- und Polarisierungszuständen vor. Klassisch aktivierte (M1) Makrophagen sezernieren zahlreiche pro-inflammatorische Substanzen, die den Zellen zur Erregerabwehr dienen und das Immunsystem aktivieren. Alternativ aktivierte (M2) Makrophagen sind an Gewebe-Umbau/Wiederherstellung und Wundheilungsprozessen beteiligt. Sie wirken unterstützend für die anti-entzündliche Antwort durch IL-10. Abhängig von der Art der Stimulation und der Sekretion an Signalmolekülen werden M2-Makrophagen in die Subtypen M2a, M2b und M2c unterteilt. IL, Interleukin; TNF, Tumornekrosefaktor; CCL, Chemokin (C-C Motiv) Ligand; IFN, Interferon; LPS, Lipopolysaccharid; TGF, *Transforming growth factor*; CCR, Chemokin (C-C Motiv) Rezeptor; IL-1RA, Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist; IK, Immunkomplexe. Angelehnt an Duluc *et al.*<sup>144</sup> und Hao *et al.*<sup>145</sup>

Der M2 Makrophagen-Phänotyp ist dadurch gekennzeichnet, dass er den M1-polarisierten Makrophagen hinsichtlich Entzündungsförderung und Gewebeschädigung entgegenwirken kann. M2-Makrophagen sind hauptsächlich an Wundheilungsprozessen sowie an der Regeneration oder dem Umbau von Geweben beteiligt. M2-Polarisierung wird vor allem durch das Vorhandensein der Zytokine IL-4 und IL-13 ausgelöst, teilweise aber auch durch IL-10 und Kortikosteroide. Die Population der M2-Makrophagen ist deutlich vielgestaltiger im Vergleich zu M1-Makrophagen.<sup>149, 150</sup> Bei den M2-Makrophagen lassen sich basierend auf Unterschieden in der Genexpression weitere Untergruppen unterscheiden: M2a, M2b, M2c und M2d.<sup>143</sup> Der prominenteste Vertreter ist der M2a Subtyp. Dieser wird, wie bereits erwähnt, durch IL-4 und IL-13 hervorgerufen. Der M2b Subtyp wird durch IL-1-Rezeptorliganden oder durch Immunkomplexe in Kombination mit LPS hervorgerufen. Der M2c Subtyp durch IL-10, TGF- $\beta$  und Glukokortikoide induziert.<sup>145</sup> Der vierte M2-Makrophagensubtyp ist charakterisiert durch hohe Expressionslevel an IL-10 sowie verminderte Level an IL-12 und zeigt einige Funktionen, die denen tumorassoziierter Makrophagen (TAMs) entsprechen. Makrophagen dieses Phänotyps werden dem Subtyp M2d zugeordnet.<sup>144</sup>

### **1.5. Interleukine – Vermittler der Immunreaktion**

Interleukine (IL) sind eine heterogene Gruppe löslicher, körpereigener Botenstoffen, die zu den Zytokinen gerechnet werden und maßgeblich an der angeborenen Immunantwort beteiligt sind. Nach ihrer Freisetzung aus verschiedenen Immunzellen binden sie an Oberflächenrezeptoren und induzieren Zellwachstum und Differenzierung in den Zielzellen. Die meisten Interleukine haben pleiotrope Rollen und wirken auf unterschiedliche Zelltypen. Das gleichzeitige Zusammenspiel verschiedener Interleukine ermöglicht differenzierte Immunantworten. Die mehr als 30 bisher beschriebenen Interleukine wurden aufgrund der Reihenfolge ihrer Entdeckung als IL-1, IL-2, etc. benannt. Mittlerweile sind die meisten Interleukine rekombinant verfügbar und werden teilweise in der Immuntherapie verschiedener Erkrankungen eingesetzt.

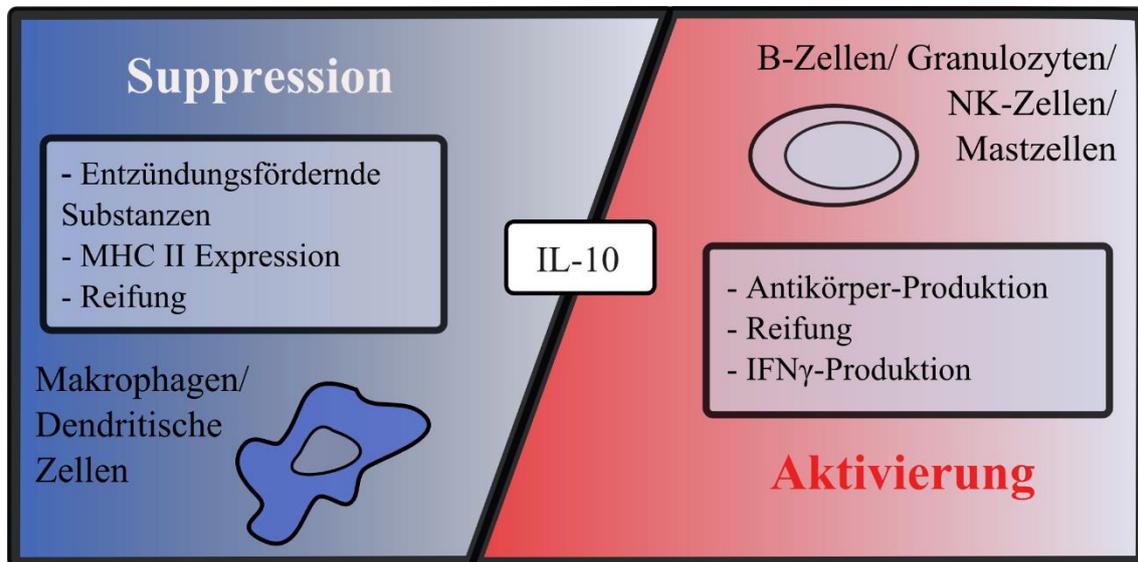
### 1.5.1. Interleukin-10

Immunreaktionen können ohne entsprechende Rückkopplungskontrolle schwerwiegende Immundefekte auslösen, die bis zum Tode gehen können.<sup>151</sup> Interleukin-10 (IL-10), als Hauptregulator der anti-inflammatorischen Reaktion bekannt, rückte schon sehr lange ins Zentrum der immunologischen Forschung. Die folgenden Kapitel zeigen zentrale Elemente der biologischen Funktion von IL-10 auf. Die meisten Ergebnisse darin beruhen auf Maus-Modellen. Zahlreiche klinische Studien konnten die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen durch entsprechende Messungen der IL-10 Konzentrationen in Abhängigkeit von Krankheitsverläufen zeigen. Durch die starke immunsupprimierende Funktion sind genaue Erkenntnisse über die Regulation der IL-10 Expression besonders für das Verständnis von Autoimmunkrankheiten und Entzündungsreaktionen von großer Bedeutung.

### 1.5.2. Struktur und Funktion von Interleukin-10

IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, das anfangs als „Zytokin-Syntheseinhibierender Faktor“ (CSIF, *cytokine synthesis inhibitor factor*) beschrieben wurde, weil es die Aktivierung von TH-1 Zellen und deren Zytokin-Produktion unterdrücken kann.<sup>152</sup> Zahlreiche Zelltypen sezernieren IL-10, darunter Makrophagen, dendritische Zellen, B-/T-Zellen und Natürliche Killer (NK)-Zellen (zusammengefasst in Moore et al.<sup>153</sup>). IL-10 wirkt antagonistisch auf die Expression von pro-inflammatorischen Genen (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und andere) und auf die Expression von MHC II und ko-stimulatorisch wirkender Moleküle (z. B. CD80/86).<sup>154, 155</sup> Die Inhibierung Antigenpräsentierender Zellen ist daher wahrscheinlich der entscheidende Mechanismus, über den IL-10 seine Wirkung auf Immunantworten ausübt, um unkontrollierte Immunantworten zu verhindern.<sup>156</sup> Die biologische Rolle von IL-10 ist jedoch nicht auf die Inaktivierung Antigenpräsentierender Zellen beschränkt. IL-10 kann im Gegensatz dazu auch B-Zellen, Granulozyten und Mastzellen aktivieren, stimulierend auf ihre Reifung wirken, das Wachstum von Keratinozyten anregen und die Aktivierung von NK-Zellen verstärken. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass IL-10 die Interferon- $\gamma$  Produktion von NK-Zellen fördert, die Immunglobulin-Sekretion von Plasmazellen verstärkt sowie den Antikörper-

Klassenwechsel (*class switching*) begünstigt (siehe Abbildung 4, zusammengefasst in Moore *et al.*<sup>153</sup>).



**Abbildung 4: Pleiotrope Rolle von Interleukin-10 auf Immunzellen**

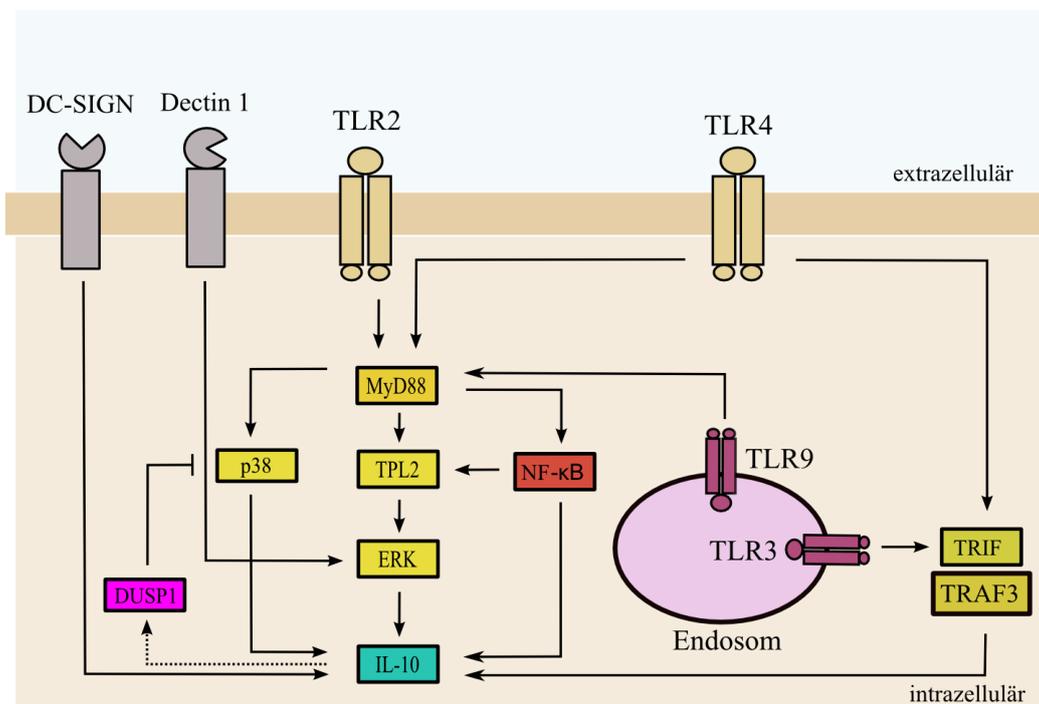
Die Effekte von Interleukin-10 sind Zelltyp abhängig. Seine anti-entzündliche Funktion vermittelt IL-10 über die Hemmung der Sekretion von anti-inflammatorischen Substanzen und der Expression von MHC II auf der Zelloberfläche von Makrophagen und dendritischen Zellen. Im Gegensatz dazu induziert IL-10 in B-Zellen, beziehungsweise Plasmazellen, die Antikörperbildung, fördert die Reifung von Granulozyten und aktiviert die Interferon- $\gamma$  Produktion von NK-Zellen. IL, Interleukin; MHC, Haupthistokompatibilitäts-Komplex; IFN, Interferon; NK, Natürliche Killer-Zellen.

### 1.5.3. Signalübertragung von Interleukin-10

Die Bindung von IL-10 an dessen spezifischen Rezeptorkomplex auf der Zelloberfläche führt zur Aktivierung des nachgeschalteten Signalweges, der als Resultat die bereits beschriebenen, immunsupprimierenden Effekte auf Immunzellen ausübt.<sup>153, 157, 158</sup> Man weiß bisher, dass IL-10 sowohl die Translokation von NF- $\kappa$ B durch Inhibierung der I $\kappa$ B Kinase blockieren kann als auch die NF- $\kappa$ B Proteine p50 und p65 im Zellkern direkt inhibieren kann, was allerdings noch völlig unverstanden ist.<sup>159</sup> Daneben wurden in den letzten Jahren einige weitere Faktoren gefunden, die durch die IL-10 vermittelte Immunantwort, die Expression pro-inflammatorischer Zytokine inhibieren können. Dazu zählen IP-10 (*interferon gamma-induced protein 10*), ISG54 (*interferon stimulated gene 54*), ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) und SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*).<sup>160</sup>

### 1.5.4. Interleukin-10 Expression in Makrophagen

Zellen aus der myeloischen Reihe, insbesondere Makrophagen und dendritische Zellen sezernieren nach Antigenkontakt mitunter die größten Mengen an IL-10 (zusammengefasst in Sabat *et al.*<sup>161</sup>). Die Erkennung pathogenassoziierter Strukturen (PAMPs) erfolgt, wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, über Mustererkennungsrezeptoren. Makrophagen exprimieren IL-10 nach Bindung spezieller PAMPs an ihre spezifischen Rezeptoren. TLR2-Ligandenbindung führt zu starker IL-10 Expression in Antigen-präsentierenden Zellen.<sup>162</sup> Auch die Aktivierung der TLRs 3, 4 und 9 führt zur Aktivierung der IL-10 Expression in Makrophagen.<sup>163</sup>



**Abbildung 5: Signale für die Interleukin-10 Expression in Makrophagen/DCs**

Die Interleukin-10 (IL-10) Expression kann durch die Aktivierung verschiedener Signalwege induziert werden. Toll-like Rezeptoren (TLR) führen zur Aktivierung des nachgeschalteten Adaptorproteins MyD88. Dieser wiederum führt zur Aktivierung von ERK, p38 und NF-κB. Letztendlich wird hierdurch die Expression von IL-10 induziert. Des Weiteren führt auch die Bindung von DC-SIGN und Dectin-1 in dendritischen Zellen zur Aktivierung der IL-10 Expression. DUSP1 kann durch Inhibierung der p38 Aktivität die IL-10 Expression unterdrücken. Modifiziert nach Saraiva und O'Garra.<sup>164</sup>

Weitere Stimuli die zur Aktivierung der IL-10 Expression führen, sind beispielsweise die Bindung entsprechender Liganden des C-Typ Lektins DC-SIGN (*Dendritic cell-specific*

*ICAM3-grabbing non-integrin*) und Dectin-1 (siehe Abbildung 5).<sup>165, 166</sup> Daneben gibt es noch weitere Signale, welche die IL-10 Expression aktivieren können.<sup>163, 167</sup> Der intrazelluläre Ablauf der Aktivierung der IL-10 Expression in Makrophagen und dendritischen Zellen ist in Abbildung 5 dargestellt. Ligandenbindung an TLR2-oder 4 führt zur Aktivierung der nachgeschalteten Signalmoleküle MyD88, TPL2<sup>168</sup> und ERK<sup>169</sup>. Zusätzlich werden weitere Regulatoren der IL-10 Expression beschreiben (zusammengefasst in Saraiva und O'Garra<sup>164</sup>).

### 1.5.5. Regulation der *IL10* Expression

Die Regulation der *IL10* Expression findet auf verschiedenen Ebenen statt. Entscheidend für eine effiziente Aktivierung der *IL10* Expression ist unter anderem die Zugänglichkeit des IL-10 Promotors. Die Zugänglichkeit zu bestimmten Genbereichen wird mitunter durch die Chromatin-Struktur reguliert. Einige Studien deuteten daher an, dass die Expression von IL-10 durch Veränderungen der Chromatin-Struktur am *IL10* Locus reguliert werden könnte.<sup>170-173</sup> Zahlreiche DNase-I hypersensitive Seiten (HSSs) wurden im *IL10* Locus von IL-10 sezernierenden Zellen in der Maus gefunden. Es existieren auch zelltypspezifische HSSs, wie beispielsweise das für Makrophagen spezifische regulatorische Element (HSS-4.5).<sup>170</sup> Da es sich bei IL-10 um ein sekundäres Zielgen von NF- $\kappa$ B handelt, scheint es so zu sein, dass Chromatin-*Remodeling* einen der initialen Schritte bei der Induktion der *IL10* Expression darstellt. Allerdings reicht die alleinige Zugänglichkeit an den IL-10 Promotor für eine signifikante *IL10* Expression nicht aus, sondern es werden weitere Signale benötigt, um höhere *IL10* Expressionslevel zu erzielen. Genaue Details über die Vorgänge am *IL10* Locus sind nicht bekannt, allerdings ist die Beteiligung von Histon-Acetylasen<sup>174</sup> und Histon-Deacetylasen<sup>175</sup> nachgewiesen. Neben der epigenetischen Kontrolle wird die *IL10* Expression hauptsächlich durch Transkriptionsfaktoren reguliert. Im Menschen und der Maus wurden dazu zahlreiche Faktoren beschrieben, darunter SP1<sup>176</sup>, SP3<sup>177</sup>, p50<sup>178</sup>, C/EBP $\beta$ <sup>179, 180</sup>, IRF1 und STAT3<sup>181</sup>. Zahlreiche Transkriptionsfaktoren können folglich an den *IL10* Locus binden und Einfluss auf die *IL10* Expression nehmen. Jeder einzelne Transkriptionsfaktor scheint jedoch in Abhängigkeit von Zelltyp- und Zellstimulus Einfluss seine Wirkung auf die IL-10 Expression auszuüben. Auch die posttranskriptionelle Regulation der *IL10*

Expression über die Modulation der mRNA Stabilität wurde beschrieben<sup>182</sup> und unterschiedliche RNA-Bindeproteine<sup>183-185</sup> sowie die mikroRNAs *miR-466l*, *miR-98* und *miR-106a*<sup>172, 186</sup> identifiziert, welche die Stabilität der IL-10 mRNA beeinflussen. Zu den weiteren Regulatoren zählen Faktoren, die die *IL10* Transkription verstärken, beziehungsweise verringern können. Erwähnenswert sei hier das NF-κB Protein p65, das an eine κB-Bindestelle 4,5 kB vor dem *IL10* Transkriptions-Start bindet und in LPS-stimulierten Makrophagen die *IL10* Transkription verstärkt.<sup>170</sup> Die Aktivierung der *IL10* Expression kann somit abhängig von den verschiedenen Anforderungen angepasst werden. Dies verdeutlicht den komplexen Mechanismus dem die *IL10* Expression auf Genexpressionsebene unterliegt.

#### **1.5.6. Interleukin-10 in der Pathogenese von Erkrankungen**

Die Forschung der vergangenen Jahrzehnte hat gezeigt, dass IL-10 während Infektionen mit nahezu allen Organismen eine zentrale Rolle in der Immunpathologie einnimmt, indem es die übermäßige Aktivierung des Immunsystems bremst und die Produktion entzündungsfördernder Substanzen, die verantwortlich für eine pathologisch erhöhte Immunantwort im Rahmen einer Infektion sein können, unterdrückt (zusammengefasst in Sabat *et al.*<sup>161</sup>). IL-10 kann selbst oder aber über seine Wirkung auf TH-1 Zellen die Überproduktion von bestimmten Zytokinen verhindern.<sup>187, 188</sup> Diese Zytokine können bei Infektionen mit Erregern zu schweren Schäden in verschiedenen Gewebearten führen.<sup>189</sup> Daher ist es essentiell, dass eine abgestimmte Regulation der IL-10 Expression gewährleistet wird. Im Gegensatz dazu besteht bei einer IL-10 Überproduktion die Gefahr, dass die entzündungsfördernde Antwort auf Pathogene verhindert wird, und somit die Erreger der Immunkontrolle entkommen können und im befallenen Organismus persistieren. Abhängig vom Erreger können somit durch zu hohe IL-10 Expressionslevel chronische Infektionen entstehen, bis hin zu tödlichen Verläufen.<sup>190, 191</sup> Neben der Rolle bei Infektionen ist IL-10 auch ein wichtiger Mediator bei anderen immunologischen Erkrankungen, vor allem bei akuten und chronischen Entzündungsreaktionen, (Auto-)immunerkrankungen, Tumorerkrankungen und auch bei Transplantationen (zusammengefasst in Moore *et al.*<sup>153</sup>). Der anti-entzündliche Effekt von IL-10 hat eine Vielzahl von Studien angestoßen, die den vorteilhaften Einsatz von IL-10 in zahlreichen

Modellsystemen gezeigt haben. Die Gabe von IL-10 reduzierte die Entzündungsreaktionen in Tiermodellen für Rheumatoide Arthritis<sup>192</sup>, Psoriasis<sup>193</sup> und entzündlichen Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn<sup>194</sup> und Colitis ulcerosa<sup>195</sup>, bei denen in klinischen Studien im Krankheitsverlauf Vorteile erzielt werden konnten. Allerdings zeigten neuere Studien im Menschen bisher enttäuschende Resultate, da die Gabe von IL-10 sehr heterogene Antworten in den Patienten induzierten und erste Langzeit-Studien keine Vorteile zeigten. So wurde für die Therapie des Morbus Crohn berichtet, dass die IL-10 Therapie zwar sehr gut vertragen wurde, allerdings die Remissionsraten im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht höher waren.<sup>196</sup> Bezogen auf das Wachstum von Tumorzellen übt IL-10 ebenfalls heterogene Funktionen aus: IL-10 ist in der Lage das Tumorwachstum direkt durch Einwirkung auf die Tumorzellen zu begünstigen. Zusätzlich kann es auch durch seine starken anti-inflammatorischen Eigenschaften das Immunsystem hemmen und damit indirekt das Tumorwachstum fördern.<sup>197</sup> Andererseits kann es aber auch die Umgebung von Tumorzellen so modulieren, dass die Zerstörung dieser Zellen durch Verstärkung der angeborenen Immunantwort gefördert wird.<sup>198</sup> Die Rolle von IL-10 ist daher hinsichtlich Tumormanifestation als auch Tumorprogression sehr unterschiedlich und bedarf der genauen Analyse für jede einzelne Tumorentität.

Abschließend betrachtet, verfügt IL-10 über sehr heterogene Eigenschaften und Funktionen bei nahezu allen immunologischen Vorgängen und besitzt daher eine zentrale Rolle im Ablauf und der Regulation einer Immunantwort. Die weitere Aufklärung der bisher noch unverstandenen Regulation der IL-10 Expression könnte deshalb zu einem genaueren Verständnis von Immunpathologien beitragen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Hersteller

<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Abcam	Abcam plc, Cambridge, U.K.
AbD	AbD Sertotec, Oxford, U.K.
AppliChem	Appllichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Becton Dickinson	Becton Dickinson/BD Biosciences, Franklin Lakes, U.S.A.
Biochrom	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
BioLegend	BioLegend, San Diego, U.S.A.
Biorad	Bio-Rad, Hercules, U.S.A.
Bioss	Bioss Inc., Woburn, U.S.A.
Carl Roth	Carl Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cell Signaling	New England Biolabs, Inc., Ipswich, U.S.A.
Corning	Corning, Inc., Tewksbury, U.S.A.
Diagenode	Diagenode, Inc., Denville, U.S.A.
Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fagron	Fagron GmbH & Co. KG, Barsbüttel, Deutschland
GE Healthcare	GE Healthcare Lifesciences, Dornstadt, Deutschland
Genaxxon	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm, Deutschland
GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Hausser Scientific	Hausser Scientific Ltd., Horsham, U.S.A.
Immunotools	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland
Invitrogen	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Life Technologies	Life Technologies GmbH/Invitrogen Cell Culture, Carlsbad, U.S.A.
Lonza	Lonza Cologne AG, Köln, Deutschland

---

Macherey Nagel	Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Medion Diagnostics	Medion Diagnostics International, Miami, U.S.A.
Merck	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NEB	New England Biolabs, Inc., Ipswich, U.S.A.
NeoLab	NeoLab Migge Laborbedarf Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Nippongenetics	NIPPON Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland
PAA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
PBL Interferon Source	PBL Interferon Source, Piscataway, U.S.A.
Polyplus	Polyplus-Transfection, Illkirch, Frankreich
Promega	Promega GmbH Corp., Madison, U.S.A.
Qiagen	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
R&D	R&D Systems, Inc., U.S.A.
Roche	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland
Santa Cruz	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, U.S.A.
Sartorius	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz
Tecan	Tecan Group, Ltd., Crailsheim, Deutschland
Thermo Fisher Scientific	Thermo Fisher Scientific Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Vector Laboratories	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, U.S.A.
VWR	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zeiss	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland

## 2.1.2. Geräte, Systeme und Software

### 2.1.2.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Bioruptor UCD-200	Diagenode
Gelelektrophorese System	Peqlab
Hera Cell 240	Thermo
Hera Cell 240i	Thermo
M2S Minishaker	IKA
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf
Milli-Q Reinstwasseranlage	Millipore
Mini-Protean II System	Biorad
Multifuge 3S-R	Biorad
Netzteil (DNA Auftrennung)	Pharmacia
Netzteil (Protein Auftrennung)	Biometra
Neubauer Improved Zählkammer	Hausser Scientific
Orbital-Rocking Schüttler	GFL
pH Meter	IKA
Roller Mixer SRT9	Stuart
Thermomixer (comfort)	Eppendorf
Wasserbad	GFL
Zentrifuge 5417R	Eppendorf

### 2.1.2.2. Detektionssysteme

System	Hersteller
DMI6000	Microscope Leica
Fusion X7-Advance	PeqLab
LightCycler 480 II	Roche
LSRII FACS Device	BD

---

NanoDrop 1000	Peqlab
Tecan Infite M200	Tecan
Ultra Cruz Blue Autoradiography Films	Santa Cruz
Zeiss Axioskop	Zeiss
REX Leuchtplatte	REX Messinstrumente
SRX 101A Xray Film Entwicklermaschine	Konica Minolta

### 2.1.2.3. Reinigungssysteme

<b>System</b>	<b>Hersteller [Artikel]</b>
Genomic DNA Isolation Kit	Qiagen [60950]
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo [K0702]
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo [K0503]
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo [K0692]
NucleoBond Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel [740414]
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen [205314]
RNeasy Kit	Qiagen [74106]

### 2.1.2.4. Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
ImageJ	US National Institute of Health
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.
Leica MetaMorph AF	MetaMorph
LightCycler 480 Software Version 1.5	Roche
Origin 7.0	OriginLab
Primer3 (Primer Design)	Whitehead Institute for Biomedical Research

**2.1.3. Reagenzien****2.1.3.1. Chemikalien**

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	Thermo
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	Thermo
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	Thermo
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	Thermo
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth
Ampicillin	Carl Roth
BD CompBeads	Becton Dickinson
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
D(+)-Galactosamin-hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	NeoLab
Dithiothreitol	Carl Roth
DMEM/Ham's F-12	Life Technologies
DMEM/High Glucose	Sigma-Aldrich
Doxycyclin	Fagron
Ethanol	Merck
Glycerin	AppliChem
Glycin	AppliChem
HEPES	AppliChem
Isopropanol	Merck
Kanamycin	Carl Roth
L-Glutamin Zellkultur Zusatz (100X)	Life Technologies
Methanol	VWR
Milchpulver, fettfrei	AppliChem
Na-Pyruvat Zellkultur Zusatz (100X)	Life Technologies
Natriumazid	AppliChem

