

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universitätsklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth**

**Untersuchung der Rolle von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ bei der Entstehung semimaturer
dendritischer Zellen und der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase**

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

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

**vorgelegt von
Christian Klameth
aus
Herrenberg**

2014

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatterin: Professor Dr. J.-S. Frick

2. Berichtstatter: Juniorprofessor Dr. A. Weber

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung.....	10
1.1 Mikroflora und Immuntoleranz im gesunden Darm	10
1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	11
1.3 Das Immunsystem	13
1.3.1 Das angeborene Immunsystem.....	13
1.3.2 Das adaptive Immunsystem	14
1.4 Dendritische Zellen	14
1.4.1 Was sind dendritische Zellen?.....	14
1.4.2 Welche Rolle haben dendritische Zellen?.....	15
1.4.3 Subtypen dendritischer Zellen	17
1.4.3.1 Immature dendritische Zellen	17
1.4.3.2 Mature dendritische Zellen	17
1.4.3.3 Semimature dendritische Zellen	17
1.5 Der Transkriptionsfaktor NFκB und seine Regulation	18
1.5.1 Bedeutung des Transkriptionsfaktors NFκB.....	18
1.5.2 Beschreibung und Funktionsweise von NFκB.....	19
1.5.3 Regulationsmöglichkeiten des Transkriptionsfaktors NFκB	20
1.5.3.1 Klassische Inhibitoren von NFκB	21
1.5.3.2 Atypische Inhibitoren von NFκB – das Protein IκB-ζ.....	21
1.6 Vorstellung zweier beispielhafter Darmkeime.....	23
1.7 Vorarbeiten	23
1.8 Zielsetzung	24
2. Material und Methoden.....	26
2.1 Material	26
2.1.1 Geräte	26
2.1.2 Verbrauchsgegenstände	26
2.1.3 Chemikalien	26
2.1.4 Antikörper.....	27
2.1.4.1 Western-Blot.....	27
2.1.4.2 Durchflusszytometrie	27
2.1.5 Bakterien.....	27

2.1.6	Kits	28
2.1.7	PCR Programme	28
2.1.7.1	qRT-RT-PCR.....	28
2.1.7.2	Genotypisierung	28
2.1.8	Medien und Puffer	29
2.1.8.1	Zellkultur.....	29
2.1.8.2	Bakterien.....	29
2.1.8.3	SDS-PAGE und Western Blotting	29
2.1.8.4	RNA Isolation und RT-RT-PCR	30
2.1.8.5	Kernextraktion und TransAM NFκB-ELISA	31
2.1.8.6	IL-6 und TNF-α ELISAs	31
2.1.8.7	Durchflusszytometrie	32
2.1.9	Primer	32
2.1.9.1	RT-RT-PCR.....	32
2.1.9.2	Genotypisierung	32
2.1.10	Mäuse	32
2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Bakterien.....	33
2.2.1.1	Bacteroides vulgatus mpk.....	33
2.2.1.2	Escherichia coli mpk2.....	33
2.2.2	Etablierung einer IκB-ζ ^{-/-} -Mauslinie	33
2.2.2.1	Zucht und Haltung	33
2.2.2.2	DNA Isolation	34
2.2.2.3	Genotypisierung	34
2.2.3	Zellkultur	35
2.2.3.1	Zellzahlbestimmung.....	35
2.2.3.2	Isolierung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark (BMDC)	35
2.2.3.3	BMDC Kultivierung	35
2.2.4	Stimulation und Restimulation	36
2.2.5	Proteinuntersuchungen	36
2.2.5.1	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	36
2.2.5.2	Probenvorbereitung	37
2.2.5.3	SDS-PAGE.....	37
2.2.5.4	Western Blotting	37
2.2.5.5	Blocken	38
2.2.5.6	Teilung der Membran	38
2.2.5.7	Immundetektion von IκB-ζ und β-Actin	38

2.2.5.8	Entwicklung	38
2.2.6	Genexpressionsanalyse	39
2.2.6.1	Kontaminationsprophylaxe	39
2.2.6.2	RNA Konzentrationsbestimmung	39
2.2.6.3	Probenvorbereitung	39
2.2.6.4	RNA Aufreinigung	39
2.2.6.5	DNase Verdau	40
2.2.6.6	RT-RT-PCR	40
2.2.6.7	Auswertung der RT-RT-PCR	41
2.2.7	Zytokinbestimmung	41
2.2.7.1	Probenvorbereitung	42
2.2.7.2	ELISA Durchführung	42
2.2.8	TransAM NF κ B ELISA	43
2.2.8.1	Herstellung von Kernlysaten	43
2.2.8.2	ELISA Durchführung	43
2.2.9	DC Aktivierungsuntersuchung mittels Durchflusszytometrie	44
2.2.10	Untersuchung einer induzierten Colitis <i>in vivo</i>	45
2.2.10.1	Induktion und Versuchsablauf	45
2.2.10.2	Analyse der Auswirkung einer DSS induzierten Colitis	45
3.	Ergebnisse	46
3.1	Analyse der TNF α - und IL-6-Zytokinexpression immaturer, semimaturer und maturer WT BMDCs	46
3.2	Analyse der I κ B- ζ -Expression	48
3.2.1	Analyse der I κ B- ζ -Proteinexpression in WT BMDCs	48
3.2.2	Semiquantitative Analyse der I κ B- ζ -mRNA-Expression in WT BMDCs	50
3.2.2.1	I κ B- ζ -mRNA-Expressionsraten in WT BMDCs nach Stimulation	50
3.2.2.2	I κ B- ζ -mRNA-Expressionsraten in WT BMDCs nach Restimulation	50
3.2.3	Semiquantitative Analyse der I κ B- ζ -mRNA-Expression in IL-6 ^{-/-} BMDCs	53
3.2.3.1	I κ B- ζ -mRNA-Expressionsraten in IL-6 ^{-/-} BMDCs nach Stimulation	53
3.2.3.2	I κ B- ζ -mRNA-Expressionsraten in IL-6 ^{-/-} BMDCs nach Restimulation	53
3.3	Analyse der Zusammensetzung der NF κ B-Untereinheiten in BMDC-Kernlysaten	56
3.4	Analyse der TNF- α - und IL-6-Zytokinexpression in I κ B- ζ ^{-/-} BMDCs	59
3.5	Analyse der Aktivierungs- und Oberflächenmarker auf WT und I κ B- ζ ^{-/-} BMDCs	62
3.5.1	Analyse der MHC-II Oberflächenexpression auf WT und I κ B- ζ ^{-/-} BMDCs	62
3.5.2	Analyse der CD40 Oberflächenexpression auf WT und I κ B- ζ ^{-/-} BMDCs	66
3.6	Auswirkungen der I κ B- ζ -Deletion auf eine DSS induzierte akute Colitis <i>in vivo</i>	67

4. Diskussion	70
4.1 Relevanz von I κ B- ζ in dendritischen Zellen	70
4.1.1 Zytokinproduktion dendritischer Zellen ist abhängig von ihrem Reifegrad	70
4.1.2 I κ B- ζ lässt sich in dendritischen Zellen stimuluspezifisch induzieren.....	72
4.1.3 I κ B- ζ mRNA-Expression wird durch IL-6 begünstigt	73
4.1.4 NF κ B Verhältnis unter Restimulation zur p50-Untereinheit verschoben.....	74
4.2 Auswirkungen der I κ B- ζ -Deletion auf dendritische Zellen.....	75
4.2.1 I κ B- ζ -Deletion resultiert in stark veränderter Zytokinexpression.....	75
4.2.2 I κ B- ζ -Deletion resultiert in erhöhter MHC-II- und Kostimulator-Expression	77
4.3 I κ B- ζ -Defizienz resultiert einem aggressiveren Verlauf einer akuten Colitis.....	77
5. Zusammenfassung.....	79
6. Literaturverzeichnis	81
7. Danksagung.....	86
8. Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANK	<i>ankyrin repeats</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i> (antigenpräsentierende Zelle)
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
BMDC	<i>Bone marrow derived dendritic cell</i> (knochenmarksgereifte dendritische Zelle)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CU	Colitis ulcerosa
DAI	<i>Disease Activity Index</i>
DC	<i>Dendritic cell</i> (dendritische Zelle)
DSS	<i>Dextran sulfate sodium</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IKK	<i>Inducible IκB-kinase</i>
IL	Interleukin
IκB	Inhibitor κ B
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LZ	<i>Leucine zipper</i>
MAMP	<i>Microbe associated molecular pattern</i>
MC	Morbus Crohn
MHC	<i>Major histokompatibility complex</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
NFκB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PFA	Paraformaldehyd
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RHD	<i>Rel homology domain</i>
RT	Raumtemperatur
RT-RT-PCR	<i>Real time - Reverse Transcription - PCR</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Tab.	Tabelle
TAD	<i>Transcriptional activation domain</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
T_H	T-Helferzelle
TLR	<i>Toll-Like</i> Rezeptor
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Mikroflora und Immuntoleranz im gesunden Darm

Damit der menschliche Verdauungstrakt tagtäglich seiner Aufgabe nachkommen kann, den Organismus mit lebensnotwendigen Nährstoffen zu versorgen und gleichzeitig Gift- und Abfallstoffe aus dem Körper auszuschleusen, ist er auf eine schier unzählbare Menge und Vielfalt bakterieller Symbionten angewiesen, die so genannte Mikroflora des Darms^{2,3}. Diese kommensalen Bakterien helfen dem Verdauungsapparat Gene zu regulieren, Nährstoffe zu absorbieren, Fremdstoffe abzubauen und nicht zuletzt die mukosale Barriere gegenüber pathogenen Keimen aufrechtzuerhalten⁴. Beeinflusst durch Faktoren genetischer sowie umweltbezogener Art (z.B. Hygiene) entwickelt sich aus dem nach der Geburt anfangs keimfreien Darm im Laufe der ersten Lebensjahre ein den dort herrschenden Bedingungen entsprechendes, vorwiegend anaerob dominiertes System verschiedenster bakterieller Spezies. Trotz der extrem hohen Keimzahl von bis zu 10^{14} Bakterien im

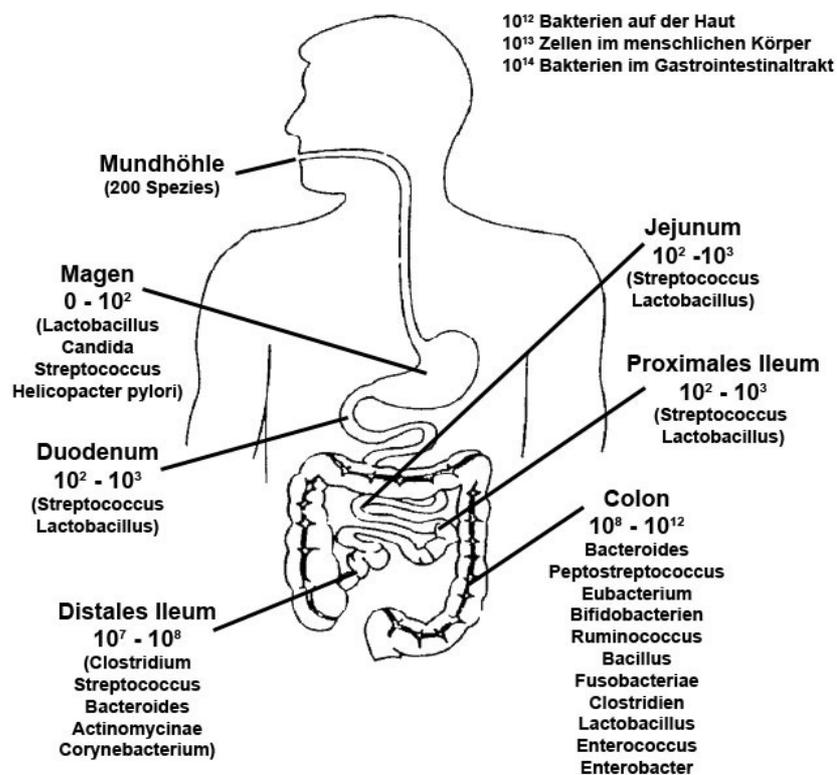


Abb. 1: Mikroflora des Gastrointestinaltraktes

(Modifiziert nach Berg²)

Gastrointestinaltrakt des Menschen (zum Vergleich: Der menschliche Organismus besitzt lediglich etwa 10^{13} Zellen) kommt es im gesunden Darm normalerweise zu keiner manifesten inflammatorischen Reaktion gegen diese Keime. Es entwickelt sich vielmehr ein Zustand der aktiven Toleranz gegenüber diesen Bakterien, was sich daran zeigt, dass dieselben Bakterien in primär sterilen Bereichen des Körpers eine heftige Immunantwort auslösen würden^{5,6}.

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Ist der Zustand aus Toleranz und Inflammation gestört, kann es zum Krankheitsbild einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED) kommen. Unter dem Begriff der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen subsummiert man die beiden Krankheitsbilder des Morbus Crohn (MC) und der Colitis ulcerosa (CU). Beiden Krankheiten liegt eine Dysregulation des Immunsystems zugrunde, welche langfristig zu einer unumkehrbaren Störung der gastrointestinalen Struktur und deren Funktion führt⁷. Trotz klinisch teilweise sehr ähnlicher Präsentation, können doch klare Unterschiede zwischen den beiden Krankheitsbildern festgemacht werden. So handelt es sich bei MC um eine schubförmig auftretende, die gesamte Darmwand betreffende, entzündliche Erkrankung, welche an verschiedenen Stellen im ganzen Gastrointestinaltrakt auftreten kann und dort häufig mit Granulomen und Fisteln assoziiert ist. Bei der CU hingegen ist die Inflammation streng auf das Colon begrenzt und dringt auch nicht durch alle Darmwandschichten hindurch. Ferner ist die Entzündung zusammenhängend und breitet sich beinahe ausnahmslos vom Rectum in oraler Richtung aus⁸. Patienten imponieren bei beiden Erkrankungen mit starken abdominellen Beschwerden, Durchfall und rektalen Blutungen, aber auch mit unspezifischen Symptomen wie Fieber, Müdigkeit und Gewichtsverlust⁹. Auch extraintestinale Krankheiten wie zum Beispiel Uveitis, primär sklerosierende Cholangitis, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum und Arthritis können auf dem Vorhandensein einer CED beruhen¹. Zusätzlich haben Patienten mit CED ein gegenüber der Allgemeinbevölkerung erhöhtes Risiko an Neoplasien des Gastrointestinaltrakts zu erkranken¹⁰.

Die genaue Ätiologie beider Erkrankungen ist bis heute noch nicht vollständig geklärt, aber es konnten diverse krankheitsbegünstigende und –verhindernde

Faktoren beschrieben werden. So gilt der familiäre Hintergrund des Patienten für beide Krankheiten nach wie vor als größter unabhängiger Risikofaktor, was eine genetische Komponente sehr wahrscheinlich macht^{11,12}. Aber auch andere Einflussgrößen wie ethnische Abstammung (erhöhtes Risiko für Kaukasier und Afroamerikaner, geringeres Risiko für Asiaten und Hispanoamerikaner), geographische Lage (Nord-Süd und West-Ost Gefälle), Essgewohnheiten (erhöhtes Risiko bei kohlenhydratreicher Ernährung), Rauchen (erhöhtes Risiko für MC, Risikoreduktion bei CU) sowie übermäßige Hygiene scheinen eine große Rolle bei Entstehung und Verlauf der beiden Erkrankungen zu spielen¹³⁻¹⁶. Entsprechend der gängigen Krankheitshypothese haben aber alle Faktoren, genetisch wie umweltbedingter Art, gemeinsam, dass sie zu einer inadäquaten und überschießenden, T_H1-, T_H2- und T_H17-Zell basierten Immunantwort des Körpers mit einer gestörten Toleranz gegenüber der bakteriellen Mikroflora des Darms führen^{9,17-22}.

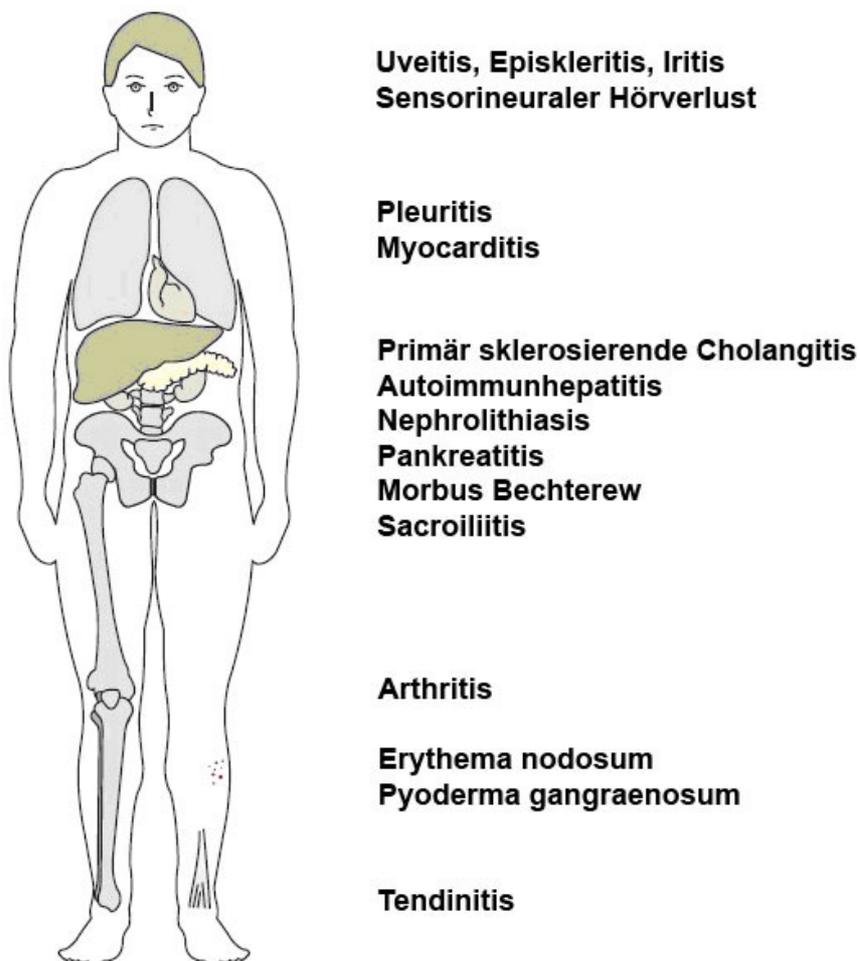


Abb. 2: Extraintestinale Manifestationsorte chronisch entzündlicher Darmerkrankungen
(Modifiziert nach Baumgart¹)

1.3 Das Immunsystem

Arbeitet das Immunsystem korrekt, dient es als Verteidigung gegen Krankheitserreger aller Art wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten. Ebenso ist es in der Lage, entartete Körperzellen zu erkennen und zu beseitigen. Entsprechend seiner Entstehungsgeschichte lässt sich das Immunsystem in das angeborene und das erworbene, adaptive Immunsystem unterteilen²³.

1.3.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist entweder passiv oder wird bei Bedarf sehr schnell aktiviert. Im Gegenzug ist es allerdings nicht in der Lage, Krankheitserreger spezifisch zu erkennen oder ein immunologisches Gedächtnis auszubilden²³.

Die erste defensive Funktion des angeborenen Immunsystems ist die reine physikalische Barriere der Oberflächenepithelien des Organismus. Bei Schleimhäuten sind diese zusätzlich mit einer schützenden Schicht aus Mukus überzogen, welche die Anheftung fremder Organismen erschwert. Des Weiteren produzieren manche Epithelien chemische Substanzen, welche das Wachstum von Mikroorganismen hemmen oder diese sogar ganz abtöten. Ein Beispiel hierfür wäre der saure pH-Wert des Magens sowie die von den Panethschen Zellen im Darm produzierten α -Defensine. Besonders im Darm stellt auch die Besiedlung der Oberflächenepithelien mit kommensalen Bakterien eine Schutzfunktion dar (siehe 1.1). Durch Konkurrenz mit pathogenen Bakterien um Nährstoffe und Anheftungsstellen an Zelloberflächen entsteht die sogenannte Kolonisierungsresistenz²⁴.

Neben diesen eher passiven Möglichkeiten des angeborenen Immunsystems, Krankheitserreger abzuwehren, gibt es auch ein aktives Defensivsystem auf zellulärer Basis. Hierzu zählen die phagozytierenden Zelltypen der Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen (siehe 1.4) sowie Mastzellen, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten und natürliche Killerzellen. Während Letztere für die Erkennung virusinfizierter oder entarteter Zellen und deren direkte Abtötung verantwortlich sind, erkennen die erstgenannten Zelltypen eingedrungene Mikroorganismen anhand konservierter Muster auf deren Oberfläche. Diese sogenannten *microbe associated molecular patterns* (MAMPs), zu denen beispielsweise das LPS gramnegativer Bakterien zählt, werden über *pattern*

recognition receptors (PRRs) wie *Toll-like receptors* (TLR) erkannt, wodurch die Phagozytose des Mikroorganismus eingeleitet wird²⁵. Eine weitere wichtige Aufgabe der Zellen des angeborenen Immunsystems ist die Produktion von Zytokinen und Chemokinen, die weitere Zellen an den Entzündungsort locken und somit den Weg für eine adaptive Immunantwort ebnet²³.

1.3.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich dadurch aus, dass es Erreger spezifisch erkennt und nach Abklingen einer Infektion ein immunologisches Gedächtnis entwickelt, welches dafür sorgt, dass bei einem erneuten Kontakt mit demselben Erregertyp das adaptive Immunsystem direkt in vollem Ausmaß zur Verfügung steht. Zu den Zellen der spezifischen Immunabwehr gehören B- und T-Lymphozyten. Sie werden durch antigenpräsentierende Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert und zu Proliferation und Selektion angeregt. Aktivierte Lymphozyten exprimieren daraufhin einen Antikörper, welcher im Falle von B-Lymphozyten ins Blut abgegeben wird und die humorale Immunität bedingt. Zelluläre Immunität hingegen wird über T-Lymphozyten realisiert. Sie präsentieren den Antikörper als Rezeptor auf ihrer Oberfläche und können so Krankheitserreger spezifisch erkennen und binden²³. Man unterteilt T-Lymphozyten ferner nach ihren spezifischen Funktionen im Gesamtgefüge der Immunabwehr in T-Helferzellen (T_H-Zellen), welche wiederum in T_{H1}, T_{H2} und T_{H17} unterteilt werden können, regulatorische T-Zellen (T_{reg}) und zytotoxische T-Zellen (T_c).

Läuft eine Immunantwort gegen einen pathogenen Keim korrekt ab, arbeiten angeborenes und adaptives Immunsystem immer Hand in Hand und ermöglichen so die erfolgreiche Abwehr des eingedrungenen Krankheitserregers.

1.4 Dendritische Zellen

1.4.1 Was sind dendritische Zellen?

Dendritische Zellen (DCs) sind neben Makrophagen die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen (APCs) des menschlichen Organismus und sind dem angeborenen Immunsystem zugehörig. Sie entwickeln sich aus myeloiden

Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und verbinden das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem. Entsprechend dieser Aufgabe sind sie primär in Haut, Lymphknoten, Milz, Thymus und im Gastrointestinaltrakt zu finden²³. Besonders im Colon gelten sie hierbei als die vorherrschenden APCs²⁶. Entlang der *tight junctions* der Epithelzellen ragen die Ausläufer der dendritischen Zellen bis in das Darmlumen hinein, wo sie in ständigem Kontakt mit der dort vorliegenden bakteriellen Mikroflora stehen²⁷. Sie sind in der Lage Antigene über TLR zu erkennen und via Makropinozytose, Phagozytose oder Endozytose aufzunehmen und nach intrazellulärer Verarbeitung die Antigenfragmente über MHC-II Oberflächenproteine den T-Zellen des erworbenen Immunsystems zu präsentieren, um so eine Immunantwort in Gang zu setzen²⁸⁻³⁰.

1.4.2 Welche Rolle haben dendritische Zellen?

Haben dendritische Zellen ein Antigen über TLR detektiert, wird die Antigenaufnahme induziert. Auf diese Weise aktivierte dendritische Zellen begeben sich in Richtung sekundär lymphatischem Gewebe wie Thymus, Lymphknoten und Milz, um diese Peptidfragmente via MHC-II den T-Helferzellen zu präsentieren³¹⁻³⁵. Gleichzeitig setzt die Reifung der dendritischen Zelle ein, welche mit der Änderung der Expression spezifischer Oberflächenmarker einhergeht: Um das Antigen den T-Helferzellen bestmöglich darbieten zu können, wird die Oberflächenexpression von MHC-II erhöht. Zusätzlich werden auch kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 auf der Zelloberfläche der DCs verstärkt exprimiert. Beides zusammen führt letztendlich zur verbesserten Rekrutierung naiver T_H0 -Zellen²³. Die Polarisierung der T-Helferzellen in T_H1 -, T_H2 - und T_H17 - und T_{reg} -Richtung wiederum ist vor allem von den Zytokinen verursacht, welche die dendritischen Zellen in Abhängigkeit von ihrer Differenzierung produzieren. So resultiert eine IL-12 Sekretion durch APCs in einer T_H1 Antwort, während IL-4 zu einer T_H2 Antwort führt³⁶. TGF- β in Kombination mit IL-6 wiederum begünstigt eine T_H17 -Differenzierung naiver T-Zellen³⁷⁻³⁹. Zusätzlich induziert TGF- β den Transkriptionsfaktor *foxP3*, was zur Induktion regulatorischer T-Zellen führt³⁸. Auch IL-10 sezernierende APCs können regulatorische T-Zellen induzieren⁴⁰.

Den dendritischen Zellen wird also aufgrund ihrer Fähigkeit zur Überwachung aller nach außen hin präsentierten Oberflächen des menschlichen Körpers und der

situationsadaptierten Einteilung der ihn besiedelnden Keime in kommensal oder pathogen die entscheidende Rolle zu teil, entweder eine Immunantwort in Gang zu setzen, oder den *status quo* durch aktive Toleranz zu erhalten⁴¹⁻⁴³.

