

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier)

## **Hemmung NF- $\kappa$ B-regulierter Genexpression in TNF-toleranten Zellen auf transkriptioneller Ebene: Hinweise auf eine Rolle von C/EBP $\beta$**

**Carmen Sydlik**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. K. Brand  
2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 31.03.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 14.09.2005 angenommen.

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	TNF-Toleranz	1
1.1.1	Toleranz	1
1.1.2	TNF und seine Funktionen	1
1.1.3	TNF-induzierte Toleranz	2
1.2	Das NF- $\kappa$ B-System	4
1.2.1	Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B/Rel-Familie und I $\kappa$ B-Inhibitorproteine	4
1.2.2	Aktivierung und Regulation des NF- $\kappa$ B-Systems	5
1.2.3	Der TNF-Signalweg	8
1.3	Regulation der Genexpression durch NF- $\kappa$ B im Zusammenwirken mit anderen Transkriptionsfaktoren	8
1.3.1	Die Proteine der C/EBP-Familie	8
1.3.2	Transkriptionelle Regulation der IL-8-Genexpression	10
1.4	Fragestellung	14
<b>2</b>	<b>Material und Methodik</b>	<b>15</b>
2.1	Material	15
2.1.1	Antikörper	15
2.1.2	Reagenzien	16
2.1.3	Plasmide	16
2.2	Methodik	16
2.2.1	Zellkultur	16
2.2.2	Endotoxintest	17
2.2.3	Zytotoxizitätstest (WST-1-Test)	17
2.2.4	Isolierung zytosolischer und nukleärer Extrakte	17
2.2.5	Transfektion und Luciferase-Assay	18
2.2.6	Überexpressionsstudien	19

---

2.2.7	Gelretardierungsassay	20
2.2.8	Supershift-Analyse und Kompetitionsstudien	22
2.2.9	Zytokin-Bestimmung	22
2.2.10	Western Blot-Analyse	22
2.2.11	Immunpräzipitation und Assoziationsassay	23
2.2.12	Statistische Auswertung	24
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1	Etablierung der Bedingungen für die TNF-Toleranz	25
3.1.1	TNF-Toleranz in monozytären THP-1-Zellen	25
3.1.2	Toleranz in HeLa-Zellen	28
3.2	Untersuchung des NF- $\kappa$ B-Systems	29
3.2.1	Aktivierung von NF- $\kappa$ B	29
3.2.2	$\kappa$ B-Proteolyse und nukleäre Translokation von p50/p65-Komplexen	31
3.3	Die Rolle von C/EBP $\beta$ bei der TNF-Toleranz	34
3.3.1	C/EBP $\beta$ als Komponente DNA-bindender Komplexe am IL-8-Promotor-Oligonukleotid unter TNF-Toleranz-Bedingungen	34
3.3.2	Erhöhte DNA-Bindungsaktivität von C/EBP $\beta$ sowie vermehrte Assoziation dieses Proteins mit p65 in TNF-toleranten Zellen	36
3.3.3	Hemmung der TNF-induzierten IL-8-Promotor- und 3 $\kappa$ B-abhängigen Transkription durch Überexpression von C/EBP $\beta$	39
3.4	Charakterisierung von Oct-1 in TNF-toleranten Zellen	41
3.4.1	Zunahme der DNA-Bindungsaktivität von Oct-1 in TNF-toleranten Zellen	41
3.4.2	Effekt von Oct-1 auf die TNF-induzierte IL-8-Promotor- und 3 $\kappa$ B-abhängige Transkription	41

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	44
4.1	Hemmung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Transkription in TNF-toleranten Zellen	44
4.2	Untersuchung der Rolle von Oct-1 bei der TNF-Toleranz	46
4.3	Analyse der Funktion von C/EBP $\beta$ in toleranten Zellen	47
4.4	Regulation der Expression NF- $\kappa$ B- und C/EBP $\beta$ -abhängiger Gene	48
4.5	Inhibitorischer Einfluß von C/EBP $\beta$ auf die NF- $\kappa$ B-vermittelte Transkription	49
4.6	NF- $\kappa$ B und C/EBP $\beta$ als Vermittler der TNF-Toleranz: ein Modell	50
4.7	Klinische Bedeutung der TNF-Toleranz	52
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	54
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	56
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	72
7.1	Abkürzungsverzeichnis	72
7.2	Danksagung	77
7.3	Lebenslauf	79
7.3	Publikationen und Kongreßbeiträge	80