---

Natriumchlorid	VWR
Natrium-Desoxycholat	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat	AppliChem
Natriumhydroxid	Carl Roth
Neomycin	Biochrom
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Life Technologies
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich
Orange G	Sigma-Aldrich
PBS 10x	Sigma-Aldrich
PBS 1x	Sigma-Aldrich
Polyacrylamid (40 %)	Carl Roth
Polybren	Sigma-Aldrich
Polysorbat 20/Tween 20	Merck
Tetramethylethyldiamin	Carl Roth
Tris Base	AppliChem
Wasserstoffperoxid (30 %)	AppliChem

### 2.1.3.2. Enzyme und dazugehörige Kits

<b>Enzyme</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Directional TOPO Cloning Kit</i>	Life Technologies
LR Clonase II Enzym Mix	Life Technologies
<i>Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase</i>	Thermo Scientific
Pfx Platinum DNA Polymerase System	Life Technologies
<i>QuantiTect Reverse Transcription Kit</i>	Qiagen
Restriktionsendonukleasen	NEB oder Thermo Scientific
T4 DNA Polymerase	Thermo Scientific

**2.1.3.3. Zytokine**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller [Artikel]</b>
rm Interferon- $\gamma$	Immunotools [12343536]
rm Interleukin-4	Immunotools [12340043]
rm Interleukin-1 $\beta$	Immunotools [12340015]
rm Interleukin-10	Immunotools [12340105]
rm M-CSF	Immunotools [12343115]
rm TNF- $\alpha$	Immunotools [12343016]

**2.1.3.4. Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Beschreibung</b>
anti-Maus $\beta$ -actin	Maus, monoklonal; bezogen von Sigma-Aldrich (Klon AC-74)
anti-Maus CD11b:APC	Ratte, APC-markiert; bezogen von BD (Klon M1/70)
anti-Maus CD11c:APC-Cy7	Hamster, APC-Cy7- markiert; bezogen von BD (Klon HL3)
anti-Maus CD117:PE-Cy5	Ratte, PE-Cy5-markiert; bezogen von BD (Klon 2B8)
anti-Maus F4/80:PE	Ratte, PE-markiert; bezogen von AbD (Klon A3-1)
anti-Maus Histon-H3 (trimethyl K4)	Kaninchen, polyklonal; bezogen von Bioss
anti-Maus IgG	HRP-konjugierter sekundärer Antikörper; Promega (W4021)
anti-Kaninchen IgG	HRP-konjugierter sekundärer Antikörper; Promega (W4011)
anti-Maus I $\kappa$ B $\zeta$	Kaninchen, polyklonal; gereinigter Antikörper, gerichtet gegen kurze N- und C-terminale Sequenzen des murinen I $\kappa$ B $\zeta$ (L) (N-SPGSDSSDFSST-SSVSSC-C, N-QIRRILKGKSIQQRAP-PY-C); Konzentration: 1 mg/mL

### 2.1.3.5. Sonstige Reagenzien

Reagenz	Hersteller
1 kb DNA Leiter	Thermo
1 kb DNA Leiter Plus	Thermo
10x PCR Amplifikations Puffer	Life Technologies
10x PCR Verstärker Lösung	Life Technologies
AbD SeroBlock FcR	AbD
BCA Protein Quantifizierungs-Kit	Pierce
ECL Western Blot Substrat Kit	Promega
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum, Tetrazyklin-frei	Life Technologies
GenAgarose LE	Genaxxon
jetPEI	Polyplus
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth
LPS, <i>E. coli</i> serotype O111:B4	Sigma
Maus SeroBlock FcR BUF041B	AbD Serotec
Midori Green Advance	Nippongenetics
Mouse Cytometric Bead Assay	BD
MycoZapPlusCL Antibiotikum	Lonza
Peptidoglycan (PGN), <i>Bacillus subtilis</i>	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth
Spectra Multicolour Broad Range Protein Leiter	Thermo
Zymosan A	Sigma-Aldrich

## 2.1.4. Oligonukleotide

### 2.1.4.1. Oligonukleotide für qRT-PCR

Bezeichnung	Sequenz
<i>CCL2_for</i>	5'-GAG GAA GGC CAG CCC AGC AC-3'
<i>CCL2_rev</i>	5'-TGG GGC GTT AAC TGC ATC TGG C-3'
<i>CXCL9_for</i>	5'-GAT TTG TAG TGG ATC GTG CCT C-3'
<i>CXCL9_rev</i>	5'-GGA ACC CTA GTG ATA AGG AAT GC -3'
<i>CXCL10_for</i>	5'-TCC CTA TGG CCC TCA TTC TCA-3'
<i>CXCL10_rev</i>	5'-CCA AGT GCT GCC GTC ATT TTC-3'
<i>CXCL11_for</i>	5'-TGT AAT TTA CCC GAG TAA CGG C-3'
<i>CXCL11_rev</i>	5'-CAC CTT TGT CGT TTA TGA GCC TT-3'
<i>ELAM1_for</i>	5'-CTC ACT CCT GAC ATC GTC CTC-3'
<i>ELAM1_rev</i>	5'-ACG TTG TAA GAA GGC ACA TGG-3'
<i>GAPDH_for</i>	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'
<i>GAPDH_rev</i>	5'-CAC CAC CCT GTT GCT GTA GCC-3'
<i>GBP4_for</i>	5'-ATG GTG ATT CCC TTG TGG AAA G-3'
<i>GBP4_rev</i>	5'-AAG GAG TGA TAA AAC GCT GCT T-3'
<i>IL6_for</i>	5'-AGT TGC CTT CTT GGG ACT GA-3'
<i>IL6_rev</i>	5'-TCC ACG ATT TCC CAG AGA AC-3'
<i>IL10_for</i>	5'-AGC CTT ATC GGA AAT GAT CCA GT-3'
<i>IL10_rev</i>	5'-GGC CTT GTA GAC ACC TTG GT-3'
<i>LCN2_for</i>	5'-GGG AAA TAT GCA CAG GTA TCC TC-3'
<i>LCN2_rev</i>	5'-GCC ACT TGC ACA TTG TAG CTC-3'
<i>NFKBIA_for</i>	5'-CTC ACT CCT GAC ATC GTC CTC-3'
<i>NFKBIA_rev</i>	5'-ACG TTG TAA GAA GGC ACA TGG-3'
<i>NFKBIZ_for</i>	5'-TAT CGG GTG ACA CAG TTG GA-3'
<i>NFKBIZ_rev</i>	5'-TGA ATG GAC TTC CCC TTC AG-3'
<i>TNFA_for</i>	5'-CCT CAG CCT CTT CTC CTT CCT-3'
<i>TNFA_rev</i>	5'-GGT GTG GGT GAG GAG CA-3'
<i>VCAM1_for</i>	5'-TTG GGA GCC TCA ACG GTA CT-3'
<i>VCAM1_rev</i>	5'-GCA ATC GTT TTG TAT TCA GGG GA-3'

#### 2.1.4.2. Oligonukleotide für ChIP-Anwendungen

Bezeichnung	Sequenz
<i>ChIP_Aktb_for</i>	5'-TCG ATA TCC ACG TGA CAT CCA-3'
<i>ChIP_Aktb_rev</i>	5'-GCA GCA TTT TTT TAC CCC CTC-3'
<i>ChIP_Gapdh_for</i>	5'-GGG GTT GCT GTG TCA CTA CCG-3'
<i>ChIP_Gapdh_for</i>	5'-CAG AGA CCT GAA TGC TGC TTC C-3'
<i>ChIP_IL10prox_for</i>	5'-TAG AAG AGG GAG GAG GAG CC-3'
<i>ChIP_IL10prox_rev</i>	5'-TGT GGC TTT GGT AGT GCA AG-3'
<i>ChIP_TNFa_for</i>	5'-CCC CAG ATT GCC ACA GAA TC-3'
<i>ChIP_TNFa_rev</i>	5'-CCA GTG AGT GAA AGG GAC AG-3'
<i>ChIP_IL6prox_for</i>	5'-CGA TGC TAA ACG ACG TCA CAT TGT GCA-3'
<i>ChIP_IL6prox_rev</i>	5'-CTC CAG AGC AGA ATG AGC TAC AGA CAT-3'

#### 2.1.4.3. Oligonukleotide für Genotypisierungen

Bezeichnung	Sequenz
<i>GENO_NFKBIZ_A</i>	5'-TTT CTT TCG CCT CTT CAC CAG GTT TCT CC-3'
<i>GENO_NFKBIZ_B</i>	5'-ATT GGC AGC TAC CGC CAC CTG AAA GGC AC-3'
<i>GENO_NFKBIZ_C</i>	5'-CTT CCA TTT GTC ACG TCC TGC-3'

#### 2.1.4.4. Oligonukleotide für Klonierungen

Bezeichnung	Sequenz
<i>CDS_NFKBIZ_A</i>	5'-ATG ATC GTG GAC AAG CTG C-3'
<i>CDS_NFKBIZ_B</i>	5'-CTA GTA TGG TGG TGC TCG CTG-3'
<i>PROM_IL6_for</i>	5'-CTA GCG AGA TCT TGA GAG TGT GTT TTG TAA-3'

*PROM\_IL6\_rev*                    5' -CTA GCG GCT AGC CCA GAG CAG AAT GAG  
CTA-3'

### 2.1.5. Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pCMV-VSG-G	Säugetier-Expressionsvektor; vermittelt die CMV Promotor-gesteuerte Expression des <i>VSV-G</i> Verpackungsproteins; benötigt für die Synthese von lentiviralen Partikeln; Backbone: pCMV; Resistenz: Ampicillin; bezogen von Addgene
pCMV $\Delta$ R8.9	Säugetier-Expressionsvektor; vermittelt die CMV Promotor-gesteuerte Expression der <i>gag</i> , <i>pol</i> und <i>env</i> Proteine; Backbone: pCMV; Resistenz: Ampicillin; bezogen von C. Lengerke (Universität Tübingen) <sup>199</sup>
pGL3-BASIC	Reportergen-Backbone; Resistenz: Ampicillin; bezogen von Promega
pGL2-BASIC	Reportergen-Backbone; Resistenz: Ampicillin; bezogen von Promega
pGL3-ELAM1	Promotorkonstrukt des murinen ELAM-1 Promotors; Backbone: pGL3-BASIC; Resistenz: Ampicillin
pGL3-IL6	Promotorkonstrukt des murinen IL-6 Promotors; Backbone: pGL3-BASIC; Resistenz: Ampicillin
pGL3-LCN2	Promotorkonstrukt des murinen Lcn-2 Promotors; Backbone: pGL3-BASIC; Resistenz: Ampicillin; bezogen von Addgene <sup>200</sup>
pGL2B-IL10 (-1538/+64)	Promotorkonstrukt des gesamten murinen IL-10 Promotors; Backbone: pGL2-BASIC; Resistenz: Ampicillin; bezogen von Addgene
pGL2B-IL10 (-938/+64)	Promotorkonstrukt mit verkürzter Sequenz (-938/+64) des murinen IL-10 Promotors; Backbone: pGL2-BASIC; Resistenz: Ampicillin; bezogen von Addgene

pGL2B-IL10 (-688/+64)	Promotorkonstrukt mit verkürzter Sequenz (-688/+64) des murinen IL-10 Promotors; Backbone: pGL2-BASIC; Resistenz: Ampicillin; bezogen von Addgene
pGL2B-IL10 (-376/+64)	Promotorkonstrukt mit verkürzter Sequenz (-376/+64) des murinen IL-10 Promotors; Backbone: pGL2-BASIC; Resistenz: Ampicillin; bezogen von Addgene
pGL2B-IL10 (-158/+64)	Promotorkonstrukt mit verkürzter Sequenz (-158/+64) des murinen IL-10 Promotors; Backbone: pGL2-BASIC; Resistenz: Ampicillin; bezogen von Addgene
pENTR-D-TOPO	Gateway Technology Entry Vektor; ermöglicht <i>directional TOPO cloning</i> von entsprechenden PCR Amplikons; Resistenz: Ampicillin; bezogen von Life Technologies
pENTR-D-TOPO-I $\kappa$ B $\zeta$	pENTR-D-TOPO Entry Vektor, der die <i>Coding</i> -Sequenz für das murine I $\kappa$ B $\zeta$ beinhaltet; Resistenz: Ampicillin
pINDUCER20	Backbone Vektor, der die Doxycyclin-induzierbare Expression von entsprechenden cDNAs erlaubt; Resistenz: Ampicillin & Chloramphenicol; zur Verfügung gestellt von S.J. Elledge, Harvard Medical School <sup>201</sup>
pcDNA4-p50	Säugetier-Expressionsvektor; vermittelt die CMV Promotor-gesteuerte Expression der NF- $\kappa$ B Untereinheit p50; Backbone: pcDNA4; Resistenz: Ampicillin; bezogen von G. Totzke, Universität Düsseldorf
pINDUCER20-TetOn-I $\kappa$ B $\zeta$	Expressionsvektor zur Doxycyclin-induzierbaren Expression von I $\kappa$ B $\zeta$ ; Backbone: pINDUCER20; Resistenz: Ampicillin

### 2.1.6. Lösungen und Puffer

Alle aufgeführten Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O angesetzt.

<b>Lösungen/Puffer</b>	<b>Komponenten</b>
DNA-Ladepuffer (5x)	30% (v/v) Glycerol 0,2% (w/v) orange G
HEPES-Puffer (1 M, pH 8,0)	1 M HEPES mit NaOH auf pH 8,0 einstellen
HEPES (20 mM, pH 8,0)	2% (v/v) 1 M HEPES in ddH <sub>2</sub> O
Western Blot-Blockpuffer	1x TBS-T 4% (w/v) BSA
Western Blot BSA-Waschpuffer	1x TBS-T 4 % (w/v) BSA
Western Blot primäre AK-Lösung	1x TBS-T 4% (w/v) BSA entsprechende Menge an Primär-AK 0,05% (w/v) NaN <sub>3</sub>
Western Blot sekundäre AK-Lösung	1x TBS-T 4% (w/v) BSA entsprechende Menge an Sekundär-AK

Western Blot-Transferpuffer (10X)	250 mM Tris Base 20% (v/v) Methanol
Polyacrylamid-Gele (8 %)	8% (v/v) <i>Polyacrylamid</i> 37,5% (v/v) 1 M Tris-HCl pH 6,8 0,1% (w/v) SDS 0,04% (v/v) TEMED 0,1% (w/v) APS 4% (v/v) <i>Polyacrylamid</i> 12,7% (v/v) 0.5 M Tris-HCl pH 8,8 0,1% (w/v) SDS 0,04% (v/v) TEMED 0,1% (w/v) APS
RIPA-Puffer	1% (v/v) NP-40 0,1% (w/v) SDS 0,5% (w/v) DOC 150 mM NaCl 5% (v/v) 300 mM Tris-HCl pH 8,0 Proteaseinhibitor (Thermo Protease Inhibitor Mix 1:100) frisch dazugeben
SDS-PAGE Laufpuffer (10X)	250 mM Tris Base 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS

SDS-PAGE Probenpuffer (5X)	10% (w/v) SDS 10 mM DTT 20% (v/v) Glycerol 20% (v/v) 1 M Tris-HCl, pH 6,8 0,05% Bromphenolblau
TAE-Puffer (50X)	2 M Tris Base 5,71% Eisessig 50 mM EDTA (pH 8,0)
TBS-T (10X)	0,5 M Tris Base 1,5 M NaCl mit Salzsäure auf pH 7,5 einstellen 0,5% (v/v) Polysorbat 20/ Tween 20
Tris-HCl Puffer (1 M, pH 6,8/8,8)	1 M Tris Base mit Salzsäure auf pH 6,8/8,8 einstellen
Tris-HCl Puffer (0,5 M, pH 8,8)	0,5 M Tris Base mit Salzsäure auf pH 8,8 einstellen
Tris-HCl (20 mM, pH 8,0)	2 % (v/v) 1 M Tris-HCl Puffer pH 8,0
KMM-Medium	DMEM/Ham's F-12 1x MycoZapPlusCL Antibiotikum 10% (v/v) FCS

---

FACS-Puffer	1X PBS 2% (v/v) FCS
Einfriermedium (2X)	20% (v/v) DMSO in FCS
HEK293FT-Medium	DMEM/High Glucose, 10% (v/v) FCS 1x MycoZapPlusCL Antibiotikum 1x Nicht-essentielle Aminosäuren Neomycin (400 µg/mL) 1x L-Glutamin Zellkulturzusatz 1x Na-Pyruvat Zellkulturzusatz
MEF-Medium	DMEM/High Glucose 1x MycoZapPlusCL Antibiotikum 10% (v/v) FCS
PM-Medium	DMEM/High Glucose 1x MycoZapPlusCL Antibiotikum 10% (v/v) FCS
Raw264.7-Medium	DMEM/High Glucose 1x MycoZapPlusCL Antibiotikum 10% (v/v) FCS
Raw264.7-TetOn-IκBζ-Medium	DMEM/High Glucose 1x MycoZapPlusCL Antibiotikum 10% (v/v) Tetrazyklin-freies FCS

300 µg/mL Neomycin

LB/Antibiotikum-Agar                      4% (w/v) LB-Agar (Luria/Miller)  
 autoklavieren und auf 60°C kühlen  
 50 µg/mL Antibiotikum zugeben

LB/Antibiotikum-Medium                      2% (w/v) LB-Medium (Luria/Miller)  
 autoklavieren und auf 60°C kühlen  
 50 µg/mL Antibiotikum zugeben

## 2.1.7. Zelllinien und Bakterien

### 2.1.7.1. Stabile Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
HEK293FT	Zelllinie für die Produktion von lentiviralen Partikeln; bezogen von Life Technologies
<i>Nfkbiz</i> <sup>wt/wt</sup> MEF	C57BL/6 primäre embryonale Fibroblasten; isoliert an Tag E10,5; homozygot für den Genlocus <i>Nfkbiz</i>
<i>Nfkbiz</i> <sup>ko/ko</sup> MEF	C57BL/6 primäre embryonale Fibroblasten; isoliert an Tag E10.5 <sup>82</sup>
Raw264.7	Monomyeloische Maus-Zelllinie ATCC (# TIB-71)
Raw264.7-TetOn-IκBζ	Genetisch modifizierte Raw264.7 Zellen; Doxycyclin-induzierbare Expression des murinen IκBζ

### 2.1.7.2. Bakterien

Der Bakterienstamm '*NEB 5-alpha*' (NEB) wurde für alle Transformations-Experimente verwendet und besitzt nach den Angaben des Herstellers folgenden Genotyp:

*fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

Zur Transformation des *pINDUCER20* Vektors wurde der *ccdB Survival™ 2 T1<sup>R</sup> E. coli* (Life Technologies) Bakterienstamm verwendet, der nach den Angaben des Herstellers folgenden Genotyp besitzt:

*F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG fhuA::IS2*

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen

Gesamt-RNA aus den verwendeten Zellen wurde mit Hilfe des *RNeasy Kits* (Qiagen) gewonnen. Das Vorgehen entsprach dabei den Anweisungen des Herstellers. Die gewonnene RNA wurde bei -80°C gelagert.

#### 2.2.1.2. Umschreibung von Gesamt-RNA in cDNA

Um die gereinigte Gesamt-RNA in cDNA umzuschreiben, wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) verwendet. Dabei handelt es sich um ein zweistufiges Protokoll, das den Abbau genomischer DNA und die Umschreibung („reverse Transkription“) von Gesamt-RNA in cDNA verbindet. Das Vorgehen entsprach den Angaben des Herstellers. Die gewonnene cDNA wurde auf 200 µL mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und bei -20°C gelagert.

### 2.2.1.3. Quantitative *real time*-PCR (qRT-PCR)

Zur Bestimmung von relativen Genexpressionslevel wurden die quantitative *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) durchgeführt. Dazu wurde für jede Probe ein Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{L}$  angesetzt: 10  $\mu\text{L}$  SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x; Fermentas), 2,5  $\mu\text{L}$  *Forward Primer* (2  $\mu\text{M}$  in ddH<sub>2</sub>O), 2,5  $\mu\text{L}$  *Reverse Primer* (2  $\mu\text{M}$  in ddH<sub>2</sub>O) und 5  $\mu\text{L}$  der entsprechenden cDNA. Die Reaktionen wurden mit dem LightCycler 480 II (Roche) durchgeführt; dabei wurde folgendes Protokoll verwendet: a) Initiale Denaturierung: 10 min bei 95°C; b) 30 Amplifikations-Zyklen  $\rightarrow$  10 s bei 95°C  $\rightarrow$  10 s bei 55°C  $\rightarrow$  30 s bei 72°C; c) Abschließende Elongation: 10 min bei 72°C. Die PCR wurde in dem *LightCycler 480 II* durchgeführt und die Analyse bzw. Bestimmung der relativen Expressionslevel erfolgte mit der Roche Light Cycler 480 Software (Version 1.5). Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind unter 2.1.4.1 aufgelistet.

### 2.2.1.4. Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese von DNA wurde angewendet, um DNA-Fragmente anhand ihrer Größe zu trennen. Abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurde 1-2% (w/v) GenAgarose (Carl Roth) in 1x TAE gelöst. Anschließend wurden 3  $\mu\text{L}$  *MidoriGreen Solution* (Biozym Diagnostik), ein Nukleinsäure-Farbstoff, pro 100 mL Agarose zugegeben und daraufhin in eine Gelkammer (*PerfectBlue Gelsystem Midi S*, Peqlab) mit entsprechenden Aussparungen für Probenaschen gegossen. Mit 5x DNA Probenpuffer versetzte DNA-Proben wurden in die Geltaschen überführt und zusätzlich 5  $\mu\text{L}$  der *GeneRuler™ 1 kb Plus* DNA Leiter (Thermo Scientific) zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente parallel getrennt. Die Trennung erfolgte in mit 1x TAE befüllten Gel-Kammern, an die eine Spannung von 4 V/cm angelegt wurde, bis die gewünschte Trennung der DNA-Fragmente erreicht war. Das Gel wurde dann mittels *Cybertech UV Transilluminator* (Cybertech CS 1;  $\lambda = 295 \text{ nm}$  or  $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) analysiert.

#### **2.2.1.5. DNA-Extraktion aus Agarose**

Entsprechende Bereiche aus elektrophoretisch getrennten DNA-Proben wurden mit Hilfe des *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo) isoliert. Der Ablauf entsprach den Angaben des Herstellers. Abweichend davon wurden im letzten Elutionsschritt 50  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O verwendet.

#### **2.2.1.6. DNA-Sequenzierung**

DNA-Sequenzierungen von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten wurden von der Firma *Eurofins Genomics* durchgeführt. Hierfür wurden die DNA-Proben entsprechend den Angaben des Unternehmens vorbereitet.

#### **2.2.1.7. Polymerase-Kettenreaktion**

Polymerase-Kettenreaktionen wurden mit Hilfe des *Pfx Platinum DNA Polymerase Systems* (LifeTechnologies) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Das Gesamtvolumen betrug 40  $\mu\text{L}$  und setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen: 2 mM dNTP-Lösung (dATP, dGTP, dCTP und dTTP: jeweils 300  $\mu\text{M}$ ), 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 300 nM *Forward Primer*, 300 nM *Reverse Primer*, 1x Pfx Amplifikations Puffer, 2x PCR *Enhancer* Lösung, entsprechende Mengen an *DNA-Template* und 0,02 u/ $\mu\text{L}$  *Pfx DNA Polymerase*. Die PCR-Reaktionen wurden in einem *Eppendorf Gradient Thermocycler* durchgeführt und dabei folgendes Programm verwendet: Initiale Denaturierungsphase über 5 min (94°C), anschließend 20-50 Zyklen mit je a) Denaturierung (94°C, 15 s), b) Anlagerung (55°-65°C, 30 s) und c) Elongation (68°C, 1-2 min pro kb). Das Programm endete mit einem abschließenden Elongationsschritt für 10 min bei 68°C.

#### **2.2.1.8. Klonierung von PCR-Fragmenten**

Oligonukleotide, die zur PCR Amplifikation verwendet wurden, wurden dahingehend modifiziert, dass die Ligation der Amplikons in die *pENTR-D-TOPO* Vektoren mit Hilfe des *Directional TOPO Cloning Kits* ermöglicht wurde. Dazu wurde an das 5'-Ende der entsprechenden Oligonukleotid-Sequenz ein 5'-CACC-3'-Zusatz angefügt. Die sich

daraus ergebenden *pENTR-D-TOPO* Vektoren wurden anschließend mit dem *Gateway System* (Life Technologies) und dem *LR II Clonase Enzym Mix* nach Angaben der Hersteller in kompatible Vektoren übertragen.

#### **2.2.1.9. Genotypisierung**

Genomische DNA wurde gewonnen, indem aus Mausgewebe durch Lyse in genomischem Lysepuffer die DNA extrahiert wurde. Dazu wurde das Gewebe bei 55°C für 24 hrs in genomischem Lysepuffer inkubiert und anschließend für 15 min bei 14000x *g* sedimentiert. Der Überstand wurde dann zur weiteren PCR-Analyse verwendet. DNA aus primären Zellen oder Zelllinien wurde mit Hilfe des *Genomic DNA Isolation Kit* (Thermo Scientific) nach den Angaben des Herstellers gewonnen und ebenfalls der PCR-Analyse zugeführt. Zu diesem Zweck wurde das *Pfx DNA Polymerase System* (Life Technologies) verwendet. Die Reaktionen wurden zusammen mit der *Pfx DNA Polymerase* in einem Volumen von 20 µL angesetzt. Weitere Bestandteile waren: 2 µL *10x PCR Amplifikations Puffer*, 4 µL *10x PCR Verstärker-Lösung*, 0,6 µL 10 mM dNTPs, 0,8 µL 25 mM Magnesiumsulfat, 2 µL DNA-Template, 0,6 µL *Pfx DNA-Polymerase*, jeweils 0,6 µL der Oligonukleotide (*GENO\_NFKBIZ\_A*, *GENO\_NFKBIZ\_B*, *GENO\_NFKBIZ\_C*) und entsprechende Mengen an ddH<sub>2</sub>O. Folgendes Programm wurde verwendet: Initiale Denaturierung für 30 s bei 98°C → 30 Zyklen à 10 s Denaturierung bei 98°C, Anlagerung für 30 s bei 98°C und Verlängerung für 30 s bei 68°C → Abschließender Elongationsschritt für 10 min bei 68°C. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Folgende Genotyp-spezifischen Fragmentgrößen wurden erwartet: *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup>: ~500 bp, *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup>: ~400 bp.

#### **2.2.1.10. Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien**

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden abhängig vom Vektor *NEB 5-alpha Competent E. coli* (New England BioLabs) oder *ccdB Survival E. coli* (Invitrogen) verwendet. Entsprechend den Herstellerangaben wurden die verschiedenen Ansätze angesetzt. Danach wurden die transformierten Bakterien auf LB/Agar-Platten ausgestrichen. Entsprechende Mengen an Antibiotikum wurden nach jeweiliger Vorgabe

zugegeben (Kanamycin: 50 µg/mL, Ampicillin: 100 µg/mL, Chloramphenicol: 33 µg/mL). Die LB/Agar-Platten wurden anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### **2.2.1.11. Plasmidisolierung**

Je 5 mL LB-Medium (ggf. mit Antibiotikum) wurde mit einer Bakterienkolonie inokuliert und für 12-18 hrs bei 37°C und 120 rpm geschüttelt. Aus diesen Kulturen wurde Plasmid-DNA mittels des *GeneJET Plasmid Miniprep Kits* (ThermoScientific) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Abweichend hiervon wurden im letzten Elutionsschritt 50 µL ddH<sub>2</sub>O verwendet.