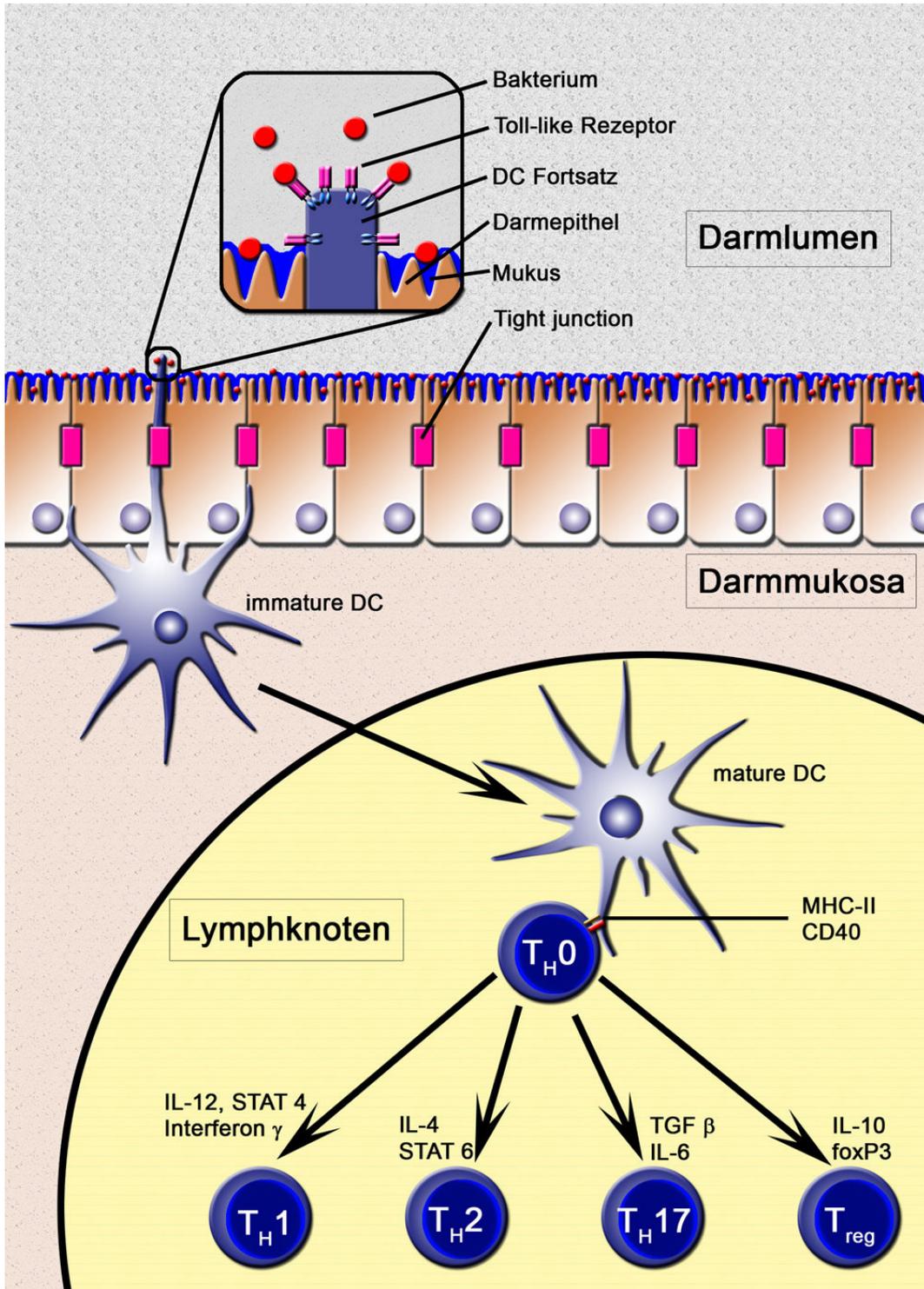


Abb. 3: Funktionsschema dendritischer Zellen im Darm

1.4.3 Subtypen dendritischer Zellen

Dendritische Zelle ist nicht gleich dendritische Zelle. Anhand diverser Kriterien wie Oberflächenmarker, Zytokinexpression, Wanderverhalten, Antigenaufnahme und T-Zell-Rekrutierungsfähigkeit lassen sich drei verschiedene Phänotypen von DCs unterscheiden: Immature, mature und semimature dendritische Zellen.

1.4.3.1 Immature dendritische Zellen

Dendritische Zellen, welche sich entweder in den Blutgefäßen oder im Gewebe verschiedener Organe aufhalten, entsprechen für gewöhnlich dem immaturren Phänotyp. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie praktisch ununterbrochen Antigene aufnehmen und prozessieren²⁹. Im Gegenzug haben sie eine sehr geringe Expression an Oberflächenmarkern wie MHC-II, CD40, CD80 und CD86 und eine entsprechend geringe Fähigkeit zur Antigenpräsentation und zur Initiierung einer T-Zell gesteuerten Immunantwort^{44,45}.

1.4.3.2 Mature dendritische Zellen

Kommt es in der Peripherie zur Aktivierung der dendritischen Zelle zum Beispiel durch Kontakt mit Bakterien oder im Zuge einer Inflammation, beginnt die immature dendritische Zelle zu reifen. Sie verlässt das Gewebe und wandert entlang der ableitenden Lymphgefäße in Richtung Lymphknoten⁴⁶. Währenddessen wird auch die Expression von MHC-II, der Kostimulatoren CD40, CD80 und CD86 und die diverser Zytokine, wie IL-12p40, IL-12p70, TNF- α , IL-1 β , und IL-6 erhöht^{43,47,48}. Im Lymphknoten angekommen regt die mature dendritische Zelle die Proliferation von T-Helferzellen an und sorgt durch ihre Zytokinproduktion für eine Polarisierung dieser T-Zellen in T_H1-, T_H2- und T_H17-Richtung^{23,36,49}.

1.4.3.3 Semimature dendritische Zellen

Genau wie bei maturaen dendritischen Zellen induziert auch beim dritten Phänotyp, den semimaturaen dendritischen Zellen, ein in der Peripherie stattgefundenener Antigenkontakt die anschließende Reifung der immaturren Zelle. Allerdings zeigen sich hier bezüglich Oberflächenmarker, Kostimulatoren und Zytokinexpressionsmuster deutliche Unterschiede zwischen maturaen und

semimaturen DCs. Semimature dendritische Zellen zeichnen sich durch eine mittelgradige Hochregulation der MHC-Klasse-II Oberflächenexpression bei gering bis mittelgradig erhöhter Expression der Kostimulatoren CD40, CD80, CD86 aus⁴⁷. Bezüglich der Zytokinexpression zeigen semimature DCs eine geringe Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL12p70 und TNF- α bei gleichzeitig hoher Produktion von IL-6^{43,47}. Eine Besonderheit dieses Phänotyps dendritischer Zellen ist auch, dass sie in ihrem Zustand arretiert sind und auch nach einem zweiten Stimulus nicht vollständig maturieren⁴³. Semimature dendritische Zellen scheinen also aufgrund der niedrigen Expression von kostimulatorischen Molekülen, MHC-Klasse-II sowie des Zytokinprofils T-Zellen nicht zu aktivieren oder zu polarisieren und damit eher zum Erhalt der intestinalen Homöostase beizutragen⁴³.

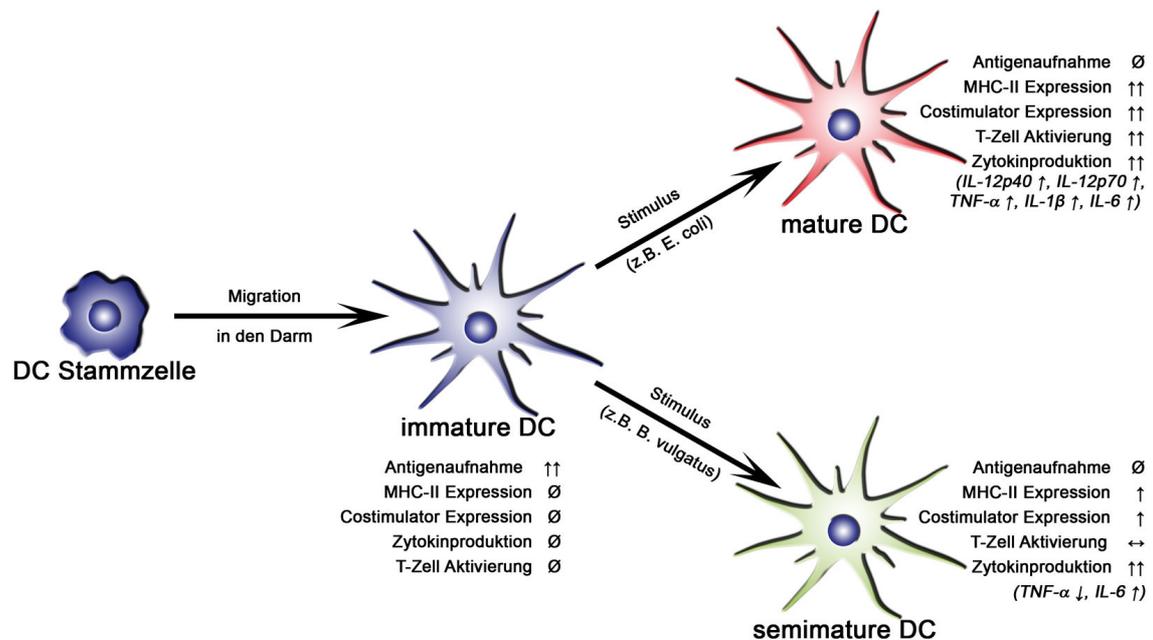


Abb. 4: Reifung dendritischer Zellen mit Oberflächenmarker- und Zytokinexpression

1.5 Der Transkriptionsfaktor NF κ B und seine Regulation

1.5.1 Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF κ B

Nuclear factor- κ B (NF κ B) stellt eine Familie von Transkriptionsfaktoren dar, der in ihrer Gesamtheit eine der bedeutendsten Rollen im Hinblick auf Inflammation, Immunität, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose zukommt. Eine Vielzahl

äußerer Stimuli, wie zum Beispiel die Erkennung bakterieller Oberflächenmoleküle über *Toll-like* Rezeptoren (TLR), führt zur Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors und greift damit auf eines der konserviertesten und bestregulierten Systeme der Zelle zu⁵⁰⁻⁵². Bindestellen für NFκB lassen sich bei einer Fülle von Promotorregionen für verschiedenste Gene finden, unter anderem IL-1β, IL-12p40, IL-10, TNF-α und IL-6⁵³⁻⁵⁸. Es verwundert daher nicht, dass eine Dysregulation von NFκB mit schweren Krankheitsbildern wie zum Beispiel Atherosklerose, Arthritis, Asthma, AIDS, Diabetes, Krebs, Muskeldystrophie, viralen Infektionen und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert ist⁵⁹⁻⁶¹.

1.5.2 Beschreibung und Funktionsweise von NFκB

Zur NFκB Familie gehören die fünf Untereinheiten p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 und p52, die Homo- oder Heterodimere bilden müssen, um transkriptionell aktiv zu werden. Dafür weisen alle Untereinheiten eine 300 Aminosäuren lange, streng konservierte Region am N-terminalen Ende des Proteins auf, die sogenannte *Rel homology domain* (RHD)^{62,63}. Diese ist neben der Dimerbildung auch für die DNA-Interaktion, die Translokation zum Nukleus sowie die Interaktion mit den Inhibitoren (IκB) verantwortlich^{64,65}. Weiter lässt sich die Familie der NFκB Untereinheiten noch nach ihrer Fähigkeit zur Aktivierung der Transkription einteilen. So verfügen lediglich die Untereinheiten p65, RelB und c-Rel über die *transcriptional activation domain* (TAD) und sind damit in der Lage, den DNA-Transkriptionsapparat zu starten. Entsprechend kann man bei p50 und p52 Homodimeren eher eine Inhibition der Transkription feststellen, da diese die DNA-Bindestelle für transkriptionell aktive NFκB-Dimere blockieren können⁶⁶. Allerdings stellt der p65/p50 Heterodimer in den meisten Zellen die vorherrschende NFκB-Dimer-Konstellation dar⁶⁷.

In unstimulierten Zellen liegt NFκB in einer Trimerform im Zytosol vor. Der NFκB-Dimer ist mit einem IκB-Protein verbunden, welches die in der RHD enthaltene nukleäre Translokationssequenz verdeckt und so das immer vorhandene Gleichgewicht zwischen zytosolischer und nukleärer Lokalisation des NFκB-Dimers zugunsten des Zytosols verschiebt⁵⁰. Kommt es nun zur Stimulation der Zelle, beispielsweise durch Erkennung bakterieller Oberflächenmoleküle über TLR, wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, an deren Ende IκB durch Aktivierung der

I κ B-Kinase (IKK) phosphoryliert und degradiert wird. Der nun freie NF κ B-Dimer gelangt in den Zellkern und startet dort die Transkription seiner Zielgene.

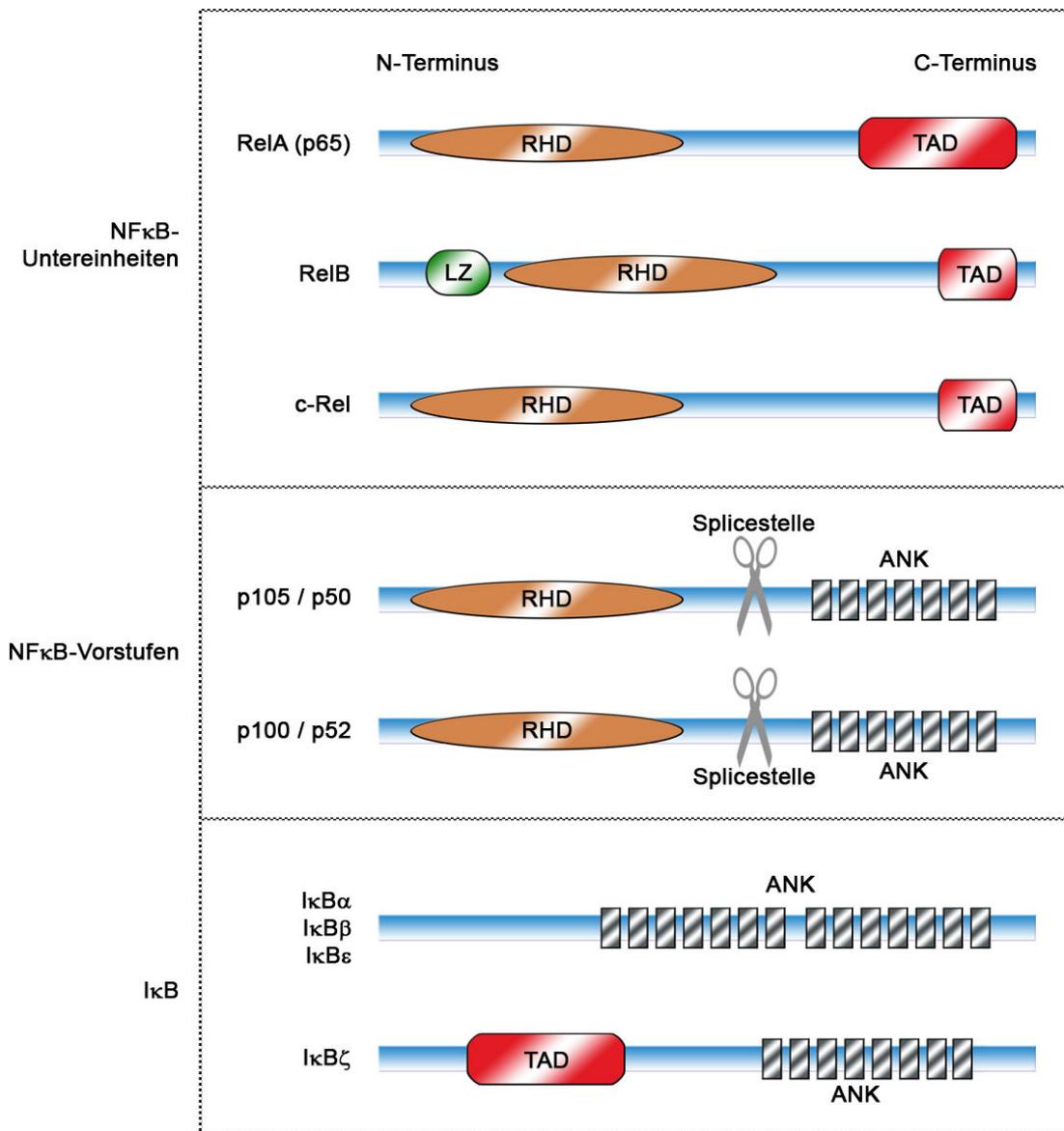


Abb. 5: Schematische Darstellung der NF κ B-Untereinheiten und seiner Inhibitoren I κ B

1.5.3 Regulationsmöglichkeiten des Transkriptionsfaktors NF κ B

Da NF κ B für die Expression so vieler zellregulierender Gene von Bedeutung ist, ist eine strenge und präzise Regulation dieses Transkriptionsfaktors von essenzieller Bedeutung. Neben einer Reihe posttranslationaler Modifikationen an Zielgenen oder direkt an NF κ B kommt der größte Anteil hierbei sicherlich den I κ B-Proteinen und ihren Kinasen (IKK) zu⁵⁰. Aufgrund ihrer Relevanz wird daher im Folgenden speziell auf deren Funktionsweise und Interaktion mit NF κ B eingegangen.

1.5.3.1 Klassische Inhibitoren von NFκB

In ruhenden, unstimulierten Zellen liegt der NFκB-Dimer gebunden an seinen Inhibitor IκB im Zytosol vor. All diese Inhibitoren zeichnen sich durch das Vorhandensein von fünf bis sieben *ankyrin repeats* (ANK) Motiven aus, welche ihnen die Interaktion mit der RHD-Sequenz der NFκB-Untereinheiten ermöglichen. Von besonderer Bedeutung für die zytosolische Inhibition sind dabei vor allem die Inhibitoren IκB-α, IκB-β und IκB-ε. Zusätzlich zu diesen besitzen aber auch die NFκB Untereinheiten p100 und p105, welche Vorstufen der Untereinheiten p52 bzw. p50 sind, eine ANK Sequenz und haben entsprechend inhibitorischen Effekt auf NFκB-Dimere^{50,68}. Es wird angenommen, dass jedes IκB-Protein bevorzugt an eine spezielle Kombination von NFκB-Untereinheiten bindet. So binden IκB-α und IκB-β bevorzugt p65 und c-Rel Untereinheiten, mit einer höheren Affinität von IκB-α zu p65/p50 Heterodimeren als zu p65/p65 Homodimeren. RelB hingegen wird exklusiv von p100 gebunden und im Zytosol gehalten⁶⁸⁻⁷⁰.

Um die Inhibition zu beenden, werden die klassischen Inhibitoren IκB-α, IκB-β und IκB-ε alle durch IKK phosphoryliert und nach Ubiquitinierung am Proteasom abgebaut (*canonical pathway*)^{71,72}. Bei p100 und p105 hingegen gibt es einerseits die Möglichkeit ihres teilweisen Abbaus zu den funktionstüchtigen Untereinheiten p52 bzw. p50, welche dann meist RelB-gebunden den Kern passieren, oder aber ebenso den klassischen Weg der kompletten Degradierung am Proteasom⁷³⁻⁷⁶.

Weiterhin erwähnenswert ist die Tatsache, dass die klassischen NFκB-Inhibitoren für gewöhnlich selbst Zielgene ihres inhibierten Transkriptionsfaktors sind. So wird beispielsweise die Aktivität von NFκB in einem *feedback-loop* negativ reguliert, indem die Gene für IκB-α abgelesen werden und dieses neusynthetisierte Protein NFκB wieder aus dem Kern schleust^{67,77}.

1.5.3.2 Atypische Inhibitoren von NFκB – das Protein IκB-ζ

Neben den klassischen Inhibitoren des Transkriptionsfaktors NFκB existieren noch zwei weitere Proteine, welche über *ankyrin repeats* verfügen und somit mit NFκB interagieren können. Einerseits das Protein Bcl3, auf welches an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll, und andererseits ein Inhibitor von NFκB zeta (IκB-ζ). Innerhalb der IκB-Familie stellt dieser eine absolute Besonderheit dar: Zwar hat IκB-ζ wie alle IκB-Protein ANK Motive (in diesem Fall sieben), jedoch verfügt es

anders als die klassischen Inhibitoren zusätzlich über eine TAD Sequenz, wie sie sonst nur bei den transkriptionell aktiven NFκB Untereinheiten p65, RelB und c-Rel gefunden wird⁷⁸. Entsprechend entfaltet IκB-ζ seine eigentliche Wirkung auch nicht primär im Zytosol, sondern im Nucleus. Hier kommt es unter Einfluss von IκB-ζ zu einer bevorzugten Bildung von p50/p50 Homodimeren, welche sonst aufgrund ihrer fehlenden TAD Sequenz überhaupt keine transkriptionelle Aktivität besitzen würden^{50,79}. Man kann also sagen, dass IκB-ζ seine inhibitorische Wirkung auf NFκB insofern ausübt, als es zu einer Modifikation der NFκB-Dimerbildung kommt, welche wiederum zu einer geänderten Zielgen-Transkription führt^{68,78,80}. So wird beispielsweise die Produktion von IL-10 und IL-6 durch p50/p50 Homodimere begünstigt, während die Expression von TNF-α unter Einfluss von IκB-ζ reduziert wird^{53,78,81}. Entsprechend findet man unter IκB-ζ defizienten Bedingungen stark verminderte IL-6 Expressionen⁸¹.

In ruhenden Zellen ist IκB-ζ praktisch nicht nachweisbar und wird erst auf einen IL-1 oder TLR4 Stimulus hin exprimiert^{80,82}. Ebenso steigt die IκB-ζ Expression nach einem kombinierten Stimulus aus IL-6 und TGF-β⁸¹. Folglich kann es also zu einer sich selbst aufschaukelnden IκB-ζ-IL-6-Reaktion kommen: Nach einem entsprechenden Stimulus wird IκB-ζ exprimiert und sorgt für eine erhöhte IL-6 Produktion. IL-6 wird mittels Exozytose aus der Zelle geschleust und wirkt dort autokrin am IL-6 Rezeptor derselben Zelle. Dieser wiederum erzeugt im Zusammenspiel mit TGF-β eine erhöhte IκB-ζ Produktion (IL-6 loop).

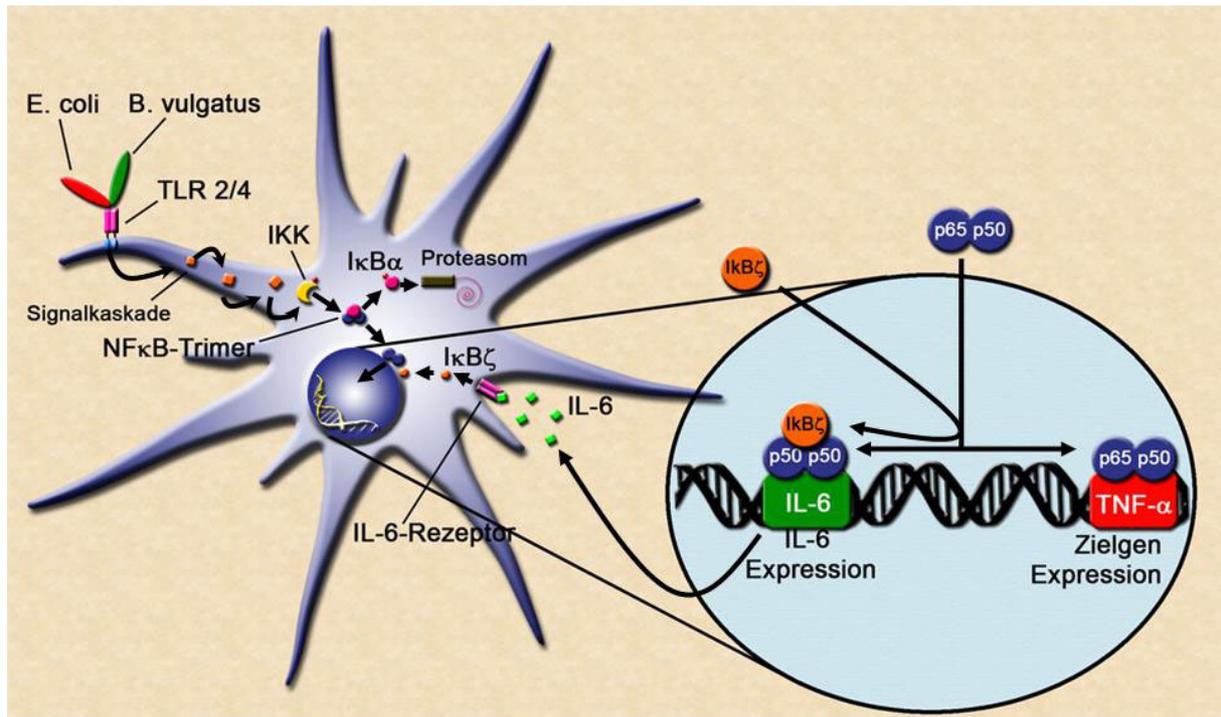


Abb. 6: NFκB-Signalkaskade und IL-6-Loop

1.6 Vorstellung zweier beispielhafter Darmkeime

B. vulgatus ist ein gramnegatives, obligat anaerobes stäbchenförmiges Bakterium und Leitkeim der Darmflora. *B. vulgatus* ist phylogenetisch eng verwandt mit *Porphyromonas gingivalis*, welcher aufgrund seiner Lipid-A-Struktur hauptsächlich über TLR2 erkannt wird⁸³.

E. coli ist ein gramnegatives, fakultativ anaerobes stäbchenförmiges Bakterium aus der Familie der Enterobacteriaceae und ist ebenfalls Bestandteil der adulten residenten Darmflora. Enterobakterielles LPS führt über Aktivierung von hauptsächlich TLR4 zur Immunantwort des Wirtes⁸⁴.

1.7 Vorarbeiten

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde bereits die wichtige Rolle der bakteriellen Mikroflora im Hinblick auf Entwicklung und Verlauf chronisch entzündlicher Darmerkrankungen am murinen Modell gezeigt. So entwickelten *E. coli*

monokolonisierte IL-2^{-/-} Mäuse eine Colitis, während bei *B. vulgatus* monokolonisierten Tieren keine inflammatorischen Zeichen gefunden werden konnten⁸⁵. Dieser Effekt konnte in Zusammenhang mit einer verstärkten IL-6 Sekretion nach *B. vulgatus* Kolonisierung gebracht werden und legte den Schluss nahe, dass IL-6 für den Schutz der Mäuse vor dem colitogenen Potential von *E. coli* und damit vor der Entwicklung einer Colitis verantwortlich ist.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass BMDCs, welche mit *E. coli* stimuliert wurden, erhöhte Mengen inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-12, IL-10 und IL-6 produzieren, während *B. vulgatus* stimulierte BMDCs lediglich erhöhte Mengen an IL-6 aufwiesen⁴⁷. Dieser Sachverhalt änderte sich auch nicht, wenn *B. vulgatus* vorstimulierte BMDCs mit *E. coli* restimuliert wurden. Mehr noch konnte durch Vorbehandlung der BMDCs mit *B. vulgatus* Überständen oder rekombinantem IL-6 deren TNF- α Sekretion signifikant vermindert werden⁴⁷. Erst durch Gabe eines IL-6-Antikörpers konnte dieser Effekt aufgehoben werden⁴⁷.

Es konnte also der Schluss gezogen werden, dass *B. vulgatus* seinen protektiven Effekt im Hinblick auf die Entwicklung einer Colitis über IL-6 initiiert und so immature BMDCs in den semimaturen Phänotyp versetzt, welcher gegenüber einem zweiten Stimulus mit *E. coli* ein tolerantes Verhalten aufweist.

1.8 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung des Proteins I κ B- ζ für die Produktion von IL-6 und so letztendlich für die Fähigkeit dendritischer Zellen, den semimaturen Phänotyp auszubilden, zu untersuchen.

In einem ersten Schritt wurde zur Bestätigung der Vorbefunde erneut die TNF- α und IL-6 Sekretion immaturer, semimaturer und maturer BMDCs auf einen zweiten *E. coli* Stimulus hin untersucht. Des Weiteren wurde im zeitlichen Verlauf die I κ B- ζ mRNA- und Proteinexpression immaturer, semimaturer und maturer WT- sowie IL-6^{-/-}-BMDCs analysiert und verglichen. Ferner wurden Kernlysate aller drei Phänotypen unter Stimulation sowie Restimulation generiert und im Hinblick auf die Zusammensetzung der NF κ B Untereinheiten im Nucleus untersucht. Nach erfolgreicher Zucht I κ B- ζ defizienter Mäuse wurde parallel zu den Vorversuchen die IL-6 und TNF- α Produktion restimulierter immaturer, semimaturer und maturer

BMDCs geprüft sowie ihre Expression der Oberflächenmarker MHC-II und CD40 mit *littermate* WT Kontrollen verglichen. In einem letzten Schritt wurde schließlich die Auswirkung einer I κ B- ζ -Deletion auf den Verlauf einer akuten DSS-induzierten Colitis untersucht, um herauszufinden, inwieweit *in vitro* gewonnene Erkenntnisse sich auch am lebenden Organismus wiederfinden lassen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

NAME	HERSTELLER
BioPhotometer	Eppendorf
Brutschrank	Heraeus
Curix (Entwicklermaschine)	AGFA
Durchflusszytometer LSR Fortessa	BD
ELISA-Reader Sunrise™	Tecan Group Ltd.
ELISA-Washer HydroFlex™	Tecan Group Ltd.
Lightcycler 480	Roche Applied Science
Mikroskop Axiovert 40	Carl Zeiss
Nanophotometer Nanodrop	Implen GmbH
Neubauer Zählkammer	Superior
Steril-Arbeitsbank	BDK
Thermocycler T3000	Biometra GmbH
Zentrifugen (Biofuge Stratos; Multifuge 3 S-R; Concentrator 5301)	Heraeus; Heraeus; Eppendorf

Tab. 1: Geräte

2.1.2 Verbrauchsgegenstände

NAME	HERSTELLER
Anaerobier-Beutel	Oxoid
100 µl Zellfilter	BD Falcon
ELISA Platten (Nunc-Immuno™ Plate Maxisorp™ Surface)	Nunc
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf
Zellkulturplatten	BD Falcon
Zytometerröhrchen	Greiner
Zellschaber	Corning Inc.

Tab. 2: Verbrauchsgegenstände

2.1.3 Chemikalien

NAME	HERSTELLER
Bovines Serum Albumin	Biomol
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Applied Sciences
Dextran Natriumsulfat (DSS)	MP Biomedicals

Ethidiumbromid (EtBr)	Merck
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma
GM-CSF	Eigenproduktion
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth Chemie GmbH
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom AG
Nonidet P40 (NP 40)	Sigma
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem GmbH
PBS	Gibco
Penicillin-Streptomycin	Gibco
RNase-Exitus	AppliChem GmbH
RNase-freies Wasser	Ambion
RNasin	Promega GmbH
Temed	Sigma
Trypanblau	Sigma
Tween 20	Roth Chemie GmbH
VLE RPMI-Medium 1640	Biochrom AG

Tab. 3: Chemikalien

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Western-Blot

NAME	HERKUNFT	HERSTELLER
Anti-Maus IgG (HRP konjugiert)	Maus	Promega
Anti-Kaninchen IgG (HRP konjugiert)	Kaninchen	Promega
Anti-Maus I κ B- ζ	Kaninchen	IFIB, Tübingen
Anti- β -Actin	Maus	Sigma

Tab. 4: Antikörper Western-Blot

2.1.4.2 Durchflusszytometrie

NAME	LABEL	ISOTYP	HERSTELLER
Anti-CD11c	PerCP Cy5.5	-	BD Bedford
Anti-CD40	APC	-	BD Bedford
Anti-MHC-II (I-A/I-E)	FITC	Rat IgG2 α , κ	BD Bedford

Tab. 5: Antikörper Durchflusszytometrie

2.1.5 Bakterien

NAME	HERSTELLER
Bacteroides vulgatus mpk	Max-von-Pettenkofer Institut, München
Escherichia coli mpk2	Max-von-Pettenkofer Institut, München

Tab. 6: Bakterien

2.1.6 Kits

NAME	HERSTELLER
DNA-free	Ambion
DNase Inactivation Reagent	Ambion
GenRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas
RNeasy Mini Kit	Qiagen
TransAM NFκB Family Kit	Active Motif

Tab. 7: Kits

2.1.7 PCR Programme

2.1.7.1 qRT-RT-PCR

PHASE	TEMPERATUR	DAUER	ZYKLEN
Reverse Transkription	50 °C	10 min	1
Initialdenaturierung	95 °C	5 min	1
Polymerase Ketten Reaktion:			40
Denaturierung	95 °C	5 sec	
Annealing	55 °C	10 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	
Schmelzkurvenbestimmung:			1
Denaturierung	95 °C	5 sec	
Kühlung	46 °C	1 sec	
Denaturierung	95 °C	0,06 °C/sec	
Kühlung	40 °C	∞	1

Tab. 8: PCR Programme qRT-RT-PCR

2.1.7.2 Genotypisierung

PHASE	TEMPERATUR	DAUER	ZYKLEN
Initialdenaturierung	98 °C	1 min	1
Polymerase Ketten Reaktion:			35
Denaturierung	98 °C	10 sec	
Annealing	59 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
Kühlung	4 °C	∞	1

Tab. 9: PCR Programme Genotypisierung

2.1.8 Medien und Puffer

2.1.8.1 Zellkultur

NAME	INHALT	MENGE
DC+AB Medium	VLE RPMI-1640 Penicillin-Streptomycin Nicht essentielle Aminosäuren L-Glutamin FCS (hitzeinaktiviert) β-Mercaptoethanol GM-CSF	500 ml 5 ml (10.000 U/ml Penicillin; 10.000 U/ml Streptomycin) 5 ml 5 ml (200 nM) 50 ml (10%) 2,5 ml (11 mM) 30 ml
DC-AB Medium	VLE RPMI-1640 Nicht essentielle Aminosäuren L-Glutamin FCS (hitzeinaktiviert) β-Mercaptoethanol GM-CSF	500 ml 5 ml 5 ml (200 nM) 50 ml (10%) 2,5 ml (11 mM) 30 ml

Tab. 10: Medien und Puffer Zellkultur

2.1.8.2 Bakterien

NAME	INHALT	MENGE
LB Medium pH 7,5	Trypton Hefeextrakt NaCl	10 g/l 5 g/l 10 g/l
BHI Medium pH 7,4	BHI Medium (s. oben)	37 g/l

Tab. 11: Medien und Puffer Bakterien

2.1.8.3 SDS-PAGE und Western Blotting

NAME	INHALT	MENGE
RIPA A Lysepuffer pH 7,5	Tris/HCl MgCl ₂ KCl DTT Na ₃ VO ₄ PMSF Complete Protease Inhibitor	10 mM 5 mM 10 mM 2 mM 10 mM 0,15 mM 1 Tablette pro 40 ml
Laemmli-Puffer (5x) pH 6,8	Tris/HCl DTT Glycerin 10% SDS BPB	0,5 M 0,8 g in 8 ml 0,8 ml 1,6 ml 0,05% (w/v)

SDS-Puffer	Trizma Base Glycin 10% SDS	50 mM 384 mM 0,1% (10%)
SDS Trenngel pH 8,8 12% (pro Gel)	H ₂ O Acrylamid Mix (30%) Tris/HCl (1 M) 10% SDS Ammoniumpersulfat (10%) TEMED	1,6 ml 2 ml 1,3 ml 50 µl 50 µl 2 µl
SDS Sammelgel pH 6,8 5% (pro Gel)	H ₂ O Acrylamid Mix (30%) Tris/HCl (1 M) 10% SDS Ammoniumpersulfat (10%) TEMED	1,4 ml 335 µl 250 µl 20 µl 20 µl 2 µl
Blot-Puffer	Trizma Base Glycin	25 mM 192 mM
Waschpuffer pH 7,6	Trizma Base NaCl Tween 20	242 mg/l 800 mg/l 0,1%
Blockpuffer pH 7,6	Trizma Base NaCl Tween 20 Soja Milch	242 mg/l 800 mg/l 0,1% 5% (w/v)
ECL Lösung A	Luminol (44 g/l) p-Coumarinsäure (15 g/l) Tris/HCl (100 mM)	250 µl 220 µl 25 ml
ECL Lösung B	H ₂ O ₂ Tris/HCl (100 mM)	30 µl 25 ml

Tab. 12: Medien und Puffer SDS-PAGE und Western Blotting

2.1.8.4 RNA Isolation und RT-RT-PCR

NAME	INHALT	MENGE
Lysepuffer	RLT Puffer (Quiagen) β-Mercaptoethanol	- 1% (v/v)
DNase Verdaulösung (pro Ansatz)	gDNA wipeout buffer (Ambion) DNase rRNasin	5 µl 2 µl 1 µl
RT-RT-PCR Puffer (pro Ansatz)	Quanti Fast SYBR Green Forward Primer (100 µM) Backward Primer (100 µM) Quanti Fast RTMix Nuclease freies Wasser	5 µl 0,1 µl 0,1 µl 0,1 µl 3,7 µl

Tab. 13: Medien und Puffer RNA Isolation und RT-RT-PCR

2.1.8.5 Kernextraktion und TransAM NF κ B-ELISA

NAME	INHALT	MENGE
PBS/Na ₃ VO ₄	PBS Na ₃ VO ₄	- 1% (v/v)
CLB (pro Ansatz)	DTT Protease Inhibitor Cocktail (Active Motif) Lysis Buffer AM2 (Active Motif)	0,11 μ l 0,23 μ l 22,2 μ l
CBB (pro Ansatz)	DTT Herring sperm DNA Binding Buffer AM3	0,07 μ l 0,34 μ l 33,4 μ l
HB-Puffer pH 7,5	Hepes NaF Na ₂ MoO ₄ EDTA	20 mM 5 mM 10 μ M 0,1 mM
ABBB (pro Ansatz)	H ₂ O Antybody Binding Buffer AM2	202,5 μ l 22,5 μ l
Waschpuffer	H ₂ O 10x Wash Buffer AM2	2,025 ml 225 μ l

Tab. 14: Medien und Puffer Kernextraktion und TransAM NF κ B-ELISA

2.1.8.6 IL-6 und TNF- α ELISA

NAME	INHALT	MENGE
ELISA Waschpuffer	PBS Tween-20 H ₂ O	9,55 g 0,05% (v/v) 10 l
ELISA Coatingpuffer pH 6,5	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	11,8 g 16,1 g 1 l
ELISA Blockpuffer	PBS FCS (hitzeinaktiviert) H ₂ O	9,55 g 10% (v/v) 1 l
ELISA Stopplösung	H ₂ SO ₄	1 M
ABBB (pro Ansatz)	H ₂ O Antybody Binding Buffer AM2	202,5 μ l 22,5 μ l
Waschpuffer	H ₂ O 10x Wash Buffer AM2	2,025 ml 225 μ l

Tab. 15: Medien und Puffer IL-6 und TNF- α ELISAs

2.1.8.7 Durchflusszytometrie

NAME	INHALT	MENGE
Aktivierungsmastermix (pro Ansatz)	PBS + 10% FCS Anti-CD11c Anti-MHC-II Anti-CD40	50 µl 0,5 µl 0,5 µl 0,5 µl
FMO-Mastermix (pro Ansatz)	PBS + 10% FCS Anti-CD11c	50 µl 0,5 µl
Fc-Block	VLE RPMI-1640 Anti-Fc-Antikörper aus Hybridoma Zell Überstand	

Tab. 16: Medien und Puffer Durchflusszytometrie

2.1.9 Primer

2.1.9.1 RT-RT-PCR

NAME	SEQUENZ (5' -> 3')
IκB-ζ mRNA Forward	GCTCCGACTCGATTTTC
IκB-ζ mRNA Reverse	GAGTTCTTCAAACACC
NF-IL6 mRNA Forward	TTTCGGGACTTGATGCAATCCGGA
NF-IL6 mRNA Reverse	GCTGACAGTTACACGTGTGTTGC

Tab. 17: Primer RT-RT-PCR

2.1.9.2 Genotypisierung

NAME	SEQUENZ (5' -> 3')
GT IκB-ζ 1	TTTCTTTTCGCCTCTTCACCAGGTTTCTCC
GT IκB-ζ 2	ATTGGCAGCTACCGCCACCTGAAAGGCAC
GT IκB-ζ 3	CTTCCATTTGTCACGTCCTGC

Tab. 18: Primer Genotypisierung

2.1.10 Mäuse

NAME	HERSTELLER
C57BL6	Charles River
IL-6 ^{-/-} (auf BL6 Hintergrund)	Eigenzucht, Tübingen
IκB-ζ ^{-/-} (auf BL6 Hintergrund)	Eigenzucht, Tübingen

Tab. 19: Mäuse

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterien

2.2.1.1 *Bacteroides vulgatus* mpk

B. vulgatus wurde aus den Fäces einer gesunden SPF-Maus isoliert und in konzentrierten Stammlösungen bei -20°C in BHI/Glycerin gelagert. 50 µl dieser Stammlösung wurden aufgetaut und zu 10 ml LB Medium gegeben, welches ein Stück Schweineleber enthielt. Die Bakterien wurden bei 37°C für 3 Tage unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Am Tag 3 wurden 5 ml der Bakteriensuspension entnommen und in 50 ml BHI Medium für einen weiteren Tag anaerob bei 37°C kultiviert.

2.2.1.2 *Escherichia coli* mpk2

E. coli Stammlösungen wurden bei -20°C in LB/Glycerin gelagert. 50 µl dieser Stammlösung wurden aufgetaut, in 5 ml LB Medium gegeben und unter aeroben Bedingungen bei 37°C schüttelnd über Nacht kultiviert.

Am Stimulationstag wurden 300 µl der Übernachtskultur in 20 ml LB Medium gegeben und für weitere 2,5 Stunden aerob bei 37°C schüttelnd kultiviert.

2.2.2 Etablierung einer $\text{IkB-}\zeta^{-/-}$ -Mauslinie

2.2.2.1 Zucht und Haltung

Nach Erhalt zweier heterozygoter Zuchtpaare wurden diese Mäuse 1:1 bzw. 1:2 (m:w) verpaart. Die Nachkommen wurden entsprechend den Ergebnissen der Genotypisierung (s. 2.2.2.3) ebenfalls heterozygot 1:1 bzw. 1:2 verpaart oder kamen homozygot 6 bis 8 Wochen p.p. in den Versuchseinsatz. Homozygote Zuchtversuche blieben bis auf weiteres erfolglos.

2.2.2.2 DNA Isolation

Das zur Genotypisierung notwendige DNA-Material wurde aus Mäuseohrstanzen gewonnen. Hierzu wurde eine Ohrlochmarkierung gesetzt und Gewebe aus dem Ohr der Maus gestanzt. Dieses wurde in einem Reaktionsgefäß mit 150 µl ViaGen Direct PCR Lysis Reagent + 1 µl Proteinase K versetzt, gut durchmischt und für 3 h bei 56°C im Heizblock inkubiert. Nach Ablauf der 3 h wurde die Temperatur auf 85°C angehoben und das Lysat weitere 45 min inkubiert. Um verbleibende Fell- und Gewebereste auf dem Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln, erfolgte ein kurzer Zentrifugationsschritt. Die Proben wurden bei 4°C gelagert.

2.2.2.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Jungtiere erfolgte durch Amplifizierung eines IκB-ζ-Genabschnitts mittels PCR und anschließender elektrophoretischer Auftrennung der Amplifikate in 1% Agarosegel. Hierbei wurden zu 1,5 µl Mausohrlysat 48,5 µl GT-Mastermix gegeben und mit dem in 2.1.7.2 beschriebenen PCR-Protokoll im Thermocycler amplifiziert. In die Taschen des Agarosegels wurden je 12 µl Amplifikat + 2 µl Organe G bzw. 4 µl Gen Ruler gegeben und bei 80 V für 60 min aufgetrennt. Die Färbung der Banden wurde durch 20 min Inkubation in 1:10.000 EtBr und anschließender 40 min Inkubation im Wasserbad erreicht. In der UV-Kammer wurde das Gel belichtet und der Genotyp der Mäuse über Auswertung des Bandenmusters bestimmt. Hierbei entsprach eine Amplifikatlänge von 520 bp dem homozygoten IκB-ζ^{+/+}-Wildtyp, 430 bp dem homozygoten IκB-ζ^{-/-}-Typ und eine Doppelbande bei 430 bp und 520 bp dem heterozygoten IκB-ζ^{+/-}-Typ.

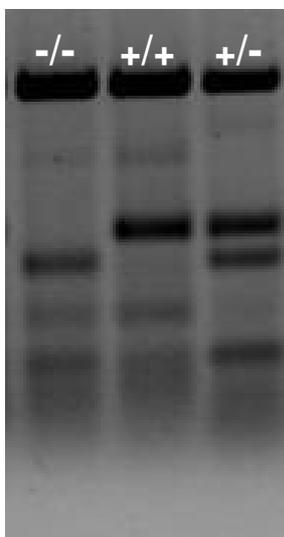


Abb. 7: Genotypisierung (von links: homozygot KO, WT und heterozygot)

2.2.3 Zellkultur

2.2.3.1 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung wurde mit der Neubauer Zählkammer durchgeführt. Durch Färbung der Zellen mit Trypanblau konnte zwischen lebenden und toten Zellen differenziert werden, wobei nur die lebenden gezählt wurden. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl in 4 Großquadranten}}{4} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Anzahl der Zellen in 1 ml}$$

Formel 1: Zellzahlbestimmung mit Neubauer Zählkammer

2.2.3.2 Isolierung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark (BMDC)

Zellen aus dem Knochenmark von 6-12 Wochen alten C57BL/6 (Wildtyp), *IL6*^{-/-} bzw. *IκB-ζ*^{+/+} und *IκB-ζ*^{-/-} Mäusen wurden nach Lutz *et al.* isoliert und kultiviert⁸⁶. Dabei wurden Femur und Tibia beidseits entnommen, Muskelreste vom Knochen entfernt, die Markhöhle mit sterilem PBS durchspült und die Knochenmarkszellen durch einen sterilen 100 μm Zellfilter von Muskel- und sonstigen Geweberesten getrennt. Die gefilterte Zellsuspension wurde anschließend bei 400 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml 37°C warmem DC+AB Medium resuspendiert.

Nach Bestimmung der Zellzahl (s. Formel 1) wurden von der Zellsuspension 2×10^6 Zellen in eine mit 10 ml DC+AB Medium vorbereitete 100 mm Petrischale ausgesät.

2.2.3.3 BMDC Kultivierung

Am 3. Tag nach Zellisolation wurden 10 ml Medium in jede Petrischale gegeben. Am Tag 6 wurden aus jeder Schale 10 ml Medium entnommen, in 50 ml Falcon Tubes gesammelt, bei 400 x g für 5 min zentrifugiert und die Zellpellets in 19 ml DC+AB Medium resuspendiert. Jede Schale erhielt 1 ml der gepoolten Zellsuspension. Am 7. Tag wurden die Zellen durch vorsichtiges Abschaben mit einem Zellschaber geerntet, bei 400 x g für 5 min zentrifugiert, das Pellet in 10 ml DC-AB Medium resuspendiert, gezählt (s. Formel 1) und für die Stimulation verwendet.

2.2.4 Stimulation und Restimulation

An Tag 7 wurden je 2×10^6 BMDCs pro *well* in unbeschichteten 6-*well* Zellkulturplatten (BD Falcon) in 2 ml Medium ausgesät und für 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit *B. vulgatus* (MOI 1), *E. coli* (MOI 1), LPS lo (1 ng/ml) und LPS hi (1 µg/ml) stimuliert und während der entsprechenden Stimulationszeiten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Eine Stunde nach Stimulationsbeginn wurde zu jedem *well* (auch zur unstimulierten Negativkontrolle) 2 µl Gentamycin (1 mg/ml) gegeben, um ein weiteres Wachstum der Bakterien zu unterbinden. Nach Ablauf der gewünschten Stimulationszeit wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturplatte gelöst, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 400 x g für 5 min zentrifugiert.

Bei Restimulation wurden die BMDCs in 6-*well* Platten für 24 Stunden stimuliert und anschließend die Platte bei 400 x g für 5 min zentrifugiert. Das alte Medium wurde abgesaugt, durch 2 ml frisches DC-AB Medium ersetzt und für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ vor Restimulationsbeginn inkubiert. Zur Restimulation wurde *E. coli* (MOI 1) in jedes zu stimulierende *well* hinzugegeben. Eine Stunde nach Restimulation wurde zu jedem *well* (auch zur unstimulierten Negativkontrolle) 2 µl Gentamycin gegeben, um ein weiteres Wachstum der Bakterien zu unterbinden. Nach Ablauf der gewünschten Stimulationszeit wurde wie bei der regulären Stimulation verfahren (s. oben).

2.2.5 Proteinuntersuchungen

2.2.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford Proteinassay. Dieser Test basiert auf einer Änderung des Absorptionsmaximums hin zu einer Wellenlänge von 595 nm, wenn der in dem Bradford-Reagenz enthaltene Farbstoff an Proteine bindet.

Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde BSA in den Konzentrationen 80 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml und 0 µg/ml vermessen und hieraus eine Standardkurve generiert ($R^2 > 0,99$). Die Proben wurden 1:200 mit d_0H_2O verdünnt und zu 80 µl der verdünnten Probe bzw. des Standards 20 µl des

Bradford-Reagenz hinzugegeben. Die Messung erfolgte am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm.

2.2.5.2 Probenvorbereitung

Nach Ende der Stimulation und Zentrifugation (s. 2.2.4) wurde das Pellet in 20 μ l RIPA-Lysepuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert, danach bei 12.000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert und der klare Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

2.2.5.3 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine des Zelllysates erfolgte mittels SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht der jeweiligen Proteine. Bevor die Proben in die Taschen des Gels aufgetragen wurden, wurde eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt (s. 2.2.5.1) und 30 μ g Gesamtprotein eingesetzt. Das hierzu nötige Volumen wurde mit d_4 H₂O auf 13 μ l aufgefüllt und mit 2 μ l 5x Laemmli-Puffer versehen. Die gesamten 15 μ l wurden zusammen mit 10 μ l Marker auf ein 10% SDS Gel aufgetragen und bei konstanter Stromstärke aufgetrennt, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

2.2.5.4 Western Blotting

Um die nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran zu übertragen, kam das Blotting-Verfahren nach Western zum Einsatz. Hierbei wurde die vorher in 1% Methanol aktivierte Membran auf das Gel gelegt und mit ober- sowie unterhalb dieser beiden befindlichen, in Transferpuffer getränkten Whatman-Papieren und Schwämmchen in die Blotvorrichtung geklemmt. Die Ausrichtung hierbei war so, dass die PVDF-Membran zur Anode hin ausgerichtet war. Der Transfer erfolgte bei 48 V für 5 h bei 4°C ohne Eis. Anhand des farbigen Markers konnte der Erfolg des Transfers optisch verifiziert werden.

2.2.5.5 Blocken

Die PVDF-Membran wurde für 1 h in Blockpuffer gegeben, um die Membran abzusättigen und eine unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern. Nach Ablauf der Stunde wurde die Membran dreimal für 20 min in Waschpuffer gereinigt.

2.2.5.6 Teilung der Membran

Da sich Ziel- und Referenzprotein in ihren Molekulargewichten ausreichend unterscheiden (I κ B- ζ 78 kDa zu β -Actin 42 kDa), wurde die Membran unter Zuhilfenahme des Markers knapp unter der 50 kDa Bande geschnitten, um die Membranen getrennt voneinander mit ihrem jeweiligen primären Antikörper inkubieren zu können.

2.2.5.7 Immundetektion von I κ B- ζ und β -Actin

Der Kaninchen anti-Maus I κ B- ζ und der Maus anti-Maus β -Actin Primärantikörper wurde 1:2.000 in Blockpuffer + 0,05% NaN₃ verdünnt und die entsprechende Membran über Nacht bei 4 °C rollend darin inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal für 20 min in Waschpuffer + 4% BSA gewaschen und für 1 h mit dem 1:10.000 verdünnten anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper (HRP konjugiert) bzw. dem anti-Maus IgG Sekundärantikörper (HRP konjugiert) inkubiert. Es folgten 3 erneute Waschschrte für je 10 min in TBS/T.

2.2.5.8 Entwicklung

Zur Visualisierung der Protein-Antikörper-Komplexe wurde die Membran für 1 min in ECL-Lösung (A+B) getaucht, um danach in einer Filmkammer einen Röntgenfilm zu belichten. Mehrere Filme wurden übereinander gestapelt und für unterschiedliche Zeiten belichtet und anschließend in der Entwicklermaschine entwickelt.

2.2.6 Genexpressionsanalyse

2.2.6.1 Kontaminationsprophylaxe

Da für die durchgeführten Genexpressionsanalysen mit mRNA gearbeitet wurde, mussten spezielle Vorkehrungen getroffen werden, um eine Kontamination der Proben mit RNasen zu verhindern. Diese würden die mRNA in der Probe abbauen und eine qualitative oder quantitative Aussage massiv relativieren.

Sämtliche Gebrauchsmaterialien und Chemikalien (gestopfte Pipettenspitzen, Handschuhe, Reaktionsgefäße, PCR-Platten, H₂O etc.) waren entweder ab Werk garantiert RNase-frei oder wurden mit RNase-Exitus behandelt, um evtl. vorhandene RNasen zu entfernen.

2.2.6.2 RNA Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der RNA Konzentration erfolgte photometrisch mit dem NanoPhotometer. Hierbei macht man sich das Absorptionsmaximum von RNA bei einer Wellenlänge 260 nm zunutze und erhält hieraus die Konzentration an RNA in der Probe. Die Messung erfolgte mit einem Linsenfaktor von 50 und Photometer sowie Linse wurden zwischen den einzelnen Messungen mit RNase-freiem Wasser gereinigt, um einer Falschmessung des äußerst sensitiven Gerätes durch Verschleppung von Probenmaterial vorzubeugen.

2.2.6.3 Probenvorbereitung

Nach Ende der Stimulation und Zentrifugation (s. 2.2.4) wurde das Pellet in 350 µl RLT-Puffer + 1% β-Mercaptoethanol resuspendiert und bei -80 °C eingefroren.