Zur Gewinnung großer Mengen Plasmid-DNA wurden einzelne, nach Transformation gewonnene Bakterienkolonien, wie in 2.2.1.11 beschrieben angezüchtet und die gereinigte DNA hinsichtlich ihrer Sequenz analysiert. Die einzelnen ausgewählten Bakteriensuspensionen wurden anschließend in 200 mL LB Medium für 12-18 hrs bei 37°C und 120 rpm inkubiert. Es wurden entsprechende Mengen an Antibiotikum zugegeben (Kanamycin, Ampicillin oder Chloramphenicol). Am darauffolgenden Tag wurde die Plasmid-DNA mittels des *NucleoBond Xtra Maxi Kit* (Macherey Nagel) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Abweichend hiervon wurden im letzten Elutionsschritt bis zu 800 µL ddH<sub>2</sub>O verwendet.

#### **2.2.1.12. Generierung von Luziferase Reportergergenkonstrukten**

Entsprechende Sequenzen von Genabschnitten wurden mittels Standard-PCR aus genomischer DNA amplifiziert und nach Restriktionsverdau mit *BamHI* und *EcoRV* in die *multiple cloning site* des pGL3basic Vektors ligiert, um das entsprechende pGL3-Luziferase Reporterkonstrukt zu erhalten. Entsprechende Primer inklusive Restriktionsstellen für die jeweiligen Enzyme wurden verwendet (siehe 2.1.4.4).

#### **2.2.1.13. Generierung der *pINDUCER20* Expressionsplasmide**

Zur Generierung von *pINDUCER20* Expressionsplasmiden wurde das *Gateway*-kompatible *pINDUCER* (Life Technologies) System verwendet. Ziel war es die Doxycyclin-abhängige Expression der kanonischen IκBζ-Isoform IκBζ-(L) in Raw264.7

Zellen zu ermöglichen. Dazu wurde die für I $\kappa$ B $\zeta$ -(L) kodierende Sequenz mittels PCR aus genomischer cDNA vervielfältigt. Die dafür verwendeten Primer waren: *CDS\_NFKBIZ\_A* und *CDS\_NFKBIZ\_B*. Zur Generierung der *pINDUCER20* Plasmide wurden die kodierenden Sequenzen zuerst in *pENTR-D-TOPO* Plasmide kloniert (*pENTR-D-TOPO\_I $\kappa$ B $\zeta$* ). In der anschließenden Reaktion wurden diese *pENTR-D-TOPO* Plasmide in *pINDUCER20* Plasmide mit Hilfe des *Gateway Systems* (Life Technologie) übertragen. Hieraus ergab sich das Plasmid: *pINDUCER20-TetOn-I $\kappa$ B $\zeta$*

## **2.2.2. Zellbiologische Methoden**

### **2.2.2.1. Auftauen und Einfrieren von Zellen**

Eingefrorene Zellen wurden rasch im 37°C Wasserbad aufgetaut und sofort in ein 50 mL Gefäß mit Zelltyp-spezifischem Medium überführt. Danach folgte mehrmaliges Invertieren und Sedimentieren der Zellen bei 300x g für 5 min. Nach Abnahme des Überstands wurden die Zellen in 10 mL frischem Medium aufgenommen.

Die Kryokonservierung von Zellen erfolgte in entsprechenden Kryo-Gefäßen, indem eine Zellsuspension ( $10^6 - 10^7$  Zellen pro mL Medium) mit einem gleichen Volumen an 2x Einfriermedium versetzt wurde. Anschließend wurde die Mischung für 20 min bei -20 °C und für einen Tag bei -80 °C gelagert. Zur langfristigen Lagerung wurden die Kryo-Gefäße in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

### **2.2.2.2. Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte mit Hilfe der *Neubauer Zählkammer improved* (Carl Roth GmbH) nach den Angaben des Herstellers. Zur Unterscheidung von vitalen und avitalen Zellen wurde zusätzlich Trypanblau in die Zellsuspension gegeben.

### **2.2.2.3. Kultivierung von Zelllinien**

Bei den untersuchten Zelllinien handelt es sich um die Maus-Makrophagen-Zelllinie Raw264.7 und HEK293FT Zellen. Diese Zellen wurden in DMEM/High Glucose Medium mit Zusätzen an FCS (10 %) und 1x MycoZapCL Antibiotikum unter Standardbedingungen (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) kultiviert. Medium für HEK293FT Zellen

enthielt zusätzlich noch folgende Zusätze: 1x Na-Pyruvat, 1x Nicht-essentielle Aminosäuren, 1x L-Glutamin und 400 µg/mL Neomycin.

#### **2.2.2.4. Gewinnung von murinen embryonale Fibroblasten**

Murine embryonale Fibroblasten (MEFs) wurden nach den Vorgaben aus Standard-Protokollen<sup>202</sup> entnommen. Die Entnahme erfolgte an Tag 10,5 *post coitum*. Zur Kultivierung dieser primären Zellen wurde DMEM/High Glucose Medium mit Zusätzen an FCS (10 %) und 1x MycoZapCL Antibiotikum verwendet. MEFs wurden in befeuchteter Atmosphäre unter reduzierten Sauerstoff-Bedingungen (5 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub>, 37 °C) kultiviert. Die sich ergebenden Zelllinien wurden *Nfkbiz<sup>wt/wt</sup>* MEF, für Wildtyp-MEF-Zelllinien, oder *Nfkbiz<sup>ko/ko</sup>* MEF, für IκBζ-knockout MEF-Zelllinien, genannt. Zur Durchführung von Experimenten wurden ausschließlich Zelllinien mit Passagenzahlen < 30 verwendet.

#### **2.2.2.5. Gewinnung von Peritonealmakrophagen**

Primäre Peritonealmakrophagen (PM) aus der Maus wurden nach folgendem Protokoll isoliert (angelehnt an Standard-Protokolle<sup>202</sup>): Mäuse wurden durch CO<sub>2</sub> getötet und die ventrale Bauchseite mit 70% Ethanol gereinigt. Durch einen oberflächlichen Schnitt, beginnend im kleinen Becken, wurde das Peritoneum dargestellt. Nach vollständiger Entfernung der Abdominalhaut und darunterliegender Muskulatur wurde ein Katheter (0,7x19 mm, BD) in die Peritonealhöhle von ventrokaudal eingeführt und 10 mL 1x PBS in diese injiziert. Anschließend wurde das Peritoneum vorsichtig mit den Fingern massiert und das injizierte PBS über den Katheter wieder abgezogen. Die gewonnene Peritonealflüssigkeit wurde bei 500x g für 5 min sedimentiert und in 2 mL DMEM/Ham's-F12 Medium mit Zusatz an FCS (10 %) und 1x MycoZapCL Antibiotikum zu gleichen Volumina in entsprechende Platten ausgebracht. Es erfolgte die Kultivierung für 2 hrs bei Standard-Bedingungen (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C). Danach wurde der Überstand abgenommen und die adhärenierten Zellen viermal mit PM-Medium gewaschen. Diese gereinigten Zellen wurden dann bei Standard-Bedingungen (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) in PM-Medium kultiviert.

### 2.2.2.6. Generierung und Kultivierung knochenmarksabstammender

#### Makrophagen

Knochenmarkabstammende Makrophagen (im Folgenden als KMM bezeichnet, englisch für *bone-marrow derived macrophages*) wurden laut nachfolgendem Protokoll generiert (angelehnt an Standard-Protokolle<sup>77, 203</sup>). Die Mäuse wurden zu Beginn durch CO<sub>2</sub> getötet. Nach Reinigung des Abdomens, des Beckens und der Hinterbeine mit 70% Ethanol wurde ein kleiner Hautschnitt auf der ventralen Medianlinie der Abdominalhaut bis zum oberen Sprunggelenk der Hinterbeine durchgeführt. Die darunterliegende Muskulatur wurde großflächig entfernt, sodass Femur und Tibia freigelegt werden konnten. Anschließend wurde das Femur am proximalen und distalen Ende durchtrennt. Mit 10 mL 1x PBS wurden die Röhrenknochen mittels einer dünnen Nadel durchspült. Die so gewonnenen Knochenmarkszellen wurden anschließend sedimentiert und in DMEM/High Glucose Medium mit Zusätzen an FCS (10 %), 30 ng/mL rm M-CSF und 1x MycoZapCL Antibiotikum aufgenommen und in Zellkulturflaschen ausgebracht. An Tag 3 nach Isolation erfolgte die weitere Zugabe von 30 mL Medium und an Tag 5 wurde das gesamte Medium durch frisches Medium, jetzt jedoch ohne Zusatz an rekombinantem M-CSF, ersetzt. An Tag 6 war die Ausdifferenzierung der Knochenmarkszellen abgeschlossen und die KMM konnten für Versuche am Folgetag entsprechend den Anforderungen ausgesät werden.

### 2.2.2.7. Produktion von Lentiviren und Transduktion

Lentiviren wurden in HEK293FT Zellen generiert. Zur Transfektion wurden folgende Vektoren verwendet: pCMVΔR8.9 (0,10 µg/cm<sup>2</sup>), pCMV-VSV-G (0,05 µg/cm<sup>2</sup>) und entsprechende Mengen an pINDUCER20 (0,10 µg/cm<sup>2</sup>) Plasmiden. Nach 48 hrs befinden sich im Überstand die Viruspartikel, die mit dafür geeigneten Filtern (Sartorius VS2042) nach Angaben des Herstellers konzentriert wurden. Diese Überstände wurden daraufhin auf Raw264.7 Zellen gegeben und zusätzlich Polybren (Endkonzentration 4 µg/mL) hinzugefügt. Diese Ansätze wurden für 48 hrs bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Selektionierung der transduzierten Zellen mit Neomycin (1 mg/mL) über 7 Tage.

### **2.2.2.8. Generierung und Kultivierung von Raw264.7-TetOn-I $\kappa$ B $\zeta$ Zellen**

Die Verwendung von Raw264.7-TetOn-I $\kappa$ B $\zeta$  Zellen ermöglicht die Doxycylin-abhängige Expression von I $\kappa$ B $\zeta$ . Dazu wurden Raw264.7 Zellen mit dem *pINDUCER20-TetOn-I $\kappa$ B $\zeta$*  Vektor (siehe Kapitel 2.2.1.13) transduziert. Für 7 Tage erfolgte die Kultivierung in Gegenwart von 1 mg/mL Neomycin. Die so selektionierte Zelllinie Raw264.7-TetOn-I $\kappa$ B $\zeta$  wurde in Gegenwart von 300  $\mu$ g/mL Neomycin weiter kultiviert. Die Induktion der ektopischen I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression erfolgte durch Zugabe von 2  $\mu$ g/mL Doxycyclin zum Kulturmedium.

### **2.2.2.9. Vorbehandlung und pro-inflammatorische Aktivierung von Makrophagen**

Peritonealmakrophagen und Knochenmarksmakrophagen wurden durch Zugabe unterschiedlicher Stimulanzen aktiviert. Die Zugabe von 30 ng/mL rm Interferon- $\gamma$  oder 20 ng/mL rm IL-4 über 24 hrs überführte die Makrophagen in den M1 (IFN- $\gamma$ )- bzw. M2 (IL-4)-Polarisierungszustand. Anschließend erfolgte die weitere Verwendung der Zellen. Zur Aktivierung dieser Makrophagen wurde vor Zugabe der Stimulantien das Kulturmedium ausgetauscht. Die pro-inflammatorische Stimulation der verwendeten Zellen erfolgte für die jeweils angegebenen Zeiträume mit folgenden Substanzen: 25 ng/mL rm IL-1 $\beta$ , 25 ng/mL rm TNF- $\alpha$ , 1  $\mu$ g/mL LPS, 1  $\mu$ g/mL Peptidoglykan (PGN, *Bacillus subtilis*) oder 1  $\mu$ g/mL Zymosan A (Zym oder Zym A). Andernfalls wurde kein neues Medium bei Stimulationsstart zugegeben. Für diese Zwecke wurde ausschließlich zuvor auf 37°C aufgewärmtes Medium verwendet.

### **2.2.2.10. Luziferase Reportergen Assay**

Raw264.7-TetOn-I $\kappa$ B $\zeta$  Zellen wurden in 6-well Platten ausgebracht und 24 hrs später mit pGL3/pGL2 Promotorkonstrukten (*Firefly* Luziferase) sowie pRL-Konstrukten (*Renilla* Luziferase) (2.1.5) mit Hilfe des *jetPEI* Transfektions Reagenzes (Polyplus) nach den Angaben des Herstellers transfiziert. 8 hrs nach Transfektion wurden dem Medium 2  $\mu$ g/mL Doxycylin zugesetzt, um die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  zu initiieren. Nach weiteren 16 hrs wurde das Medium durch frisches Medium mit 2  $\mu$ g/mL Doxycyclin ersetzt; zusätzlich erfolgte die Gabe von LPS (1  $\mu$ g/mL) für 20 hrs. Entsprechende Raw264.7-TetOn-I $\kappa$ B $\zeta$  Kontrollzellen wurden analog ohne Zugabe von Doxycylin kultiviert. Die

Zellen wurden geerntet und die Luziferaseaktivität mit dem *Dual Luciferase Kit* (Promega) entsprechend den Herstellerangaben analysiert. Zur Normalisierung der (*Firefly*) Luziferaseaktivität diente die Aktivität der Renilla-Luziferase.

### **2.2.3. Immunbiologische Methoden**

#### **2.2.3.1. Generierung von Proteinlysaten für Western Blot Analysen**

Zur Gewinnung von Proteinlysaten erfolgte die Zellyse in eiskaltem RIPA-Puffer für 10 min (50 µl RIPA-Puffer/10<sup>6</sup> Zellen). Zusätzlich wurde das Lysat im Ultraschallbad (*Bioruptor UCD-200*; Intensität: hoch, Sonifizierungs-Frequenz: 50%, Pulslänge: 5 s) für weitere 10 min behandelt. Nach Zentrifugation bei 20000x g für 15 min wurde der Überstand in neue Behälter überführt und bei -20°C gelagert.

#### **2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration in Zellysaten wurde das *BCA Protein Quantification Assay Kit* (Thermo Scientific) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Je 2 µL Lysat wurden in 200 µL BCA-Lösung in einer Vertiefung einer 96-well Platte gegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte in Duplikaten. Die Proteinkonzentration wurde relativ zu einer BSA Standardreihe berechnet.

#### **2.2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Proteine wurden mittels Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE, *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) getrennt. Die Proteinlysate wurden mit 5x Ladepuffer versetzt und anschließend für 5 min auf 95°C erhitzt. Danach wurden die Proben auf die zuvor frisch gegossenen Polyacrylamid Gele geladen (*Mini-Protean II System*; 15-well Gele: 10-15 µg Gesamt-Protein pro well; 10-well Gele: 20-30 µg Gesamt-Protein pro well). Die scheinbaren Molekulargewichte wurden relativ zum *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Scientific) ermittelt. Der Gellauf erfolgte in *Mini-Protean II Gelelektrophorese* Kammern bei 100 V

für 15 min und anschließend 150 V, bis die Bromphenolblau-Bande aus dem Gel ausgetreten war.

#### **2.2.3.4. Immuno-(Western) Blot**

Der Transfer der Proteine von SDS-PA Gelen auf PVDF (*PVDF Transfer Membrane*, GE Healthcare)-Membranen erfolgte im *Mini-Protean Tank Blotting System* (Biorad) für 2 hrs bei 80 V und 4 °C in 1x Western Blot-Transferpuffer. Die Membranen wurden für 1 h in 1x Western Blot-Blockpuffer bei RT geschüttelt und über Nacht in Western Blot primärer AK-Lösung bei 4 °C inkubiert. Folgende Antikörper, mit den angegebenen Verdünnungen, wurden verwendet: anti-Maus  $\beta$ -Actin (1:10000); anti-Maus I $\kappa$ B $\zeta$  (1:2000). Dann wurden die Membranen dreimal für 20 min in Western Blot-Waschpuffer gewaschen und anschließend in Western Blot sekundärer AK-Lösung für 2 hrs bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1x TBS-T Lösung für jeweils 10 min erfolgte die Zugabe von *ECL Western Blot Substrat* (Promega) auf die Membranen. Die Analyse von Proteinbanden wurde im *Fusion X7-Advance* (Peqlab) Geldokumentationssystem durchgeführt.

#### **2.2.3.5. Bestimmung von Zytokin-Konzentrationen**

Die Konzentrationen von Zytokinen in Zellkulturüberständen wurden mit dem *Mouse Cytometric Bead Array System* (Maus- IL-6, IL-10, MCP-1, TNF; BD) bestimmt. Das Vorgehen entsprach dabei den Angaben des Herstellers. Falls eine Vorbehandlung der Makrophagen nötig war, wurden entsprechende Substanzen 24 hrs vor Beginn den Zellkulturansätzen zugeben. Das Medium wurde in diesem Fall bei Stimulationsstart nochmals erneuert.

#### **2.2.3.6. Bestimmung von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie**

Oberflächenmarker von KMM wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu wurden die zu untersuchenden KMM zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und bei 500x g für 5 min sedimentiert. Die Zellen wurden anschließend in *AbD SeroBlock FcR* (Endkonzentration 1:100) enthaltenen FACS-Puffer aufgenommen. Nach 10 min wurden

der Zellsuspension folgende Antikörper zugesetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert: *anti-F4/80:PE* (1:20), *anti-Gr-1:PacificBlue* (1:20), *anti-CD11b:APC* (1:50), *anti-CD11c:APC-Cy7* (1:50). Danach wurden die KMM zweimal in FACS-Puffer gewaschen und im Durchflusszytometer analysiert. Zur Kontrolle wurden identische Versuche mit Fluorochrom-markierten Isotyp-Kontrollen durchgeführt.

### 2.2.3.7. Chromatinimmunpräzipitation

Für die Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) wurde das *HighCell# ChIP Kit* von Diagenode laut Herstelleranleitung für je  $10^7$  KMM verwendet. Diese KMM wurden zuvor für 5 hrs mit LPS kultiviert. Der Antikörper anti-Maus Histon H3 (trimethyl-K4) wurde eingesetzt (siehe 2.1.3.4). Die *CP* Werte wurden durch qPCR-Analyse im *LightCycler 480 II* bestimmt (96-well Platten; 20  $\mu$ L Gesamtvolumen; siehe 2.2.1.3).

**Tabelle 4:** ChIP-relevante qRT-PCR Oligonukleotide.

Promotorregion	5' - Primer	3' - Primer
<i>Il10 proximal (-97/+35)</i>	<i>ChIP_IL10prox_for</i>	<i>ChIP_IL10prox_rev</i>
<i>Il6 proximal</i>	<i>ChIP_IL6prox_for</i>	<i>ChIP_IL6prox_rev</i>
<i>Tnf proximal</i>	<i>ChIP_TNFa_for</i>	<i>ChIP_TNFa_rev</i>

Als Kontrollgene für die Analyse des IL10-Promotors dienten Genbereiche von *Aktb* (kodierend für  $\beta$ -Aktin) und *Gapdh* (kodierend für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; Sequenzen siehe 2.1.4.2). Die Spezifität der Oligonukleotidpaare wurde mittels Schmelzkurvenanalyse überprüft. Zur Berechnung der relativen Anreicherung der H3K4-Trimethylierung am jeweiligen Promotorabschnitt wurden die erhaltenen *CP*-Werte der Wildtyp-KMM als Vielfache der *CP*-Werte der *Knockout*-KMM berechnet.

#### **2.2.4. Statistische Auswertung**

Die angegebenen Werte stellen jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (StdAbw) oder die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) für die angegebene Anzahl an unabhängigen Experimenten dar. Der Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben wurde angewendet um eine statistische Signifikanz zu berechnen. (\*) zeigt statistische Signifikanz an (\*  $\equiv$   $p < 0,05$ ).

### 3 Ergebnisse

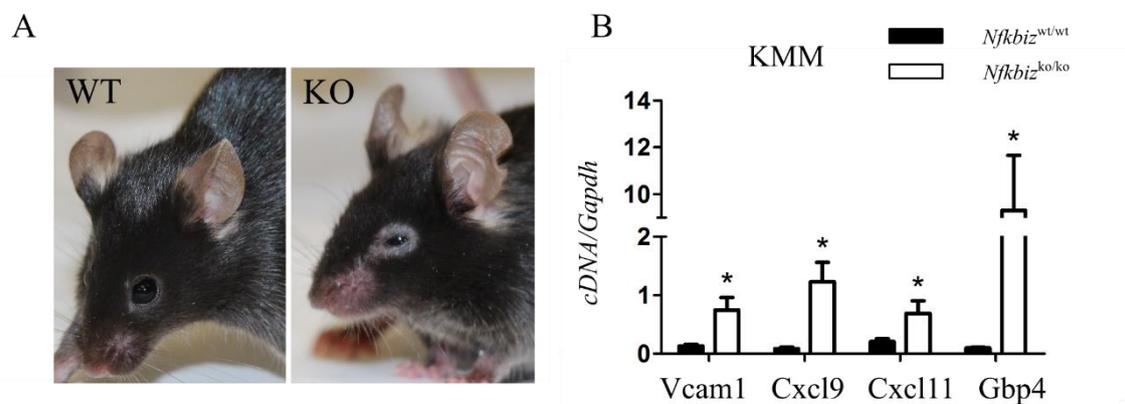
#### 3.1. Phänotypische Eigenschaften von *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen

Die Generierung von *Nfkbiz-knockout* (*Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup>) C57Bl6 Mäusen, in denen die Exone 4-8 des Gens *Nfkbiz* (kodierend für IκBζ) deletiert wurden<sup>82</sup>, ermöglichte vergleichende Experimente mit *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Zellen, um über die resultierenden Änderungen neue Erkenntnisse hinsichtlich der Rolle und Funktionsweise von IκBζ in verschiedenen Zelltypen zu gewinnen.

Genexpressionsanalysen mit isolierten Peritoneal- (PM) und Knochenmarksmakrophagen (KMM) aus *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen zeigten, dass IκBζ hauptsächlich als Koaktivator an der Expressionsregulation entzündungsfördernder Faktoren beteiligt ist. Unter diesen sind als wichtige pro-inflammatorische Vertreter IL-6, IL-12p40, GM-CSF und MCP-1 zu nennen.<sup>61, 77</sup> Diese pro-inflammatorischen Signalmoleküle werden als Reaktion auf Entzündungsreize von Immunzellen ausgeschüttet und fördern den Entzündungsprozess. Sie tragen somit maßgeblich zur Aktivierung der Immunantwort des Organismus bei. Basierend auf diesen bisher gewonnenen Erkenntnissen sollten *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäuse einen immunsupprimierten Phänotyp im Rahmen von Entzündungsreaktionen zeigen. Überraschenderweise ist dieser Rückschluss nicht zutreffend, da *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäuse nicht durch eine verminderte Immunantwort auffallen, sondern vielmehr einen pro-inflammatorischen Phänotyp im Rahmen von Infektionen und immunologischen Vorgängen entwickeln. Typischerweise entwickeln *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäuse im Alter von 4-6 Wochen eine chronische Konjunktivitis mit periokulärer Infiltration von Immunzellen. Diese chronische Infiltration führt letztlich zur Zerstörung des umliegenden Gewebes. Zudem zeigen *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäuse Zeichen atopischer Dermatitis, die mit entsprechender Ekzembildung einhergeht. *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäuse sind aufgrund dieser Merkmale, die sie schon wenige Wochen nach der Geburt entwickeln, bereits rein makroskopisch von *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> Mäusen zu unterscheiden (Abbildung 6A).

Eine weitere Besonderheit von *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen zeigten Versuche auf, bei denen diesen Mäusen intraperitoneal LPS appliziert wurde und die darauf mit erhöhter TNF-α Konzentration im Blutplasma und zeitlich verzögerter Abnahme dieses pro-inflammatorischen Zytokins im Vergleich zu *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> Mäusen auffielen.<sup>61</sup> Diese

deutlich erhöhte TNF- $\alpha$  Plasmakonzentration in *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen konnte auch nach intraperitonealer Zymosan-Injektion gemessen werden.<sup>77</sup> Diese erhöhten TNF- $\alpha$  Level könnten eine mögliche Erklärung für pathologische Verläufe von Entzündungsreaktionen in *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen sein, wie es bereits für andere TNF- $\alpha$ -vermittelte Immunreaktionen in anderen Mausmodellen gezeigt werden konnte.<sup>204, 205</sup> Ein direkter Zusammenhang mit I $\kappa$ B $\zeta$  konnte allerdings nicht hergestellt werden, da die TNF- $\alpha$  Expression unabhängig von I $\kappa$ B $\zeta$  reguliert wird.<sup>61</sup> Eine Erklärung dafür wäre, dass I $\kappa$ B $\zeta$  einen weiteren Faktor reguliert, dessen Funktion sich antagonistisch zu TNF- $\alpha$  verhält. Genauere Untersuchungen hierzu liegen bisher nicht vor.



**Abbildung 6: *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäuse zeigen phänotypische und molekulare Auffälligkeiten.**  
**(A)** Makroskopischer Vergleich von *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> (WT) und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> (KO) Mäusen. *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäuse entwickeln nach wenigen Wochen okuläre und periokuläre Entzündungszeichen. Im Vergleich zu gleichaltrigen *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> Mäusen sind *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäuse in Größe und Gewicht reduziert. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Tieren gleichen Alters und Geschlechts.  
**(B)** KMM aus *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen wurden für 5 hrs in Gegenwart von LPS [1  $\mu$ g/mL] kultiviert und anschließend die mRNA Expressionslevel von *Vcam1*, *Cxcl9*, *Cxcl11*, *Gbp4* und *Gapdh* mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen des jeweiligen Zielgens bezogen auf die *Gapdh* Expression von drei unabhängigen Experimenten. (\*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0.05$ ) zwischen *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM an.

Eine weitere Eigenschaft konnte für *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Makrophagen in unserer Arbeitsgruppe (AG Schulze-Osthoff) gezeigt werden. Primäre, naive Makrophagen reagieren *in vitro* auf LPS mit der erhöhten Expression entzündungsfördernder Mediatoren im Vergleich zu vorher klassisch aktivierten (M1) Makrophagen. Daraus wurde geschlossen, dass naive Makrophagen aus *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen bereits zu einem gewissen

Grad *in vivo* einem klassischen Makrophagen Phänotyp (M1) entsprechen und somit auf Entzündungsreize schneller und stärker reagieren als naive Makrophagen (D. Hildebrand, persönliche Mitteilung). Die mRNA-Level von in der Literatur beschriebenen M1-assoziierten Genen sind in *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Peritonealmakrophagen im Vergleich zu *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> Peritonealmakrophagen nach LPS Kultivierung erhöht. Dazu zählen als bekannte Vertreter die Gene *Vcam1*, *Cxcl9*, *Cxcl11* und *Gbp4*. Für Knochenmarksmakrophagen wurden ebenfalls erhöhte Expressionslevel der genannten Gene gemessen (Abbildung 6B).

Da die bisherigen Erkenntnisse über die Eigenschaften von IκBζ nicht in Zusammenhang mit den phänotypischen Merkmalen von *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen stehen, ist es naheliegend, dass IκBζ die Expression von weiteren Faktoren moduliert, die ihrerseits wiederum (direkt oder indirekt) entzündungshemmend wirken. Ein hauptsächlich entzündungshemmendes und generell immunmodulatorisch wirkendes Zytokin ist Interleukin-10 (IL-10). Interessanterweise ist für IL-10 sogar eine antagonistische Wirkung auf die TNF-α Sekretion wie auch eine M2-Polarisierung fördernde Wirkung auf Makrophagen beschrieben. *Il10*<sup>ko/ko</sup> Mäuse zeigen zudem einen immunsupprimierten Phänotyp, mit der Besonderheit, dass spontan oder experimentell induzierte chronisch entzündliche Darmerkrankungen manifest werden und im Blutplasma dieser Mäuse, ähnlich zu den Versuchen mit *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen, erhöhte TNF-α Konzentrationen nach Antigenstimulation gemessen werden.<sup>206, 207</sup> Diese Eigenschaften von IL-10 spiegeln damit auch die phänotypischen Defizite von *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen wider.