2.2.6.4 RNA Aufreinigung

Die RNA Aufreinigung wurde mit dem Qiagen RNeasy Kit durchgeführt. Zu den 350 µl Probe in RLT-Puffer wurde im Verhältnis 1:1 70% Ethanol gegeben und gründlich vermischt. Die gesamten 700 µl wurden auf eine RNeasy Mini-Säule in einem 2 ml Sammelgefäß aufgetragen und bei 8.000 x g für 20 sec zentrifugiert. Der Inhalt des Sammelgefäßes wurde verworfen und 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben. Es folgte erneute Zentrifugation bei 8.000 x g für 20 sec. Die Säule kam in

ein neues Sammelgefäß, wurde mit 500 µl RPE-Puffer beladen und bei 8.000 x g für 20 sec zentrifugiert. Das Sammelgefäß wurde geleert, die Säule erneut mit 500 µl RPE-Puffer beladen und bei 8.000 x g für 2 min zentrifugiert. Nachdem das Sammelgefäß wieder geleert wurde, wurde die Säule bei 14.000 x g für 1 min zum Trocknen zentrifugiert. Die Säule kam in ein RNase-freies Reaktionsgefäß, wurde mit 40 µl RNase-freiem H₂O beladen, für 1 min bei RT inkubiert und bei 8.000 x g für 1 min zentrifugiert. Das im Reaktionsgefäß aufgefangene Eluat enthielt die aufgereinigte RNA.

2.2.6.5 DNase Verdau

Damit für die quantitative RT-RT-PCR ausschließlich RNA amplifiziert und vermessen wird, muss die Probe von genomischer DNA befreit werden. Hierzu wurde nach vorangegangener Konzentrationsbestimmung (s. 2.2.6.2) das benötigte Volumen für 5 µg RNA mit RNase-freiem H₂O auf 50 µl ergänzt und mit 8 µl DNase-Verdau-Puffer versetzt. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde der DNase-Verdau durch Hinzugabe von 6 µl DNase Inactivation Reagenz gestoppt und anschließend für 2 min intensiv gevortext. Es folgte eine Zentrifugation bei 10.000 x g für 1 min. Der klare Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und enthält die DNA-freie RNA.

2.2.6.6 RT-RT-PCR

Die aufgereinigten, DNA-freien RNA-Proben wurden im RT-RT-PCR-System in einem Ansatz in cDNA umgeschrieben, amplifiziert und mittels SybrGreen-System quantifiziert. Hierzu wurden die Proben im Verhältnis 1:10 mit RNase-freiem H₂O verdünnt und je 1 µl der Verdünnung auf eine 96-*well* PCR Platte pipettiert. Zur Generierung einer Standardkurve wurden je 2 µl der verdünnten Proben gemischt und daraus eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungsschritten 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 hergestellt und ebenfalls auf die 96-*well* PCR Platte pipettiert. In jedes *well* wurden 9 µl RT-RT-PCR-Puffer hinzugegeben, die Platte bei 400 x g für 3 min bei RT zentrifugiert und anschließend im LightCycler 480 vermessen. Das Amplifikationsprogramm setzte sich wie unter 2.1.7.1 beschrieben zusammen.

2.2.6.7 Auswertung der RT-RT-PCR

Prinzipiell erwartet man bei einer PCR eine Amplifikationseffizienz von 2, da mit jedem PCR Zyklus sich die Menge an cDNA verdoppeln sollte. Abhängig von Faktoren wie zum Beispiel der Primerspezifität kann dieser Wert jedoch hiervon leicht abweichen. Anhand der generierten Standardkurve und deren Steigung m lässt sich die Effizienz der durchgeführten PCR berechnen (1) und die gemessenen C_p -Werte entsprechend korrigieren (2).

$$(1) \quad E = 10^{-\frac{1}{m}}$$

$$(2) \quad R = \frac{E_{Testgen}^{(Cp(unstimuliert)_{Testgen} - Cp(stimuliert)_{Testgen})}}{E_{Housekeepinggen}^{(Cp(unstimuliert)_{Housekeepinggen} - Cp(stimuliert)_{Housekeepinggen})}}$$

Formel 2: Effizienzberechnung einer PCR

Die Auswertung der Genexpression des untersuchten Zielgens erfolgte relativ zum Referenzgen β -Actin, von welchem man eine konstante, vom Stimulus unabhängige Expression voraussetzen kann. Die Berechnung des Transkriptionslevels erfolgte hierbei nach der $\Delta\Delta C_p$ -Methode:

$$(1) \quad \Delta C_p = C_{p_{Zielgen}} - C_{p_{Referenzgen}}$$

$$(2) \quad \Delta\Delta C_p = \Delta C_{p_{Probe}} - \Delta C_{p_{0h-Wert}}$$

$$(3) \quad R = 2^{-\Delta\Delta C_p}$$

Formel 3: $\Delta\Delta C_p$ -Methode

R stellt den relativen Wert der Genexpression des Zielgens verglichen mit dem des Referenzgens β -Actin zum gleichen Zeitpunkt, bereinigt um die Basisexpression beider bei Stimulationsbeginn (0h-Wert) dar. Die Quadrierung trägt der Tatsache Rechnung, dass die Proben mit jedem PCR Zyklus einer Verdopplung unterliegen.

2.2.7 Zytokinbestimmung

Die Messung der Zytokine TNF- α und IL-6 im Zellkulturüberstand erfolgte mittels ELISA. Dies ist ein immunologisches Nachweisverfahren für Proteine, welches auf

einer enzymatischen Farbreaktion basiert, die photometrisch analysiert werden kann. Hierzu wird eine 96-*well* Mikrotiterplatte mit einem für das zu untersuchende Protein spezifischen Antikörper (*Capture*-Antikörper) inkubiert und dieser somit an der Oberfläche der Platte gebunden. Gibt man nun die Probe hinzu, bindet der Antikörper sein Zielprotein und dieses bleibt bei den sich anschließenden Waschschritten in den *wells* erhalten. Durch Hinzugabe eines zweiten, ebenfalls für das Zielprotein spezifischen Antikörpers (*Detection*-Antikörper), bindet auch dieser und stellt durch sein gekoppeltes Enzym die Grundlage für die sich anschließende Farbreaktion dar. Hierbei wird durch besagtes Enzym ein hinzugegebenes Substrat umgesetzt und somit die Farbreaktion proportional zum gebundenen Protein in Gang gesetzt. Nach einer gewissen Zeit wird die Farbreaktion durch Denaturierung des Enzyms mit Schwefelsäure gestoppt und die Intensität am Photometer gemessen.

2.2.7.1 Probenvorbereitung

Nach Ende der Stimulation und Zentrifugation (s. 2.2.4) wurden aus dem Überstand 300 µl entnommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C eingefroren.

2.2.7.2 ELISA Durchführung

Der *Caputre*-Antikörper wurde 1:250 in *Coating Buffer* verdünnt, 100 µl der Verdünnung in jedes *well* der Mikrotiterplatte gegeben und diese über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgte die Entfernung von nicht gebundenem Antikörper über einen Waschzyklus am ELISA-Washer und das Blocken der Platte durch Hinzugabe von 200 µl *assay diluent* in jedes *well*, um eine unspezifische Bindung von Protein an die Plattenoberfläche zu verhindern. Nach erneutem Waschen wurde die Platte mit den 1:50 (IL-6) bzw. 1:5 (TNF-α) in *assay diluent* verdünnten Proben beschickt. Um eine quantitative Auswertung zu ermöglichen, wurde ein Standard mit den Konzentrationen 1.000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,625 pg/ml und 0 pg/ml generiert und in Duplikaten auf die Mikrotiterplatte gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei RT und einem Waschzyklus wurden 100 µl des 1:250 in *assay diluent* verdünnten *Detection*-Antikörpers in jedes *well* gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Es schlossen sich zwei Waschzyklen an. In jedes *well* wurden 100 µl Substrat gegeben,

um die Farbreaktion zu beginnen. Anhand des Standards konnte der Zeitpunkt des Stopps der Reaktion bestimmt werden. Dies erfolgte mit 50 μl 1 N H_2SO_4 . Die Messung am Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm schloss sich unmittelbar in Folge an.

2.2.8 TransAM NF κ B ELISA

Da es sich bei NF κ B um ein Protein handelt, welches im Zytoplasma der Zelle vorkommt und nur auf bestimmte Stimuli hin in den Kern transloziert, um hier seine Funktion als Transkriptionsfaktor wahrzunehmen, wurden zur Messung dieses Faktors Kernlysate generiert und nur diese vermessen. Dadurch wurde ausschließlich der durch den Stimulus induzierte, transkriptionsrelevante Anteil der NF κ B Konzentration in einer Zelle gemessen.

2.2.8.1 Herstellung von Kernlysaten

Nach Ende der Stimulation und Zentrifugation (s. 2.2.4) wurde das Pellet in 2 ml 1:100 Na_3VO_4 in PBS resuspendiert und bei 400 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 1 ml HB-Puffer resuspendiert und in ein frisches, gekühltes Reaktionsgefäß überführt. Nach 15 min Inkubationszeit wurden 50 μl Nonidet P-40 hinzugegeben, 10 sec intensiv gevortext und bei >14.000 x g für 30 sec bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Pellet in 50 μl CLB resuspendiert und für 30 min bei 4°C schüttelnd inkubiert. Es folgte die Zentrifugation bei 14.000 x g für 10 min bei 4°C und die Überführung des Überstandes in ein frisches Reaktionsgefäß. Die Proteinkonzentration dieses Überstandes wurde mittels Bradford Proteinassay bei einer Verdünnung von 1:50 mit ddH_2O bestimmt (s. 2.2.5.1).

2.2.8.2 ELISA Durchführung

Auf der Oberfläche der speziellen ELISA-Platten befanden sich Oligonukleotidsequenzen mit einer Bindestelle für NF κ B. Dadurch entfiel das manuelle *coating* der Platte mit primärem Antikörper.

Es wurden 20 µg Kernlysate pro *well* eingesetzt. Das hierzu nötige Volumen (s. 2.2.8.1) wurde mit CLB auf 20 µl ergänzt. Nach einstündiger, schüttelnder Inkubation bei RT wurde dreimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und somit nicht gebundenes Protein entfernt. Danach wurden 100 µl des 1:1.000 in ABBB verdünnten Primärantikörpers gegen die zu untersuchende NFκB -Untereinheit (p50, p52, p65, c-Rel, RelB) in jedes *well* hinzugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit je 200 µl Waschpuffer und in jedes *well* wurden 100 µl des enzymgekoppelten Sekundärantikörpers gegeben. Nach erneuter einstündiger Inkubation und viermaligem Waschen mit 200 µl Waschpuffer wurden 100 µl *developing solution* pro *well* hinzugegeben und so die Farbreaktion gestartet. Nach 2,5 min wurde die Reaktion durch 100 µl *stop solution* beendet. Es schloss sich unmittelbar die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 655 nm am ELISA Reader an.

2.2.9 DC Aktivierungsuntersuchung mittels Durchflusszytometrie

Nach Ende der Stimulation und Zentrifugation (s. 2.2.4) wurde das Pellet in 1 ml Fc-Block aufgenommen und für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 400 x g für 5 min, Aufnahme des Pellets in 1 ml PBS + 1% FCS und erneuter Zentrifugation bei 400 x g für 5 min wurde das Pellet in 110 µl PBS + 1% FCS aufgenommen. Je 50 µl der Zellsuspension wurden in eine 96-*well* Platte überführt, die übrigen 10 µl gesammelt und zu wieder je 50 µl zur Einzel- bzw. Isotypfärbung verwendet. In jedes *well* kamen 50 µl Aktivierungsmastermix oder FMO-Mastermix. In die *wells* der Einzel- oder Isotypfärbung kamen jeweils 0,5 µl Antikörper gegen MHC-II, CD11c, CD40 oder IgG2α,κ in 50 µl PBS + 1% FCS. Es folgte eine 30 min Inkubation bei 4°C gefolgt von einem Zentrifugationsschritt bei 400 x g für 5 min. Die Überstände wurden abgekippt, das Pellet in 100 µl PBS + 1% FCS aufgenommen und erneut bei 400 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 125 µl PBS + 1% FCS resuspendiert und in ein Zytometerröhrchen überführt, in welchem bereits 25 µl PFA vorgelegt waren.

2.2.10 Untersuchung einer induzierten Colitis *in vivo*

2.2.10.1 Induktion und Versuchsablauf

Mäuse mit einem Gewicht von mindestens 18 g erhielten 2,5% Dextran Natriumsulfat im Trinkwasser. Es wurde ihr Startgewicht protokolliert und der DAI (s. 2.2.10.2) erhoben. Ab Versuchstag 3 wurden die Tiere täglich gewogen und nach den Kriterien des DAI beurteilt. Zusätzlich wurde an Tag 3 und 6 das Trinkwasser erneuert und wieder mit 2,5% DSS versehen. An Versuchstag 7 wurde ein letztes Mal Gewicht und DAI erhoben und die Tiere zur anschließenden weiteren Analyse getötet.

2.2.10.2 Analyse der Auswirkung einer DSS induzierten Colitis

Während des Versuchs wurde zu Beginn und ab dem dritten Tag täglich das Gewicht der Mäuse protokolliert. Zusätzlich wurden die Tiere nach Kriterien des *disease activity index* (DAI) beurteilt⁸⁷. Dabei wurden subjektiv Fell und Haltung der Mäuse, Konsistenz und Farbe des Stuhls sowie der Anus der Tiere inspiziert (s. Tab. 20). An Versuchstag 7 wurden post mortem Kolonlänge und Kolongewicht (ohne Faeces) bestimmt und der Quotient aus beiden errechnet. Wäre während des laufenden Versuchs das Gewicht einer Maus unter 20% des Ausgangswertes gefallen, hätte diese direkt der Analyse von Kolonlänge und –gewicht zugeführt werden müssen.

KATEGORIE	BEURTEILUNGSKRITERIUM	PUNKTE	DAI
Fellbeschaffenheit	normal – sehr struppig	[0 – 3]	Σ [0 – 15]
Haltung der Maus	normal – apathisch, bucklig	[0 – 3]	
Stuhlkonsistenz	normal – Durchfall	[0 – 3]	
Blut im Stuhl	ja / nein	[0 ; 3]	
Blut am Anus	ja / nein	[0 ; 3]	

Tab. 20: Kriterien des *disease activity index* (DAI)

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der TNF α - und IL-6-Zytokinexpression immaturer, semimaturer und maturer WT BMDCs

An die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe anknüpfend wurde zunächst die Zytokinexpression vorstimulierter BMDCs in Hinblick auf eine zweite Stimulation mit *E. coli* untersucht. Hierzu wurden BMDCs isoliert und für 24 Stunden mit PBS (immatur), *B. vulgatus* oder 1 ng/ml LPS (semimatur) bzw. *E. coli* oder 1 μ g/ml LPS (matur) vorstimuliert. Die anschließende Restimulation erfolgte mit *E. coli* (MOI 1) für 14 Stunden. Aus den Kulturüberständen wurde die TNF- α beziehungsweise IL-6 Konzentration bestimmt.

Hierbei zeigte sich, dass immature, PBS vorstimulierte BMDCs auf einen *E. coli* Stimulus mit einer massiven Ausschüttung von TNF- α reagierten (3188 pg/ml), während diese bei semimaturen BMDCs signifikant geringer ausfiel (571 pg/ml bei *B. vulgatus* beziehungsweise 1091 pg/ml bei 1 ng/ml LPS Vorstimulation). Mature BMDCs hingegen zeigten nach einem zweiten *E. coli* Stimulus praktisch keine TNF- α Expression mehr (11,5 pg/ml bei *E. coli* bzw. 20,4 pg/ml bei 1 μ g/ml LPS Vorstimulation (Abb. 8a).

Bei der Analyse der IL-6 Expression zeigten immature, PBS vorstimulierte BMDCs, mit im Mittel 87,1 ng/ml keine signifikant höhere IL-6 Produktion als semimature BMDCs (72,0 ng/ml bei *B. vulgatus* beziehungsweise 79,4 ng/ml bei 1 ng/ml LPS Vorstimulation), während mature BMDCs auf einem zweiten *E. coli* Stimulus mit einer signifikant geringeren IL-6 Produktion reagierten (51,1 ng/ml bei *E. coli* beziehungsweise 56,4 ng/ml bei 1 μ g/ml LPS Vorstimulation) (Abb. 8b).

BMDCs, welche sowohl mit PBS stimuliert als auch mit PBS restimuliert wurden, zeigten keine messbare TNF- α oder IL-6 Produktion.

Bezüglich ihrer Zytokinexpression unterscheiden sich immature, semimature und mature BMDCs also darin, dass semimature BMDCs auf einen zweiten *E. coli* Stimulus mit einer deutlich reduzierten TNF- α Produktion bei mit restimulierten immaturren Zellen vergleichbarer IL-6 Produktion reagieren. Mature BMDCs hingegen

produzieren auf einen zweiten Stimulus hin praktisch kein TNF- α mehr, aber gleichzeitig sinkt auch die IL-6 Produktion deutlich.

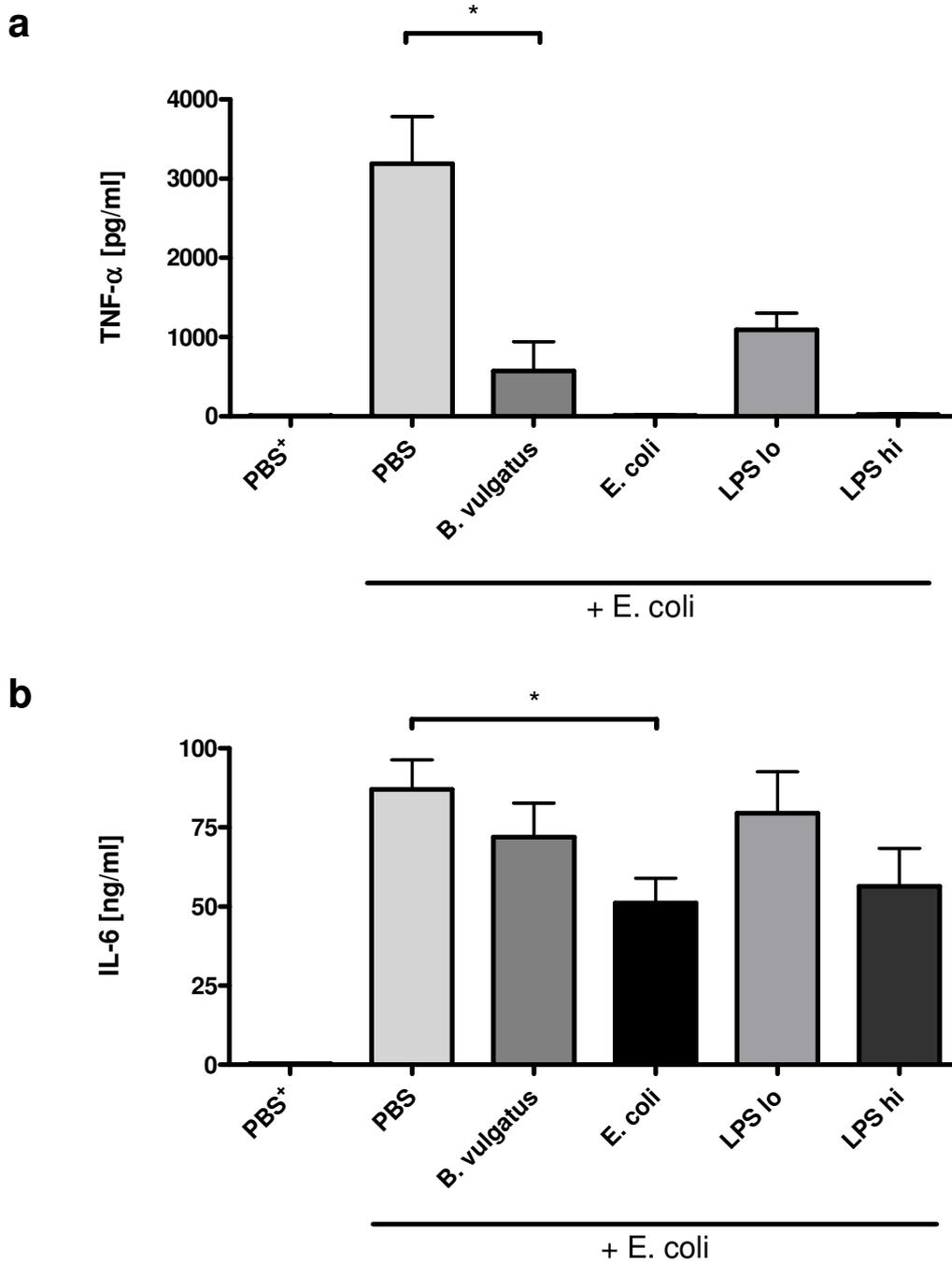


Abb. 8: Zytokinexpression immaturer, semimaturer und maturer WT BMDCs nach 14h Restimulation mit *E. coli* (MOI 1)

A: TNF- α Expression ; B: IL-6 Expression

BMDCs wurden mit PBS, *B. vulgatus* (MOI 1), *E. coli* (MOI 1), LPS lo (1 ng/ml) oder LPS hi (1 μ g/ml) für 24h vorstimuliert und anschließend für weitere 14h mit *E. coli* (MOI 1) restimuliert. Die Zytokinmessung erfolgte mittels ELISA. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung innerhalb der jeweiligen Versuchsreihe ($n = 3$; $n^+ = 1$). Ein p -Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen (t -test).

3.2 Analyse der I κ B- ζ -Expression

3.2.1 Analyse der I κ B- ζ -Proteinexpression in WT BMDCs

NF κ B ist einer der wichtigsten zellulären Transkriptionsfaktoren und ist praktisch in jeder Zelle des menschlichen Organismus von großer Bedeutung. Sowohl die transkriptionelle Regulation von TNF- α ⁵⁷ als auch die von IL-6^{58,88,89} werden durch diesen Transkriptionsfaktor beeinflusst. I κ B- ζ stellt einen Modulator von NF κ B dar und ist in der Lage, die Zielgene von NF κ B durch Beeinflussung von dessen Dimerbildung zu verändern.

Zum Nachweis der Präsenz und Induzierbarkeit von I κ B- ζ in BMDCs wurden diese mit PBS, *B. vulgatus* (MOI 1) oder *E. coli* (MOI 1) für 2, 4 und 10 Stunden stimuliert bzw. mit den gleichen Stimuli für 24 Stunden vorstimuliert und anschließend für weitere 14 Stunden mit *E. coli* (MOI 1) restimuliert. Die Detektion von I κ B- ζ geschah über Antikörper im Western Blot Verfahren.

In PBS stimulierten BMDCs (LANE 2 – 5, Abb. 9) war I κ B- ζ detektierbar, zeigte jedoch keine relevante Kinetik im Verlauf der Messreihe. Zwar ließ sich 2 Stunden nach Stimulationsbeginn I κ B- ζ erstmalig nachweisen, doch blieb die Intensität der Banden bis zum Ende der Messreihe nach 10 Stunden annähernd konstant. Diese kann als Vergleichsparameter für die mit *B. vulgatus* bzw. *E. coli* stimulierten Proben zu gleichen Zeitpunkten dienen.

In *B. vulgatus* stimulierten BMDCs (LANE 6 – 8, Abb. 9) war I κ B- ζ ebenfalls detektierbar, zeigte hier aber eine Kinetik. War zum Zeitpunkt 2 Stunden noch vergleichbar viel I κ B- ζ nachweisbar wie in PBS stimulierten BMDCs, ließ sich 4 Stunden nach Stimulationsbeginn eine Erhöhung der Bandenintensität feststellen. Diese nahm bis zum Ende der Messreihe wieder auf Niveau der PBS Kontrolle ab.

In *E. coli* stimulierten BMDCs (LANE 9 – 11, Abb. 9) zeichnete sich dieser Unterschied noch deutlicher ab. Bereits 2h nach Stimulationsbeginn konnte ein Unterschied in der I κ B- ζ Bandenintensität zwischen *E. coli* und PBS stimulierten BMDCs gefunden werden. Dieser wurde bis zum Ende der Messreihe stetig größer.

In naiven, PBS vorstimulierten und *E. coli* restimulierten BMDCs (LANE 13, Abb. 9) ließ sich I κ B- ζ erwartungsgemäß detektieren und zeigte eine Bandenintensität, die leicht unter der von 10-stündiger *E. coli* Stimulation lag. Bedenkt man, dass diese Restimulation einer 14-stündigen *E. coli* Stimulation entspricht, ordnet sich diese Messung in die vorherige Messreihe ein und legt den Schluss nahe, dass nach dem

Maximum an Intensität bei 10 Stunden *E. coli* Stimulation die I κ B- ζ -Proteinmenge wieder zurückgeht.

In semimaturen, *B. vulgatus* vorstimulierten und *E. coli* restimulierten BMDCs (LANE 14, Abb. 9) ließ sich I κ B- ζ in größerer Menge detektieren als in der unstimulierten Kontrolle (LANE 12, Abb. 9). Dieser Unterschied fiel bei maturaen, *E. coli* vorstimulierten und *E. coli* restimulierten BMDCs (LANE 15, Abb. 9) minimal größer aus.

Somit lässt sich I κ B- ζ sowohl auf einen *B. vulgatus*, als auch auf einen *E. coli* Stimulus hin nachweisen, zeigt hierbei aber stimulusabhängige Kinetiken. Auf einen ersten *E. coli* Stimulus werden die größten Mengen Protein im Verlauf der ersten 10 Stunden synthetisiert. Unter Restimulation fällt die I κ B- ζ Produktion semimaturer und maturaer BMDCs vergleichbar aus. Es bleibt aber festzuhalten, dass sowohl semimature als auch mature BMDCs auf einen zweiten Stimulus hin weniger I κ B- ζ produzierten als dies bei Erststimulation immaturer BMDCs der Fall war.