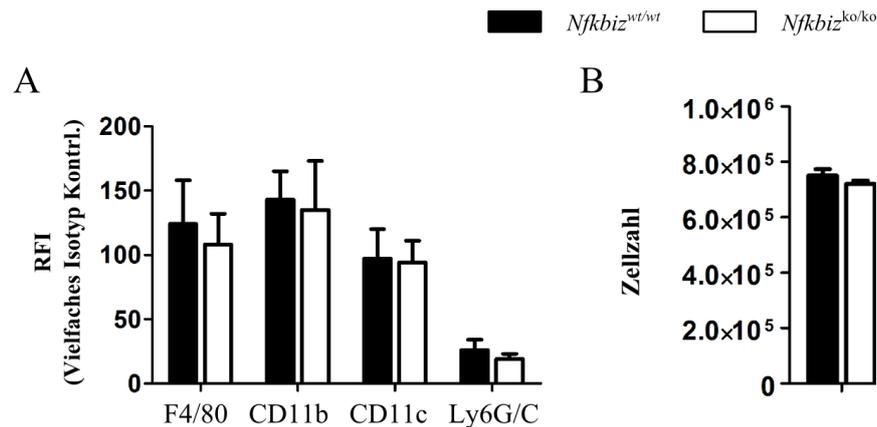
### **3.2. Etablierung eines Zellsystems zur Untersuchung der Funktionen von IκBζ**

Die Verwendung von Immunzellen erlaubt eine stimulusabhängige Induktion der Expression von *Nfkbiz*. Bisherige Studien konnten zeigen, dass IκBζ/*Nfkbiz* mit Abstand am stärksten in Makrophagen exprimiert wird. Um den Einfluss von IκBζ/*Nfkbiz* auf die Genexpressionsregulation zu untersuchen, wurden in den nachfolgenden Experimenten Zellen aus C57Bl6/*Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen verwendet. Diese *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäuse wurden freundlicherweise von M. Morimatsu<sup>82</sup> zur Verfügung gestellt.

### 3.2.1. Isolierung und Charakterisierung von Knochenmarksmakrophagen aus *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen

Knochenmarkszellen wurden aus *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen entnommen und durch Kultivierung mit Makrophagenkolonien-stimulierendem Faktor (M-CSF, *macrophage colony-stimulating factor*) *in vitro* zu Knochenmarksmakrophagen (KMM) differenziert (Kapitel 2.2.2.6).<sup>203</sup> Nach sieben Tagen Kultivierung der Knochenmarkszellen wurden die differenzierten KMM für weitergehende Versuche verwendet. Lichtmikroskopisch konnten keine Unterschiede zwischen *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Zahl der gewonnenen KMM/10<sup>6</sup> Knochenmarkszellen war ebenfalls bei einer Reinheit von jeweils  $\geq 90$  % unabhängig vom Genotyp (Abbildung 7B). Zur Charakterisierung der gewonnenen KMM wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression Makrophagen-assoziiierter Oberflächenproteine als Marker untersucht. Die klassischen Monozyten/Makrophagen Oberflächenmarker CD11b, F4/80, CD11c und Ly6G/C wurden bei den gewonnenen KMM Zellen nachgewiesen. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte keinen Unterschied im Expressionsmuster der Markerproteine auf *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM (Abbildung 7A).

In vorausgehenden Arbeiten wurde die Funktionalität der isolierten KMM untersucht. Klassische Eigenschaften von Makrophagen beinhalten die Fähigkeiten Partikel zu phagozytieren (Phagozytose), abhängig von umgebenden Faktoren in Gewebe einzuwandern (Chemotaxis) und auf entsprechende Reize der Umgebung mit der Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite zu reagieren (respiratorischer Burst). Die Untersuchungen zeigten keine Unterschiede bei der Messung des Phagozytosepotentials. Ebenso unterschieden sich die *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM nicht signifikant in Chemotaxis und der Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite (Daten nicht gezeigt).



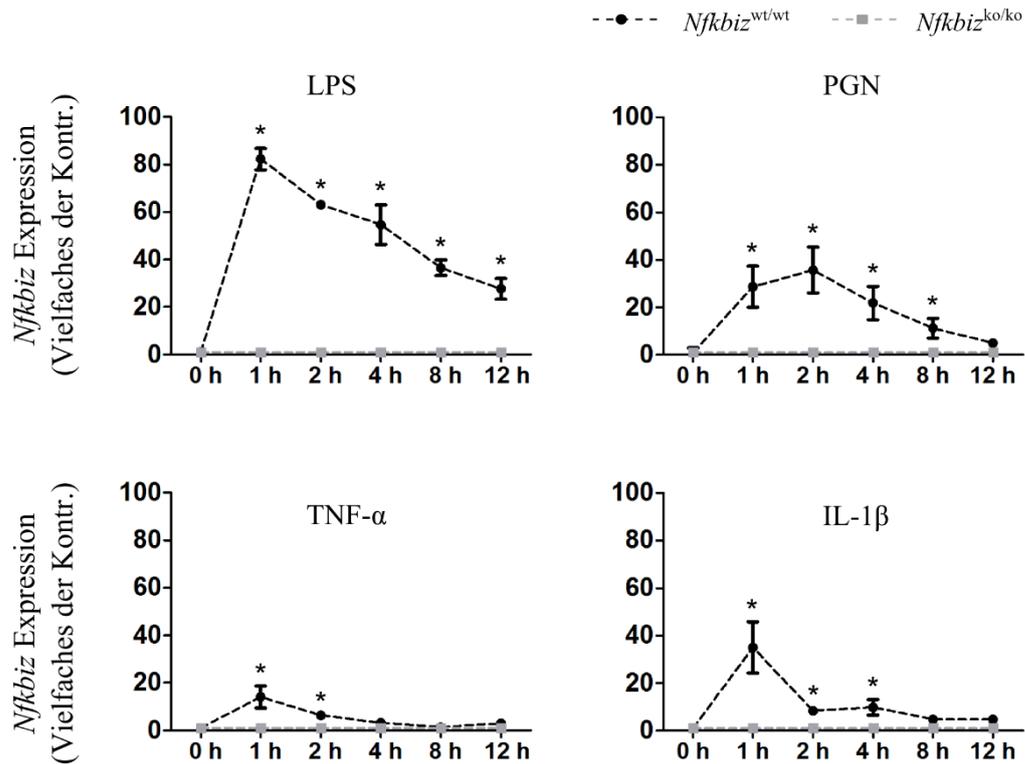
**Abbildung 7: Charakterisierung der KMM aus *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen.**

(A) KMM aus *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen wurden mittels Durchflusszytometrie mit spezifischen Antikörpern gegen F4/80, CD11b, CD11c und Ly6G/C untersucht. Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzintensitäten (RFI) als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung als Vielfache der gemessenen RFI der IgG-Isotypkontrollen aus drei unabhängigen Experimenten. (B) Anzahl der gewonnenen KMM aus 10<sup>6</sup> Knochenmarkszellen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für drei unabhängige Experimente.

Für die gewonnenen KMM konnte somit gezeigt werden, dass sie phänotypisch und funktionell Makrophagen entsprechen und dass ein funktionsloses *Nfkbiz*-Transkript keinen Einfluss auf die Ausübung klassischer Makrophagen Eigenschaften hat.

### 3.2.2. KMM zeigen eine Stimulus-abhängige Expression von *Nfkbiz*

Die Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs führt in zahlreichen Zelltypen zur Induktion der Transkription von *Nfkbiz*. Besonders Makrophagen zeigen nach TLR-Aktivierung erhöhte *Nfkbiz* mRNA-Expressionslevel. Mittels qRT-PCR Analysen konnte die LPS-abhängige Expression von *Nfkbiz* in KMM bestätigt werden (Abbildung 8). Neben LPS wurden weitere entzündungsfördernde Faktoren zur Stimulation der *Nfkbiz* Expression verwendet. Peptidoglykan (PGN) ist ebenfalls ein Bestandteil von Bakterienmembranen und aktiviert über den TLR2-Signalweg die NF- $\kappa$ B-abhängige Expression. Genauso wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), die nach Bindung an ihre entsprechenden Rezeptoren ebenfalls zur Expression von *Nfkbiz* führen.



**Abbildung 8: *Nfkbiz* Genexpression in *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM mit unterschiedlichen Stimuli.**

*Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM wurden für 12 hrs in Gegenwart von LPS [1  $\mu$ g/mL], PGN [1  $\mu$ g/mL], TNF- $\alpha$  [25 ng/mL] oder IL-1 $\beta$  [25 ng/mL] kultiviert und zu den entsprechenden Zeitpunkten die mRNA-Expressionslevel von *Nfkbiz* und *Gapdh* mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Vielfachen des Ausgangswerts zu Beginn der Stimulation als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. (\*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0.05$ ) zwischen *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM an.

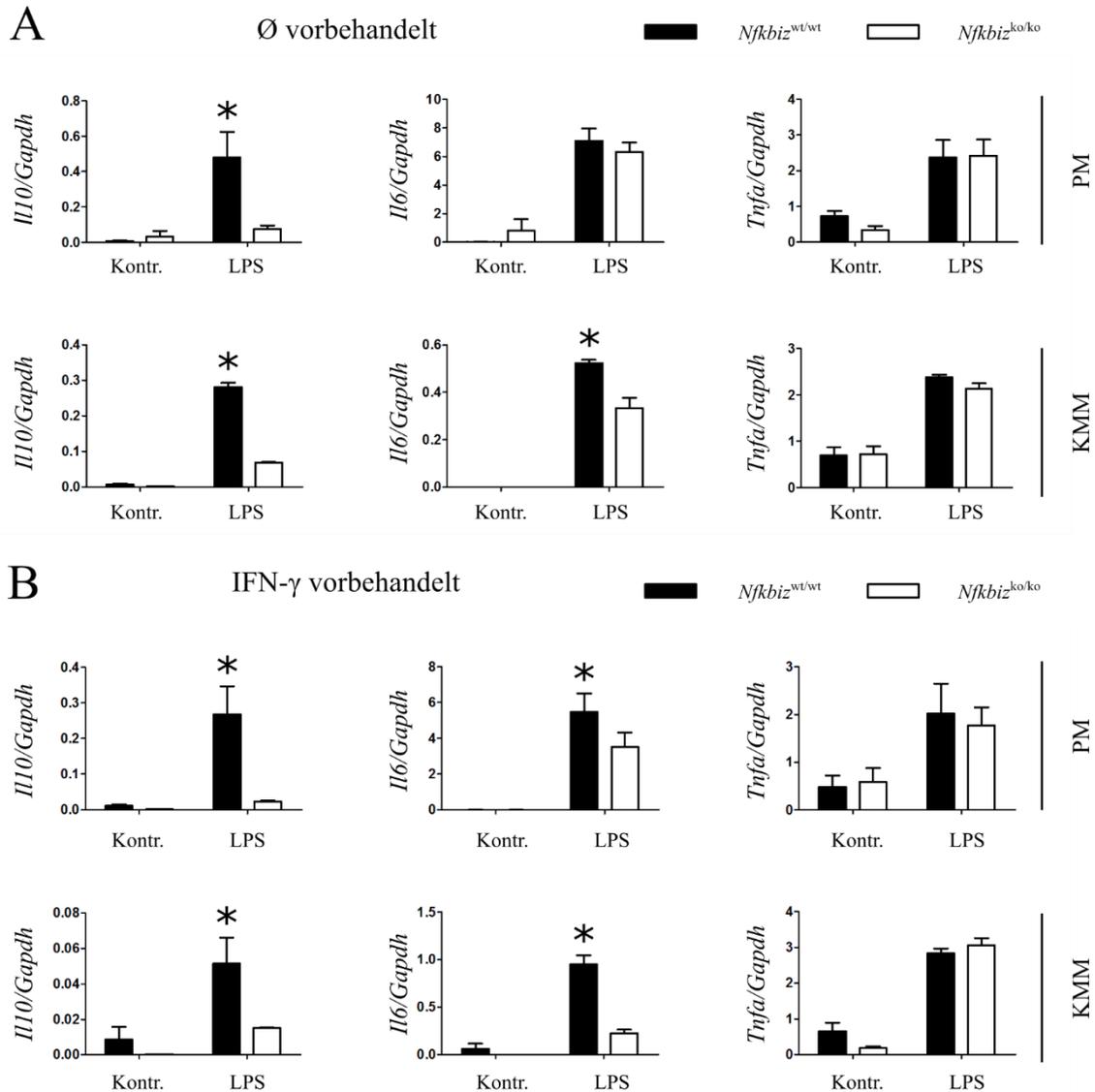
Das *Nfkbiz* mRNA-Expressionslevel ist nach LPS-Stimulation (~80-fach) im Vergleich zu den Bedingungen mit PGN (~40-fach), TNF- $\alpha$  (~20-fach) oder IL-1 $\beta$  (~40-fach) deutlich erhöht (Abbildung 8). Unter allen Bedingungen wurde für die *Nfkbiz*-Expression ein maximaler Wert nach 1-2 hrs bestimmt. In *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM konnte in keinem der Fälle das *Nfkbiz*-Transkript nachgewiesen werden.

### 3.3. I $\kappa$ B $\zeta$ ist ein wichtiger Regulator der *Il10*/IL-10 Expression<sup>C</sup>

#### 3.3.1. *Nfkbiz*-defiziente Makrophagen und Fibroblasten zeigen verminderte *Il10* Genexpressionlevel nach TLR-Stimulation

Nachdem die Phänotypisierung und funktionelle Charakterisierung der isolierten Knochenmarksmakrophagen keine Unterschiede zwischen *Nfkbiz*-Wildtyp und *Knockout* Zellen zeigte, wurden diese in den folgenden Versuchen als Modellsystem zur Untersuchung der I $\kappa$ B $\zeta$ -vermittelten Regulation der *Il10* Genexpression verwendet. Dazu wurden zu Beginn *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> PM und KMM für 5 hrs mit LPS kultiviert und die Genexpressionslevel von *Il6*, *Tnfa* und *Il10* bestimmt (Abbildung 9A). Sowohl für PM als auch KMM wurden nach LPS-Behandlung reduzierte *Il10* Expressionslevel in den *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Makrophagen im Vergleich zu *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> Makrophagen gemessen. Die I $\kappa$ B $\zeta$ -regulierte *Il6* Genexpression war nur im Falle der *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM, nicht aber der *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> PM, signifikant vermindert. Die *Tnfa* Genexpressionslevel waren in *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> PM und KMM, verglichen mit *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> PM und KMM nicht verändert. Bei den verwendeten PM und KMM handelt es sich um sogenannte primäre unbehandelte Makrophagen (nachfolgend als „naive Makrophagen“ bezeichnet), die im Falle der KMM erst *in vitro* aus Vorläuferzellen entstehen und bis zu diesem Zeitpunkt keinen Antigenkontakt hatten. Die publizierten Daten zur Abhängigkeit der *Il6*/IL-6 Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  wurden mit zuvor aktivierten Makrophagen durchgeführt.<sup>61</sup> In diesen qRT-PCR Analysen wurden Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) behandelte PM und KMM verwendet. Werden sowohl die PM als auch die KMM über 24 hrs mit IFN- $\gamma$  aktiviert und anschließend mit LPS stimuliert, so finden sich auch bei den PM signifikant reduzierte *Il6* Expressionslevel in den *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> PM (~1,5-fach) und KMM (~5-fach) im Vergleich zu *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> PM und KMM. Die *Il10* Expressionslevel sind sowohl für naive als auch für IFN- $\gamma$  vorbehandelte Makrophagen nach LPS-Behandlung verringert (Abbildung 9B).

<sup>C</sup> Teile dieses Abschnitts wurden bereits modifiziert in Hörber et al.<sup>286</sup> veröffentlicht.



**Abbildung 9: *Il10* Genexpression ist in *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> PM und KMM vermindert.**

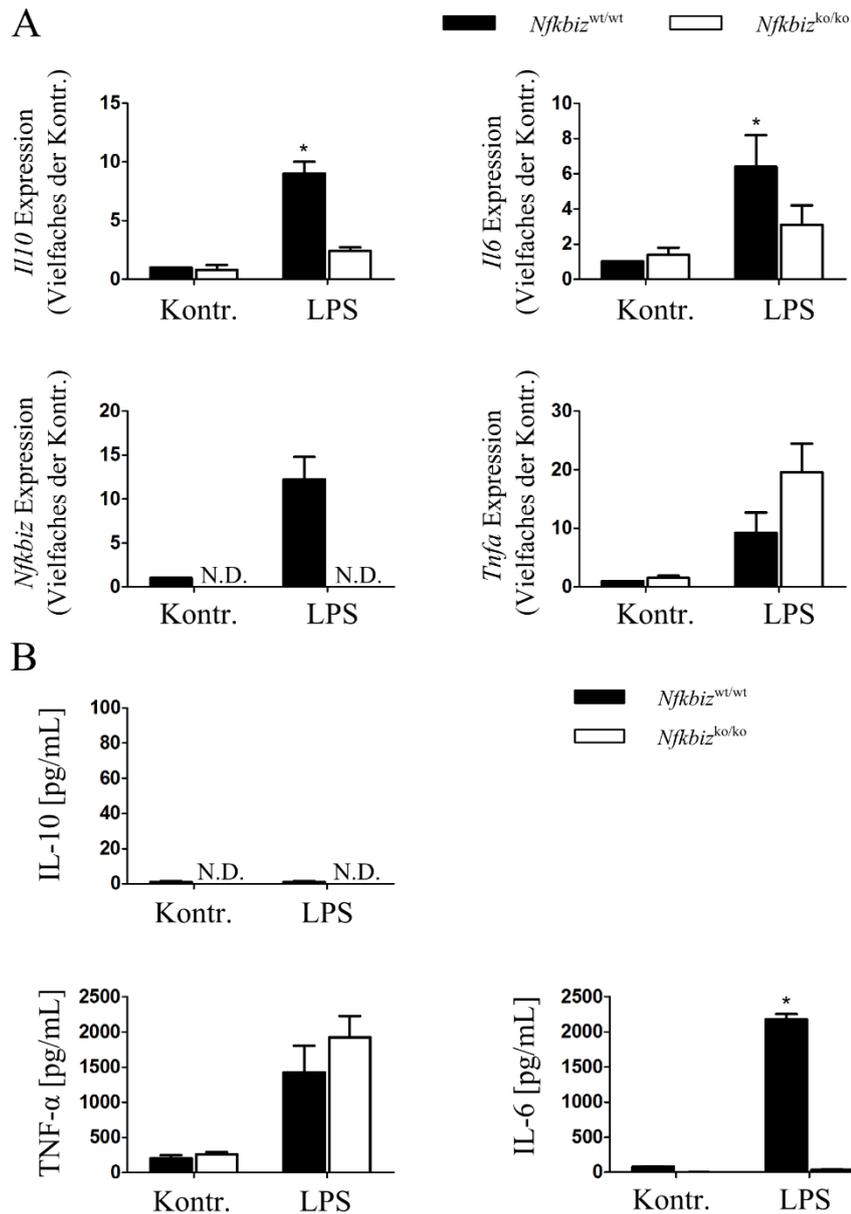
(A) *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> PM und KMM wurden für 5 hrs in Gegenwart von LPS [1 µg/mL] kultiviert. Anschließend wurden die mRNA-Expressionslevel von *Il10*, *Il6*, *Tnfa* und *Gapdh* mittels qRT-PCR bestimmt. (B) *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> PM und KMM wurden für 24 hrs mit Zusatz an IFN-γ [100 ng/mL] kultiviert und anschließend LPS [1 µg/mL] zugegeben und für weitere 5 hrs kultiviert. Es erfolgte die Analyse der mRNA- Expressionslevel für *Il10*, *Il6*, *Tnfa* und *Gapdh* mittels qRT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens vier unabhängigen Experimenten. (\*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0.05$ ) zwischen *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> PM oder KMM an. Diese Abbildung wurde mit geringfügigen Modifikationen bereits in Hörber *et al.* veröffentlicht.<sup>208</sup>

Im nächsten Schritt wurden primäre embryonale Fibroblasten (MEF) aus *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen gewonnen, um die IκBζ Abhängigkeit der *Il10* Genexpression in

weiteren Zelltypen zu untersuchen. Die qRT-PCR Analysen zeigten reduzierte mRNA-Expressionslevel für *Il10* und *Il6* in *Nfkbiz<sup>ko/ko</sup>* MEFs im Vergleich zu den mRNA-Expressionslevel der *Nfkbiz<sup>wt/wt</sup>* MEFs nach LPS-Behandlung. Das *Nfkbiz*-Transkript war in *Nfkbiz<sup>ko/ko</sup>* MEFs nicht nachzuweisen, wurde aber in *Nfkbiz<sup>wt/wt</sup>* MEFs auf das ~15-fache des Ausgangswertes erhöht. Interessanterweise waren die *Tnfa* mRNA-Expressionslevel in *Nfkbiz<sup>ko/ko</sup>* MEFs im Vergleich zu denen in *Nfkbiz<sup>wt/wt</sup>* MEFs nach LPS-Behandlung ebenfalls erhöht. Parallel dazu wurden die Proteinkonzentrationen in den Kulturmedien von LPS- kultivierten MEFs gemessen. Nach 24 hrs LPS-Behandlung konnten in den Kulturüberständen der *Nfkbiz<sup>ko/ko</sup>* MEFs nur sehr geringe IL-6 Konzentrationen gemessen werden, wohingegen bei *Nfkbiz<sup>wt/wt</sup>* MEFs die Menge an sezerniertem IL-6 im Überstand nach LPS-Behandlung stark erhöht war (~80-fach). Die IL-10 Proteinkonzentrationen lagen sowohl in den Überständen der *Nfkbiz<sup>wt/wt</sup>* MEFs als auch *Nfkbiz<sup>ko/ko</sup>* MEFs unterhalb der Detektionsgrenze.

Eine Aussage über die Rolle von I $\kappa$ B $\zeta$  auf die IL-10 Proteinexpression kann daher nicht getroffen werden. Die qRT-PCR Analysen deuten hingegen eindeutig auf eine I $\kappa$ B $\zeta$ -vermittelte IL-10 Expression hin. Die geringe IL-10 Proteinmenge im Überstand begründet sich wahrscheinlich in der Verwendung von Fibroblasten als Zellsystem, da Fibroblasten keine relevanten Mengen an IL-10 sezernieren sollten.

Eine interessante Eigenschaft zeigten die MEFs hinsichtlich der TNF- $\alpha$  Proteinkonzentration im Kulturmedium. Ähnlich den mRNA-Werten wurden für *Nfkbiz<sup>ko/ko</sup>* MEFs nach LPS-Behandlung tendenziell höhere Konzentrationen an TNF- $\alpha$  gemessen, als dies der Fall für *Nfkbiz<sup>wt/wt</sup>* MEFs war. Dieser Effekt steht im Einklang mit der im Anfangsteil beschriebenen erhöhten TNF- $\alpha$  Konzentration im Blutplasma von *Nfkbiz<sup>ko/ko</sup>* C57Bl6 Mäusen nach intraperitonealer LPS-Injektion.

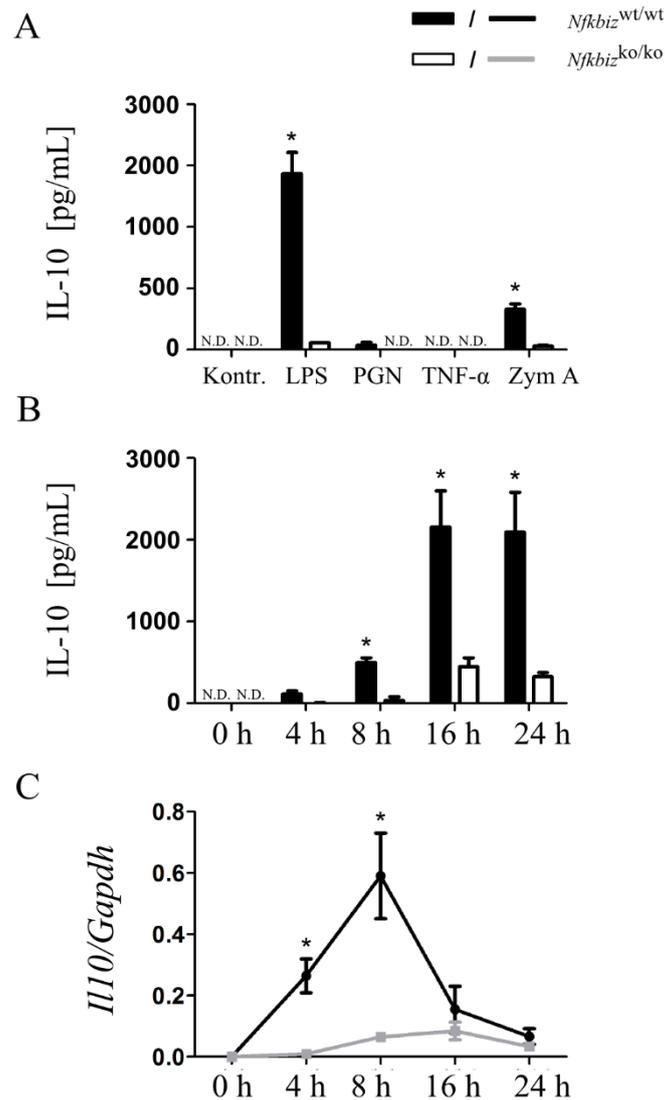


**Abbildung 10:  $Nfkbiz^{ko/ko}$  MEFs zeigen verringerte *Il10* Expressionslevel.**

(A) Embryonale Mausfibroblasten, isoliert aus  $Nfkbiz^{wt/wt}$  und  $Nfkbiz^{ko/ko}$  Embryos an Tag 10,5 *post coitum*, wurden über 5 hrs in Gegenwart von LPS [1  $\mu\text{g/mL}$ ] kultiviert und anschließend die mRNA-Expressionslevel von *Il10*, *Il6*, *Nfkbiz*, *Tnfa* und *Gapdh* mittels qRT-PCR bestimmt. (B)  $5 \times 10^5$   $Nfkbiz^{wt/wt}$  und  $Nfkbiz^{ko/ko}$  MEFs wurden über 24 hrs in Gegenwart von LPS [1  $\mu\text{g/mL}$ ] in 1 mL MEF-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Proteinkonzentrationen von IL-10, IL-6 und TNF- $\alpha$  in den Kulturüberständen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. (\*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen  $Nfkbiz^{wt/wt}$  und  $Nfkbiz^{ko/ko}$  MEF an. N.D., nicht detektiert. Teile dieser Abbildung wurden mit geringfügigen Modifikationen bereits in Hörber *et al.* veröffentlicht.<sup>208</sup>

### 3.3.2. Die Interleukin-10 Proteinexpression von *Nfkbiz*-defizienten Knochenmarksmakrophagen ist vermindert

Um die Relevanz der  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -abhängigen *I110* Genexpression in Makrophagen auf IL-10 Proteinsekretion zu übertragen, wurden im Folgenden die Proteinlevel von KMM nach Antigenstimulation untersucht. *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM wurden in Gegenwart von LPS, PGN oder TNF- $\alpha$  kultiviert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Zymosan A (Zym A) stimuliert, bei dem es sich um ein Polymer aus Pilzen handelt, das ebenfalls an den TLR2 bindet und diesen aktiviert. Zym A ist als IL-10 Induktor in Makrophagen etabliert und daher zur Analyse der Abhängigkeit der IL-10 Expression von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  geeignet.<sup>209</sup> Nach 24 hrs Inkubation in Gegenwart von LPS, PGN, TNF- $\alpha$  oder Zym A wurden die Zellkulturmedien der Makrophagen abgenommen und die IL-10 Proteinkonzentrationen mit Hilfe des *Cytometric Bead Array* (CBA) Systems durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 11A). Zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der *I110*/IL-10 Expression wurden *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM über 24 hrs in Gegenwart von LPS kultiviert und zu den angezeigten Zeitpunkten sowohl die IL-10 Proteinkonzentration im Kulturmedium (Abbildung 11B) als auch das Genexpressionslevel von *I110* bestimmt (Abbildung 11C).



**Abbildung 11: IL-10 Expression ist in *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM vermindert.**

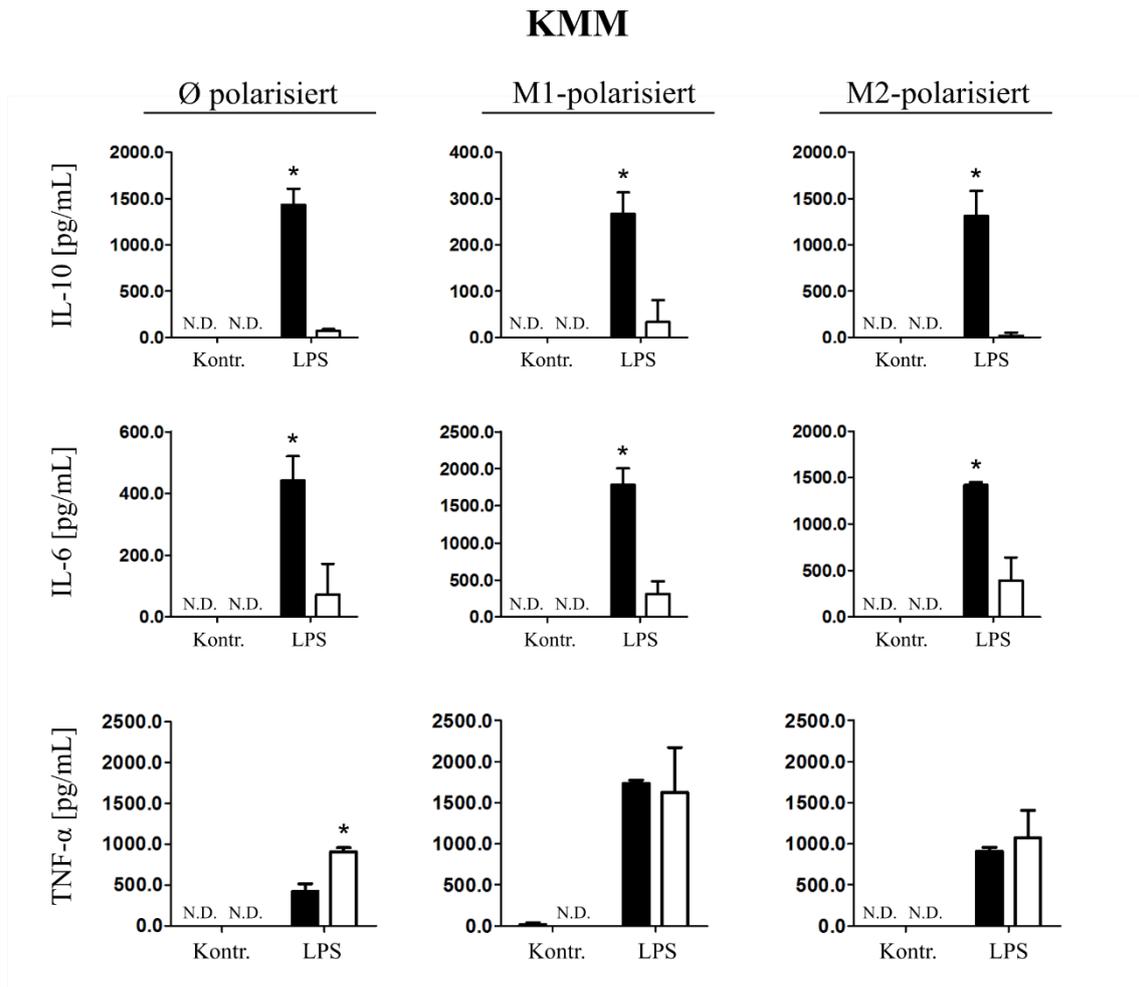
(A)  $5 \times 10^5$  *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM wurden in 1 mL KMM Medium für 24 hrs in Gegenwart von LPS [1  $\mu$ g/mL], PGN [1  $\mu$ g/mL], TNF- $\alpha$  [25 ng/mL] oder Zym A [1  $\mu$ g/mL] kultiviert. Anschließend wurden die IL-10 Proteinkonzentrationen in den Kulturüberständen bestimmt. (B)  $5 \times 10^5$  *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM wurden in 1 mL KMM Medium für 24 hrs in Gegenwart von LPS [1  $\mu$ g/mL] kultiviert und anschließend die IL-10 Proteinkonzentrationen zu den angegebenen Zeitpunkten in den Überständen bestimmt. (C)  $5 \times 10^5$  *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM wurden in 1 mL KMM Medium für 24 hrs in Gegenwart von LPS [1  $\mu$ g/mL] kultiviert und anschließend die Expressionslevel von *I110* und *Gapdh* zu den angegebenen Zeitpunkten mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. (\*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0.05$ ) zwischen *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM an. N.D., nicht detektiert. Diese Abbildung wurde mit geringfügigen Modifikationen bereits in Hörber *et al.* veröffentlicht.<sup>208</sup>

Die durchflusszytometrisch bestimmten IL-10 Proteinkonzentrationen in den Kulturüberständen der KMM bestätigten die I $\kappa$ B $\zeta$ -abhängige Expression, die bereits für die *Il10* Genexpression mittels qRT-PCR nach 5 hrs LPS Kultivierung beobachtet wurde. LPS-kultivierte *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM zeigten geringere IL-10 Proteinkonzentrationen im Vergleich zu *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> KMM in den jeweiligen Kulturüberständen. Nach ungefähr 8 hrs konnten die höchsten Expressionslevel von *Il10* bestimmt werden, wohingegen nach 16-24 hrs Maximalwerte für die IL-10 Proteinkonzentration gemessen wurden (Abbildung 11B und C). Unter den unterschiedlichen Stimuli zählt LPS zu den potentesten IL-10 Induktoren. Zym A-stimulierte KMM zeigten dazu im Vergleich eine verringerte (8-10-fach) IL-10 Proteinkonzentration im Kulturüberstand. PGN führte nur bei *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> KMM, nicht aber bei *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM zu einer messbaren IL-10 Proteinkonzentration im Überstand, wohingegen die IL-10 Proteinkonzentration im Kulturmedium der mit TNF- $\alpha$  stimulierten KMM unterhalb der Detektionsgrenze blieb. In *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> KMM führten LPS, Zym A und PGN zu höheren IL-10 Proteinkonzentrationen als in *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM.

Die I $\kappa$ B $\zeta$ -abhängige IL-10 Proteinexpression von KMM ist somit im Einklang mit den Daten zur I $\kappa$ B $\zeta$ -vermittelten *Il10* Genexpression.

### **3.3.3. Die Polarisierung der Makrophagen hat keinen Einfluss auf die Regulation der IL-10 Proteinsekretion**

In vorausgehenden Arbeiten zur I $\kappa$ B $\zeta$ -vermittelten Genexpression wurden IFN- $\gamma$  vorbehandelte und naive PM und KMM verwendet. Für beide Aktivierungszustände konnte die I $\kappa$ B $\zeta$ -abhängige *Il10* Genexpression gezeigt werden (siehe Abbildungen 9A und B). Im Folgenden wurde daher untersucht, ob die Polarisierung der KMM Einfluss auf die I $\kappa$ B $\zeta$ -vermittelte IL-10 Proteinexpression hat. Hierzu wurden *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM 24 hrs ohne Zusatz oder in Gegenwart von IFN- $\gamma$  (M1-Polarisierung) oder IL-4 (M2-Polarisierung) kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit LPS und nach weiteren 24 hrs wurde die Proteinkonzentration von IL-10 im Kulturüberstand ermittelt. Auch hier wurde wieder als Positiv- bzw. Negativkontrolle für I $\kappa$ B $\zeta$ -regulierte Proteine die Proteinkonzentration von IL-6 bzw. TNF- $\alpha$  bestimmt.



**Abbildung 12: Die Regulation der IL-10 Proteinexpression durch IκBζ ist unabhängig vom Polarisierungsstatus der PM und KMM.**

*Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> (schwarze Balken) und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> (weiße Balken) KMM wurden entweder unbehandelt belassen (Ø polarisiert) oder für 24 hrs mit IFN-γ [25 ng/mL] (M1-polarisiert) oder IL-4 [100 ng/mL] (M2-polarisiert) in jeweils 1 mL KMM Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die Kultivierung für weitere 24 hrs in Gegenwart von LPS [1 µg/mL]. Die IL-10, IL-6 und TNF-α Protein-konzentrationen wurden mittels *Cytometric Bead Array* (CBA) System in den Kulturüberständen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten. (\*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0.05$ ) zwischen *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM an. N.D., nicht detektiert. Diese Abbildung wurde mit geringfügigen Modifikationen bereits in Hörber *et al.* veröffentlicht.<sup>208</sup>

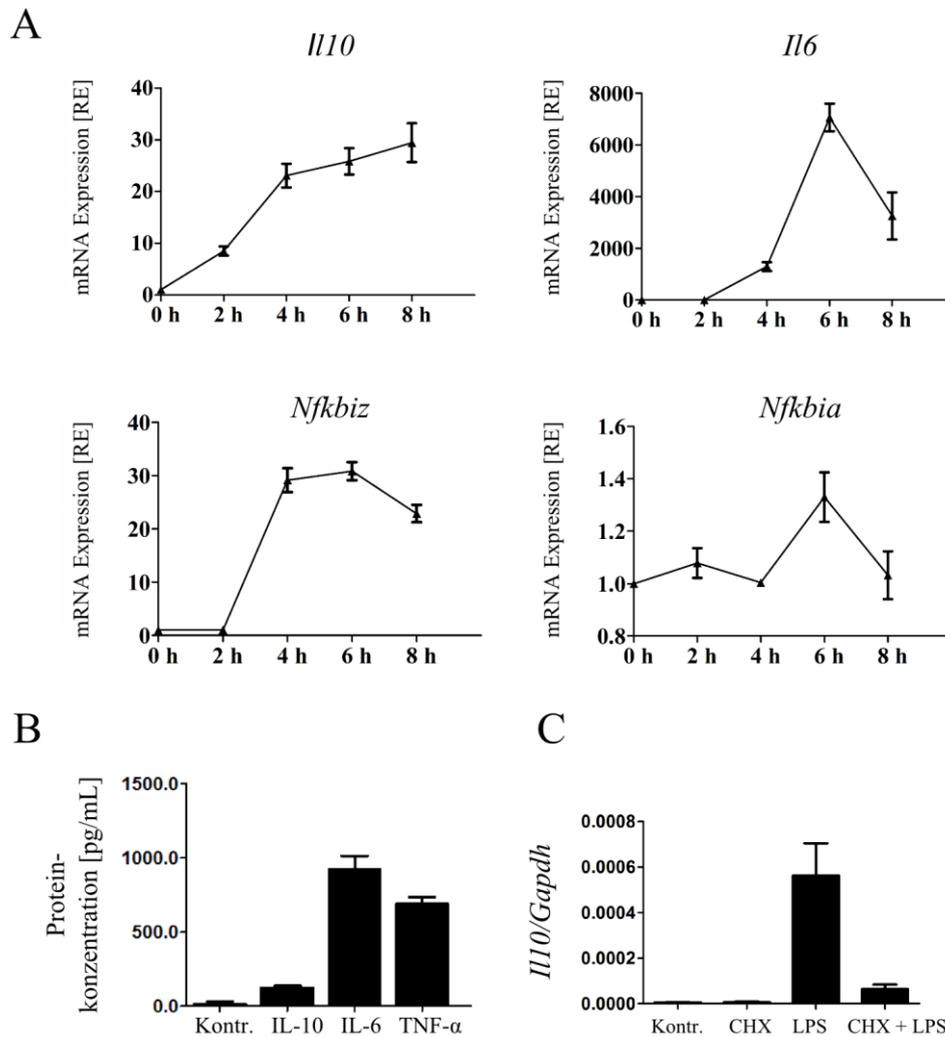
*Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM sezernierten deutlich geringere Mengen an IL-10 als *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> KMM. Diese Beobachtung konnte für M1- und M2-polarisierte, als auch für naive KMM gemacht werden. Wie erwartet, fanden sich im Kulturüberstand der *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM außerdem deutlich geringere Mengen IL-6 als im Überstand der *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> KMM. Die

TNF- $\alpha$  Proteinkonzentrationen in den Kulturüberständen der M1- oder M2-polarisierten *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM zeigten keine Unterschiede. Interessanterweise fand sich für naive KMM nach LPS-Stimulation eine signifikant erhöhte TNF- $\alpha$  Proteinkonzentration im Überstand der *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM im Vergleich zu *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> KMM. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der erhöhten TNF- $\alpha$  Proteinkonzentration *in vivo* nach intraperitonealer LPS/Zym A Injektion (Kapitel 3.1) und der leicht erhöhten TNF- $\alpha$  Proteinkonzentration im Kulturüberstand von *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> MEFs (Kapitel 3.3.1). In Übereinstimmung mit den erhöhten Expressionslevel M1 assoziierter Gene in naiven *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM (Kapitel 3.1) ist TNF- $\alpha$  als Marker für M1-polarisierte Makrophagen beschrieben.<sup>210</sup>

### 3.3.4. Raw264.7 Makrophagen als Modellsystem zur Untersuchung des Einflusses von I $\kappa$ B $\zeta$ auf die *Il10*/IL-10 Expression

Zur weiteren Analyse der I $\kappa$ B $\zeta$ -vermittelten Regulation der *Il10*/IL-10 Expression wurde die Raw264.7 Makrophagen-Zelllinie verwendet. Raw264.7 Makrophagen wurden mit LPS stimuliert und die mRNA-Expressionslevel von *Nfkbiz* und *Il10* über einen Zeitraum von 8 hrs bestimmt. Abhängig von der Dauer der Stimulation wurden für beide Gene erhöhte Expressionslevel gemessen, die vergleichbar mit denjenigen in KMM waren (Abbildung 13A). Die Raw264.7 Makrophagen sezernierten infolge der Stimulation mit LPS auch IL-10 in den Kulturüberstand. Die Menge an IL-10 im Überstand der Raw264.7 Makrophagen entsprach etwa 1/5 der IL-10 Proteinkonzentration im Vergleich zu LPS-stimulierten KMM. Vergleichbare Beobachtungen konnten für die IL-6 und TNF- $\alpha$  Sekretion der Raw264.7 Makrophagen gemacht werden (Abbildung 13B).

Die Resultate belegen, dass eine geeignete Stimulation in der Raw264.7 Zelllinie die Expression von *Nfkbiz*/I $\kappa$ B $\zeta$  und *Il10*/IL-10 induzieren kann. Die Raw264.7 Zelllinie wurde daher als Modellsystem zur Untersuchung der I $\kappa$ B $\zeta$ -regulierten Genexpression und speziell der I $\kappa$ B $\zeta$ -vermittelten *Il10*/IL-10 Expression verwendet.



**Abbildung 13: *Il10* mRNA und IL-10 Proteinexpression in Raw264.7 Makrophagen**

(A) Raw264.7 Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 hrs in Gegenwart von LPS [1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] kultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten die mRNA-Expressionslevel von *Il10*, *Il6*, *Nfkbiz* und *Nfkbia* mittels qRT-PCR bestimmt. (B)  $5 \times 10^5$  Raw264.7 Zellen wurden in 1 mL Raw264.7 Medium für 24 hrs mit LPS [1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] kultiviert und anschließend die IL-10 Proteinkonzentration im Überstand bestimmt. (C)  $1 \times 10^6$  Raw264.7 Zellen wurden für 20 min in Gegenwart von Cycloheximid (CHX, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) kultiviert und anschließend mit LPS [1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] für 6 hrs aktiviert oder ohne Zusatz weiterhin in Raw264.7 Medium kultiviert. *Il10* und *Gapdh* Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

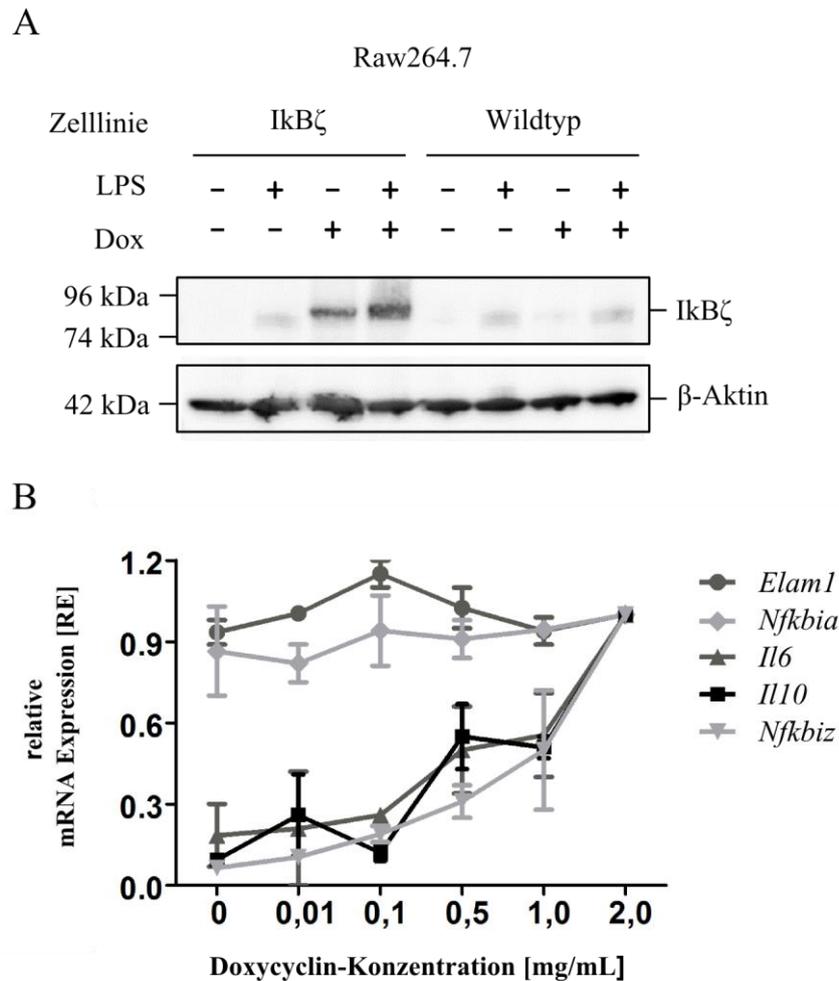
Da die bisherigen Versuche gezeigt haben, dass  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  für die *Il10* Expression essentiell ist, sollte eine Hemmung der  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  Proteinbiosynthese ebenfalls den Anstieg der *Il10* Genexpression verhindern. Dazu wurden Raw264.7 Makrophagen vor LPS-Stimulation mit dem Translationshemmstoff Cycloheximid (CHX) kultiviert. Die Hemmung der

Proteinsynthese durch CHX blockierte die Synthese der *Il10* mRNA nahezu vollständig (Abbildung 12C, *CHX+LPS*). Voraussetzung für die Genexpression von *Il10* ist also die Neusynthese mindestens eines Proteins.

### 3.3.5. Überexpression von IκBζ induziert die *Il10* Genexpression

Bisher wurde gezeigt, dass der funktionelle *Knockout* des *Nfkbiz* Genlokus zu stark reduzierter IL-10 mRNA- und Proteinexpression führt. Im Anschluss sollte die Frage beantwortet werden, ob im Rückschluss die Überexpression von IκBζ hinreichend für die Induktion von IκBζ-Zielgenen ist. Dazu wurden Raw264.7 Makrophagen mit einem Vektor zur Doxycyclin-regulierbaren Expression von IκBζ transfiziert und mittels Selektion die stabile Zelllinie Raw264.7-TetOn-IκBζ erzeugt.

Western Blot Analysen bestätigten die Doxycyclin-abhängige Expression von IκBζ in Raw264.7-TetOn-IκBζ Makrophagen (Abbildung 14A). Die Kultivierung dieser Makrophagen mit Doxycyclin induzierte die IκBζ Expression, genauso wie die alleinige Stimulation mit LPS ebenfalls zu einer schwachen Expression von IκBζ führte. Die Kombination der Kultivierung von Raw264.7-TetOn-IκBζ Makrophagen mit Doxycyclin und LPS verstärkte nochmals die Expression von IκBζ im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Doxycyclin. Dies ist möglicherweise auf die Stabilisierung der *Nfkbiz* mRNA nach LPS-Stimulation zurückzuführen.<sup>211</sup> In den Raw264.7-TetOn-IκBζ Makrophagen korrelierten die Doxycyclin-induzierten Expressionslevel der *Nfkbiz* mRNA sehr genau mit dem Expressionslevel der mRNA von *Il10* und *Il6*. Die Expression der direkten NF-κB-Zielgene *Elam1* und *Nfkbia* wurde durch Doxycyclin nicht beeinflusst (Abbildung 14B). Die Doxycyclin-induzierbare ektopische Expression von IκBζ war somit hinreichend, um die Expression von IκBζ-Zielgenen, insbesondere von *Il10* und *Il6*, zu induzieren.



**Abbildung 14: Ektopische IkB $\zeta$ -Expression in Raw264.7-TetOn-IkB $\zeta$  Zellen induziert *Il10* Genexpression.**

(A) Raw264.7 Zellen wurden modifiziert um die Doxycyclin (Dox)-induzierbare Expression von IkB $\zeta$  zu ermöglichen. Die daraus resultierende Zelllinie Raw264.7-TetOn-IkB $\zeta$  (im Schaubild IkB $\zeta$ ) und Raw264.7 Makrophagen (im Schaubild Wildtyp) wurden in Gegenwart von 2  $\mu$ g/mL Doxycyclin für 24 hrs kultiviert und zur Überprüfung der IkB $\zeta$  Expression mittels Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen IkB $\zeta$  und  $\beta$ -Aktin analysiert. (B) Raw264.7-TetOn-IkB $\zeta$  Makrophagen wurden für 24 hrs mit Zusätzen an Doxycyclin kultiviert und anschließend die Expressionslevel von *Elam1*, *Nfkb1a*, *Il6*, *Il10* und *Nfkbiz* mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt ist das Expressionslevel des jeweiligen Gens als relative Einheit (RE) aus drei unabhängigen Experimenten; ermittelte Expressionslevel von Proben, die mit Doxycyclin [2  $\mu$ g/mL] kultiviert wurden, wurden als 1 RE gesetzt. Diese Abbildung wurde mit geringfügigen Modifikationen bereits in Hörber *et al.* veröffentlicht.<sup>208</sup>

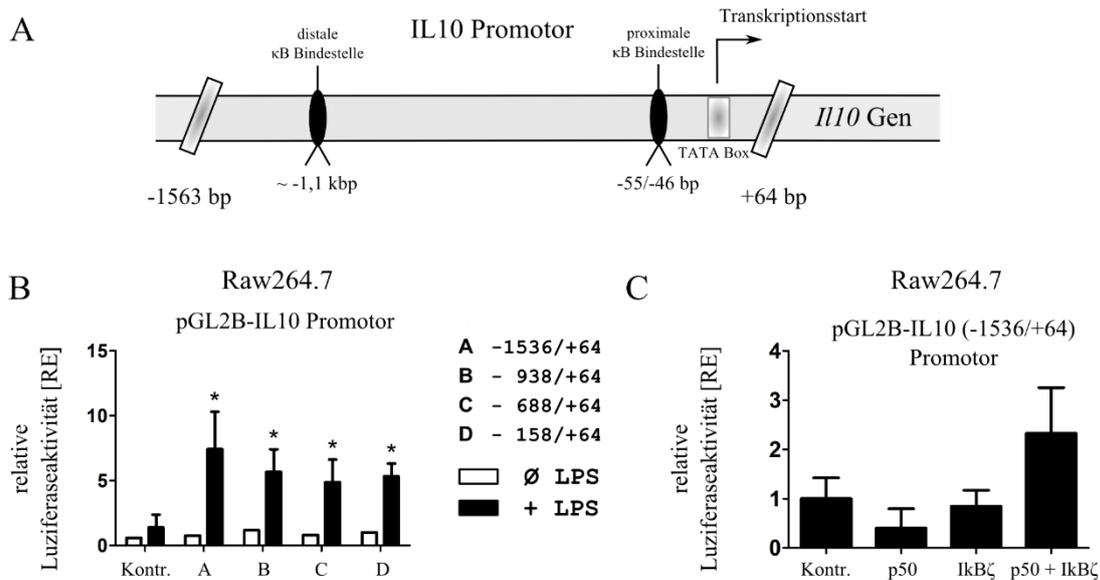
### 3.4. I $\kappa$ B $\zeta$ -reguliert den IL-10 Promotor<sup>D</sup>

Die bisher erzielten Daten deuten auf eine strikte Regulation der *Il10*/IL-10 Expression durch I $\kappa$ B $\zeta$  hin. In den nachfolgenden Experimenten wurden deshalb die zugrundeliegenden Mechanismen untersucht.

Zur Analyse der I $\kappa$ B $\zeta$ -vermittelten IL-10 Genregulation wurden Raw264.7 Makrophagen mit Luziferase-Reportergenkonstrukten transfiziert, die den murinen IL-10 Promotor (-1536/+64) oder verkürzte Abschnitte des IL-10 Promotors enthielten. Bei allen Reportergenkonstrukten zeigten die Lysate der transfizierten Raw264.7 Makrophagen nach LPS Stimulation erhöhte Luziferaseaktivität (Abbildung 15B). Da die distal verkürzten Reportergenkonstrukte ähnliche Aktivitäten aufwiesen, erfolgt die LPS-vermittelte Aktivierung des IL10-Promotors über den proximalen Bereich.

In weiteren Reportergenexperimenten wurden Raw264.7-Zellen mit dem murinen IL-10 Promotorkonstrukt (158/+64) allein oder in Kombination mit Vektoren zur Expression von I $\kappa$ B $\zeta$ , p50 oder I $\kappa$ B $\zeta$ &p50 transfiziert (Abbildung 15C). Die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  oder p50 rief keine Reporterexpression des IL-10 Promotorkonstrukts hervor. Vielmehr reduzierte die Expression von p50 die Reporteraktivität. Dies ist in Übereinstimmung mit Daten, die p50:p50 Homodimere als klassische Repressoren der NF- $\kappa$ B-vermittelten Genexpression beschreiben.<sup>212</sup> Die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  hingegen zeigte weder aktivierende noch inhibierende Effekte auf die IL-10 Promotor regulierte Luziferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle (pcDNA4-Leervektor).

<sup>D</sup> Teile dieses Abschnitts wurden bereits modifiziert in Hörber et al.<sup>286</sup> veröffentlicht.