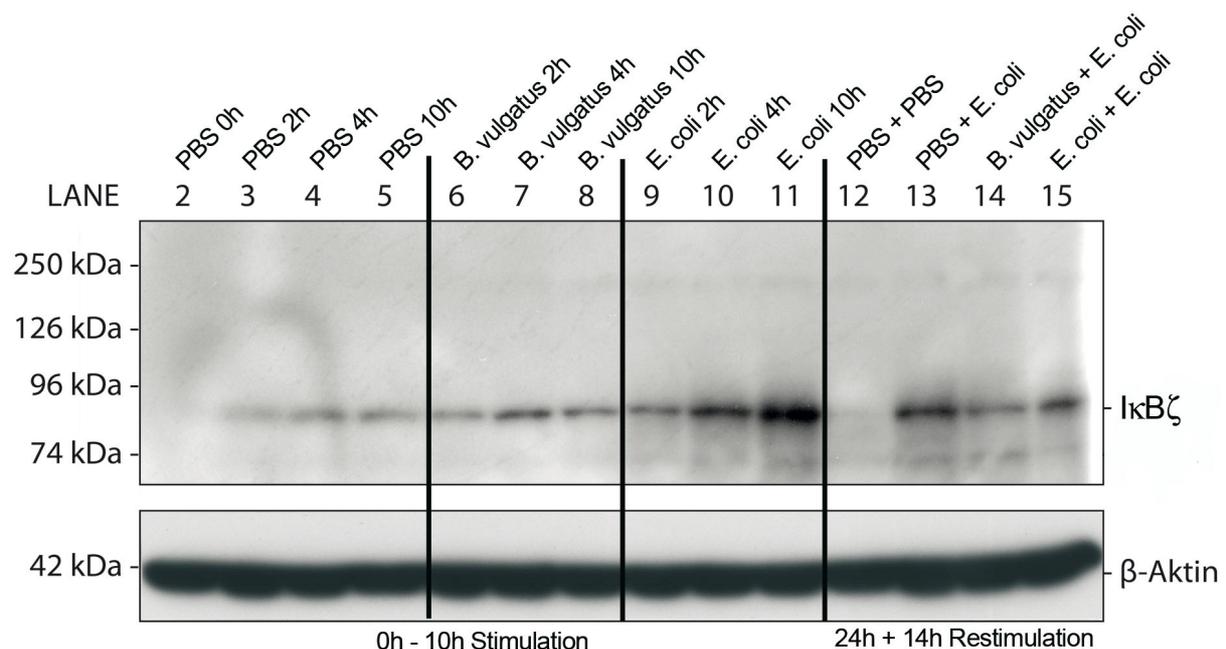


Abb. 9: I κ B- ζ -Proteinexpression in WT BMDCs zu den Zeitpunkten 0h, 2h, 4h und 10h nach Stimulationsbeginn bzw. nach 14h Restimulation mit *E. coli* (MOI 1)

BMDCs wurden mit PBS, *B. vulgatus* (MOI 1) oder *E. coli* (MOI 1) für 0h, 2h, 4h, 10h stimuliert bzw. für 24h vorstimuliert und anschließend für weitere 14h mit *E. coli* (MOI 1) restimuliert. Nach Ablauf der entsprechenden Zeiten wurden die Zellen lysiert. Die I κ B- ζ -Expression wurde mittels Antikörpern im Western Blot nachgewiesen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängig durchgeführte Versuche.

3.2.2 Semiquantitative Analyse der I κ B- ζ -mRNA-Expression in WT BMDCs

Um zu untersuchen, inwiefern sich die Ergebnisse der Proteinuntersuchungen auch auf transkriptionaler Ebene wiederfinden ließen, wurde die I κ B- ζ -Genexpression über semiquantitative RT-RT-PCR Versuche ermittelt. Hierzu wurden BMDCs mit PBS, *B. vulgatus* (MOI 1) oder *E. coli* (MOI 1) für 0, 1, 2, 4, 8, 14 und 22 Stunden stimuliert beziehungsweise mit den gleichen Stimuli für 24 Stunden vorstimuliert und anschließend für 14 Stunden mit *E. coli* (MOI 1) restimuliert. Die mRNA Transkriptionsraten wurden mit denen von β -Actin zum entsprechenden Zeitpunkt verglichen. Alle Transkriptionsraten wurden in Relation zu denjenigen von PBS stimulierten BMDCs zum Zeitpunkt 0 Stunden gesetzt, welche der Basisexpression der Zellen entspricht.

3.2.2.1 I κ B- ζ -mRNA-Expressionsraten in WT BMDCs nach Stimulation

Nach Stimulation mit *E. coli* stieg die I κ B- ζ -mRNA-Expression kontinuierlich an und erreichte ihr Maximum 2 Stunden nach Stimulationsbeginn mit einer 34,4-fachen Steigerung der Expressionsrate. Im weiteren Verlauf bis 14 Stunden nach Stimulationsbeginn fiel diese wieder auf 8,3-fache Hochregulation ab, blieb dann aber bis zum Ende der Messreihe annähernd konstant 8-fach erhöht (8,0-fach erhöht nach 22 Stunden).

Bei Stimulation mit *B. vulgatus* kam es zu einem Anstieg der Expressionsrate innerhalb der ersten 4 Stunden auf maximal 5,9-faches Niveau verglichen mit dem unstimulierten BMDCs. Bis 22 Stunden fiel dieses wieder auf 1,5 (14 Stunden) bzw. 1,7 (22 Stunden) ab.

BMDCs, welche mit PBS stimuliert wurden, zeigten während der gesamten Messreihe bis 22h keine relevante Veränderung der I κ B- ζ -Expressionsrate (0,4 - 1,02) (Abb. 10a).

3.2.2.2 I κ B- ζ -mRNA-Expressionsraten in WT BMDCs nach Restimulation

Nach 14-stündiger Restimulation mit *E. coli* (MOI 1) zeigte sich bei immaturren und semimaturren BMDCs eine vergleichbare Hochregulation der I κ B- ζ -mRNA-Expressionrate um das 24,6- bzw. 23,5-fache. Bei maturateden BMDCs fiel

diese mit 34,4-facher Erhöhung der mRNA Expressionrate zwar zahlenmäßig größer aus, jedoch erwies sich dies als statistisch nicht signifikant (t-test, $p > 0,05$) (Abb. 10b).

Analog der Befunde der Proteinexpression (s. 3.2.1) konnte auch auf mRNA Ebene eine vergleichbare, stimulusabhängige Kinetik festgestellt werden. Auch hier wurde unter *E. coli* Stimulation die größte Menge mRNA produziert, jedoch war dies auf transkriptionaler Ebene bereits nach 2 Stunden der Fall. Bei Stimulation mit *B. vulgatus* fiel die Proteinsynthese geringer aus, was sich auf mRNA Ebene ebenfalls widerspiegelte. Auf einen zweiten *E. coli* Stimulus hingegen reagierten immature, semimature und mature BMDCs alle mit vergleichbarer I κ B- ζ -mRNA-Produktion.

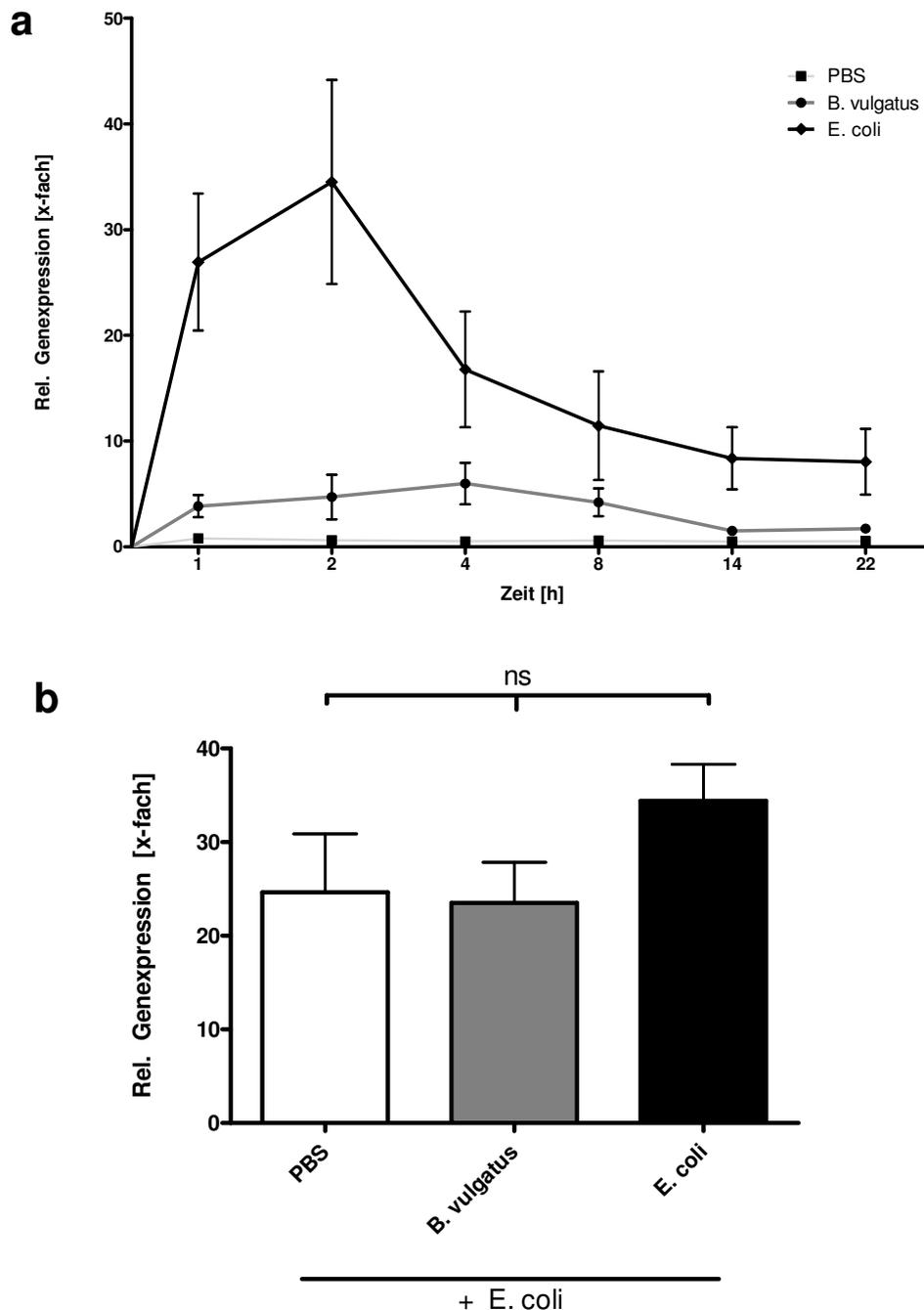


Abb. 10: Semiquantitative $\text{IkB-}\zeta\text{-mRNA}$ -Expressionsraten in WT BMDCs

A: Im zeitlichen Verlauf zwischen 0 und 22 Stunden nach Stimulationsbeginn

B: Nach 24-stündiger Vorstimulation und 14-stündiger Restimulation

BMDCs wurden mit PBS, *B. vulgatus* (MOI 1) oder *E. coli* (MOI 1) für 0 – 22h stimuliert (a) bzw. für 24h vorstimuliert und anschließend erneut für 14h mit *E. coli* (MOI 1) restimuliert (b). Nach Ablauf der entsprechenden Zeiten wurden die Zellen der RNA-Aufreinigung zugeführt. Es wurden mittels RT-RT-PCR die $\text{IkB-}\zeta\text{-mRNA}$ -Expressionsraten bestimmt und relativ zur Expressionsrate von unstimulierten BMDCs zum Zeitpunkt 0h gesetzt.

Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung innerhalb der jeweiligen Versuchsreihe ($n > 3$). Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen (t-test).

3.2.3 Semiquantitative Analyse der I κ B- ζ -mRNA-Expression in IL-6^{-/-} BMDCs

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe legten einen Zusammenhang zwischen der autokrinen Wirkung von IL-6 und der I κ B- ζ Expression nahe. Um die Bedeutung des Zytokins IL-6 auf die Genexpression von I κ B- ζ näher zu untersuchen, wurden analog zu den WT-mRNA-Expressionsversuchen parallele Untersuchungen unter gleichen Bedingungen an BMDCs aus IL-6 defizienten Mäusen durchgeführt. Experimentelles Vorgehen und Auswertung blieben hierbei unverändert (s. 3.1).

3.2.3.1 I κ B- ζ -mRNA-Expressionsraten in IL-6^{-/-} BMDCs nach Stimulation

Ähnlich wie WT BMDCs zeigten auch IL-6 defiziente BMDCs einen Anstieg der I κ B- ζ -Expressionsraten auf einen *E. coli* Stimulus hin. Dieser fiel jedoch mit einer maximalen Steigerung der Expression 2 Stunden nach Stimulationsbeginn um lediglich das 13,6-fache deutlich geringer aus. Auch im zeitlichen Verlauf zeigten sich Unterschiede. So fiel die Expression bei IL-6 defizienten BMDCs nach Erreichen des Maximalwertes deutlich rascher ab (3,6-fach nach 4 Stunden) als dies bei den WT Kontrollen der Fall war. Das bei WT BMDCs beobachtete Plateau am Ende der Messreihe war bei IL-6^{-/-} BMDCs mit einer 2,5-fachen Steigerung nach 14 Stunden beziehungsweise 22 Stunden deutlich schwächer ausgeprägt.

Bei IL-6^{-/-} BMDCs, welche mit *B. vulgatus* stimuliert wurden, fiel der Unterschied zur WT Kontrolle insofern noch ausgeprägter aus, als hier die erwartete Steigerung der Expressionraten im gesamten Verlauf bis 22 Stunden nach Stimulationsbeginn gänzlich ausblieb (0,5 – 1,1).

PBS stimulierte Kontrollen zeigten ebenfalls keine Erhöhung der I κ B- ζ -Genexpressionsraten im Verlauf von 0 bis 22 Stunden (Abb. 11a).

3.2.3.2 I κ B- ζ -mRNA-Expressionsraten in IL-6^{-/-} BMDCs nach Restimulation

Nach 14-stündiger Restimulation mit *E. coli* (MOI 1) zeigte sich sowohl bei PBS als auch bei *B. vulgatus* bzw. *E. coli* vorstimulierten IL-6^{-/-} BMDCs nur eine geringe, nicht signifikant unterschiedliche Hochregulation der I κ B- ζ -Genexpression von 4,68 bei PBS, 3,73 bei *B. vulgatus* und 4,99 bei *E. coli* Vorstimulation (s. Abb. 11b).

Anders als bei den WT BMDCs konnte auch kein Unterschied zwischen den Expressionraten bei 14 Stunden Stimulation und 14 Stunden Restimulation

festgestellt werden. War die I κ B- ζ -Expression bei WT BMDCs nach 14-stündiger Restimulation um ein Vielfaches höher, als es bei erstmaliger Stimulation nach 14 Stunden der Fall war, zeigten IL-6^{-/-} BMDCs nach Stimulation wie Restimulation gleich niedrige mRNA Expressionsraten. Es liegt also der Schluss nahe, dass IL-6 defiziente BMDCs nicht nur sehr geringe Mengen I κ B- ζ produzieren können, sondern ebenfalls in ihrer Fähigkeit zur Reifung eingeschränkt sind.

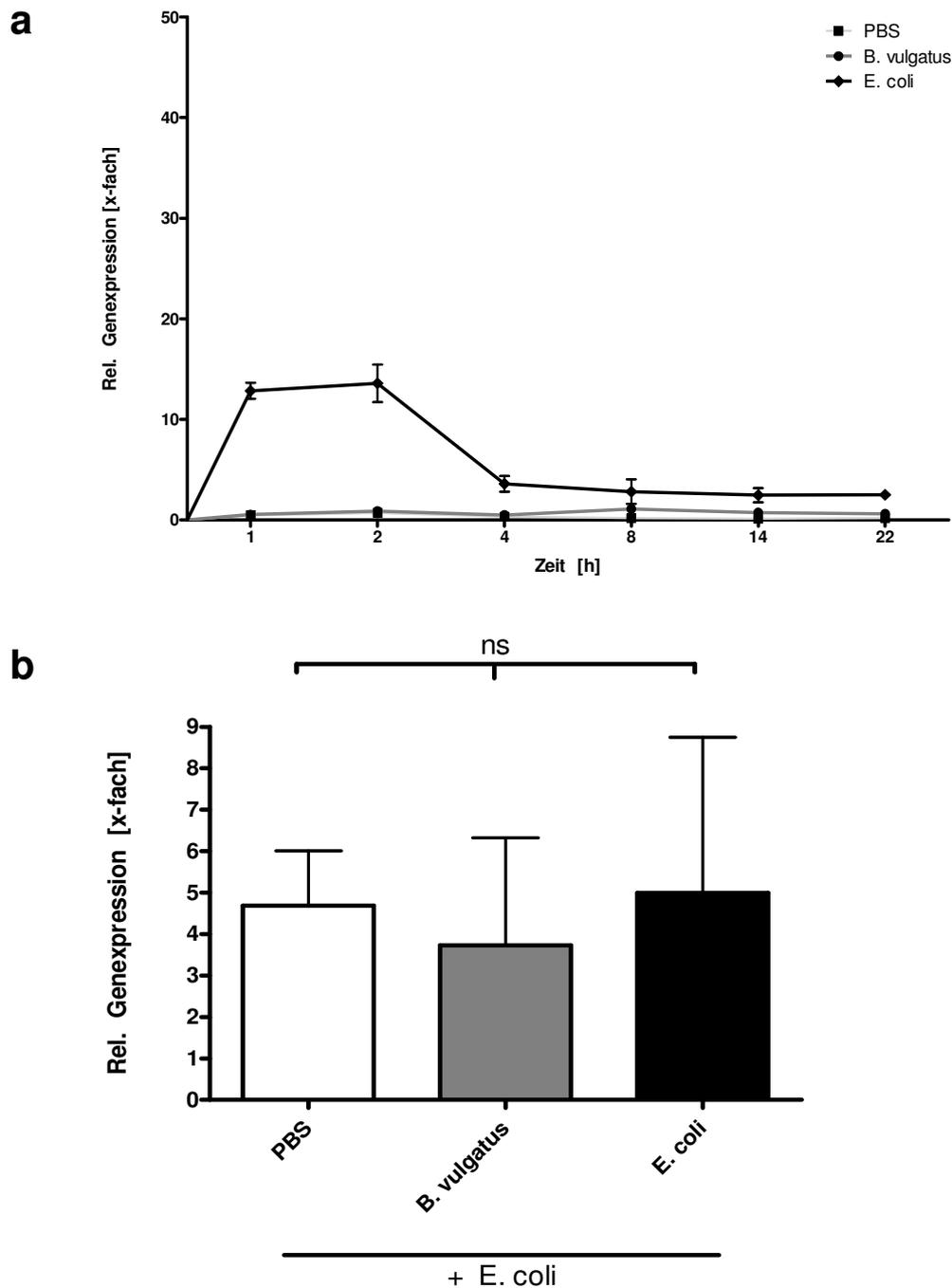


Abb. 11: Semiquantitative $\text{IkB-}\zeta\text{-mRNA}$ -Expressionsraten in $\text{IL-6}^{-/-}$ BMDCs

A: Im zeitlichen Verlauf zwischen 0 und 22 Stunden nach Stimulationsbeginn

B: Nach 24-stündiger Vorstimulation und 14-stündiger Restimulation

BMDCs wurden mit PBS, *B. vulgatus* (MOI 1) oder *E. coli* (MOI 1) für 0 – 22h stimuliert (a) bzw. für 24h vorstimuliert und anschließend erneut für 14h mit *E. coli* (MOI 1) restimuliert (b). Nach Ablauf der entsprechenden Zeiten wurden die Zellen der RNA-Aufreinigung zugeführt. Es wurden mittels RT-RT-PCR die $\text{IkB-}\zeta\text{-mRNA}$ -Expressionsraten bestimmt und relativ zur Expressionsrate von unstimulierten BMDCs zum Zeitpunkt 0h gesetzt.

Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung innerhalb der jeweiligen Versuchsreihe ($n > 3$). Ein p -Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen (t -test).

3.3 Analyse der Zusammensetzung der NFκB-Untereinheiten in BMDC-Kernlysaten

Bis jetzt konnte gezeigt werden, dass sich IκB-ζ sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene in BMDCs nachweisen lässt und eine stimulluspezifische Expressionskinetik aufweist. Ferner unterscheiden sich immature, semimature und mature BMDCs nach einem zweiten Stimulus deutlich hinsichtlich ihrer Produktionsmenge an TNF-α und IL-6.

Bedenkt man, dass der Transkriptionsfaktor NFκB für beide Zytokine von Relevanz ist und IκB-ζ einen Modulator eben dieses Transkriptionsfaktors darstellt, liegt der Schluss nahe, dass während der stimullusabhängigen Reifung immaturer BMDCs hin zu semimaturen beziehungsweise maturaen BMDCs, sich IκB-ζ abhängig auch die Zusammensetzung der NFκB-Untereinheiten im Kern ändern müsste. Daraus würde als Konsequenz die Änderung der Zytokinexpression folgen, welche, wie bereits erwähnt, beobachtet wurde.

Um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen wurden BMDCs mit PBS, *B. vulgatus* (MOI 1) (Abb. 12a) oder *E. coli* (MOI 1) (Abb. 12b) für 30 Minuten stimulliert beziehungsweise für 24 Stunden vorstimulliert und für weitere 30 Minuten mit *E. coli* (MOI 1) restimulliert. Aus den Zellen wurden Kernlysate gewonnen und diese mittels NFκB-TransAM-ELISA spezifisch vermessen.

BMDCs, welche für 30 Minuten mit *E. coli* (MOI 1) stimulliert wurden, zeigten hinsichtlich ihrer Konzentration der NFκB-Untereinheiten im Kern einen deutlichen Anstieg der p65-Untereinheit (1,90-fache Konzentration verglichen mit PBS stimullierten BMDCs), während sich die Konzentration der Untereinheiten p50 (1,19-fache), p52 (0,98-fache), c-Rel (1,02-fache) und RelB (0,99-fache) nur unwesentlich von der Konzentration unstimullierter BMDCs unterschied (Abb. 12a, grau).

Bei maturaen BMDCs, welche zuvor für 24 Stunden mit *E. coli* stimulliert und anschließend erneut für 30 Minuten mit *E. coli* restimulliert wurden, zeigte sich ein gänzlich anderes Verhältnis der NFκB-Untereinheiten zueinander. Während die p50-Untereinheit in ihrer Konzentration im Kern annähernd konstant wie bei erstmaliger Stimullation blieb (1,15-fache), fiel die Konzentration der anderen

Untereinheiten signifikant ab (p65 0,38-fache und p52 0,34-fache Konzentration verglichen mit PBS stimulierten BMDCs) (Abb. 12a, schwarz).

Hingegen konnte man bei BMDCs, welche für 30 Minuten mit *B. vulgatus* (MOI 1) stimuliert wurden, keine signifikante Veränderung der NFκB-Untereinheiten im Kern beobachten. Die Konzentrationen von p65 (1,10-fache), p50 (0,98-fache), p52 (1,01-fache), c-Rel (1,86-fache) und RelB (0,90-fache) blieben auch nach Stimulation mit *B. vulgatus* auf einem Niveau, welches mit dem unstimulierten Kontrollen vergleichbar war (Abb. 12b, grau).

Dieser Aspekt änderte sich auch nicht, wenn semimature BMDCs, welche zuvor für 24 Stunden mit *B. vulgatus* stimuliert worden waren, nun für 30 Minuten mit *E. coli* restimuliert wurden. Die Konzentrationen der NFκB-Untereinheiten p65 (1,45-fache), p50 (1,20-fache), p52 (1,04-fache), c-Rel (1,49-fache) und RelB (1,00-fache) zeigten keine signifikanten Unterschiede zu denen immaturer BMDCs, welche mit PBS stimuliert und restimuliert wurden (Abb. 12b, schwarz).

Hinsichtlich der Zusammensetzung der NFκB-Untereinheiten scheinen sich also ebenfalls stimulusabhängige Charakteristika abzuzeichnen. Während bei Stimulation immaturer BMDCs mit *E. coli* die transkriptionelle Reaktion in einem Verhältniswechsel der NFκB-Untereinheiten hin zur p65-Untereinheit resultiert, zeigt sich bei Stimulation immaturer BMDCs mit *B. vulgatus* keine Veränderung der Untereinheiten zueinander. Dies trifft ebenso auf die Restimulation semimaturer beziehungsweise maturer BMDCs zu. Während sich bei maturen BMDCs nach einem zweiten *E. coli* Stimulus die Konzentrationen aller Untereinheiten außer p50 signifikant reduzieren, bleiben diese bei semimaturen BMDCs auch nach *E. coli* Restimulation unverändert. Ob und inwieweit die Stimulationszeit von 30 Minuten für diesen Sachverhalt mit eine Rolle spielt, bleibt vorerst offen.

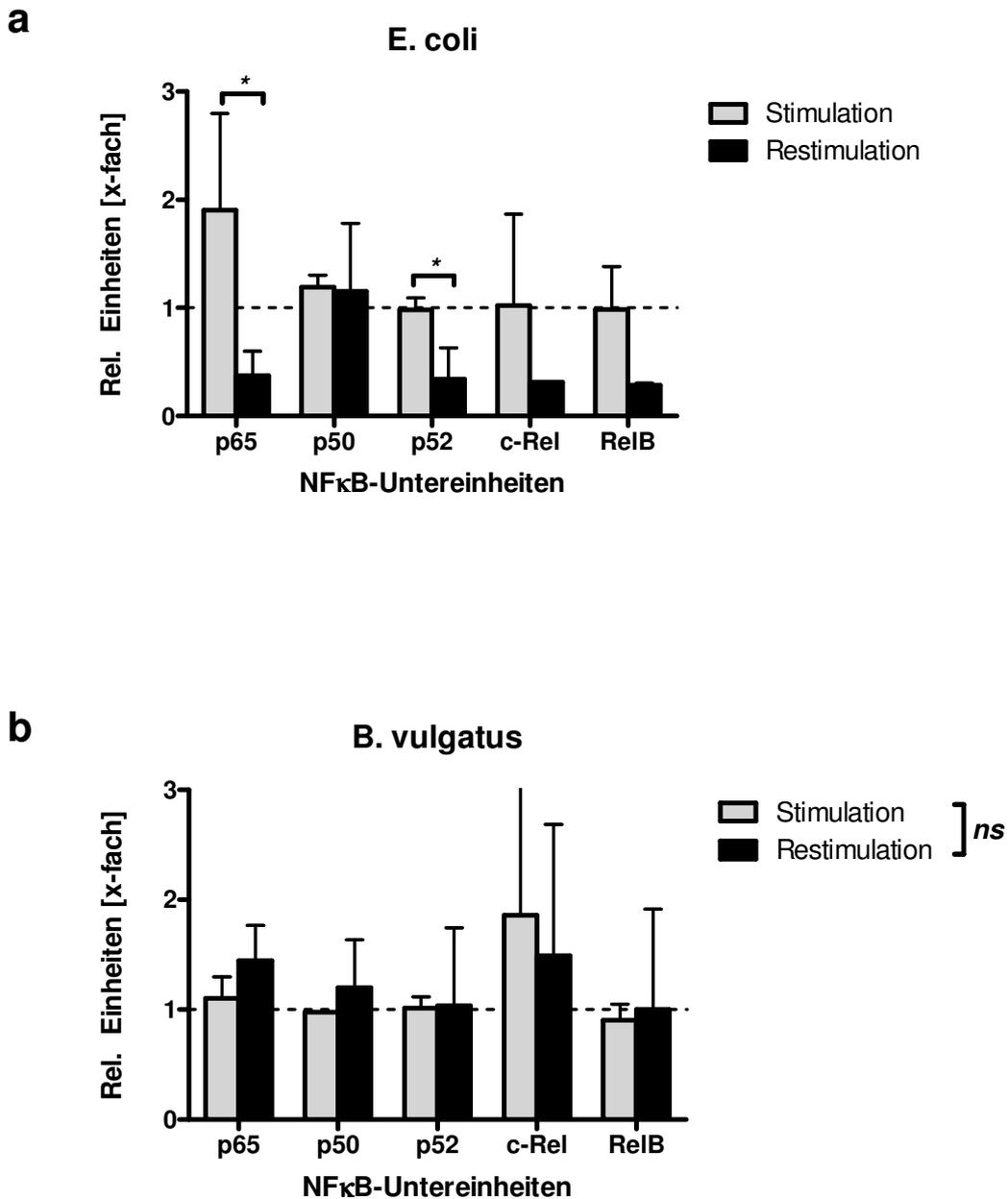


Abb. 12: Zusammensetzung der NFκB-Untereinheiten in BMDC-Kernlysaten

A: Nach 30min Stimulation mit *E. coli* (MOI 1) bzw. 24h Vorstimulation mit *E. coli* (MOI 1) und 30min Restimulation mit *E. coli* (MOI 1)

B: Nach 30min Stimulation mit *B. vulgatus* (MOI 1) bzw. 24h Vorstimulation mit *B. vulgatus* (MOI 1) und 30min Restimulation mit *E. coli* (MOI 1)

BMDCs wurden mit *B. vulgatus* (MOI 1) oder *E. coli* (MOI 1) für 30min stimuliert bzw. für 24h vorstimuliert und anschließend erneut für 30min mit *E. coli* (MOI 1) restimuliert. Aus den Zellen wurden Kernlysate gewonnen und diese mittels TransAM-ELISA auf ihre NFκB-Untereinheiten untersucht. Der Wert 1 entspricht der Menge an NFκB-Untereinheit, welche bei PBS stimulierten BMDCs zu den entsprechenden Zeitpunkten in Kernlysaten detektiert werden konnte.

Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung innerhalb der jeweiligen Versuchsreihe ($n = 3$). Ein p -Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen (t -test).

3.4 Analyse der TNF- α - und IL-6-Zytokinexpression in restimulierten I κ B- ζ ^{-/-} BMDCs

Die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche zeigten einerseits, dass die I κ B- ζ Genexpression von der Zytokinexpression abhängig ist, insbesondere derjenigen von IL-6 (s. 3.2.3), und andererseits die Zytokinexpression vom Grad der Maturation der BMDCs beeinflusst wird (s. 3.1). Diese wiederum konnte in Zusammenhang mit der I κ B- ζ gesteuerten NF κ B-Regulation gebracht werden (s. 3.3). Daher bot es sich nun an zu untersuchen, inwieweit eine Deletion von I κ B- ζ Auswirkungen auf die Zytokinexpression und damit auch auf die Fähigkeit der BMDCs zur Maturation hat. Hierzu wurden analog zu den Zytokinexpressionsversuchen an WT BMDCs (s. 3.1) analoge Untersuchungen unter gleichen Bedingungen an BMDCs aus I κ B- ζ defizienten Mäusen und entsprechenden littermate Positivkontrollen durchgeführt.

Bezüglich der TNF- α Konzentration (Abb. 13a) nach PBS Vorstimulation für 24 Stunden und 14-stündiger *E. coli* Restimulation zeigten sowohl WT als auch KO BMDCs die aus den Vorversuchen erwartete TNF- α Produktion von im Mittel 2922,1 pg/ml (WT) bzw. 3597,4 pg/ml (KO).

Anders verhielten sich *B. vulgatus* (MOI 1) bzw. LPS lo (1 ng/ml) vorstimulierte BMDCs. Während semimature I κ B- ζ ^{+/+}-Zellen erneut TNF- α Mengen produzierten, welche mit denen der Vorversuch vergleichbar waren (873,4 pg/ml bei *B. vulgatus* bzw. 156,5 pg/ml bei *E. coli* Vorstimulation), lag die Konzentration an TNF- α bei I κ B- ζ defizienten BMDCs mit 1999,5 pg/ml (*B. vulgatus*) bzw. 1806,9 pg/ml (LPS lo) signifikant höher. Damit ließ sich auch der typische Konzentrationsunterschied an TNF- α zwischen immaturren, PBS vorstimulierten und semimaturren, *B. vulgatus* bzw. LPS lo vorstimulierten BMDCs nicht mehr signifikant nachweisen.

Hinsichtlich maturer, *E. coli* (MOI 1) bzw. LPS hi (1 μ g/ml) vorstimulierter BMDCs ließ sich wiederum kein signifikanter Unterschied bezüglich der TNF- α Menge feststellen. Erneut konnte praktisch keine TNF- α Produktion nachgewiesen werden und so lag diese bei WT Zellen bei 15,03 pg/ml (*E. coli*) bzw. 8,87 pg/ml (LPS hi) und bei KO BMDCs bei 19,98 pg/ml (*E. coli*) bzw. 33,4 pg/ml (LPS hi).

In Hinblick auf die IL-6 Produktion (Abb. 13b) stellte sich heraus, dass die Deletion von I κ B- ζ mit einer allgemeinen, signifikanten Reduktion der IL-6 Produktion einherging, welche unabhängig vom vorherigen Stimulus auftrat. So war die Produktion immaturer, PBS vorstimulierter WT BMDCs, auf einen *E. coli* Stimulus mit im Mittel 151,37 ng/ml IL-6 gut doppelt so hoch, wie die I κ B- ζ ^{-/-} defizienter BMDCs

(73,4 ng/ml). Bei semimaturen, *B. vulgatus* oder LPS (1 ng/ml) vorstimulierten WT BMDCs, zeigte sich nach Restimulation mit *E. coli* ein zu den Vorversuchen kongruentes Bild mit einer Produktion von IL-6 im Bereich immaturer BMDCs (168,8 ng/ml bei *B. vulgatus* bzw. 180,5 ng/ml). Dies war auch bei $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta^{-/-}$ BMDCs der Fall, doch fiel hier die Produktion im Allgemeinen deutlich geringer aus, als bei den WT Kontrollen (75,8 ng/ml bei *B. vulgatus* bzw. 63,0 ng/ml bei 1 ng/ml LPS Vorstimulation). Die gleiche Beobachtung konnte auch bei maturen, *E. coli* oder LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) vorstimulierten, BMDCs gemacht werden. So lag die IL-6 Produktion allgemein unter der immaturer beziehungsweise semimaturer BMDCs mit Unterschieden lediglich quantitativer Natur. Während restimulierte, mature WT BMDCs im Mittel 88,6 ng/ml (*E. coli* Vorstimulation) beziehungsweise 114,5 ng/ml (1 $\mu\text{g/ml}$ LPS Vorstimulation) IL-6 produzierten, fanden sich bei $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta^{-/-}$ BMDCs nach Restimulation mit *E. coli* nur noch lediglich 17,4 ng/ml (*E. coli* Vorstimulation) beziehungsweise 19,8 ng/ml (1 $\mu\text{g/ml}$ LPS Vorstimulation) IL-6.

Bezüglich ihrer Zytokinexpression unterscheiden sich BMDCs also insofern, als die beim *B. vulgatus* (MOI 1) bzw. LPS lo (1 ng/ml) vorstimulierten, semimaturen Phänotyp erwartete Reduktion der TNF- α Produktion bei $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ defizienten Zellen ausbleibt und die IL-6 Produktion in etwa um die Hälfte des beim WT erwarteten Wertes abfällt. Ob $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta^{-/-}$ BMDCs also überhaupt noch die Kriterien der Klassifikation zum semimaturen Phänotyp erfüllen ist fraglich.

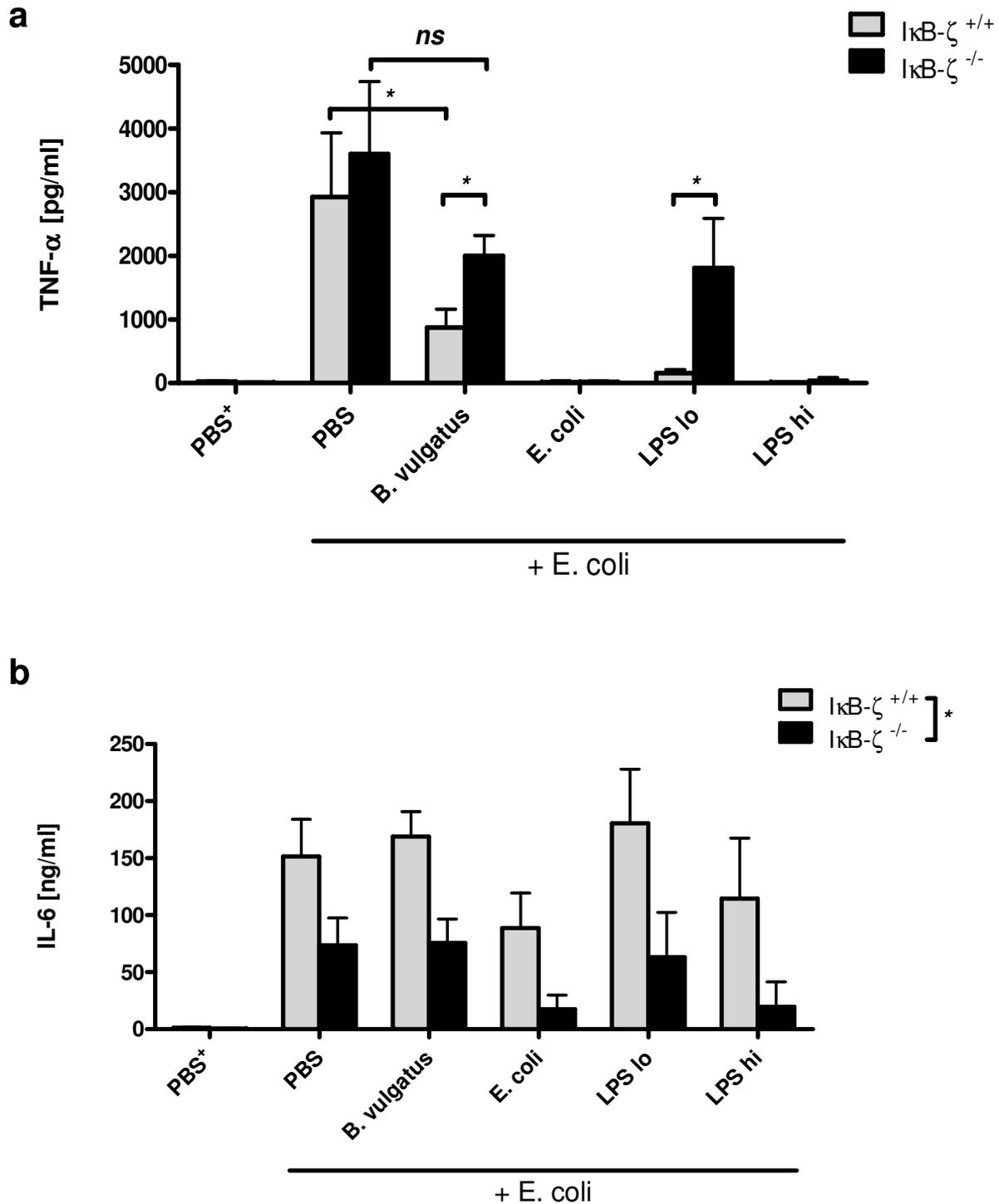


Abb. 13: Zytokinexpression immaturer, semimaturer und maturer WT- und IκB-ζ^{-/-} BMDCs nach 14h Restimulation mit E. coli (MOI 1)

A: TNF-α Expression ; B: IL-6 Expression

BMDCs wurden mit PBS, B. vulgatus (MOI 1), E. coli (MOI 1), LPS lo (1 ng/ml) oder LPS hi (1 μg/ml) für 24h vorstimuliert und anschließend für weitere 14h mit E. coli (MOI 1) restimuliert. Die Zytokinmessung erfolgte mittels ELISA. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung innerhalb der jeweiligen Versuchsreihe (n = 3; n* = 1). Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen (t-test).

3.5 Analyse der Aktivierungs- und Oberflächenmarker auf WT und $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta^{-/-}$ BMDCs

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, inwieweit sich WT BMDCs von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta^{-/-}$ BMDCs auch im Hinblick auf ihre Expression von Aktivierungs- und Oberflächenmarker unterscheiden, was letztendlich Rückschlüsse auf ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation und Initiierung einer Immunantwort erlauben würde.

Hierzu wurden BMDCs für 24 Stunden mit PBS (immatur), *B. vulgatus* oder 1 ng/ml LPS (semimatur) bzw. *E. coli* oder 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS (matur) stimuliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.5.1 Analyse der MHC-II Oberflächenexpression auf WT und $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta^{-/-}$ BMDCs

Bei der Analyse wurden alle CD11c positiven Zellen nach dem Grad ihrer MHC-II Oberflächenexpression in drei Gruppen eingeteilt (MHC-II low, MHC-II intermediate, MHC-II high, s. Abb. 14 und Tab. 21).

Sowohl bei WT als auch $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta^{-/-}$ BMDCs zeigte sich eine stimulusabhängige Verschiebung der MHC-II Oberflächenexpression, welche allerdings in unterschiedlicher Intensität stattfand.

Bei immaturren WT BMDCs lag das Verhältnis der MHC-II Oberflächenexpression nach 24 Stunden PBS Stimulation bei 42,63 : 26,2 : 31,18 (low : intermediate : high) (s Tab. 21). Wurden die WT Zellen mit *B. vulgatus* (MOI 1) bzw. LPS lo (1 ng/ml) stimuliert, resultierte dies in einem leichten, nicht signifikanten Anstieg der MHC-II high BMDCs, welcher sich primär aus der Gruppe der MHC-II intermediate BMDCs rekrutieren müsste, da diese Gruppe signifikant geringer ausfiel als es bei immaturren BMDCs der Fall war und die MHC-II low Gruppe hingegen keine signifikante quantitative Veränderung zeigte (33,46 : 18,28 : 48,26 bei *B. vulgatus* bzw. 29,8 : 16,82 : 53,38 bei LPS lo). Bei Stimulation von WT BMDCs mit *E. coli* (MOI 1) bzw. LPS hi (1 $\mu\text{g/ml}$) fiel die Tendenz hin zu hoher MHC-II Oberflächenexpression noch intensiver aus. So stieg der Anteil MHC high BMDCs signifikant zu Ungunsten der beiden anderen Untergruppen an (19,39 : 16,23 : 64,38 bei *E. coli* bzw. 18,13 : 11,28 : 66,68 bei LPS hi).

Bei immaturren $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta^{-/-}$ BMDCs lag das Verhältnis der MHC-II Gruppen nach 24 Stunden PBS Stimulation bei 17,24 : 30,38 : 52,38. Damit lag schon bei unstimulierten BMDCs eine im Vergleich zur WT Kontrolle signifikant höhere MHC-II Oberflächenexpression vor, welche sich primär aus der MHC-II low Gruppe rekrutiert haben müsste, da diese deutlich geringer ausfiel. Wurden die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta^{-/-}$ Zellen mit *B. vulgatus* (MOI 1) bzw. LPS lo (1 ng/ml) stimuliert, stieg der Anteil an MHC-II high positiven BMDCs noch weiter an, wobei hier vor allem der Anteil an MHC-II intermediate abfiel (11,71 : 18,31 : 69,98 bei *B. vulgatus* bzw. 11,43 : 15,65 : 72,92 bei LPS lo). Durch *E. coli* (MOI 1) bzw. LPS hi (1 $\mu\text{g/ml}$) Stimulation erhielt man den höchsten Anteil an MHC-II high positiven BMDCs, welche sich sowohl aus der MHC-II low Population als auch aus der MHC-II intermediate Population rekrutieren ließen, welche signifikant zurück gingen.

Vergleicht man nun zusätzlich die Verhältnisse der MHC-II Gruppen zwischen WT BMDCs und $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta^{-/-}$ BMDCs (s. Tab. 21, rechte Spalte), erkennt man, wie bereits erwähnt, dass bereits unstimulierte, immature BMDCs signifikant höhere MHC-II Oberflächenexpression aufweisen. Bei *B. vulgatus* stimulierten BMDCs wirkt sich die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Defizienz insofern aus, als man den bei WT Zellen beobachteten leichten Abfall von MHC-II intermediate hin zu MHC-II high bei konstanter MHC-II low Population nicht feststellen kann. Mehr noch fällt in Abwesenheit von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta^{-/-}$ auf, dass die ansteigende MHC-II high Population besonders auf Kosten der MHC-II niedrigexprimierenden Zellen steigt, sodass *B. vulgatus* (MOI 1) bzw. LPS lo (1 ng/ml) stimulierte $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta^{-/-}$ BMDCs hinsichtlich ihrer MHC-II Oberflächenexpression eher mit maturaen WT BMDCs zu vergleichen wären, als mit semimaturaen. Ein Vergleich der MHC-II Oberflächenexpression von WT BMDCs mit $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta^{-/-}$ BMDCs im Hinblick auf einen *E. coli* (MOI 1) bzw. LPS hi (1 $\mu\text{g/ml}$) Stimulus zeigt Unterschiede primär quantitativer Natur. Beide Zelltypen entsprechen dem MHC-II Muster maturaer BMDCs, wobei die Anzahl an MHC-II high positiven Zellen bei $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ defizienten BMDCs noch deutlich höher ausfällt, als bei WT BMDCs.

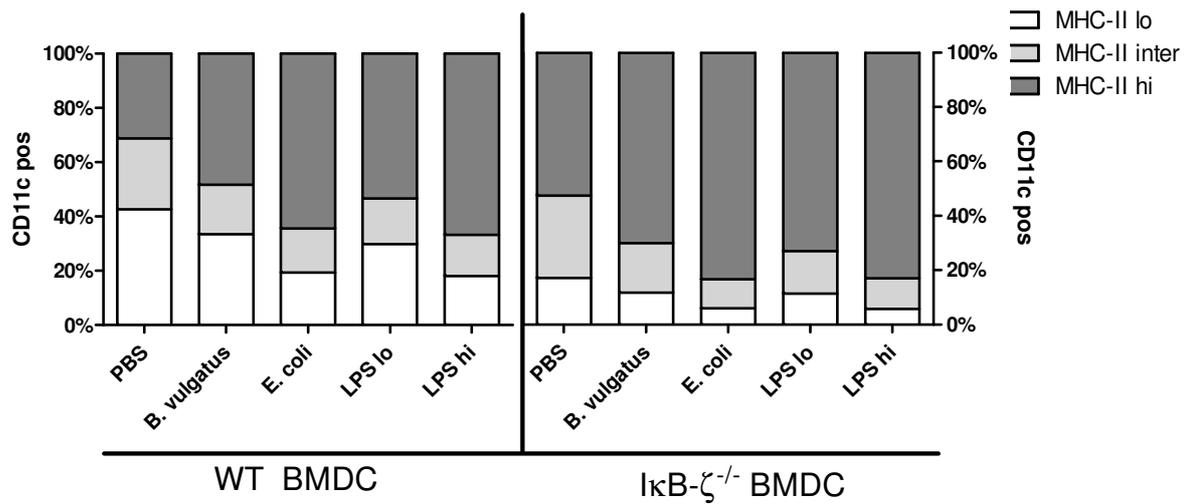


Abb. 14: MHC-II Oberflächenexpression auf WT- und IκB-ζ^{-/-} BMDCs nach 24h Stimulation

BMDCs wurden mit PBS, *B. vulgatus* (MOI 1), *E. coli* (MOI 1), LPS lo (1 ng/ml) oder LPS hi (1 µg/ml) für 24h stimuliert. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD11c, CD-40 und MHC-II markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Alle CD11c positiven Zellen wurden nach Grad ihrer MHC-II Oberflächenexpression in drei Gruppen aufgeteilt (MHC low, MHC intermediate, MHC high). Zur Darstellung kamen jeweils die Mittelwerte aus 5 WT und 5 IκB-ζ^{-/-} Versuchsläufen.

Stimulus	Genotyp	Marker	CD11c pos Zellen [%]	Std. Abw.	t-test Stimulus vs. PBS	t-test WT vs. KO
PBS	<i>WT</i>	MHC-II lo	37,4	± 17,01		p < 0,05
		MHC-II inter	24,52	± 4,73		p < 0,05
		MHC-II hi	38,08	± 21,68		<i>ns</i>
	<i>KO</i>	MHC-II lo	17,24	± 5,15		
		MHC-II inter	30,38	± 4,76		
		MHC-II hi	52,38	± 6,16		
B. vulgatus	<i>WT</i>	MHC-II lo	33,46	± 17,55	<i>ns</i>	p < 0,05
		MHC-II inter	18,28	± 4,04	p < 0,05	<i>ns</i>
		MHC-II hi	48,26	± 20,29	<i>ns</i>	p < 0,05
	<i>KO</i>	MHC-II lo	11,712	± 5,41	<i>ns</i>	
		MHC-II inter	18,308	± 3,18	p < 0,05	
		MHC-II hi	69,98	± 7,80	p < 0,05	
E. coli	<i>WT</i>	MHC-II lo	19,394	± 9,99	p < 0,05	p < 0,05
		MHC-II inter	16,226	± 5,54	p < 0,05	p < 0,05
		MHC-II hi	64,38	± 15,34	p < 0,05	p < 0,05
	<i>KO</i>	MHC-II lo	5,944	± 2,97	p < 0,05	
		MHC-II inter	10,756	± 2,61	p < 0,05	
		MHC-II hi	83,3	± 5,31	p < 0,05	
LPS lo	<i>WT</i>	MHC-II lo	29,8	± 17,78	<i>ns</i>	p < 0,05
		MHC-II inter	16,82	± 6,52	p < 0,05	<i>ns</i>
		MHC-II hi	53,38	± 24,25	<i>ns</i>	<i>ns</i>
	<i>KO</i>	MHC-II lo	11,43	± 6,06	<i>ns</i>	
		MHC-II inter	15,65	± 6,63	p < 0,05	
		MHC-II hi	72,92	± 11,51	p < 0,05	
LPS hi	<i>WT</i>	MHC-II lo	18,132	± 8,73	<i>ns</i>	p < 0,05
		MHC-II inter	15,188	± 3,01	p < 0,05	p < 0,05
		MHC-II hi	66,68	± 11,69	p < 0,05	p < 0,05
	<i>KO</i>	MHC-II lo	5,778	± 3,00	p < 0,05	
		MHC-II inter	11,282	± 2,55	p < 0,05	
		MHC-II hi	82,94	± 5,23	p < 0,05	

Tab. 21: MHC-II Oberflächenexpression auf WT- und $I\kappa B-\zeta^{-/-}$ BMDCs nach 24h Stimulation

CD11c positive Zellen aus 5 WT und 5 $I\kappa B-\zeta^{-/-}$ Versuchstieren wurden nach Grad ihrer MHC-II-Oberflächenexpression in drei Gruppen aufgeteilt (MHC low, MHC intermediate, MHC high). Die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen und deren Standardabweichung wurden berechnet. Die Signifikanzbestimmung erfolgte mittels t-test.

3.5.2 Analyse der CD40 Oberflächenexpression auf WT und I κ B- ζ ^{-/-} BMDCs

Beim Vergleich der CD40 Expression auf der Zelloberfläche von WT und I κ B- ζ ^{-/-} BMDCs zeigten immature, 24 Stunden PBS stimulierte BMDCs keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich ihrer CD40 Oberflächenexpression (1,1% aller CD11c positiven Zellen bei WT und 6,71% bei I κ B- ζ ^{-/-} BMDCs).

Erfolgte eine Stimulation mit *B. vulgatus* (MOI 1) bzw. LPS lo (1 ng/ml), stieg der Anteil an CD40 positiven Zellen bei WT BMDCs unwesentlich auf 3,89% bzw. 12,5% aller CD11c positiven Zellen an, während bei I κ B- ζ defizienten BMDCs ein signifikanter Anstieg auf 25,35% bzw. 31,25% beobachtet werden konnte.

Durch Stimulation mit *E. coli* (MOI 1) bzw. LPS hi (1 μ g/ml) war sowohl bei WT als auch bei I κ B- ζ ^{-/-} BMDCs ein im Vergleich zur PBS stimulierten Kontrolle signifikanter Anstieg der CD40 exprimierenden Zellen festzustellen (29,62% bzw. 28,43% bei WT BMDCs und 53,78% bzw. 51,53% bei I κ B- ζ ^{-/-} BMDCs).

Jenseits der stimulusabhängigen Unterschiede der CD40 Expression zwischen immaturen, semimaturen und maturen BMDCs konnten also auch Unterschiede zwischen den beiden BMDC Genotypen festgestellt werden, welche auf die Abwesenheit von I κ B- ζ zurückzuführen sein müssen. So fiel die CD40 Expression auf I κ B- ζ defizienten BMDCs nach *B. vulgatus*, *E. coli* und LPS hi Stimulation jeweils signifikant höher aus, als es bei den WT Kontrollen der Fall war. Ähnlich der Ergebnisse der Analyse der MHC-II Oberflächenexpression (s. 3.5.1) war dieser Unterschied im Falle von *B. vulgatus* bzw. LPS lo stimulierter I κ B- ζ ^{-/-} BMDCs so groß, dass diese Zellen hinsichtlich ihrer CD40 Oberflächenexpression eher mit maturen, *E. coli* stimulierten WT BMDCs zu vergleichen wären.

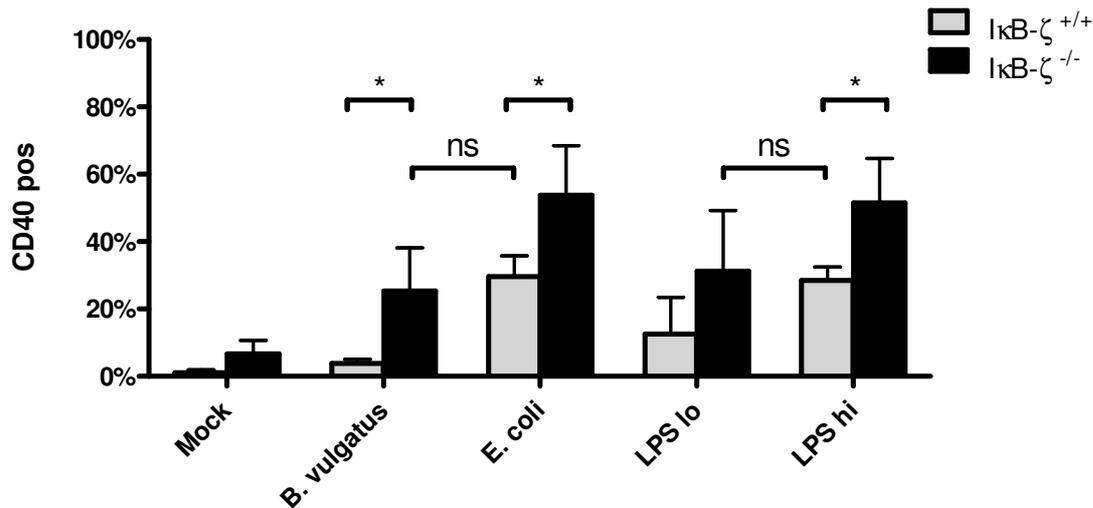


Abb. 15: CD-40 Oberflächenexpression auf WT- und IκB-ζ^{-/-} BMDCs nach 24h Stimulation

BMDCs wurden mit PBS, *B. vulgatus* (MOI 1), *E. coli* (MOI 1), LPS lo (1 ng/ml) oder LPS hi (1 μg/ml) für 24h stimuliert. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD11c, CD-40 und MHC-II markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die CD-40 exprimierenden Zellen wurden in Prozent aller CD11c positiven Zellen aufgetragen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung innerhalb der jeweiligen Versuchsreihe (n > 3). Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen (2way ANOVA).