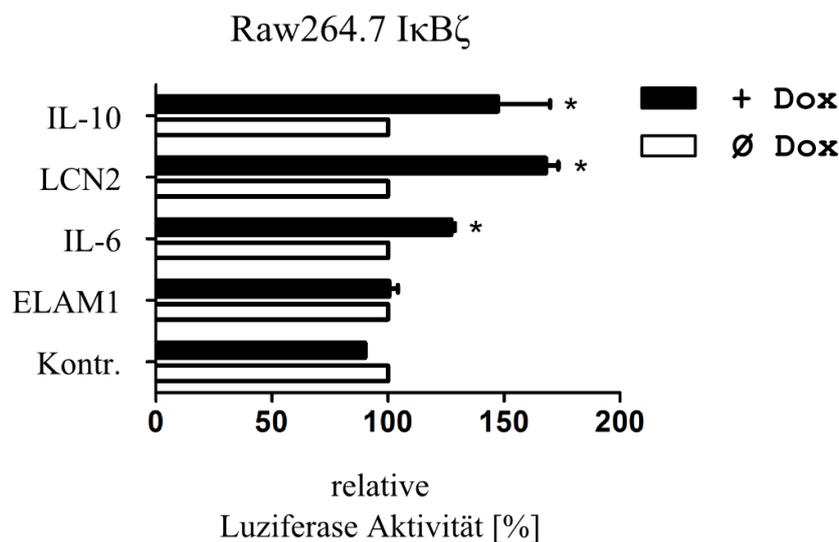


**Abbildung 15: IκBζ reguliert den murinen IL-10 Promotor.**

(A) Vereinfachte Darstellung des murinen IL10-Promotors. Der untersuchte Promotorbereich umfasst die Sequenzen von -1563 bp bis +64 bp bezogen auf den Transkriptionsstart des *Il10* Gens. Schwarzovale Strukturen kennzeichnen die κB Bindestellen im IL-10 Promotor. (B) Raw264.7 Makrophagen wurden transient mit pGL2b-IL-10 Promotorkonstrukten und einem Kontrollkonstrukt (Renilla-Luziferase) transfiziert und für 24 hrs in An- oder Abwesenheit von LPS [1 µg/mL] kultiviert. Die *Firefly*-Luziferaseaktivitäten wurden gemessen und auf die gemessene Renilla-Luziferaseaktivität normiert. Dargestellt ist die relative Luziferaseaktivität als Mittelwert ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. (\*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0.05$ ) zwischen LPS-stimulierten und nicht stimulierten Raw264.7 Makrophagen an. (C) Raw264.7 Makrophagen wurden transient mit entsprechenden Mengen an pGL2basic, pcDNA4-p50 oder pcDNA4-HA-IκBζ mit pGL2b-IL-10(-158/+64) Promotor kotransfiziert und mit LPS [1 µg/mL] für 24 hrs kultiviert. Die *Firefly*-Luziferaseaktivität wurde in den entsprechenden Lysaten gemessen und auf die gemessene Aktivität des Renilla-Konstrukts normalisiert. Dargestellt ist die relative Luziferaseaktivität als Mittelwert ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Diese Abbildung wurde mit geringfügigen Modifikationen bereits in Hörber *et al.* veröffentlicht.<sup>208</sup>

Bei Kotransfektion der Raw264.7 Makrophagen mit IκBζ und p50 konnte nach LPS Stimulation eine 2-3-fache Erhöhung der relativen Luziferaseaktivität des IL-10 Promotorkonstrukts im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden, ein Hinweis auf die p50:p50:IκBζ Komplex vermittelte Aktivierung des IL-10 Promotors. Die mittels Reportgenanalysen gewonnenen Daten zeigen folglich, dass *in vitro* nur das Zusammenspiel von IκBζ und p50, nicht aber die einzelnen Proteine, zu einer Aktivierung des IL-10 Promotors führen und sind somit im Einklang mit der beschriebenen Interaktion von p50:p50 Homodimeren und IκBζ. Als nächstes wurde untersucht, ob die alleinige

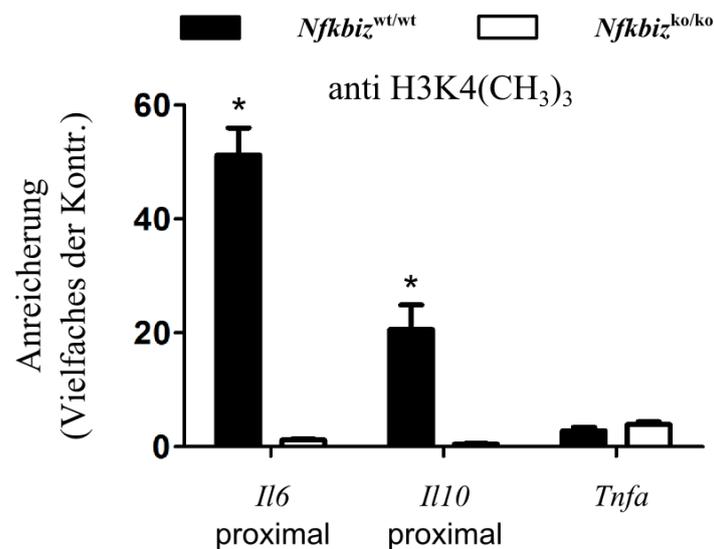
Überexpression von I $\kappa$ B $\zeta$  ausreichend ist, um eine erhöhte IL-10 Promotor Reporterogenaktivität zu erzielen. Dazu wurde die Doxycyclin-induzierbare Raw264.7-TetOn-I $\kappa$ B $\zeta$  Zelllinie verwendet. Die transiente Transfektion dieser Zellen mit dem IL-10 Promotor (-158/+64) und anschließender Doxycyclin-induzierter I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression führte dabei zu einer Erhöhung (~150 %) der relativen Luziferaseaktivität des IL-10 Promotorkonstruktes im Vergleich zu den ebenfalls mit dem IL-10 Promotorkonstrukt transfizierten, aber nicht Doxycyclin-kultivierten Raw264.7-TetOn-I $\kappa$ B $\zeta$  Zellen. Als Positivkontrollen dienten die Promotorkonstrukte der I $\kappa$ B $\zeta$ -Zielgene Lipocalin-2 (*Lcn2*, 170 %) und IL-6 (130 %), die ebenfalls durch alleinige I $\kappa$ B $\zeta$ -Überexpression erhöhte Reporterogenaktivität zeigten im Vergleich zu nicht Doxycyclin-kultivierten Zellen.



**Abbildung 16: I $\kappa$ B $\zeta$ -Expression führt zu erhöhter IL-10 Promotoraktivität.**

Raw264.7-TetOn-I $\kappa$ B $\zeta$  Makrophagen (Raw264.7 I $\kappa$ B $\zeta$ ) wurden transient mit entsprechenden Mengen an pGL2b-IL-10(-158/+64) Promotor Reportergenkonstrukt und LCN-2, ELAM-1 oder IL-6 Promotorkonstrukten oder einem Kontrollkonstrukt kotransfiziert und mit LPS für 24 hrs kultiviert. Danach wurde die ektopische Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  durch Zugabe von Doxycyclin für 24 hrs induziert. Die Luziferase-Aktivität wurde anschließend gemessen und gegen die Renilla-Aktivität normalisiert. Den nicht Doxycyclin-behandelten Makrophagen wurde jeweils 100 % Aktivität zugeordnet (weiße Balken). Dargestellt ist die relative Luziferaseaktivität bezogen auf nicht Doxycyclin-stimulierte Makrophagen als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. (\*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0.05$ ) zwischen Doxycyclin stimulierten und unbehandelten Raw264.7-TetOn-I $\kappa$ B $\zeta$  Zellen an. Diese Abbildung wurde mit geringfügigen Modifikationen bereits in Hörber *et al.* veröffentlicht.<sup>208</sup>

Als Negativkontrolle wurden Reporterkonstrukte für den ELAM-1 Promotor und ein Kontrollplasmid (pcDNA4-Kontrollkonstrukt) transient transfiziert, die wie zu erwarten vergleichbare relative Luziferaseaktivitäten mit und ohne Doxycyclin-Zugabe zeigten (Abbildung 16).



**Abbildung 17: Die H3K4-Trimethylierung am IL-10 Promotor ist in *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM vermindert.**

ChIP-Analysen wurden unter Verwendung spezifischer H3K4-Trimethyl Antikörper mit *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM, die zuvor 5 hrs in Gegenwart von LPS kultiviert wurden, durchgeführt. Mittels qRT-PCR Analyse der aus Chromatin gewonnenen DNA und der Verwendung der ChIP-Oligonukleotide für *Il6*, *Il10* und *Tnfa* wurde der Grad der Trimethylierung von H3K4 am IL-10/IL-6/TNF- $\alpha$  Promotor bestimmt. Dargestellt ist die Anreicherung der H3K4-Trimethylierung am entsprechenden Promotorabschnitt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. (\*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0.05$ ) zwischen LPS-stimulierten *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM an. Diese Abbildung wurde mit geringfügigen Modifikationen bereits in Hörber *et al.* veröffentlicht.<sup>208</sup>

Um den Einfluss von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  auf die Aktivierung der Transkription durch Regulation des Präinitiationskomplexes zu untersuchen, wurde der Grad der Trimethylierung von Histon H3 an Lysin 4 (H3K4me<sub>3</sub>) im Promotorbereich der jeweiligen Zielgene bestimmt. Um diesen von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -Zielgenen zu bestimmen, wurden von LPS-stimulierten und unbehandelten *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM Chromatinimmunopräzipitations (ChIP)-Analysen mit Antikörpern gegen trimethyliertes H3K4 durchgeführt. Die ChIP-Analysen

ergaben eine relative Anreicherung (~20-fach) der H3K4-Trimethylierung an der proximalen  $\kappa$ B-Bindestelle des IL-10 Promotors von LPS-stimulierten *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> KMM im Vergleich zu Kontroll-*Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> KMM (Abbildung 17). Wie zu erwarten war bei LPS-stimulierten *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM keine Anreicherung am proximalen IL-10 Promotorbereich zu beobachten. Die H3K4-Trimethylierung zeigte ebenfalls eine Anreicherung an der proximalen  $\kappa$ B-Bindestelle des IL-6 Promotors (~50-fach) bei LPS-stimulierten *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup>, nicht aber bei *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM. Im Gegensatz dazu zeigten die qRT-PCR Analysen unter Verwendung von Oligonukleotiden für die proximale  $\kappa$ B Bindestelle des TNF- $\alpha$  Promotors sowohl für LPS-stimulierte *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> KMM als auch für LPS-stimulierte *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> KMM vergleichbare Werte.

Zusammenfassend zeigen die gewonnenen Daten, dass  $\kappa$ B $\zeta$  in Kombination mit p50:p50 Homodimeren den IL-10 Promotor aktivieren, direkt die H3K4-Trimethylierung an Promotorbereichen entsprechender Zielgene modifizieren und damit die Expression dieser Zielgene beeinflussen kann.

## 4 Diskussion

Die Aktivierung und Steuerung der Immunantwort erfordert eine präzise Regulation. Besonders dem angeborenen Immunsystem kommt hierbei eine Schlüsselrolle zu, da es maßgeblich an der Erkennung und Beseitigung von Erregern beteiligt ist und die Aktivierung der hochspezifischen erworbenen Immunantwort einleitet. Neben der Abwehr von eindringenden Erregern kommt dem angeborenen Immunsystem ebenso eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und der Regulation von Wundheilungsprozessen zu.

Eine zentrale Rolle dabei spielt in Immunzellen auf molekularer Ebene der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B. Die genregulatorischen Eigenschaften von NF- $\kappa$ B sind beispielhaft für die Vielzahl der Regulationsmöglichkeiten der Genexpression und spiegeln damit auch den unmittelbaren Einfluss auf komplexe physiologische Abläufe wider. Im Laufe der Jahre wurden zahlreiche NF- $\kappa$ B regulierende Proteine identifiziert und deren Wirkung auf die NF- $\kappa$ B-abhängige Genexpression aufgeklärt. Man kann heutzutage erklären, weshalb Stimulus- und Zelltyp-abhängig nur sehr genau definierte Gengruppen aktiviert werden, obwohl NF- $\kappa$ B grundsätzlich die Expression einer sehr großen Anzahl von Genen aktivieren kann. Die Entdeckung der atypischen Inhibitorproteine von NF- $\kappa$ B erweiterte zusätzlich das Verständnis der verschiedenen Regulationsebenen der NF- $\kappa$ B-vermittelten Genexpression. Da diese Proteine nicht konstitutiv, sondern stimulusabhängig und zudem nur in spezifischen Zelltypen exprimiert werden, wird mit ihrer Expression eine sehr präzise Genregulation und damit verbundene spezifische Immunantwort erzielt.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit befassen sich mit einem Vertreter der atypischen I $\kappa$ B Proteine, namentlich I $\kappa$ B $\zeta$ , und dessen Einfluss auf die Genexpression. Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass I $\kappa$ B $\zeta$  für die Genexpression einiger entzündungsfördernder Faktoren essentiell ist. Zum ersten Mal konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass I $\kappa$ B $\zeta$  auch die Expression eines entzündungshemmenden Faktors reguliert.

## 4.1. I $\kappa$ B $\zeta$ reguliert die *Il10/IL-10* Expression

Die phänotypischen Eigenschaften *Nfkbiz*-defizienter Mäuse, die auf entzündungshemmende Effekte von I $\kappa$ B $\zeta$  schließen lassen, konnten bisher nicht in kausalen Zusammenhang mit der Expression bekannter I $\kappa$ B $\zeta$ -abhängiger Gene gebracht werden. Daher wurden die Analysen auf die Expression entzündungshemmender Gene ausgeweitet. Diese Analysen identifizierten IL-10, das bekannteste und potenteste entzündungshemmende Zytokin, als neues I $\kappa$ B $\zeta$ -reguliertes Zielgen.

### 4.1.1. Etablierung eines Zellsystems zur Untersuchung der I $\kappa$ B $\zeta$ -vermittelten Genexpression

Aus Vorarbeiten und zahlreichen Publikationen zu I $\kappa$ B $\zeta$  ist bekannt, dass entzündungsfördernde Substanzen in Zellen der Makrophagen/Monozyten-Linie eine erhöhte *Nfkbiz*-Expression hervorrufen. Zugleich gehören Makrophagen zu den potentesten IL-10 sezernierenden Zellen, die als hauptverantwortlich für IL-10-vermittelte Effekte angesehen werden und zentraler Bestandteil der zellulären angeborenen Immunantwort sind (siehe Kapitel 1.5.4). Daher wurden Peritoneal- (PM) und Knochenmarksmakrophagen (KMM) aus *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen isoliert und als Modellsystem für die vorliegenden Untersuchungen etabliert. Die Identifizierung und Charakterisierung dieser Zellen erfolgte mittels Detektion der für makrophagenartige Zellen charakteristischen Oberflächenmarker. In früheren Untersuchungen wurde bereits die Funktionalität der isolierten PM und KMM hinsichtlich klassischer makrophagentypischer Effektorfunktionen verifiziert. Bei keinen der genannten Charakteristika konnten Genotyp-abhängige Unterschiede zwischen *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Makrophagen festgestellt werden (Abbildung 7A). Die isolierten PM und KMM waren somit als Modellsystem zur Untersuchung der Genexpressionsregulation durch I $\kappa$ B $\zeta$  und speziell für Untersuchungen zur Regulation der IL-10 Expression geeignet.

### 4.1.2. *Il10/IL-10* Genexpression ist von I $\kappa$ B $\zeta$ abhängig

PM und KMM aus *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen wurden in Gegenwart entzündungsfördernder Substanzen kultiviert und die Genexpression analysiert. Die

Analysen ergaben einheitlich verminderte *Il10* mRNA Level in *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> PM und KMM im Vergleich zu *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> PM und KMM (Abbildung 9). Diese Ergebnisse wurden insbesondere mit der entzündungsfördernden Substanz LPS erzielt, die sowohl die *Nfkbiz* Expression als auch die IL-10 Sekretion am stärksten induzierte (Abbildungen 8 und 11A). Weitere entzündungsfördernde Substanzen wie PGN, IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  führten nur zu einer gering erhöhten Expression von *Nfkbiz* und standen daher bei den Untersuchungen I $\kappa$ B $\zeta$ -vermittelter Effekte nicht im Vordergrund.

Die Abhängigkeit der *Il10* Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  konnte sowohl für naive Makrophagen als auch unabhängig von der Vorbehandlung (M1- oder M2-Polarisierung) der Population (PM oder KMM) an Makrophagen gezeigt werden. Dies ist hervorzuheben, da die I $\kappa$ B $\zeta$ -vermittelte Expression von *Il6* nur bei bestimmten Polarisierungen und Subtypen der Makrophagen zu beobachten ist.<sup>77</sup> Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die *Il10* Expression, wenn sie durch einen entzündungsfördernden Stimulus ausgelöst wird, in PM und KMM streng I $\kappa$ B $\zeta$ -abhängig und unabhängig vom jeweiligen Aktivierungszustand der Makrophagen ist. Dagegen wird beispielsweise die Abhängigkeit von I $\kappa$ B $\zeta$  bei der Expression von *Il6* durch die Makrophagenpopulation und deren Aktivierungszustand beeinflusst.<sup>77</sup>

Weitere Hinweise auf eine Abhängigkeit der Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  ergaben Untersuchungen an genmodifizierten Raw264.7-TetOn-I $\kappa$ B $\zeta$  Makrophagen. Durch Zugabe von Doxycyclin kann in diesen Zellen die Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  induziert werden. In Raw264.7-TetOn-I $\kappa$ B $\zeta$  Makrophagen bewirkte die induzierte Expression von exogenem I $\kappa$ B $\zeta$  eine vermehrte Expression der *Il10* mRNA (Abbildung 14B). Als Positivkontrolle einer I $\kappa$ B $\zeta$ -gesteuerten Genexpression diente die Bestimmung der *Il6* Expressionlevel, die mit den Werten der *Nfkbiz* Expressionlevel ebenso korrelierte (Abbildung 14B). Die alleinige Überexpression von I $\kappa$ B $\zeta$  war folglich ausreichend, um die Transkription von *Il10* zu induzieren.

Messungen der Proteinkonzentrationen im Kulturüberstand LPS-stimulierter Makrophagen bestätigten die auf Transkriptionsebene gefundene I $\kappa$ B $\zeta$ -Abhängigkeit der IL-10 Expression. Nach entsprechend starker und spezifischer Stimulation sezernierten die Makrophagen relevante Mengen an IL-10. Nach LPS Stimulation, bei der zuvor die stärkste mRNA Expression gefunden wurde, wurden erwartungsgemäß die höchsten IL-10

Konzentrationen im Kulturüberstand gemessen. Unter Kontrollbedingungen sezernierten Makrophagen keine nachweisbaren Mengen IL-10. Ebenso zeigten Makrophagen, die mit IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  behandelt wurden, kaum erhöhte IL-10 Konzentrationen (Abbildung 11A). Die Art der Polarisierung der Makrophagen hatte ebenfalls einen großen Einfluss auf die Menge an sezerniertem IL-10. Es wurden die IL-10 Konzentrationen von unbehandelten, M1- und M2-polarisierten Makrophagen bestimmt. M1-polarisierte Makrophagen weisen starke antimikrobielle Eigenschaften auf und vermitteln pro-inflammatorische Antworten, während M2-polarisierte Makrophagen anti-inflammatorische Effektorfunktionen ausüben (siehe Kapitel 1.4.1). M2-Makrophagen haben neben der Rolle für die Limitierung von Immunreaktionen auch eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase. Dabei sezernieren diese Makrophagen reduzierte Mengen an entzündungsfördernden Substanzen, wodurch eine pathologische Immunantwort verhindert wird. Ebenso wird die im Rahmen einer Entzündung ablaufende Umwandlung von M1- zu M2-polarisierten Makrophagen durch IL-10 vermittelt. Dass *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Makrophagen im Rahmen von Entzündungsreaktionen im Genexpressionsmuster denen von M1-Makrophagen entsprechen, konnte bereits in anderen Untersuchungen mit LPS-behandelten KMM angedeutet werden. Dabei wurde in naiven *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM nach LPS-Stimulation frühzeitig erhöhte Mengen an phosphoryliertem STAT1 nachgewiesen, einem wichtigen Marker für M1-aktivierte Makrophagen (D. Hildebrand, persönliche Mitteilung). Auch die in dieser Arbeit gemessenen Genexpressionslevel M1-assoziiierter Gene waren in *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> KMM nach LPS-Stimulation im Vergleich zu *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> KMM signifikant erhöht (Abbildung 6B). Eine verminderte Expression an IL-10 kann somit die M1-Polarisierung der *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Makrophagen zusätzlich begünstigen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die *Il10*/IL-10 Expression in Makrophagen unabhängig von Zelltyp und Stimulus auf mRNA und Protein-Ebene durch I $\kappa$ B $\zeta$  reguliert wird, und dass I $\kappa$ B $\zeta$  bereits im naiven Zustand möglicherweise einen Einfluss auf die Polarisierung der Makrophagen hat.

### 4.1.3. Mechanismus der Regulation

Hinweise auf die zugrundeliegenden Mechanismen der  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -abhängigen *IL10*/*IL-10* Expression ergaben Reporteranalysen mit *IL-10* Promotorkonstrukten in Raw264.7-TetOn- $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  Makrophagen. Doxycyclin-induzierte Expression von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  erhöhte in diesen Makrophagen die *IL-10* Promotoraktivität im Vergleich zu nicht  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -exprimierenden Zellen (Abbildung 15D). Auch für die Regulation der *IL-6* und *LCN-2* Promotoren konnte mit diesen Reporteranalysen eine Abhängigkeit von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  gezeigt werden. Bekannte NF- $\kappa$ B-abhängige, aber  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -unabhängige Gene, wie beispielsweise *Elam1*, zeigten in Reporteranalysen keine erhöhte Promotoraktivität nach Doxycyclin-induzierter Expression von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  im Vergleich zu nicht  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ -exprimierenden Makrophagen (Abbildung 14D). Die alleinige Expression von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  ist somit hinreichend, um die Promotoraktivität seiner Zielgene zu erhöhen.

Weitere Reporteranalysen wurden in Raw264.7 Makrophagen durchgeführt, um den direkten Einfluß von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  und p50 auf die Regulation des *IL-10* Promotors zu untersuchen. Bekannt ist, dass  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  auf Transkriptionsebene über Protein-Protein Interaktionen mit p50:p50 Homodimeren die Aktivität des jeweiligen Zielgen-Promotors reguliert.<sup>62</sup> Die Reporteranalysen konnten dies bestätigen, da in Raw264.7 Makrophagen die Expression von  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  und p50 allein jeweils keine Aktivierung des *IL-10* Promotors auslöste, wohingegen die kombinierte Expression beider Proteine zu einer erhöhten Aktivität des *IL-10* Promotors führte (Abbildung 14C). Jedoch zeigen aktuelle Daten, dass die Expression von p50 alleine bereits ausreichen sollte, um die Aktivität des *IL-10* Promotors zu erhöhen.<sup>213</sup> Entsprechende Studien von Cao *et al.* wurden ebenfalls mit Reporterkonstrukten in Raw264.7 Makrophagen durchgeführt. Diese zu den hier gezeigten Ergebnissen im Widerspruch stehenden Daten sind möglicherweise auf unterschiedliche Konzentrationen an p50:p50 Homodimeren im Zellkern zurückzuführen. Da p50 Proteine selbst keine TAD besitzen und nur nach Bindung an andere TAD-enhaltenden Proteine aus der NF- $\kappa$ B Familie ihren Einfluss auf die Transkription ausüben, sollten niedrige Konzentrationen an p50:p50 Homodimeren die Transkription nicht hemmen. Bei hohen Konzentrationen an p50:p50 Homodimeren sollten jedoch durch Verdrängung transkriptionsaktiver TAD-enhaltender NF- $\kappa$ B Proteine die Aktivierung der Transkription gehemmt werden. Eine endgültige

Beurteilung der Wirkung von p50:p50 Homodimere auf die Aktivität des IL-10 Promotors steht somit noch aus.

Versuche mit KMM aus *Nfkb1(p50)*-defizienten Mäusen zeigten vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Expression von IL-10-mRNA und Protein.<sup>213</sup> Folglich ist davon auszugehen, dass p50:p50 Homodimere und IκBζ notwendig für die vollständige Aktivierung des IL-10 Promotors sind und dass das Fehlen eines dieser Faktoren zu verminderter Expression von IL-10 führt.

Die Regulation der Promotoraktivität erfolgt klassischerweise über Transkriptionsfaktoren. Bis heute wurden zahlreiche Transkriptionsfaktoren identifiziert, die an den IL-10 Promotor binden und seine Aktivität modulieren. IκBζ erweitert diese Liste der IL-10 Promotor-regulierenden Faktoren. Geringe Mengen an IL-10 werden von *Nfkbiz<sup>ko/ko</sup>* KMM allerdings noch sezerniert. Dies zeigt, dass IκBζ-unabhängige Mechanismen existieren, welche die IL-10 Expression beeinflussen. Der Einfluss derartig zahlreicher Faktoren verdeutlicht die komplexe und genau regulierte Expression von IL-10, die die vielfältige Rolle von IL-10 im Rahmen von Erkrankungen widerspiegelt.<sup>214</sup>

Chromatinimmunopräzipitations (ChIP)-Analysen wurden durchgeführt mit der Zielsetzung, den Grad der H3K4-Trimethylierung an bestimmten Promotorbereichen zu untersuchen. Vergleichende Experimente mit Chromatin LPS-stimulierter *Nfkbiz<sup>wt/wt</sup>* und *Nfkbiz<sup>ko/ko</sup>* KMM zeigten eine Anreicherung der H3K4-Trimethylierung am proximalen IL-10 und IL-6 Promotor für *Nfkbiz<sup>wt/wt</sup>* KMM. Diese Anreicherung war bei ChIP-Analysen mit *Nfkbiz<sup>ko/ko</sup>* KMM nicht festzustellen. Als Negativkontrolle diente die Untersuchung der Anreicherung am TNF-α Promotor. Hier wurden erwartungsgemäß keine Genotyp-abhängigen Unterschiede in der H3K4-Trimethylierung festgestellt (Abbildung 17). Der H3K4-Trimethylierungsgrad wird als klassischer Marker für aktive Transkription angesehen und ist ein Hinweis auf den direkten Einfluss von IκBζ auf die Rekrutierung Chromatin-modifizierender Enzyme und den Einfluss auf das Chromatin-*Remodeling*. Dies ist in Übereinstimmung mit kürzlich veröffentlichten Daten, die verdeutlichen, dass IκBζ direkt an der Rekrutierung des SWI/SNF Komplexes beteiligt ist und damit die Zugänglichkeit zu transkriptionsrelevanten DNA-Abschnitten von Zielgenen reguliert.<sup>80</sup> Ebenso konnte die Assoziation mit bestimmten Histondeacetylasen für IκBζ gezeigt werden<sup>215</sup>, die ebenfalls am Chromatin-*Remodeling* beteiligt sind. Diese

Theorie unterstützend, findet man im Genbereich des IL-10 Promotors keine CpG-Insel-Motive. Diese DNA-Bereiche sind klassischerweise mit der Transkription primärer NF- $\kappa$ B-Zielgene in Makrophagen assoziiert (siehe 1.2.1.3). Der Mechanismus des Chromatin-*Remodelings* an Promotorabschnitten ohne CpG-Inseln erfolgt somit unter anderem über I $\kappa$ B $\zeta$ , wie kürzlich in TLR-aktivierten Makrophagen gezeigt werden konnte.<sup>80</sup>

Die IL-10 Expression wird somit hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene reguliert, indem I $\kappa$ B $\zeta$  einerseits die Zugänglichkeit zum IL-10 Promotor durch Rekrutierung von Chromatin-*Remodeling* Faktoren reguliert und andererseits direkt über Interaktionen mit p50:p50 Homodimeren die *Il10* Expression am IL-10 Promotor aktiviert. Dies unterstreicht die Schlüsselrolle von I $\kappa$ B $\zeta$  bei der IL-10 Expression.