3.6 Auswirkungen der IκB-ζ-Deletion auf eine DSS induzierte akute Colitis *in vivo*

Nachdem die bisherigen Versuche alle an Zellkulturen aus isolierten BMDCs *in vitro* durchgeführt wurden, stellte sich die Frage, ob und inwieweit sich eine Deletion von IκB-ζ auch auf eine Immunantwort im lebenden Organismus auswirken würde. Hierzu wurde bei je 6 IκB-ζ WT und 6 IκB-ζ KO littermate Mäusen eine akute Colitis durch Gabe von 2,5% DSS haltigem Trinkwasser induziert. Die Mäuse wurden im Verlauf von 7 Tagen bezüglich ihres Gewichts untersucht (Abb. 16a) und nach Kriterien des DAI beurteilt (Abb. 16b und 2.2.10). Post mortem wurde das Kolon vermessen, gewogen und der Quotient aus Gewicht pro Länge errechnet (Abb. 16c).

Hinsichtlich des Gewichts zeigten sich deutlich Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Während die WT Mäuse bis Versuchstag 6 keine Gewichtsreduktion zeigten und erst an Tag 7 eine leichte Reduktion um 3,37% eintrat, verloren die IκB-ζ KO Mäuse schon von Beginn an Gewicht (1,77% an Tag 3). Dieser Effekt konnte an

den Folgetagen bis Tag 7 bestätigt und verstärkt beobachtet werden. So lag an Tag 7 eine Gewichtsreduktion um 16,8% vor.

Diese Beobachtung konnte auch beim DAI wieder gefunden werden. Während I κ B- ζ WT Mäuse erst an Tag 5 mit einem deutlichen Sprung des DAI auf 5,17 erste äußerlich erkennbare Krankheitszeichen zeigten, konnte man bei den KO Versuchstieren bereits an Tag 3 einen erhöhten DAI von 2,5 festhalten. Dieser Trend setzte sich bis zum Tag 7 fort und so fiel der DAI der KO Gruppe an Tag 7 mit 9,58 signifikant höher aus als der der WT Mäuse, welcher lediglich 6,91 betrug.

Die post mortem durchgeführten Analysen von Kolonlänge, Kolongewicht und des Quotienten der beiden zeigten keine relevanten Unterschiede.

Es liegt also der Schluss nahe, dass analog zu den *in vitro* gesammelten Daten, welche eine verminderte Fähigkeit zur Toleranzentwicklung und erhöhte Bereitschaft zur Antigenpräsentation und letztendlich Inflammation von I κ B- ζ defizienten BMDCs nahe legen, auch *in vivo* eine verstärkte Immunantwort bei I κ B- ζ KO Mäusen zu erwarten ist. Da sich das Kolon hinsichtlich Länge und Gewicht hierbei aber nicht relevant zwischen den beiden Versuchsgruppen unterscheidet, könnten die Effekte der Gendelektion vermutlich auch systemisch zu finden sein und weisen damit auf eine allgemein herabgesetzte Immuntoleranz der KO Tiere hin.

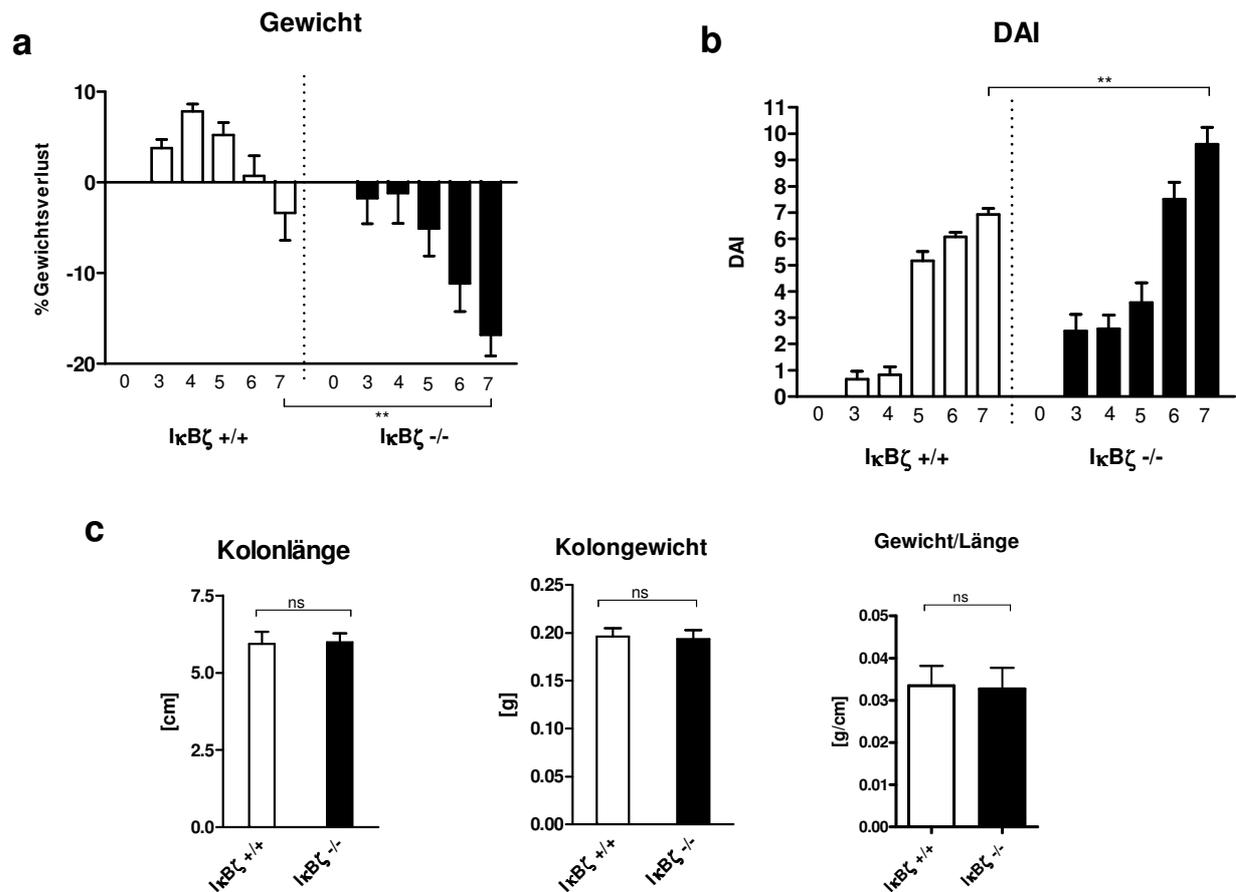


Abb. 16: Verlauf einer akuten, DSS induzierten Colitis bei IkB- ζ WT und KO littermate Mäusen

Mäuse mit einem Gewicht von mindestens 22 g bekamen über 7 Tage hinweg 2,5% DSS haltiges Trinkwasser und wurden täglich in Hinblick auf Gewicht (a) und nach Kriterien des DAI (Fell, Schonhaltung, Stuhlkonsistenz, Blut im Stuhl, Blut am Anus) untersucht (b). An Versuchstag 7 wurden die Tiere post mortem nach Kolonlänge und Kolongewicht analysiert und deren Quotienten berechnet (c). Während des Versuchs wurde an Tag 3 und 6 das DSS im Trinkwasser erneuert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung innerhalb der jeweiligen Versuchsreihe ($n > 3$). Ein p -Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen (t -test).

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich immature, semimature und mature dendritische Zellen hinsichtlich ihrer TNF- α - und IL-6-Expression auf einen zweiten *E. coli* Stimulus hin unterscheiden. Auch wurde gezeigt, dass I κ B- ζ in immaturren dendritischen Zellen weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene nachweisbar ist und eine *B. vulgatus* oder *E. coli* Stimulation mit einer signifikanten Erhöhung der I κ B- ζ -Expressionsraten einhergeht. Auf einen zweiten *E. coli* Stimulus hingegen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen immaturren, semimaturren und maturated dendritischen Zellen hinsichtlich ihrer I κ B- ζ -mRNA-Expression. Unter IL-6-defizienten Bedingungen konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass ein Verlust des Zytokins IL-6 mit einer drastisch verminderten I κ B- ζ -mRNA-Expression einhergeht. Ferner stellte sich heraus, dass semimature und mature dendritische Zellen im Hinblick auf die Zusammensetzung der NF κ B-Untereinheiten im Kern unterschiedliches Verhalten in Stimulation und Restimulation aufweisen. Die Versuche an I κ B- ζ -defizienten Zellen brachten die Erkenntnis, dass einerseits die IL-6-Produktion in Abwesenheit von I κ B- ζ nach Restimulation für alle drei Phänotypen dendritischer Zellen signifikant abfällt und andererseits die TNF- α -Expression semimaturren dendritischer Zellen sich nicht mehr von derjenigen immaturren dendritischer Zellen unterscheidet. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass unter I κ B- ζ ^{-/-} Bedingungen allgemein höhere MHC-II- und CD40- Oberflächenexpressionen auf dendritischen Zellen festzustellen sind. *In vivo* konnte die Bedeutung von I κ B- ζ insofern bestätigt werden, als sich der Verlust des I κ B- ζ -Gens in einem intensiveren Verlauf einer akuten DSS induzierten Colitis äußert.

4.1 Relevanz von I κ B- ζ in dendritischen Zellen

4.1.1 Zytokinproduktion dendritischer Zellen ist abhängig von ihrem Reifegrad

Entsprechend der Vorversuche und der gängigen Lehrmeinung^{43,90} konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich immature, semimature und mature

dendritische Zellen in ihrem Zytokinexpressionsmuster deutlich voneinander unterscheiden. Allerdings wurde hier der Schwerpunkt primär auf das Verhalten immaturer, semimaturer und maturer Zellen auf einen weiteren bakteriellen Stimulus gelegt und so IL-6 als Stellvertreter eines antiinflammatorischen Zytokins und TNF- α als Stellvertreter eines proinflammatorischen Zytokins untersucht. Es kann aber aufgrund der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen davon ausgegangen werden, dass weitere proinflammatorische Zytokine wie IL-12p40, IL-12p70 und IL-1 β beziehungsweise antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 in ähnlichem Maße moduliert werden, wie es bei den hier stellvertretend verwendeten TNF- α und IL-6 der Fall war⁴³. So zeigten immature dendritische Zellen auf einen maturierenden *E. coli* Stimulus wie erwartet eine erhöhte Expression an TNF- α und IL-6. Übertragen würde dies bedeuten, dass die Zellen in der Lage wären, die Polarisierung von T-Helferzellen in T_H1-, T_H2- und T_H17-Richtung zu begünstigen, welche dann auf den entsprechenden Stimulus mit einer inflammatorischen Antwort reagieren würden.

Es ist bekannt, dass eine Stimulation mit *B. vulgatus* in einer geringeren Produktion an TNF- α und IL-12p70 resultiert als es bei einer Stimulation dendritischer Zellen mit *E. coli* der Fall wäre⁸³. Bemerkenswert ist aber die Tatsache, dass diese semimaturen, *B. vulgatus* vorstimulierten Zellen, auch auf einen weiteren *E. coli* Stimulus hin nicht mit einer geänderten Zytokinexpression reagieren und ihren semimaturen Phänotyp beibehalten können, obwohl dieser Stimulus für gewöhnlich zu einer vollständigen Maturation führen müsste. Sie zeigen also auch nach Restimulation mit *E. coli* nur eine sehr geringe Produktion proinflammatorischer Zytokine, dafür aber sehr hohe IL-6-Produktionen, welche im Vergleich zu derjenigen von *E. coli* erststimulierten immaturen dendritischen Zellen nur unwesentlich geringer ausfallen. Mit diesem Zytokinexpressionsmuster würde es im Lymphknoten zu einer T-Zell-Polarisierung vorwiegend in T_{reg} Richtung und damit letztendlich in Richtung Toleranz gegen das präsentierte Antigen kommen.

Bei maturen dendritischen Zellen wiederum blieb jegliche Produktion von TNF- α aus, während jedoch IL-6 auch nach einer zweiten Stimulation mit *E. coli* weiterhin nachweisbar blieb, wenngleich auch in geringerem Maße als bei erstmaliger Stimulation. Es kann also überlegt werden, dass mature dendritische Zellen auf einen zweiten, identischen Stimulus entweder ähnlich wie semimature dendritische Zellen mit Toleranz reagieren würden, oder aber sie sich allgemein auf einen zweiten Stimulus praktisch inert verhalten und überhaupt keine T-Zellantwort nach sich

ziehen würden. Hierzu wäre es interessant, restimulierte mature dendritische Zellen im Hinblick auf ihr Migrationsverhalten sowie ihre Fähigkeit zur Antigenaufnahme und –präsentation und T-Zellen Polarisierung zu untersuchen.

4.1.2 I κ B- ζ lässt sich in dendritischen Zellen stimuluspezifisch induzieren

Die durchgeführten Untersuchungen brachten zu Tage, dass I κ B- ζ sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene in ruhenden Zellen praktisch nicht nachweisbar ist, sich aber auf einen Stimulus mit teilweise deutlichen Expressionssteigerungen induzieren lässt. Diese Ansicht ist weitestgehend vergleichbar mit derjenigen anderer Arbeitsgruppen⁹¹⁻⁹³.

So konnte beispielsweise die Arbeitsgruppe um Yamazaki et al.⁹³ an RAW264.7-Zellen sowie an peritonealen Makrophagen ebenfalls in Ruhe keine und unter LPS-Stimulation erhöhte I κ B- ζ -mRNA-Expressionen feststellen. Die zeitliche Kinetik der Expression der dort untersuchten Zelllinien verhielt sich ebenso analog zu derjenigen der in dieser Arbeit untersuchten dendritischen Zellen. So war I κ B- ζ auf mRNA-Ebene in RAW264.7 und peritonealen Makrophagen bereits 30 Minuten nach Stimulationsbeginn nachweisbar und erreichte seine maximale Expression nach circa einer Stunde. Im Fall der hier untersuchten dendritischen Zellen konnte I κ B- ζ ebenfalls bereits nach 30 Minuten detektiert werden (Daten nicht gezeigt) und die Expression stieg daraufhin kontinuierlich an. Das Maximum wurde allerdings mit etwa zwei Stunden nach Stimulationsbeginn erst etwas später erreicht. Bezüglich des weiteren Verlaufs der Expression verhielten sich alle drei Zell-Typen wiederum sehr ähnlich. So kam es nach Erreichen des Maximums zu einem Abfall der Expression, wobei auch 24 Stunden nach Stimulation I κ B- ζ noch nachgewiesen werden konnte.

Bei den Untersuchungen von Yamazaki et al.⁹³ zeigte sich auch, dass I κ B- ζ erstmalig ab einer LPS-Konzentration von 0,1 ng/ml induziert werden kann und dann mit steigenden LPS-Konzentrationen immer intensiver exprimiert wird. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterien *B. vulgatus* und *E. coli* verhielten sich dabei in ihrem Stimulationsverhalten sehr ähnlich. So konnte *B. vulgatus* entsprechend der niedrigen LPS-Konzentrationen bei Yamazaki et al.⁹³ die I κ B- ζ -Expression in einem geringeren Ausmaß steigern als es bei *E. coli* bzw. hohen

LPS-Konzentrationen der Fall war. Bedenkt man nun, dass niedrige LPS Konzentrationen (1 ng/ml) genau wie *B. vulgatus* Stimulation in dendritischen Zellen den semimaturen Phänotyp hervorruft, während hohe LPS-Konzentrationen (1 µg/ml) und *E. coli* Stimulation zu maturen dendritischen Zellen führen, könnte also auch die variable IκB-ζ Genexpression für das Erreichen des jeweiligen Phänotyps beziehungsweise den Erhalt dessen Funktion von Bedeutung sein. Die hohen IκB-ζ-Level in maturen dendritischen Zellen könnten notwendig sein, um einem unerwünscht starken inflammatorischen Effekt entgegenzuwirken⁹³ und würde aufgrund der noch sehr lange andauernden Expression das völlige Fehlen einer TNF-α-Antwort auf einen zweiten *E. coli* Stimulus erklären (siehe 4.1.1). Semimature dendritische Zellen produzieren wesentlich geringere Mengen IκB-ζ, benötigen aber eventuell aufgrund der allgemein geringeren Expression proinflammatorischer Zytokine auch eine geringere Gegenregulation.

4.1.3 IκB-ζ mRNA-Expression wird durch IL-6 begünstigt

Dass IκB-ζ für die Expression des Zytokins IL-6 eine entscheidende Rolle spielt, wurde schon oft ergründet und entsprechend kann man unter IκB-ζ-defizienten Bedingungen eine deutlich verminderte IL-6-Produktion feststellen^{92,94,95}. In dieser Arbeit konnte wiederum auch eine Abhängigkeit in umgekehrter Richtung zwischen IL-6 und IκB-ζ gezeigt werden. So resultierte die Deletion von IL-6 in einer allgemein deutlich geminderten IκB-ζ-mRNA-Expression. Diese trat in einem solchen Ausmaß auf, dass IκB-ζ nur noch auf einen maturierenden *E. coli* Stimulus hin nachweisbar war. Es kann also angenommen werden, dass IL-6 nicht nur ein Zielgen von IκB-ζ (beziehungsweise NFκB) ist, sondern auch zwingend für dessen Expression benötigt wird. Entsprechendes wurde auch bei T-Zellen beobachtet, welche IκB-ζ auf einen IL-6- und TGF-β-Stimulus in erhöhtem Maße exprimieren⁸¹. Im Falle dendritischer Zellen könnte angenommen werden, dass ein erster Stimulus via TLR zu einer leichten Produktion des Proteins IκB-ζ führt, welches dann wiederum die Produktion von IL-6 einleiten kann. IL-6 würde daraufhin aus der Zelle ausgeschleust werden und könnte auto- beziehungsweise parakrin am IL-6-Rezeptor derselben Zelle wirken, um die IκB-ζ-Expression bedeutend zu verstärken. Die Erkenntnis, dass bei peritonealen Makrophagen auf einen TLR-Stimulus hin IκB-ζ-mRNA bereits nach 60 Minuten nachweisbar wird, während die ersten IL-6-mRNA-Replikate erst nach 240

Minuten gefunden werden können, spricht gegen die Annahme, dass diese Abfolge von Beginn an durch IL-6 gestartet wird, um überhaupt erste Mengen an I κ B- ζ zu produzieren⁹². Nichtsdestotrotz kann davon ausgegangen werden, dass I κ B- ζ und IL-6 durch ihr wechselseitiges Zusammenspiel einen wichtigen Stellenwert für die für semimature dendritische Zellen typischen Zytokinexpressionsmuster haben.

4.1.4 NF κ B Verhältnis unter Restimulation zur p50-Untereinheit verschoben

Bezüglich der Zusammensetzung der NF κ B-Untereinheiten im Kern konnte bei immaturen dendritischen Zellen, welche einem maturierenden oder semimaturierenden Stimulus ausgesetzt wurden, keine klare Präferenz zu einer NF κ B-Untereinheit festgestellt werden. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass es vor allem die allgemein am häufigsten aufzufindenden p65/p50-Heterodimere sein müssen, welche 30 Minuten nach Stimulation im Kern für die Transkription entsprechender Gene (zum Beispiel TNF- α) sorgen⁹⁶. Die kurze Zeit von nur 30 Minuten zwischen Stimulationsbeginn und Beginn der Analyse spricht zusätzlich eher für eine Antwort über den *canonical pathway*, zu dem auch die NF κ B-Antwort über p65/p50-Heterodimere zählt⁵⁰. Das Vorhandensein von relevanten Konzentrationen an I κ B- ζ , welche die Dimerbildung beeinflussen könnten, ist zu diesem Zeitpunkt ohnehin noch nicht gegeben⁹², was diese Vermutung weiter unterstützt. Dieser Sachverhalt ändert sich aber, wenn man mature dendritische Zellen 24 Stunden nach dem ersten Stimulus einem weiteren *E. coli* Stimulus aussetzt. I κ B- ζ ist, wie in 4.1.2 erörtert, nach wie vor in großen Mengen vorhanden und so überrascht es nicht, dass bei der Analyse der NF κ B-Untereinheiten im Kern ein relatives Übergewicht der p50-Untereinheit zu finden war. Die Bildung von p50/p50-Homodimeren, welche in Verbindung mit I κ B- ζ transkriptionell aktiv werden können, liegt nahe und würde die IL-6 Produktion maturer dendritischer Zellen mit Abwesenheit von TNF- α erklären (siehe 4.1.2).

Semimature dendritische Zellen, welche eine zweite Stimulation über *E. coli* erfuhren, zeigten auch hier keine signifikante Präferenz zu einer NF κ B-Untereinheit im Kern. Allerdings sind bei einer *B. vulgatus* Erststimulation, welche einer LPS-Stimulation in geringer Konzentration entspricht, die I κ B- ζ -Expressionsraten allgemein geringer als bei maturierenden Stimuli⁹². Daher könnte das von der

Erststimulation produzierte Rest-I κ B- ζ nicht mehr oder nicht mehr in ausreichendem Maße im Kern vorhanden sein, um eine NF κ B-Antwort entsprechend zu modulieren. Es müsste also erst neues I κ B- ζ synthetisiert werden, was, wie bereits erwähnt, frühestens etwa 30 Minuten nach Stimulationsbeginn der Fall wäre. Da hier genau der Zeitpunkt der Analyse lag, trägt dies zu dem nicht gefundenen Effekt einer NF κ B-Modulation semimaturer dendritischer Zellen sicherlich einen nicht unerheblichen Teil bei. Passend zu dieser Hypothese verhielten sich, wie in 4.1.1 ausgeführt, auch die Zytokinexpressionsbefunde, nach denen semimature dendritische Zellen auf einen zweiten *E. coli* Stimulus hin mit einer deutlich verminderten, aber dennoch vorhandenen TNF- α Produktion reagierten. Diese wäre erklärbar durch die gemessenen NF κ B-Relationen, welche 30 Minuten nach *E. coli* Restimulation bei semimaturen dendritischen Zellen eine p65/p50-Antwort mit TNF- α Produktion nahe legen würden. Das bei restimulierten semimaturen dendritischen Zellen in großem Maße nachweisbare IL-6 macht eine I κ B- ζ -bedingte p50/p50-Antwort äußerst wahrscheinlich, aber vermutlich hätte man diese erst zu einem späteren Messzeitpunkt (>60 Minuten) detektieren können.

4.2 Auswirkungen der I κ B- ζ -Deletion auf dendritische Zellen

4.2.1 I κ B- ζ -Deletion resultiert in stark veränderter Zytokinexpression

Um die bereits beschriebene Relevanz des Proteins I κ B- ζ für Verhalten und Reifung dendritischer Zellen näher zu untersuchen, wurden die Zytokinexpressionen regulärer mit denen I κ B- ζ -defizienter dendritischer Zellen verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die Expression von IL-6 unter I κ B- ζ -defizienten Bedingungen stimulusunabhängig um einen nicht unerheblichen Anteil zurückgeht, wenngleich aber auch nicht auf Null. Dieser Befund ist sehr gut mit der gängigen Theorie in Einklang zu bringen, dass I κ B- ζ über NF κ B die Transkription dieses Zytokins begünstigen würde und damit nach Deletion des Gens für I κ B- ζ entsprechend weniger IL-6 exprimiert werden kann. Zu dieser Erkenntnis ist auch die Arbeitsgruppe um Okamoto et al.⁸¹ gekommen, nachdem I κ B- ζ ^{-/-} dendritische Zellen mit 0,1 μ g/ml

LPS einen maturierenden TLR-Stimulus erhielten. Bezüglich der allerdings immer noch nachweisbaren IL-6-Expressionen unter I κ B- ζ defizienten Bedingungen bleibt festzuhalten, dass NF κ B nicht alleiniger Transkriptionsfaktor für dieses Zytokin ist. Für einen weiteren Transkriptionsfaktor, namentlich NF-IL6, konnten Bindestellen in der Promoterregion für IL-6 gefunden werden⁹⁷. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass NF-IL6 sogar synergetisch mit NF κ B die IL-6-Expression fördert⁹⁸. Zusammen mit der Tatsache, dass NF-IL6 genau wie NF κ B über einen TLR oder TNF- α -Stimulus aktivierbar ist⁹⁹, könnte dies die Erklärung für die immer noch vorhandene IL-6-Produktion unter I κ B- ζ -Defizienz sein.

Betrachtet man die TNF- α -Expression immaturer und maturer dendritischer Zellen, so zeigten die Messungen, dass eine Deletion von I κ B- ζ in keinem relevanten Unterschied der beiden Genotypen bezüglich ihrer Produktion dieses Zytokins resultiert. Immature dendritische Zellen produzierten auf einen maturierenden TLR-Stimulus erhebliche Mengen TNF- α , während mature dendritische Zellen auf einen weiteren TLR-Stimulus mit keiner Zytokinproduktion mehr reagierten. Dies ist ebenso mit den Messungen der Arbeitsgruppe um Okamoto et al.⁸¹ in Einklang zu bringen, bei welchen immature dendritische Zellen mit 0,1 μ g/ml LPS stimuliert wurden. Interessant ist allerdings, dass bei Stimulation mit sehr niedrigen LPS Konzentrationen (1 ng/ml) beziehungsweise *B. vulgatus*, welche regulär zum semimaturen Phänotyp führen sollte, bei I κ B- ζ defizienten Zellen sehr wohl Unterschiede bezüglich ihrer TNF- α -Produktion festzustellen waren. So fiel die Expression dieses proinflammatorischen Zytokins auf einen TLR-Stimulus hin bei I κ B- ζ ^{-/-} dendritischen Zellen deutlich höher aus, als bei I κ B- ζ ^{+/+} dendritischen Zellen und lag im Bereich restimulierter immaturer dendritischer Zellen. Da dieser Rückgang proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α bei gleichzeitig hoher Expression antiinflammatorischer Zytokine wie IL-6 aber eines der Hauptkriterien semimaturer dendritischer Zellen ist, kann also angenommen werden, dass I κ B- ζ zwar nicht für das Erreichen des maturen Phänotyps, wohl aber für die Differenzierung dendritischer Zellen zum semimaturen Phänotyp von erwähnenswerter Relevanz sein sollte.

4.2.2 I κ B- ζ -Deletion resultiert in erhöhter MHC-II- und Kostimulator-Expression

Da neben den Zytokinmustern auch die Expression T-Zell-aktivierender Oberflächenmarker für die Unterteilung dendritischer Zellen in immaturen, semimaturen und maturen Zustand von Bedeutung ist, wurde ergänzend zur Zytokinanalyse auch die Expression von MHC-II und die des Kostimulators CD40 unter An- wie Abwesenheit von I κ B- ζ untersucht. Hierbei zeigte sich, dass bei I κ B- ζ ^{-/-} dendritischen Zellen eine allgemein erhöhte Basisexpression der Oberflächenmarker MHC-II und CD40 aufzufinden war. Bemerkenswert ist hierbei vor allem die Tatsache, dass diese sich nach Stimulation I κ B- ζ ^{-/-} dendritischer Zellen mit *B. vulgatus* beziehungsweise LPS in sehr niedrigen Konzentrationen (1 ng/ml) auf einem Niveau befand, welches mit demjenigen maturer WT dendritischen Zellen vergleichbar war. Diese Beobachtung widerspricht allerdings den Ergebnissen von Okamoto et al.⁸¹, die bezüglich der CD40-Expression keine Unterschiede feststellen konnten, welche auf der Abwesenheit von I κ B- ζ beruhten. Dennoch scheint es so, als ob sich der semimature Phänotyp ohne I κ B- ζ nicht ausprägen lässt und immature dendritische Zellen nach TLR-Stimulus direkt in den maturen Phänotyp wechseln. *In vivo* würde dies bedeuten, dass diese Zellen mittels ihrer hohen Expression an MHC-II und CD40 T-Zellen verstärkt rekrutieren könnten und diese dann durch erhöhte Produktion an TNF- α bei gleichzeitig geringer Produktion an IL-6 vorwiegend in T_H1-, T_H2- und T_H17-Richtung polarisieren würden. Dieser Schluss legt nahe, dass auch ein unter normalen Umständen harmloser Stimulus, dem der Organismus sonst mit Toleranz entgegentreten würde, unter I κ B- ζ -defizienten Bedingungen eine T-Zell-gesteuerte Inflammation in Gang setzen kann.

4.3 I κ B- ζ -Defizienz resultiert einem aggressiveren Verlauf einer akuten Colitis

Wie bereits beschrieben ist unter I κ B- ζ -Defizienz eine allgemeine erhöhte Disposition hin zu inflammatorischen Überreaktionen zu erwarten. Die Letalität homozygoter I κ B- ζ ^{-/-}-Zucht, die hohe Embryonen- und Geburtensterblichkeit sowie das gehäufte Auftreten autoimmuner Erkrankungen bei I κ B- ζ ^{-/-} Mäusen stützen diese Annahme⁹².

Allerdings gibt es sehr wenige Daten bezüglich der direkten Auswirkungen einer I κ B- ζ -Defizienz auf den Verlauf einer akuten Colitis im Mausmodell. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher WT- und I κ B- ζ ^{-/-}-Geschwistertiere hinsichtlich dieser Auswirkungen untersucht und es konnte eine Relevanz des Proteins I κ B- ζ festgestellt werden. I κ B- ζ ^{-/-}-Mäuse verloren schneller und mehr an Gewicht, als ihre WT Geschwistertiere es taten und erzielten höhere Werte im klinischen Aktivitätsscore intestinaler Entzündungen (*Disease Activity Index, DAI*). Beides spricht dafür, dass I κ B- ζ -Defizienz mit einer stärkeren Reaktion der Tiere auf das Colitis-induzierende Hapten Dextran Natriumsulfat (DSS) einhergeht. Eine mögliche Ursache hierfür wäre darin zu finden, dass I κ B- ζ als wichtiger Regulator des Transkriptionsfaktors NF κ B auch einen hohen Stellenwert für die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase hat⁶⁰. Die Bedeutung von NF κ B für den Verlauf einer akuten Colitis konnte in verschiedenen Arbeiten verdeutlicht werden¹⁰⁰⁻¹⁰². Da eine Inaktivierung der p65-Untereinheit mit einem mildereren Verlauf einer induzierten Colitis einhergeht, gerät das Protein I κ B- ζ in den Fokus, weil es, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, ebenfalls in der Lage ist, die Aktivität der p65-Untereinheit im Kern zu reduzieren¹⁰³. Allgemein lässt sich sagen, dass die *in vitro* gesammelten Daten, welche I κ B- ζ eine wichtige Rolle bei der Modulation einer Immunantwort zwischen Inflammation und Toleranz zugeschrieben haben, sich auch *in vivo* wiederfinden lassen und dass sich parallel zu anderen Autoimmunerkrankungen auch die Inflammation einer akuten Colitis in Abwesenheit von I κ B- ζ intensiviert. Da dieses murine Modell stellvertretend für die Erforschung humaner chronisch entzündlicher Darmerkrankungen verwendet wird und dort eine Dysregulation des Transkriptionsfaktors NF κ B erwiesenermaßen eine Rolle spielt^{104,105}, liegt die Vermutung nahe, dass auch I κ B- ζ als Modulator dieses Transkriptionsfaktors nicht unerheblich zu Saluto- und Pathogenese dieses Krankheitsbildes beitragen könnte.

5. Zusammenfassung

Obwohl chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa hohe Fallzahlen und jährlich steigende Inzidenzen aufweisen, ist über die Ätiologie beider Krankheiten bis jetzt nur wenig bekannt¹⁴. Es wird, wie bei allen Autoimmunerkrankungen, davon ausgegangen, dass das Immunsystem auf harmlose Stimuli mit einer heftigen Inflammation reagiert und sich durch die daraus resultierenden Gewebeschäden Symptome und Verlauf der Krankheiten zumindest teilweise erklären lassen¹⁰⁶. Dendritischen Zellen, als Hauptvertretern antigenpräsentierender Zellen im Darm, kommt hierbei eine besonders wichtige Bedeutung zu, da sie als Teil des angeborenen Immunsystems am Anfang jeder ablaufenden Immunantwort stehen und sich schon hier entscheidet, ob und wie der Körper gegen Fremdstoffe jeder Art vorgehen wird¹⁰⁷. Semimature dendritische Zellen haben die Fähigkeit, eine Immunantwort in Richtung Toleranz zu lenken und eine Inflammation zu verhindern¹⁰⁸. Hieraus könnte ihnen letztendlich auch für Entstehung und Verlauf chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine entscheidende Rolle zukommen¹⁰⁹.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Bedeutung des Proteins I κ B- ζ für die Entstehung dieser semimaturen dendritischen Zellen und der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass semimature dendritische Zellen sich durch hohe Expressionen antiinflammatorischer Zytokine wie IL-6 bei gleichzeitig niedrigen Expressionen proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α sowie der Oberflächenmarker MHC-II und CD40 auszeichnen. Dieser Effekt konnte in nicht unerheblichem Ausmaß auf die Anwesenheit von I κ B- ζ zurückgeführt werden, da eine Deletion des Gens diese Effekte aufhebt und eine Zuteilung dendritischer Zellen zum semimaturen Phänotyp sehr fragwürdig erscheinen lässt. *In vivo* äußerte sich diese Deletion insofern, als der Verlauf einer induzierten akuten Colitis bei I κ B- ζ defizienten Mäusen signifikant fulminanter verlief, als in WT Kontrolltieren.

Überträgt man dieses Modell und die *in vitro* gesammelten Erkenntnisse auf die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen des Menschen, bei denen dendritische Zellen und der Transkriptionsfaktor NF κ B ebenfalls als wichtige Knotenpunkte der Krankheitsentstehung und -entwicklung identifiziert wurden^{104,105,107,109}, erkennt man, dass auch I κ B- ζ als Modulator dieses Transkriptionsfaktors zwischen Toleranz und

Inflammation in dendritischen Zellen eine wichtige Rolle im Gesamtgefüge der Autoimmunerkrankungen zuteil wird. I κ B- ζ könnte damit ein interessantes und neuartiges Ziel alternativer Behandlungsmöglichkeiten werden, beispielsweise mit probiotischen Bakterien wie *B. vulgatus* oder mit gezieltem pharmakologischem Eingreifen im NF κ B-Signalweg. Beides hätte zur Folge, dass es zum vorwiegenden Vorhandensein semimaturer dendritischer Zellen im Darm kommen würde, die dann wiederum die Krankheitseffekte vermindern oder gar deren Entstehung gänzlich verhindern könnten.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Baumgart, D. C. & Sandborn, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* **369**, 1641-1657, doi:10.1016/S0140-6736(07)60751-X (2007).
- 2 Berg, R. D. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in microbiology* **4**, 430-435 (1996).
- 3 Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H. & Bohannon, B. J. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4399-4406 (2001).
- 4 Hooper, L. V. et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* **291**, 881-884 (2001).
- 5 Berg, R. D. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* **4**, 430-435 (1996).
- 6 Kraus, T. A. & Mayer, L. Oral tolerance and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* **21**, 692-696 (2005).
- 7 Podolsky, D. K. Inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine* **347**, 417-429, doi:10.1056/NEJMra020831 (2002).
- 8 Fuss, I. J. et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *The Journal of clinical investigation* **113**, 1490-1497, doi:10.1172/JCI19836 (2004).
- 9 Strober, W., Fuss, I. & Mannon, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *The Journal of clinical investigation* **117**, 514-521, doi:10.1172/JCI30587 (2007).
- 10 Bernstein, C. N., Blanchard, J. F., Kliwer, E. & Wajda, A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* **91**, 854-862 (2001).
- 11 Russell, R. K. & Satsangi, J. IBD: a family affair. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* **18**, 525-539, doi:10.1016/j.bpg.2003.12.006 (2004).
- 12 Satsangi, J., Grootcholten, C., Holt, H. & Jewell, D. P. Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut* **38**, 738-741 (1996).
- 13 Riordan, A. M., Ruxton, C. H. & Hunter, J. O. A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars. *European journal of clinical nutrition* **52**, 229-238 (1998).
- 14 Loftus, E. V., Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* **126**, 1504-1517 (2004).
- 15 Nguyen, G. C. et al. Inflammatory bowel disease characteristics among African Americans, Hispanics, and non-Hispanic Whites: characterization of a large North American cohort. *The American journal of gastroenterology* **101**, 1012-1023, doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00504.x (2006).
- 16 Desai, H. G. & Gupte, P. A. Increasing incidence of Crohn's disease in India: is it related to improved sanitation? *Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology* **24**, 23-24 (2005).
- 17 Cario, E. & Podolsky, D. K. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* **68**, 7010-7017 (2000).
- 18 Akhtar, M., Watson, J. L., Nazli, A. & McKay, D. M. Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway. *Faseb J* **17**, 1319-1321, doi:10.1096/fj.03-0950fje (2003).
- 19 Franchimont, D. et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* **53**, 987-992 (2004).
- 20 Hart, A. L. et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **129**, 50-65 (2005).
- 21 Ina, K. et al. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol* **163**, 1081-1090 (1999).
- 22 Cho, J. H. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* **8**, 458-466, doi:10.1038/nri2340 (2008).
- 23 Murphy, K., Travers, P., Walport, M. & Janeway, C. *Janeway's immunobiology*. 7th edn, (Garland Science, 2008).
- 24 Stecher, B. & Hardt, W. D. The role of microbiota in infectious disease. *Trends in microbiology* **16**, 107-114, doi:10.1016/j.tim.2007.12.008 (2008).
- 25 Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology* **17**, 1-14, doi:10.1093/intimm/dxh186 (2005).

- 26 Cruickshank, S. M., English, N. R., Felsburg, P. J. & Carding, S. R. Characterization of colonic dendritic cells in normal and colitic mice. *World J Gastroenterol* **11**, 6338-6347 (2005).
- 27 Rescigno, M. et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* **2**, 361-367, doi:10.1038/86373 (2001).
- 28 Inaba, K., Inaba, M., Naito, M. & Steinman, R. M. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* **178**, 479-488 (1993).
- 29 Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182**, 389-400 (1995).
- 30 Iwasaki, A. & Kelsall, B. L. Mucosal immunity and inflammation. I. Mucosal dendritic cells: their specialized role in initiating T cell responses. *The American journal of physiology* **276**, G1074-1078 (1999).
- 31 Huang, Q. et al. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* **294**, 870-875 (2001).
- 32 Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252 (1998).
- 33 Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol* **13**, 291-298 (2001).
- 34 Banchereau, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811, doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767 (2000).
- 35 Dowling, D., Hamilton, C. M. & O'Neill, S. M. A comparative analysis of cytokine responses, cell surface marker expression and MAPKs in DCs matured with LPS compared with a panel of TLR ligands. *Cytokine* **41**, 254-262, doi:10.1016/j.cyto.2007.11.020 (2008).
- 36 Netea, M. G., Van der Meer, J. W., Suttmuller, R. P., Adema, G. J. & Kullberg, B. J. From the Th1/Th2 paradigm towards a Toll-like receptor/T-helper bias. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**, 3991-3996, doi:10.1128/AAC.49.10.3991-3996.2005 (2005).
- 37 Bettelli, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235-238, doi:10.1038/nature04753 (2006).
- 38 Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* **8**, 345-350, doi:10.1038/ni0407-345 (2007).
- 39 Baumgart, D. C. & Carding, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* **369**, 1627-1640, doi:10.1016/S0140-6736(07)60750-8 (2007).
- 40 Groux, H. et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-742, doi:10.1038/39614 (1997).
- 41 Cerf-Bensussan, N. & Gaboriau-Routhiau, V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol* **10**, 735-744, doi:10.1038/nri2850 (2010).
- 42 Rutella, S. & Locatelli, F. Intestinal dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **17**, 3761-3775, doi:10.3748/wjg.v17.i33.3761 (2011).
- 43 Lutz, M. B. & Schuler, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in immunology* **23**, 445-449 (2002).
- 44 Mommaas, A. M. et al. Distribution of HLA class II molecules in epidermal Langerhans cells in situ. *Eur J Immunol* **25**, 520-525, doi:10.1002/eji.1830250232 (1995).
- 45 Lee, M. G., Borkowski, T. A. & Udey, M. C. Regulation of expression of B7 by murine Langerhans cells: a direct relationship between B7 mRNA levels and the level of surface expression of B7 by Langerhans cells. *The Journal of investigative dermatology* **101**, 883-886 (1993).
- 46 Randolph, G. J. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Seminars in immunology* **13**, 267-274, doi:10.1006/smim.2001.0322 (2001).
- 47 Frick, J. S. et al. Colitogenic and non-colitogenic commensal bacteria differentially trigger DC maturation and Th cell polarization: an important role for IL-6. *Eur J Immunol* **36**, 1537-1547, doi:10.1002/eji.200635840 (2006).
- 48 Menges, M. et al. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* **195**, 15-21 (2002).
- 49 Cella, M., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* **9**, 10-16 (1997).
- 50 Oeckinghaus, A. & Ghosh, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, a000034, doi:10.1101/cshperspect.a000034 (2009).

- 51 Sen, R. & Baltimore, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**, 705-716 (1986).
- 52 Sen, R. & Baltimore, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**, 921-928 (1986).
- 53 Cao, S., Zhang, X., Edwards, J. P. & Mosser, D. M. NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *The Journal of biological chemistry* **281**, 26041-26050, doi:10.1074/jbc.M602222200 (2006).
- 54 Murphy, T. L., Cleveland, M. G., Kulesza, P., Magram, J. & Murphy, K. M. Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Molecular and cellular biology* **15**, 5258-5267 (1995).
- 55 Hiscott, J. et al. Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Molecular and cellular biology* **13**, 6231-6240 (1993).
- 56 Shakhov, A. N., Collart, M. A., Vassalli, P., Nedospasov, S. A. & Jongeneel, C. V. Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med* **171**, 35-47 (1990).
- 57 Collart, M. A., Baeuerle, P. & Vassalli, P. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Molecular and cellular biology* **10**, 1498-1506 (1990).
- 58 Libermann, T. A. & Baltimore, D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Molecular and cellular biology* **10**, 2327-2334 (1990).
- 59 Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A. M. & Aggarwal, B. B. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med (Berl)* **82**, 434-448, doi:10.1007/s00109-004-0555-y (2004).
- 60 Karrasch, T. & Jobin, C. NF-kappaB and the intestine: friend or foe? *Inflamm Bowel Dis* **14**, 114-124, doi:10.1002/ibd.20243 (2008).
- 61 Courtois, G. & Gilmore, T. D. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* **25**, 6831-6843, doi:10.1038/sj.onc.1209939 (2006).
- 62 Baldwin, A. S., Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**, 649-683, doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.649 (1996).
- 63 Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**, 225-260, doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.225 (1998).
- 64 Ghosh, G., van Duyne, G., Ghosh, S. & Sigler, P. B. Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. *Nature* **373**, 303-310, doi:10.1038/373303a0 (1995).
- 65 Chen, F. E., Huang, D. B., Chen, Y. Q. & Ghosh, G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature* **391**, 410-413, doi:10.1038/34956 (1998).
- 66 Zhong, H., May, M. J., Jimi, E. & Ghosh, S. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Molecular cell* **9**, 625-636 (2002).
- 67 Hayden, M. S. & Ghosh, S. Signaling to NF-kappaB. *Genes & development* **18**, 2195-2224, doi:10.1101/gad.1228704 (2004).
- 68 Hoffmann, A., Natoli, G. & Ghosh, G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* **25**, 6706-6716, doi:10.1038/sj.onc.1209933 (2006).
- 69 Malek, S., Huang, D. B., Huxford, T., Ghosh, S. & Ghosh, G. X-ray crystal structure of an IkappaBbeta x NF-kappaB p65 homodimer complex. *The Journal of biological chemistry* **278**, 23094-23100, doi:10.1074/jbc.M301022200 (2003).
- 70 Solan, N. J., Miyoshi, H., Carmona, E. M., Bren, G. D. & Paya, C. V. RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *The Journal of biological chemistry* **277**, 1405-1418, doi:10.1074/jbc.M109619200 (2002).
- 71 Wu, C. & Ghosh, S. beta-TrCP mediates the signal-induced ubiquitination of IkappaBbeta. *The Journal of biological chemistry* **274**, 29591-29594 (1999).
- 72 Kroll, M. et al. Inducible degradation of IkappaBalpha by the proteasome requires interaction with the F-box protein h-betaTrCP. *The Journal of biological chemistry* **274**, 7941-7945 (1999).
- 73 Cohen, S., Orian, A. & Ciechanover, A. Processing of p105 is inhibited by docking of p50 active subunits to the ankyrin repeat domain, and inhibition is alleviated by signaling via the carboxyl-terminal phosphorylation/ubiquitin-ligase binding domain. *The Journal of biological chemistry* **276**, 26769-26776, doi:10.1074/jbc.M102448200 (2001).
- 74 Cohen, S., Achbert-Weiner, H. & Ciechanover, A. Dual effects of IkappaB kinase beta-mediated phosphorylation on p105 Fate: SCF(beta-TrCP)-dependent degradation and SCF(beta-TrCP)-independent processing. *Molecular and cellular biology* **24**, 475-486 (2004).
- 75 Lin, L. & Ghosh, S. A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Molecular and cellular biology* **16**, 2248-2254 (1996).

- 76 Lin, L., DeMartino, G. N. & Greene, W. C. Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. *Cell* **92**, 819-828 (1998).
- 77 Pahl, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853-6866, doi:10.1038/sj.onc.1203239 (1999).
- 78 Motoyama, M., Yamazaki, S., Eto-Kimura, A., Takeshige, K. & Muta, T. Positive and negative regulation of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by IkappaB-zeta, an inducible nuclear protein. *The Journal of biological chemistry* **280**, 7444-7451, doi:10.1074/jbc.M412738200 (2005).
- 79 Trinh, D. V., Zhu, N., Farhang, G., Kim, B. J. & Huxford, T. The nuclear I kappaB protein I kappaB zeta specifically binds NF-kappaB p50 homodimers and forms a ternary complex on kappaB DNA. *Journal of molecular biology* **379**, 122-135, doi:10.1016/j.jmb.2008.03.060 (2008).
- 80 Yamamoto, M. et al. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature* **430**, 218-222, doi:10.1038/nature02738 (2004).
- 81 Okamoto, K. et al. IkappaBzeta regulates T(H)17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature* **464**, 1381-1385, doi:10.1038/nature08922 (2010).
- 82 Yamazaki, S., Muta, T., Matsuo, S. & Takeshige, K. Stimulus-specific induction of a novel nuclear factor-kappaB regulator, IkappaB-zeta, via Toll/Interleukin-1 receptor is mediated by mRNA stabilization. *The Journal of biological chemistry* **280**, 1678-1687, doi:10.1074/jbc.M409983200 (2005).
- 83 Hirschfeld, M. et al. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* **69**, 1477-1482, doi:10.1128/IAI.69.3.1477-1482.2001 (2001).
- 84 Poltorak, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088 (1998).
- 85 Waidmann, M. et al. *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology* **125**, 162-177 (2003).
- 86 Lutz, M. B. et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J.Immunol.Methods* **223**, 77-92 (1999).
- 87 Frick, J. S. et al. Contribution of adenosine A2B receptors to inflammatory parameters of experimental colitis. *J.Immunol.* **182**, 4957-4964 (2009).
- 88 Shimizu, Y., van Seventer, G. A., Horgan, K. J. & Shaw, S. Costimulation of proliferative responses of resting CD4+ T cells by the interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin or VLA-6 with laminin. *J Immunol* **145**, 59-67 (1990).
- 89 Son, Y. H. et al. Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *Journal of cardiovascular pharmacology* **51**, 71-77, doi:10.1097/FJC.0b013e31815bd23d (2008).
- 90 Frick, J. S., Grunebach, F. & Autenrieth, I. B. Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: A novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *Int.J.Med.Microbiol.* (2009).
- 91 Muta, T. IkappaB-zeta: an inducible regulator of nuclear factor-kappaB. *Vitam.Horm.* **74**, 301-316 (2006).
- 92 Yamamoto, M. et al. Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature* **430**, 218-222 (2004).
- 93 Yamazaki, S., Muta, T. & Takeshige, K. A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. *J.Biol.Chem.* **276**, 27657-27662 (2001).
- 94 Seshadri, S., Kannan, Y., Mitra, S., Parker-Barnes, J. & Wewers, M. D. MAIL regulates human monocyte IL-6 production. *J Immunol* **183**, 5358-5368, doi:10.4049/jimmunol.0802736 (2009).
- 95 Dagvadorj, J. et al. Interleukin (IL)-10 attenuates lipopolysaccharide-induced IL-6 production via inhibition of IkappaB-zeta activity by Bcl-3. *Innate immunity* **15**, 217-224, doi:10.1177/1753425909103738 (2009).
- 96 Hayden, M. S. & Ghosh, S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* **18**, 2195-2224 (2004).
- 97 Akira, S. et al. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J* **9**, 1897-1906 (1990).
- 98 Matsusaka, T. et al. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10193-10197 (1993).
- 99 Kinoshita, S., Akira, S. & Kishimoto, T. A member of the C/EBP family, NF-IL6 beta, forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1473-1476 (1992).

- 100 Comalada, M. et al. *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *Eur J Immunol* **35**, 584-592, doi:10.1002/eji.200425778 (2005).
- 101 Karrasch, T., Kim, J. S., Jang, B. I. & Jobin, C. The flavonoid luteolin worsens chemical-induced colitis in NF-kappaB(EGFP) transgenic mice through blockade of NF-kappaB-dependent protective molecules. *PLoS One* **2**, e596, doi:10.1371/journal.pone.0000596 (2007).
- 102 Fitzpatrick, L. R., Wang, J. & Le, T. Gliotoxin, an inhibitor of nuclear factor-kappa B, attenuates peptidoglycan-polysaccharide-induced colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis* **8**, 159-167 (2002).
- 103 Neurath, M. F., Pettersson, S., Meyer zum Buschenfelde, K. H. & Strober, W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* **2**, 998-1004 (1996).
- 104 Schreiber, S., Nikolaus, S. & Hampe, J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* **42**, 477-484 (1998).
- 105 Ellis, R. D. et al. Activation of nuclear factor kappa B in Crohn's disease. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* **47**, 440-445 (1998).
- 106 Strober, W., Fuss, I. & Mannon, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J.Clin.Invest* **117**, 514-521 (2007).
- 107 Rescigno, M. & Di Sabatino, A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *The Journal of clinical investigation* **119**, 2441-2450, doi:10.1172/JCI39134 (2009).
- 108 Lutz, M. B. & Schuler, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* **23**, 445-449 (2002).
- 109 Steinman, R. M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M. C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* **21**, 685-711 (2003).

7. Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. med. Julia-Stefanie Frick möchte ich mich nicht nur für die Bereitstellung meines Dissertationsthemas, sondern auch für die hervorragende Betreuung, die vielen vielen guten Tipps bei der Durchführung und Erstellung dieser Doktorarbeit und die stets offene Tür bei Fragen oder Problemen jeglicher Art ganz herzlich bedanken.

Bei Professor Alexander Weber bedanke ich mich herzlich für die Begutachtung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff danke ich für die institutsübergreifende Kooperation, die für die Realisierung der IκB-ζ-Versuche unverzichtbar war.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dipl. Biochem. Alex Steimle für etliche geopferte Stunden seinerseits bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche dieser Arbeit, viel Witz und Humor im Labor und große fachliche Kompetenz und Verständnis bei der Beantwortung meiner Fragen.

Ebenso möchte ich der gesamten AG Frick für die herzliche Aufnahme in die Gruppe, eine herrliche Zeit, viele lustige Stunden im und ums Labor, eine überaus angenehme Atmosphäre und die stets riesige Bereitschaft zur Hilfestellung in jeder Situation danken.

Großer Dank gilt auch Herrn Dipl. Biochem. Dominic Hildebrand, der mir nicht nur die Durchführung der IκB-ζ-Versuche in vivo überhaupt erst ermöglichte, sondern mir auch immer mit guten Tipps und viel Engagement zur Seite stand.

Frau Prof. Marlies Knipper und Frau Dr. Tanja Rieß danke ich für die Aufnahme ins IZKF-Promotionskolleg und für die große Starthilfe bei der Ausarbeitung der schriftlichen Fassung dieser Arbeit.

Ich danke auch allen Korrekturlesern dieser Arbeit, die sich durch viele Seiten voller Cicero-würdiger verschachtelter Langsätze gespickt mit abstrusen Abkürzungen und unverständlichen Begrifflichkeiten quälen mussten (q.e.d.).

Selbstverständlich danke ich auch meinen Eltern, die mir mein Studium und damit überhaupt erst diese Dissertation durch ihre Unterstützung ermöglicht haben.

Nicht zuletzt, sondern von ganzem Herzen danke ich auch meiner Verlobten Nelli, die mir Kraft und Motivation gab, diese Arbeit zu Ende zu führen, die mich verständnisvoll und unterstützend durchs Studium begleitete und mir jeden Tag aufs Neue aufbauend und liebevoll zur Seite steht.