#### **4.1.4. Physiologische Relevanz**

##### **4.1.4.1. Rolle der IL-10 Sekretion von Makrophagen in der Immunantwort**

Makrophagen können nach pro-inflammatorischer Stimulation mit der Ausschüttung von IL-10 reagieren. Wie in dieser Arbeit gezeigt, sezernieren nach Kultivierung mit LPS naive wie auch M2-polarisierte Makrophagen große Mengen an IL-10. M1-polarisierte Makrophagen sezernieren hingegen deutlich geringere Mengen IL-10 (Abbildung 12). Dies bestätigt das bisherige klassische Aktivierungsmodell von Makrophagen, in dem klassisch aktivierte (M1) Makrophagen durch Sekretion großer Mengen von IL-6 und TNF- $\alpha$  in Kombination mit geringen Mengen an sezerniertem IL-10 beschrieben werden. Alternativ aktivierte (M2) Makrophagen hingegen sezernieren erhöhte Mengen an IL-10 und verminderte Mengen an TNF- $\alpha$ . Proteinmessungen mit LPS stimulierten *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> KMM bestätigten diese Annahmen. In *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Makrophagen wurden für alle drei Polarisierungsgrade reduzierte IL-10 Proteinkonzentrationen gemessen (Abbildung 12). Abhängig von den Umgebungsbedingungen kann sowohl eine M1- als auch eine M2-Polarisierung für die entsprechenden Effektorfunktionen der Makrophagen sinnvoll sein. Klassisch aktivierte Makrophagen sezernieren entzündungsfördernde Substanzen, die zur Rekrutierung und Aktivierung zahlreicher weiterer Immunzellen führen, um eindringende Erreger schnell und effektiv zu beseitigen. Dieser Vorgang führt allerdings ohne entsprechende Hemmung recht schnell zur Schädigung des Wirtsgewebes. Deshalb

wird das entzündungshemmende Zytokin IL-10 ausgeschüttet, um die Immunreaktion abzubremsen. Eine Fehlregulation der IL-10 Sekretion kann folglich starken Einfluss auf den Verlauf einer Immunreaktion nehmen. Ein Defekt in der IL-10 Expression führt zu Immunpathologien, im Rahmen derer es zur Gewebeschädigung und dauerhafter Aktivierung des Immunsystems kommen kann. Mögliche Folgen sind chronische Entzündungen und Störungen der Gewebemöostase. Eine strikte Regulation der IL-10 Expression in Makrophagen ist daher absolut erforderlich. Die vorliegende Arbeit zeigt eindeutig, dass I $\kappa$ B $\zeta$  hierbei eine entscheidende Rolle zukommt.

#### 4.1.4.2. Weitere IL-10 produzierende Zellen

Zusätzlich zu den gezeigten Daten, die durch Verwendung von PM und KMM gewonnen wurden, sind in dieser Arbeit murine embryonale Fibroblasten (MEFs) aus *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen isoliert und hinsichtlich der Abhängigkeit der IL-10 Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  untersucht worden. Auf Genexpressionsebene konnte durch Bestimmung der Transkriptionslevel nach LPS-Kultivierung der Fibroblasten für *Il10* und *Il6* eine I $\kappa$ B $\zeta$ -abhängige Expression gezeigt werden. Jedoch waren die sezernierten Proteinmengen an IL-10 im Vergleich zu den sezernierten Mengen der KMM gering. Im Gegensatz dazu entsprachen die sezernierten Mengen an IL-6 denen der KMM. Man kann folgern, dass die I $\kappa$ B $\zeta$ -abhängige Expression von IL-10 prinzipiell auch in Fibroblasten konserviert ist, allerdings muss hier von einer untergeordneten physiologischen Relevanz ausgegangen werden, da die sezernierten Mengen wahrscheinlich keinen Einfluss auf die IL-10 Gesamtmenge eines Organismus nehmen. Entsprechende *in vivo* Studien mit gewebespezifischen I $\kappa$ B $\zeta$ -*knockout* Mäusen könnten hierbei weitere Informationen zur Relevanz der IL-10 Sekretion durch Fibroblasten geben.

Neben den in dieser Arbeit verwendeten Makrophagen und Fibroblasten, existieren zahlreiche weitere Zellarten, die ebenfalls großen Einfluss auf die IL-10 Proteinmenge eines Organismus nehmen. Nahezu alle Immunzellen können IL-10 sezernieren, was die Schlüsselrolle von IL-10 im Rahmen einer Immunantwort bekräftigt. Unter anderem wurde die Regulation der IL-10 Expression durch I $\kappa$ B $\zeta$  in primären B220<sup>+</sup> B-Zellen beschrieben.<sup>216</sup> Die Autoren erwähnen darin ebenfalls die Abhängigkeit der IL-10 Expression (mRNA und Protein) von I $\kappa$ B $\zeta$ . Weitere Studien haben allerdings gezeigt,

dass IL-10 assoziierte Effekte vor allem durch Zellen aus der Makrophagen/Monozyten-Linie vermittelt werden. In einem LPS-vermittelten Endotoxämiemodell konnte gezeigt werden, dass für die Unterdrückung einer Immunreaktion das Vorhandensein des IL-10 Rezeptors auf Makrophagen/Monozyten, nicht jedoch auf Lymphozyten, essentiell ist.<sup>206</sup> IL-10 Rezeptor-(*Il10R1*)-*knockout* Mäuse haben eine erhöhte Anfälligkeit für chemisch induzierte Darmentzündungen, die vergleichbar mit denen bei *Il10*-*knockout* Mäusen ist. Makrophagen/Monozyten sind also die zentralen Vermittler IL-10- assoziierter chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.

Es bedarf weiterer Untersuchungen, um zu klären, ob die Regulation der IL-10 Expression in allen Zellen des Immunsystems durch I $\kappa$ B $\zeta$  vermittelt wird. Zusätzlich sollten auch Nicht-Immunzellen untersucht werden, ob diese auch I $\kappa$ B $\zeta$ -abhängig IL-10 sezernieren. Dies könnte dazu beitragen, die komplexen Vorgänge bei der Hemmung einer Immunantwort besser zu verstehen.

#### **4.1.4.3. Von der molekularen zur systemischen Wirkung – Interleukin-10 im Rahmen von Erkrankungen**

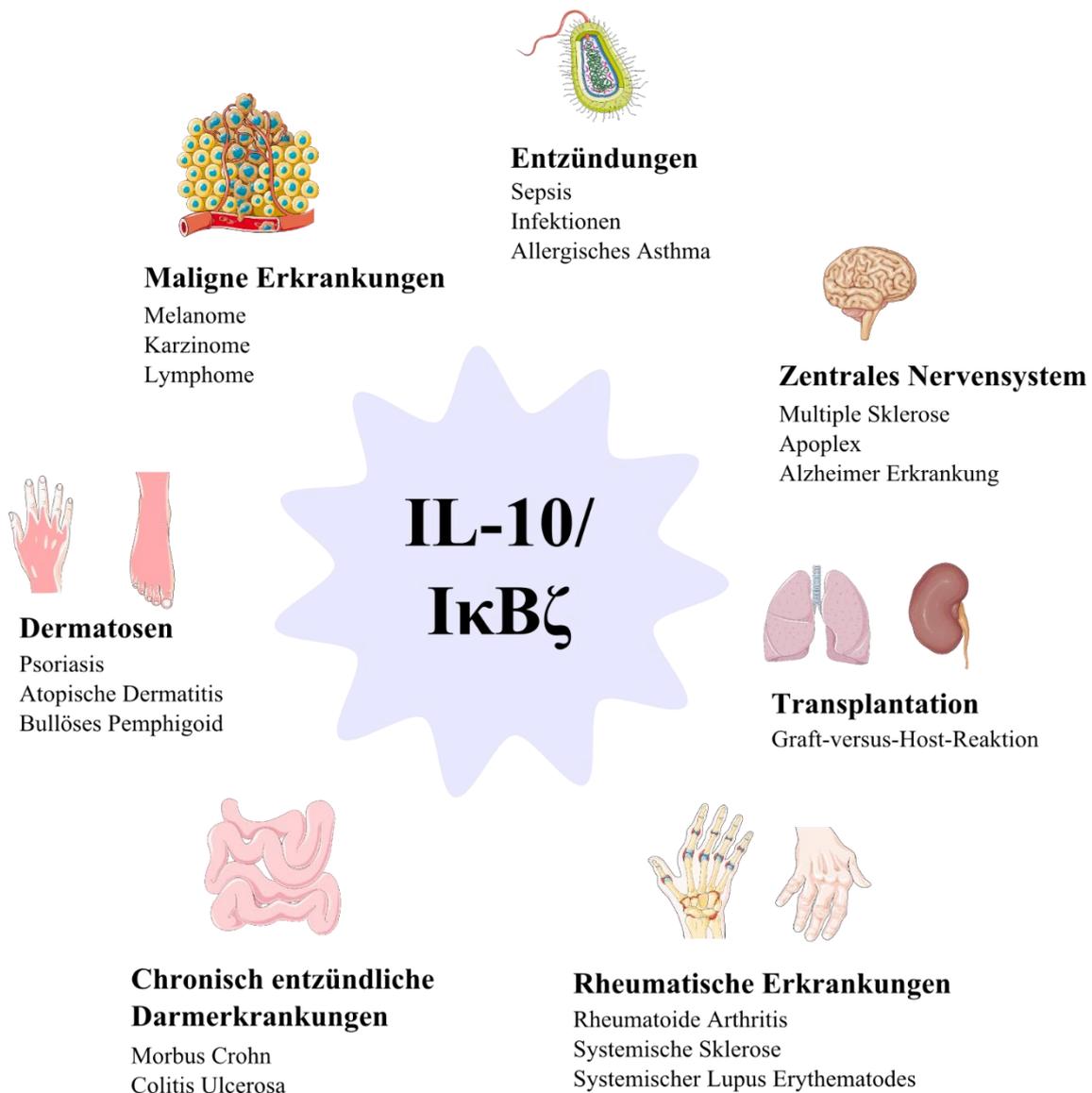
Das Verständnis der molekularen Mechanismen, die der Regulation der IL-10 Expression zugrunde liegen, ist von entscheidender Bedeutung, um auf physiologische Vorgänge aufmerksam zu werden, die durch IL-10 beeinflusst werden oder durch IL-10 beeinflussbar sind. Dazu zählen Immunpathologien im Allgemeinen, die abhängig vom Ausmaß der Veränderung der IL-10 Expression unterschiedlichste Auswirkungen haben können. Ein Übermaß an IL-10 unterdrückt die adäquate Reaktion auf Entzündungsreize, wie sie bei Infektionen auftreten können. Verringerte IL-10 Level hingegen führen zu pathologischen Immunreaktionen durch ein übermäßig aktives Immunsystem, das zu Autoimmunkrankheiten oder chronischen Entzündungen führen kann. Diese gegensätzlichen Auswirkungen fehlgesteuerter IL-10-Sekretion machen deutlich, dass eine strikte Regulation der IL-10 Expression für die Immunhomöostase eines Organismus von großer Bedeutung ist..

Die phänotypischen Eigenschaften von *Il10*-defizienten Mäusen belegen für IL-10 eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung der intestinalen Immunhomöostase. *Il10*<sup>ko/ko</sup> Mäuse entwickeln sporadisch auftretende intestinale Entzündungen, die denjenigen im

Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen entsprechen.<sup>217</sup> Des Weiteren zeigen *Il10*-defiziente Mäuse nach LPS-Injektion erhöhte Konzentrationen an zirkulierendem TNF- $\alpha$  und sind besonders anfällig für einen LPS-induzierten septischen Schock.<sup>206</sup> Für *Nfkbiz*-defiziente Mäuse konnten nach LPS-Injektion ebenfalls erhöhte TNF- $\alpha$  Level im Blut bestimmt werden, genauso wie eine erhöhte Prädisposition für chronisch entzündliche Darmerkrankungen zu finden ist.<sup>61</sup> Die I $\kappa$ B $\zeta$ -Abhängigkeit der IL-10 Expression könnte somit ursächlich für einige phänotypische Eigenschaften der *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Maus sein. Es muss allerdings erwähnt werden, dass *Il10*-defiziente Mäuse keine der in *Nfkbiz*-defizienten Mäusen beschriebenen dermalen Auffälligkeiten entwickeln. I $\kappa$ B $\zeta$ -Defizienz äußert sich noch in weiteren phänotypischen Auffälligkeiten. I $\kappa$ B $\zeta$  spielt in epithelalem Gewebe eine wichtige Rolle zur Erhaltung einer „epithelialen Homöostase“ indem es als antiapoptotisches Protein in diesen Zellen wirkt.<sup>85</sup> I $\kappa$ B $\zeta$ -Defizienz wird in diesen Zellen als Ursache für die Entwicklung der Dermatitis-ähnlichen Läsionen angesehen.<sup>85</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die *Il10* mRNA Level in Epithelzellen von Psoriasis befallener Areale vermindert sind<sup>218, 219</sup> und eine IL-10 Supplementation als Therapie dissuziert wird.<sup>218</sup> Ein Zusammenhang mit einer fehlregulierten I $\kappa$ B $\zeta$ -abhängigen IL-10 Expression könnte hier folglich ebenso als Ursache zugrunde liegen.

Eine Dysregulation der IL-10 Sekretion kann für eine Vielzahl von Erkrankungen und Pathologien verantwortlich sein. In Abbildung 18 sind beispielhaft einige Organ-bezogenen Erkrankungen aufgeführt, die mit pathologisch veränderten IL-10 Konzentrationen, lokal oder systemisch, assoziiert sind.<sup>220</sup>

Neben der dominanten Rolle von IL-10 im Rahmen von Infektionen und Entzündungen im Tier konnten zahlreiche Studien einen Einfluss von IL-10 auch auf pathologische Vorgänge im Menschen aufzeigen. Nennenswert sind vor allem chronisch entzündliche Darmerkrankungen, bei denen es zu Schädigungen in der Darmwand kommt, die wie bereits beschrieben auf verminderten IL-10 Konzentrationen beruhen. Bisherige Studien konnten allerdings für die systemische Gabe von IL-10 keine prognostische Verbesserung der Erkrankung aufweisen. Deutlich bessere Ergebnisse wurden hingegen mit der intrainestinalen Einbringung von IL-10 sezernierenden gramnegativen Kokken (*Lactococcus lactis*) in zwei Mausmodellen erzielt.<sup>221</sup> *Il10*-defiziente Mäuse entwickelten nach Einbringung dieser Bakterien keine typische Phänotyp-assozierte Kolitis.



**Abbildung 18: Möglicher Einfluss der  $I\kappa B\zeta$ -abhängigen Expression von IL-10 auf pathophysiologische Prozesse**

Schematische Darstellung von pathophysiologischen Vorgängen, die durch eine fehlregulierte IL-10 Expression möglicherweise begünstigt werden. Im Speziellen handelt es sich um Vorgänge bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von malignen und rheumatischen Erkrankungen, bei Infektionen, Dermatosen, Abstoßungsreaktionen von Transplantaten, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und bei immunologischen Vorgängen im Zentralnervensystem. Die Abbildung wurde mit Hilfe von *Servier Medical Art* erstellt.

Ebenso verbesserten sich Mäuse klinisch nach *Lactococcus lactis* -Einbringung, bei denen chemisch eine Kolitis induziert wurde. Auch hier ist ein Zusammenhang zwischen

einer möglichen Dysfunktionalität von I $\kappa$ B $\zeta$  mit assoziierter Fehlregulation der IL-10 Expression vorstellbar. Neben diesen Erkrankungen sind auch rheumatologische und maligne Erkrankungen mit pathologischen IL-10 Konzentrationen assoziiert. Zu nennen sind hier Beobachtungen an Lymphomzellen aus diffusgroßzelligen B-Zelllymphomen, für die im Rahmen einer dauerhaften Aktivierung von NF- $\kappa$ B eine konstitutive Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  gezeigt wurde.<sup>89</sup> Passend zu den in dieser Arbeit gezeigten Daten mit induzierbar I $\kappa$ B $\zeta$ -exprimierenden Raw264.7-TetOn-I $\kappa$ B $\zeta$  Makrophagen wurden in diesen Lymphomzellen ebenfalls konstitutiv erhöhte *Il10*/IL-10-mRNA und Proteinlevel gemessen. Ob und inwieweit IL-10 zur Pathogenese, beziehungsweise Progression der Erkrankung beiträgt, ist jedoch noch unverstanden.

Insgesamt ist noch erheblicher Forschungsaufwand nötig, um beurteilen zu können inwieweit erhöhte oder erniedrigte, lokale oder systemische IL-10 Konzentrationen zur Pathogenese von den dargestellten Erkrankungen beitragen. Ein tiefergehendes Verständnis der I $\kappa$ B $\zeta$ -regulierten Expression von IL-10 kann dabei helfen die Pathogenese dieser Erkrankungen besser zu verstehen.

## 4.2. Ausblick und offene Fragen

Die hier präsentierten Resultate lieferten neue Erkenntnisse zur Funktion von I $\kappa$ B $\zeta$ . Zum ersten Mal wurde die Rolle von I $\kappa$ B $\zeta$  im Zusammenhang mit der Expression eines entzündungshemmenden Faktors aufgezeigt. Dies bekräftigt die zentrale Bedeutung von I $\kappa$ B $\zeta$  im Rahmen von Immunreaktionen und zeigt eine molekulare Ursache, die mitverantwortlich für die phänotypischen Eigenschaften der *Nfkbiz*-defizienten Mäuse sein dürfte. Um abschätzen zu können, inwieweit die in dieser Arbeit dargelegte I $\kappa$ B $\zeta$ -abhängige Regulation der IL-10 Expression Auswirkungen auf das Gesamt-IL-10 Level eines Organismus hat, bedarf es zusätzlicher funktioneller Versuchsansätze und *in vivo* Experimente. Schlussendlich gilt es auch die Frage zu beantworten inwiefern mögliche I $\kappa$ B $\zeta$ -Inhibitoren die Expression von IL-10 physiologisch beeinflussen könnten. Und inwieweit systemische Gaben von IL-10 die phänotypischen Eigenschaften der *Nfkbiz*-defizienten Mäuse aufheben können. Ein verbessertes Verständnis über die I $\kappa$ B $\zeta$ -vermittelten Effekte am IL-10 Promotor wie auch über die Mechanismen, die der IL-10 Expression in verschiedenen Zellentypen zugrunde liegen, wird zweifelslos dazu beitragen, neue Strategien für therapeutische Ansätze gegen Erkrankungen zu entwickeln, die mit pathologischer IL-10 Expression assoziiert sind.

## 5 Zusammenfassung

Der ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ist hauptverantwortlich für die Aktivierung und Regulierung der angeborenen Immunantwort. Die präzise Regulation immunrelevanter Gene wird über das Zusammenspiel von NF- $\kappa$ B mit Koaktivatoren wie dem hier untersuchten Protein I $\kappa$ B $\zeta$  gesteuert. I $\kappa$ B $\zeta$  gehört zur Gruppe der atypischen "Inhibitor von NF- $\kappa$ B" Proteine und ist essentiell für die Expression zahlreicher entzündungsfördernder Gene wie IL-6, IL-12p40 und GM-CSF. Entgegen der Erwartung entwickeln I $\kappa$ B $\zeta$ -defiziente Mäuse jedoch einen pro-inflammatorischen Phänotyp.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Zielgene von I $\kappa$ B $\zeta$  zu identifizieren, welche den pro-inflammatorischen Phänotyp der *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mauslinie erklären. Da die chronischen Entzündungen der *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäuse nicht mit den beschriebenen genregulatorischen Funktionen von I $\kappa$ B $\zeta$  erklärt werden können, wurden Genexpressionsanalysen von Peritoneal- und Knochenmarksmakrophagen aus *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäusen durchgeführt. Als ein in *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Makrophagen dysreguliertes Gen wurde Interleukin-10 (IL-10) identifiziert. Da IL-10 maßgeblich an der Begrenzung und Hemmung der Immunantwort beteiligt ist, könnte die in *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Makrophagen ausbleibende Induktion von IL-10 den pro-inflammatorischen Phänotyp der *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mauslinie erklären.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten erstmals eine Abhängigkeit der IL-10 Expression von I $\kappa$ B $\zeta$  in Makrophagen. I $\kappa$ B $\zeta$ -defiziente Makrophagen exprimieren in Gegenwart pro-inflammatorischer Agenzien wie Lipopolysaccharid oder Peptidoglykan deutlich reduzierte Mengen IL-10 mRNA und Protein. Im Gegensatz zu bisher beschriebenen Zielgenen von I $\kappa$ B $\zeta$  ist die Regulation der IL-10 Expression unabhängig sowohl vom Makrophagen-Subtyp als auch dem Status der Makrophagen-Polarisierung. Reporteranalysen mit IL-10 Promotorkonstrukten zeigen eine Expressionsverstärkung durch I $\kappa$ B $\zeta$  im Zusammenspiel mit p50:p50 Homodimeren. Da I $\kappa$ B $\zeta$  die Genexpression durch Rekrutierung Chromatin-modifizierender Enzyme an den IL-10 Promotor steuert, erhalten basale Transkriptionsfaktoren erleichtert Zugang zum IL-10 Promotor. Dies konnte mittels Chromatin-Immunopräzipitation nachgewiesen werden, die eine I $\kappa$ B $\zeta$ -vermittelte Transkriptions-verstärkende Histon H3 Lysin K4

Trimethylierung am IL-10 Promotor belegen. I $\kappa$ B $\zeta$  fungiert folglich als Transkriptionsaktivator der IL-10 Expression.

Zusammenfassend wird erstmalig die I $\kappa$ B $\zeta$ -abhängige Expression eines entzündungshemmenden Zytokins, IL-10, gezeigt. Der pro-inflammatorische Phänotyp *Nfkbiz*-defizienter Mäuse könnte somit durch die verminderte IL-10 Induktion erklärt werden. Die I $\kappa$ B $\zeta$ -abhängige Regulation der IL-10 Expression ist insofern interessant, als zahlreiche Erkrankungen mit pathologischen IL-10 Konzentrationen assoziiert sind. Für diese Erkrankungen könnte die therapeutische Beeinflussung von I $\kappa$ B $\zeta$  daher neue Therapieansätze aufzeigen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Aderem, A. and D.M. Underhill, Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, 1999. 17: p. 593-623.
2. Roitt, I., J. Brostoff, and D. Male, *Immunology*. 5. Auflage ed. 1998: Mosby Int. Ltd.
3. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1999. 64: p. 429-35.
4. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*, 2011. 30(1): p. 16-34.
5. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*, 2000. 173: p. 89-97.
6. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., Innate immunity. *N Engl J Med*, 2000. 343(5): p. 338-44.
7. Takeda, K. and S. Akira, Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 2005. 17(1): p. 1-14.
8. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997. 388(6640): p. 394-7.
9. Akira, S. and K. Takeda, Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(7): p. 499-511.
10. Takeuchi, O., et al., Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*, 2002. 169(1): p. 10-4.
11. Wyllie, D.H., et al., Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol*, 2000. 165(12): p. 7125-32.
12. Aliprantis, A.O., et al., Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*, 1999. 285(5428): p. 736-9.
13. Schwandner, R., et al., Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*, 1999. 274(25): p. 17406-9.
14. Opitz, B., et al., Toll-like receptor-2 mediates Treponema glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem*, 2001. 276(25): p. 22041-7.
15. Underhill, D.M., et al., The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, 1999. 401(6755): p. 811-5.
16. Alexopoulou, L., et al., Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2001. 413(6857): p. 732-8.
17. Poltorak, A., et al., Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 1998. 282(5396): p. 2085-8.
18. Kawasaki, K., et al., Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem*, 2000. 275(4): p. 2251-4.
19. Takeuchi, O., et al., Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol*, 2001. 13(7): p. 933-40.

20. Heil, F., et al., Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 2004. 303(5663): p. 1526-9.
21. Diebold, S.S., et al., Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 2004. 303(5663): p. 1529-31.
22. Hemmi, H., et al., A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 2000. 408(6813): p. 740-5.
23. Zhang, D., et al., A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*, 2004. 303(5663): p. 1522-6.
24. Koblansky, A.A., et al., Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity*, 2013. 38(1): p. 119-30.
25. Oldenburg, M., et al., TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science*, 2012. 337(6098): p. 1111-5.
26. Adachi, O., et al., Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*, 1998. 9(1): p. 143-50.
27. Taylor, P.R., et al., Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol*, 2007. 8(1): p. 31-8.
28. Gross, O., et al., Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature*, 2006. 442(7103): p. 651-6.
29. Dennehy, K.M. and G.D. Brown, The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol*, 2007. 82(2): p. 253-8.
30. Gantner, B.N., et al., Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*, 2003. 197(9): p. 1107-17.
31. Sen, R. and D. Baltimore, Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 1986. 46(5): p. 705-16.
32. Hayden, M.S. and S. Ghosh, NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res*, 2011. 21(2): p. 223-44.
33. Hayden, M.S., A.P. West, and S. Ghosh, NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*, 2006. 25(51): p. 6758-80.
34. Li, Q. and I.M. Verma, NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2002. 2(10): p. 725-34.
35. Courtois, G. and T.D. Gilmore, Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*, 2006. 25(51): p. 6831-43.
36. Netea, M.G. and J.W. van der Meer, Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors. *N Engl J Med*, 2011. 364(1): p. 60-70.
37. Park, H., et al., Lighting the fires within: the cell biology of autoinflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*, 2012. 12(8): p. 570-80.
38. Basseres, D.S. and A.S. Baldwin, Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene*, 2006. 25(51): p. 6817-30.

39. Gilmore, T.D. and M. Herscovitch, Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene*, 2006. 25(51): p. 6887-99.
40. Hayden, M.S. and S. Ghosh, NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*, 2012. 26(3): p. 203-34.
41. Baldwin, A.S., The NF-kappa B and I kappa B proteins: New discoveries and insights. *Annual Review of Immunology*, 1996. 14: p. 649-683.
42. Beg, A.A. and A.S. Baldwin, The I-Kappa-B Proteins - Multifunctional Regulators of Rel/Nf-Kappa-B Transcription Factors. *Genes & Development*, 1993. 7(11): p. 2064-2070.
43. Gilmore, T.D., Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 2006. 25(51): p. 6680-4.
44. Sun, S.C., Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res*, 2011. 21(1): p. 71-85.
45. Oeckinghaus, A., M.S. Hayden, and S. Ghosh, Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol*, 2011. 12(8): p. 695-708.
46. Smale, S.T., Selective transcription in response to an inflammatory stimulus. *Cell*, 2010. 140(6): p. 833-44.
47. Wang, J., et al., Distinct roles of different NF-kappa B subunits in regulating inflammatory and T cell stimulatory gene expression in dendritic cells. *J Immunol*, 2007. 178(11): p. 6777-88.
48. Yamamoto, M. and K. Takeda, Role of nuclear IkappaB proteins in the regulation of host immune responses. *J Infect Chemother*, 2008. 14(4): p. 265-9.
49. Schuster, M., et al., Atypical IkappaB proteins - nuclear modulators of NF-kappaB signaling. *Cell Commun Signal*, 2013. 11(1): p. 23.
50. Saccani, S., S. Pantano, and G. Natoli, Two waves of nuclear factor kappaB recruitment to target promoters. *J Exp Med*, 2001. 193(12): p. 1351-9.
51. Kwon, H., et al., Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature*, 1994. 370(6489): p. 477-81.
52. Clapier, C.R. and B.R. Cairns, The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem*, 2009. 78: p. 273-304.
53. Ramirez-Carrozzi, V.R., et al., Selective and antagonistic functions of SWI/SNF and Mi-2beta nucleosome remodeling complexes during an inflammatory response. *Genes Dev*, 2006. 20(3): p. 282-96.
54. Ramirez-Carrozzi, V.R., et al., A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. *Cell*, 2009. 138(1): p. 114-28.
55. Medzhitov, R. and T. Horng, Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(10): p. 692-703.
56. Singh, H., Teeing up transcription on CpG islands. *Cell*, 2009. 138(1): p. 14-6.
57. Kitamura, H., et al., MAIL, a novel nuclear I kappa B protein that potentiates LPS-induced IL-6 production. *FEBS Lett*, 2000. 485(1): p. 53-6.

58. Haruta, H., A. Kato, and K. Todokoro, Isolation of a novel interleukin-1-inducible nuclear protein bearing ankyrin-repeat motifs. *J Biol Chem*, 2001. 276(16): p. 12485-8.
59. Yamazaki, S., T. Muta, and K. Takeshige, A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. *J Biol Chem*, 2001. 276(29): p. 27657-62.
60. Shiina, T., et al., Genomic organization, chromosomal localization, and promoter analysis of the mouse Mail gene. *Immunogenetics*, 2001. 53(8): p. 649-55.
61. Yamamoto, M., et al., Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature*, 2004. 430(6996): p. 218-22.
62. Motoyama, M., et al., Positive and negative regulation of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by IkappaB-zeta, an inducible nuclear protein. *J Biol Chem*, 2005. 280(9): p. 7444-51.
63. Kitamura, H., et al., Bacterial lipopolysaccharide-induced expression of the IkappaB protein MAIL in B-lymphocytes and macrophages. *Arch Histol Cytol*, 2003. 66(1): p. 53-62.
64. Muta, T., et al., IkappaB-zeta, a new anti-inflammatory nuclear protein induced by lipopolysaccharide, is a negative regulator for nuclear factor-kappaB. *J Endotoxin Res*, 2003. 9(3): p. 187-91.
65. Ito, T., et al., Transcriptional regulation of the MAIL gene in LPS-stimulated RAW264 mouse macrophages. *Gene*, 2004. 342(1): p. 137-43.
66. Kitamura, H., et al., Bacterial lipopolysaccharide induces mRNA expression of an IkappaB MAIL through toll-like receptor 4. *J Vet Med Sci*, 2002. 64(5): p. 419-22.
67. Zhu, J., et al., IkappaB-zeta plays an important role in the ERK-dependent dysregulation of malaria parasite GPI-induced IL-12 expression. *IUBMB Life*, 2012. 64(2): p. 187-93.
68. Eto, A., et al., Essential roles for NF-kappa B and a Toll/IL-1 receptor domain-specific signal(s) in the induction of I kappa B-zeta. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 301(2): p. 495-501.
69. Hijioka, K., et al., Induction of the nuclear IkappaB protein IkappaB-zeta upon stimulation of B cell antigen receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 356(2): p. 476-80.
70. Yamazaki, S., et al., Gene-specific requirement of a nuclear protein, IkappaB-zeta, for promoter association of inflammatory transcription regulators. *J Biol Chem*, 2008. 283(47): p. 32404-11.
71. Matsuo, S., et al., Crucial roles of binding sites for NF-kappaB and C/EBPs in IkappaB-zeta-mediated transcriptional activation. *Biochem J*, 2007. 405(3): p. 605-15.
72. Seshadri, S., et al., MAIL regulates human monocyte IL-6 production. *J Immunol*, 2009. 183(8): p. 5358-68.
73. Cowland, J.B., T. Muta, and N. Borregaard, IL-1beta-specific up-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin is controlled by IkappaB-zeta. *J Immunol*, 2006. 176(9): p. 5559-66.
74. Kao, C.Y., et al., Requirements for two proximal NF-kappaB binding sites and IkappaB-zeta in IL-17A-induced human beta-defensin 2 expression by conducting airway epithelium. *J Biol Chem*, 2008. 283(22): p. 15309-18.

75. Fujino, R.S., et al., Spermatogonial cell-mediated activation of an IkappaBzeta-independent nuclear factor-kappaB pathway in Sertoli cells induces transcription of the lipocalin-2 gene. *Mol Endocrinol*, 2006. 20(4): p. 904-15.
76. Karlsen, J.R., N. Borregaard, and J.B. Cowland, Induction of neutrophil gelatinase-associated lipocalin expression by co-stimulation with interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is controlled by IkappaB-zeta but neither by C/EBP-beta nor C/EBP-delta. *J Biol Chem*, 2010. 285(19): p. 14088-100.
77. Hildebrand, D.G., et al., IkappaBzeta is a transcriptional key regulator of CCL2/MCP-1. *J Immunol*, 2013. 190(9): p. 4812-20.
78. Watanabe, S., K. Takeshige, and T. Muta, A cis-element in the 3'-untranslated region of IkappaB-zeta mRNA governs its stimulus-specific expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 356(3): p. 785-91.
79. Yamazaki, S., et al., Stimulus-specific induction of a novel nuclear factor-kappaB regulator, IkappaB-zeta, via Toll/Interleukin-1 receptor is mediated by mRNA stabilization. *J Biol Chem*, 2005. 280(2): p. 1678-87.
80. Tartey, S., et al., Akirin2 is critical for inducing inflammatory genes by bridging IkappaB-zeta and the SWI/SNF complex. *EMBO J*, 2014.
81. Kayama, H., et al., Class-specific regulation of pro-inflammatory genes by MyD88 pathways and IkappaBzeta. *J Biol Chem*, 2008. 283(18): p. 12468-77.
82. Shiina, T., et al., Targeted disruption of MAIL, a nuclear IkappaB protein, leads to severe atopic dermatitis-like disease. *J Biol Chem*, 2004. 279(53): p. 55493-8.
83. Ueta, M., et al., Spontaneous ocular surface inflammation and goblet cell disappearance in Ikappa B zeta gene-disrupted mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005. 46(2): p. 579-88.
84. Oonuma, T., et al., Role of NF-kappaB in constitutive expression of MAIL in epidermal keratinocytes. *J Vet Med Sci*, 2007. 69(3): p. 279-84.
85. Okuma, A., et al., Enhanced apoptosis by disruption of the STAT3-IkappaB-zeta signaling pathway in epithelial cells induces Sjogren's syndrome-like autoimmune disease. *Immunity*, 2013. 38(3): p. 450-60.
86. Okamoto, K., et al., IkappaBzeta regulates T(H)17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature*, 2010. 464(7293): p. 1381-5.
87. Kannan, Y., et al., IkappaBzeta augments IL-12- and IL-18-mediated IFN-gamma production in human NK cells. *Blood*, 2011. 117(10): p. 2855-63.
88. Goransson, M., et al., The myxoid liposarcoma FUS-DDIT3 fusion oncoprotein deregulates NF-kappaB target genes by interaction with NFKBIZ. *Oncogene*, 2009. 28(2): p. 270-8.
89. Nogai, H., et al., IkappaB-zeta controls the constitutive NF-kappaB target gene network and survival of ABC DLBCL. *Blood*, 2013. 122(13): p. 2242-50.
90. Metchnikoff, E., Ueber die Beziehung der Phagocyten zu Milzbrandbacillen. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, 1884. 97(3): p. 502-526.
91. Murray, P.J. and T.A. Wynn, Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*, 2011. 11(11): p. 723-37.

92. Laskin, D.L., et al., Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2011. 51: p. 267-88.
93. Soehnlein, O. and L. Lindbom, Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2010. 10(6): p. 427-39.
94. Gordon, S. and P.R. Taylor, Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(12): p. 953-64.
95. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(12): p. 958-69.
96. Takemura, R. and Z. Werb, Secretory products of macrophages and their physiological functions. *Am J Physiol*, 1984. 246(1 Pt 1): p. C1-9.
97. Hoebe, K., E. Janssen, and B. Beutler, The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*, 2004. 5(10): p. 971-4.
98. McIntyre, P.A., The reticuloendothelial system: organization and physiology. *Johns Hopkins Med J*, 1972. 130(2): p. 61-7.
99. van Furth, R., et al., The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ*, 1972. 46(6): p. 845-52.
100. Davies, L.C., et al., Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*, 2013. 14(10): p. 986-95.
101. Odegaard, J.I., et al., Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*, 2007. 447(7148): p. 1116-20.
102. Nguyen, K.D., et al., Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature*, 2011. 480(7375): p. 104-8.
103. Carlin, L.M., et al., Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*, 2013. 153(2): p. 362-75.
104. Pollard, J.W., Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(4): p. 259-70.
105. Nagata, S., Autoimmune diseases caused by defects in clearing dead cells and nuclei expelled from erythroid precursors. *Immunol Rev*, 2007. 220: p. 237-50.
106. Chow, A., et al., CD169(+) macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nat Med*, 2013. 19(4): p. 429-36.
107. Chow, A., et al., Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med*, 2011. 208(2): p. 261-71.
108. London, A., M. Cohen, and M. Schwartz, Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Front Cell Neurosci*, 2013. 7: p. 34.
109. Paolicelli, R.C., et al., Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 2011. 333(6048): p. 1456-8.
110. Ginhoux, F., et al., Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 2010. 330(6005): p. 841-5.

111. Ajami, B., et al., Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*, 2007. 10(12): p. 1538-43.
112. Ajami, B., et al., Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci*, 2011. 14(9): p. 1142-9.
113. Prinz, M., et al., Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci*, 2011. 14(10): p. 1227-35.
114. Bain, C.C., et al., Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol*, 2013. 6(3): p. 498-510.
115. Zigmund, E. and S. Jung, Intestinal macrophages: well educated exceptions from the rule. *Trends Immunol*, 2013. 34(4): p. 162-8.
116. Ganz, T., Macrophages and systemic iron homeostasis. *J Innate Immun*, 2012. 4(5-6): p. 446-53.
117. Klein, I., et al., Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages. *Blood*, 2007. 110(12): p. 4077-85.
118. Yona, S., et al., Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 2013. 38(1): p. 79-91.
119. Schulz, C., et al., A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*, 2012. 336(6077): p. 86-90.
120. Maus, U.A., et al., Role of resident alveolar macrophages in leukocyte traffic into the alveolar air space of intact mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002. 282(6): p. L1245-52.
121. Gautier, E.L., et al., Systemic analysis of PPARgamma in mouse macrophage populations reveals marked diversity in expression with critical roles in resolution of inflammation and airway immunity. *J Immunol*, 2012. 189(5): p. 2614-24.
122. Carey, B. and B.C. Trapnell, The molecular basis of pulmonary alveolar proteinosis. *Clin Immunol*, 2010. 135(2): p. 223-35.
123. Hashimoto, D., et al., Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, 2013. 38(4): p. 792-804.
124. Murphy, J., et al., The prolonged life-span of alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008. 38(4): p. 380-5.
125. Bedoret, D., et al., Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J Clin Invest*, 2009. 119(12): p. 3723-38.
126. Cailhier, J.F., et al., Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *J Immunol*, 2005. 174(4): p. 2336-42.
127. Dioszeghy, V., et al., 12/15-Lipoxygenase regulates the inflammatory response to bacterial products in vivo. *J Immunol*, 2008. 181(9): p. 6514-24.
128. Uderhardt, S., et al., 12/15-lipoxygenase orchestrates the clearance of apoptotic cells and maintains immunologic tolerance. *Immunity*, 2012. 36(5): p. 834-46.
129. Davies, L.C., et al., A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *Eur J Immunol*, 2011. 41(8): p. 2155-64.

130. Chorro, L. and F. Geissmann, Development and homeostasis of 'resident' myeloid cells: the case of the Langerhans cell. *Trends Immunol*, 2010. 31(12): p. 438-45.
131. Merad, M., F. Ginhoux, and M. Collin, Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(12): p. 935-47.
132. Chorro, L., et al., Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J Exp Med*, 2009. 206(13): p. 3089-100.
133. Hoeffel, G., et al., Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med*, 2012. 209(6): p. 1167-81.
134. den Haan, J.M. and G. Kraal, Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. *J Innate Immun*, 2012. 4(5-6): p. 437-45.
135. Kohyama, M., et al., Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature*, 2009. 457(7227): p. 318-21.
136. MacLennan, I.C., Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, 1994. 12: p. 117-39.
137. Epelman, S., et al., Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity*, 2014. 40(1): p. 91-104.
138. Stout, R.D. and J. Suttles, Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol*, 2004. 76(3): p. 509-13.
139. Stout, R.D., et al., Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol*, 2005. 175(1): p. 342-9.
140. Steinman, R.M. and J. Idoyaga, Features of the dendritic cell lineage. *Immunol Rev*, 2010. 234(1): p. 5-17.
141. Taylor, P.R., et al., Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 2005. 23: p. 901-44.
142. Biswas, S.K. and A. Mantovani, Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*, 2010. 11(10): p. 889-96.
143. Mantovani, A., et al., Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*, 2002. 23(11): p. 549-55.
144. Duluc, D., et al., Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood*, 2007. 110(13): p. 4319-30.
145. Hao, N.B., et al., Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol*, 2012. 2012: p. 948098.
146. Murphy, A.C., et al., Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*, 2010. 24(4): p. 641-51.
147. Smith, A.M., et al., Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J Exp Med*, 2009. 206(9): p. 1883-97.

148. Kawane, K., et al., Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature*, 2006. 443(7114): p. 998-1002.
149. Lucas, T., et al., Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol*, 2010. 184(7): p. 3964-77.
150. Martinez, F.O. and S. Gordon, The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, 2014. 6: p. 13.
151. Hotchkiss, R.S., G. Monneret, and D. Payen, Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2013. 13(12): p. 862-74.
152. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 1989. 170(6): p. 2081-95.
153. Moore, K.W., et al., Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, 2001. 19: p. 683-765.
154. D'Andrea, A., et al., Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med*, 1993. 178(3): p. 1041-8.
155. Fiorentino, D.F., et al., IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*, 1991. 147(11): p. 3815-22.
156. Mocellin, S., et al., The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004. 15(1): p. 61-76.
157. Carson, W.E., et al., The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood*, 1995. 85(12): p. 3577-85.
158. Jurlander, J., et al., Characterization of interleukin-10 receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 1997. 89(11): p. 4146-52.
159. Schottelius, A.J., et al., Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem*, 1999. 274(45): p. 31868-74.
160. Ito, S., et al., Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma-induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood*, 1999. 93(5): p. 1456-63.
161. Sabat, R., et al., Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010. 21(5): p. 331-44.
162. Netea, M.G., et al., Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol*, 2004. 172(6): p. 3712-8.
163. Boonstra, A., et al., Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J Immunol*, 2006. 177(11): p. 7551-8.
164. Saraiva, M. and A. O'Garra, The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*, 2010. 10(3): p. 170-81.
165. Rogers, N.C., et al., Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity*, 2005. 22(4): p. 507-17.

- 
166. Geijtenbeek, T.B., et al., Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med*, 2003. 197(1): p. 7-17.
167. Chang, E.Y., et al., Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. *J Immunol*, 2007. 178(11): p. 6705-9.
168. Kaiser, F., et al., TPL-2 negatively regulates interferon-beta production in macrophages and myeloid dendritic cells. *J Exp Med*, 2009. 206(9): p. 1863-71.
169. Agrawal, A., et al., ERK1-/- mice exhibit Th1 cell polarization and increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 2006. 176(10): p. 5788-96.
170. Saraiva, M., et al., Identification of a macrophage-specific chromatin signature in the IL-10 locus. *J Immunol*, 2005. 175(2): p. 1041-6.
171. Wang, Z.Y., et al., Regulation of IL-10 gene expression in Th2 cells by Jun proteins. *J Immunol*, 2005. 174(4): p. 2098-105.
172. Jones, E.A. and R.A. Flavell, Distal enhancer elements transcribe intergenic RNA in the IL-10 family gene cluster. *J Immunol*, 2005. 175(11): p. 7437-46.
173. Im, S.H., et al., Chromatin-level regulation of the IL10 gene in T cells. *J Biol Chem*, 2004. 279(45): p. 46818-25.
174. Chang, H.D., et al., Expression of IL-10 in Th memory lymphocytes is conditional on IL-12 or IL-4, unless the IL-10 gene is imprinted by GATA-3. *Eur J Immunol*, 2007. 37(3): p. 807-17.
175. Cheng, F., et al., A Novel Role for Histone Deacetylase 6 in the Regulation of the Tolerogenic STAT3/IL-10 Pathway in APCs. *J Immunol*, 2014. 193(6): p. 2850-62.
176. Brightbill, H.D., et al., A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages. *J Immunol*, 2000. 164(4): p. 1940-51.
177. Tone, M., et al., IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J Immunol*, 2000. 165(1): p. 286-91.
178. Mori, N. and D. Prager, Activation of the interleukin-10 gene in the human T lymphoma line HuT 78: identification and characterization of NF-kappa B binding sites in the regulatory region of the interleukin-10 gene. *Eur J Haematol*, 1997. 59(3): p. 162-70.
179. Brenner, S., et al., cAMP-induced Interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation. *J Biol Chem*, 2003. 278(8): p. 5597-604.
180. Liu, Y.W., et al., Functional cooperation of simian virus 40 promoter factor 1 and CCAAT/enhancer-binding protein beta and delta in lipopolysaccharide-induced gene activation of IL-10 in mouse macrophages. *J Immunol*, 2003. 171(2): p. 821-8.
181. Ziegler-Heitbrock, L., et al., IFN-alpha induces the human IL-10 gene by recruiting both IFN regulatory factor 1 and Stat3. *J Immunol*, 2003. 171(1): p. 285-90.
182. Anderson, P., Post-transcriptional control of cytokine production. *Nat Immunol*, 2008. 9(4): p. 353-9.
183. Stoecklin, G., et al., Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin. *J Biol Chem*, 2008. 283(17): p. 11689-99.

184. Tudor, C., et al., The p38 MAPK pathway inhibits tristetraprolin-directed decay of interleukin-10 and pro-inflammatory mediator mRNAs in murine macrophages. *FEBS Lett*, 2009. 583(12): p. 1933-8.
185. Schaljo, B., et al., Tristetraprolin is required for full anti-inflammatory response of murine macrophages to IL-10. *J Immunol*, 2009. 183(2): p. 1197-206.
186. Sharma, A., et al., Posttranscriptional regulation of interleukin-10 expression by hsa-miR-106a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(14): p. 5761-6.
187. Grunig, G., et al., Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Exp Med*, 1997. 185(6): p. 1089-99.
188. Hoffmann, K.F., A.W. Cheever, and T.A. Wynn, IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol*, 2000. 164(12): p. 6406-16.
189. Wynn, T.A., Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(8): p. 583-94.
190. Omer, F.M., J.B. de Souza, and E.M. Riley, Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii* infections. *J Immunol*, 2003. 171(10): p. 5430-6.
191. Ejrnaes, M., et al., Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J Exp Med*, 2006. 203(11): p. 2461-72.
192. Chomarat, P., et al., Balance of IL-1 receptor antagonist/IL-1 beta in rheumatoid synovium and its regulation by IL-4 and IL-10. *J Immunol*, 1995. 154(3): p. 1432-9.
193. Mussi, A., et al., IL-10 levels are decreased in psoriatic lesional skin as compared to the psoriatic lesion-free and normal skin suction blister fluids. *J Biol Regul Homeost Agents*, 1994. 8(4): p. 117-20.
194. van Deventer, S.J., C.O. Elson, and R.N. Fedorak, Multiple doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease. Crohn's Disease Study Group. *Gastroenterology*, 1997. 113(2): p. 383-9.
195. Lindsay, J.O., et al., The prevention and treatment of murine colitis using gene therapy with adenoviral vectors encoding IL-10. *J Immunol*, 2001. 166(12): p. 7625-33.
196. Fedorak, R.N., et al., Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. *Gastroenterology*, 2000. 119(6): p. 1473-82.
197. Matsuda, M., et al., Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med*, 1994. 180(6): p. 2371-6.
198. Huang, S., S.E. Ullrich, and M. Bar-Eli, Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience. *J Interferon Cytokine Res*, 1999. 19(7): p. 697-703.
199. Zufferey, R., et al., Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol*, 1997. 15(9): p. 871-5.

- 
200. Shen, F., et al., Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF-alpha-induced genes in bone cells. *J Leukoc Biol*, 2005. 77(3): p. 388-99.
201. Meerbrey, K.L., et al., The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(9): p. 3665-70.
202. Xu, J., Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts. *Curr Protoc Mol Biol*, 2005. Chapter 28: p. Unit 28 1.
203. Zhang, X., R. Goncalves, and D.M. Mosser, The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*, 2008. Chapter 14: p. Unit 14 1.
204. Pasparakis, M., et al., TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature*, 2002. 417(6891): p. 861-6.
205. Douni, E., et al., Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis. *J Inflamm*, 1995. 47(1-2): p. 27-38.
206. Pils, M.C., et al., Monocytes/macrophages and/or neutrophils are the target of IL-10 in the LPS endotoxemia model. *Eur J Immunol*, 2010. 40(2): p. 443-8.
207. Beatty, P.L., et al., Cutting edge: transgenic expression of human MUC1 in IL-10<sup>-/-</sup> mice accelerates inflammatory bowel disease and progression to colon cancer. *J Immunol*, 2007. 179(2): p. 735-9.
208. Hörber, S., et al., The Atypical Inhibitor of NF-kappaB, IkappaBzeta, Controls Macrophage Interleukin-10 Expression. *J Biol Chem*, 2016. 291(24): p. 12851-61.
209. Alvarez, Y., et al., The induction of IL-10 by zymosan in dendritic cells depends on CREB activation by the coactivators CREB-binding protein and TORC2 and autocrine PGE2. *J Immunol*, 2009. 183(2): p. 1471-9.
210. Natsuaki, Y., et al., Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol*, 2014. 15(11): p. 1064-9.
211. Dhamija, S., et al., IL-1-induced post-transcriptional mechanisms target overlapping translational silencing and destabilizing elements in IkappaBzeta mRNA. *J Biol Chem*, 2010. 285(38): p. 29165-78.
212. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 1998. 16: p. 225-60.
213. Cao, S., et al., NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem*, 2006. 281(36): p. 26041-50.
214. Groux, H. and F. Cottrez, The complex role of interleukin-10 in autoimmunity. *J Autoimmun*, 2003. 20(4): p. 281-5.
215. Totzke, G., et al., A novel member of the IkappaB family, human IkappaB-zeta, inhibits transactivation of p65 and its DNA binding. *J Biol Chem*, 2006. 281(18): p. 12645-54.
216. Hanihara, F., et al., Transcriptional and post-transcriptional regulation of IkappaB-zeta upon engagement of the BCR, TLRs and FcgammaR. *Int Immunol*, 2013. 25(9): p. 531-44.
217. Kuhn, R., et al., Interleukin-10-Deficient Mice Develop Chronic Enterocolitis. *Cell*, 1993. 75(2): p. 263-274.

218. Asadullah, K., et al., IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. *J Clin Invest*, 1998. 101(4): p. 783-94.
219. Nickoloff, B.J., et al., Keratinocyte interleukin-10 expression is upregulated in tape-stripped skin, poison ivy dermatitis, and Sezary syndrome, but not in psoriatic plaques. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994. 73(1): p. 63-8.
220. Asadullah, K., W. Sterry, and H.D. Volk, Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev*, 2003. 55(2): p. 241-69.
221. Steidler, L., et al., Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, 2000. 289(5483): p. 1352-5.

## 7 Erklärungen zum Eigenanteil

Die Ergebnisse in 3.3 und 3.4 und die Diskussion dieser Abschnitte zur Regulation von IL-10 durch I $\kappa$ B $\zeta$  wurden in Teilen bereits in der Fachzeitschrift *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht.<sup>208</sup> Betroffene Abbildungen in dieser Arbeit wurden vollständig von mir erstellt und bearbeitet.

Die Generierung und Etablierung der Raw264.7-TetOn-I $\kappa$ B $\zeta$  Zelllinie wurde von Dominic Hildebrand im Rahmen seiner Promotionsarbeit durchgeführt.

Die Genotypisierung der *Nfkbiz*<sup>wt/wt</sup> und *Nfkbiz*<sup>ko/ko</sup> Mäuse erfolgte unter Anleitung von Dr. Dominic Hildebrand und Sebastian Lorscheid, Doktorand der Abteilung, oder wurde von Kerstin Novy, technische Assistentin der Abteilung, durchgeführt.

Die Generierung des ELAM-1 Promotorkonstrukts erfolgte ebenfalls durch Kerstin Novy.

Alle weiteren Untersuchungen, Auswertungen sowie Darlegungen wurden, soweit nach bestem Wissen und Gewissen ersichtlich, von mir selbst durchgeführt.

Tübingen, 02.09.2016

Sebastian Hörber

## **8 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit zum Thema „Regulation der Interleukin-10 Expression durch das atypische „Inhibitor von NF- $\kappa$ B“ Protein I $\kappa$ B $\zeta$ “ eigenständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle sinngemäß und wörtlich übernommenen Textstellen aus Veröffentlichungen oder aus anderweitigen fremden Äußerungen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Tübingen, 02.09.2016

Sebastian Hörber

## 9 Veröffentlichungen

**Hörber S.**, Hildebrand D.G., Lieb W.S., Lorscheid S., Hailfinger S., Schulze-Osthoff K., Essmann F. The atypical inhibitor of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\zeta$ , controls macrophage interleukin-10 expression. *J Biol Chem*. 2016 Jun; 291(24):12851-61.

Hildebrand D.G., Alexander E., **Hörber S.**, Lehle S., Obermayer K., Münck N., Rothfuss O., Frick J., Morimatsu M., Schmitz I., Roth O., Schulze-Osthoff K. I $\kappa$ B $\zeta$  is a transcriptional key regulator of MCP-1/CCL2. *J Immunol*. 2013; 190(9):4812-20.

Guenova E., Teske A., Fehrenbacher B., **Hoerber S.**, Adamczyk A., Schaller M., Hoetzenecker W., Biedermann T. Interleukin 23 expression in pyoderma gangrenosum and targeted therapy with ustekinumab. *Arch Dermatol*. 2011 Oct; 147(10):1203-5.

Guenova E., Hoetzenecker W., **Hoerber S.**, Boettcher Y., Teske A., Volz T., Schaller M., Biedermann T., Röcken M. Systemic IL-4 treatment suppresses IL-23 and abrogates inflammatory responses in T cell mediated delayed type hypersensitivity. Conference Paper in *J Invest Dermatol*. 2010 Sep; Vol 130

Guenova E., Hoetzenecker W., Hamdi N., **Hoerber S.**, Volz T., Boettcher Y., Schaller M., Biedermann T., Röcken M. Targeted depletion of IL-23 by IL-4 in vivo impairs T cell mediated delayed-type hypersensitivity. Conference Paper in *Exp Dermatol*. 2010 Feb; Vol 19

## **10 Danksagungen**

Ich möchte mich ganz herzlich bei Professor Dr. Klaus Schulze-Osthoff für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe, die exzellenten Arbeitsbedingungen und die Unterstützung in den letzten Jahren bedanken.

Besonderer Dank gilt PD Dr. Frank Eßmann für seine ausgezeichnete Betreuung, seine Ratschläge und Hilfestellungen während den letzten Jahren und auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Den Mitgliedern der AG Schulze-Osthoff danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die zahlreichen Hilfen und die schöne Zeit im Labor.

Meinen Eltern Regina und Günther Hörber danke ich von Herzen für Ihre Unterstützung in den letzten Jahren ohne die diese Arbeit nicht denkbar gewesen wäre.

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.