## **1 Einleitung**

### **1.1 TNF-Toleranz**

#### **1.1.1 Toleranz**

Als Toleranz bezeichnet man den Verlust der Empfindlichkeit eines Organismus oder einer Zelle bei wiederholter Exposition gegenüber der gleichen Substanz (17, 164). Diese Fähigkeit, sich an mehrfache oder kontinuierliche Stimulation zu gewöhnen und nicht mehr oder nur mit einer im Vergleich zum ersten Kontakt verminderten Antwort auf diese reagieren zu können, findet sich als ein generelles Prinzip sowohl bei immunologischen als auch bei pharmakologischen Prozessen (164). Toleranz kann unter gewissen Voraussetzungen als protektiver Mechanismus der Zellen dienen. So entsteht im Verlauf akut entzündlicher Erkrankungen wie Sepsis ein Toleranzzustand, der über eine selektive Verminderung der Produktion proinflammatorischer Zytokine und eine gleichzeitig erhöhte Bildung antiinflammatorischer Moleküle schädliche Auswirkungen der Entzündungsreaktion abschwächt (150, 164). Derselbe Vorgang kann jedoch gleichzeitig negative Folgen haben und bis hin zur Entwicklung einer Immunparalyse führen. Dieser anerge Zustand bildet sich vor allem in der Spätphase des septischen Schocks aus und begünstigt sekundäre, unter Umständen letale Infektionen (96, 142). Außerdem scheinen toleranzähnliche Prozesse in der Pathophysiologie chronisch entzündlicher, insbesondere ischämischer Erkrankungen (27, 72, 90, 159) sowie bei der Entstehung und Ausbreitung von Tumoren (13) eine Rolle zu spielen.

#### **1.1.2 TNF und seine Funktionen**

Das Zytokin Tumornekrosefaktor (TNF, TNF- $\alpha$ ) ruft bei entzündlichen, immunologischen und malignen Prozessen ein breites Spektrum zellulärer Antworten hervor (13, 15, 19, 93, 137). Infolge der Einwirkung verschiedener Stimuli wie z. B. Lipopolysaccharid (LPS), Zytokinen (z. B. Interleukin (IL)-2; GM-CSF, „granulocyte/monocyte colony-stimulating factor“) oder Komponenten des Komplementsystems wird es vor allem von Makrophagen und Monozyten, aber auch von vielen anderen Zelltypen sowie einigen Tumoren sezerniert (15, 93, 137). TNF wirkt mit bei der Regulation von zellulären Abläufen wie Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose (15, 93). Im Rahmen von entzündlichen Reaktionen initiiert TNF durch die Induktion einer Vielzahl inflammatorischer Moleküle beispielsweise die Akti-

vierung von Leukozyten, fördert ihre Adhäsion ans Endothel sowie ihre Migration und stimuliert die Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen (15, 93, 137). TNF fungiert daher in niedriger Konzentration als essentieller Bestandteil der physiologischen Abwehr von Infektionen (137). Eine akute exzessive systemische TNF-Produktion bei Fieber und Sepsis kann jedoch zur Entwicklung von Komplikationen wie disseminierter intravasaler Gerinnung und Multiorganversagen beitragen (93, 137). Darüber hinaus soll eine Dysregulation der Expression oder Signalübertragung von TNF an der Pathogenese zahlreicher chronischer Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn, multipler Sklerose und Morbus Alzheimer sowie an der Entstehung der Graft versus host-Reaktion nach Organtransplantationen beteiligt sein (15, 18, 19, 93, 106). Des Weiteren ist TNF bei verschiedenen malignen Prozessen (z. B. Kolon-, Mamma- und Prostatakarzinomen sowie Lymphomen und Leukämien) von Bedeutung, wobei ihm eine ambivalente Rolle zugeschrieben wird (12, 13, 132, 149). Eine erhöhte Konzentration von TNF, das in der Umgebung von Tumoren häufig kontinuierlich freigesetzt wird, gilt zum einen als prognostisch ungünstiger Faktor, da TNF infolge seiner wachstumsstimulierenden Wirkung die Vermehrung und Ausbreitung der neoplastischen Zellen fördert (12, 13, 149). Zudem ist das Zytokin für die Kachexieentwicklung verantwortlich (137). Zum anderen kann TNF durch seine zytotoxischen Effekte sowie die Aktivierung von Immunmediatoren aber auch inhibitorisch auf das Tumorwachstum wirken (133, 149), indem es tumorassoziierte Neovaskularisationen zerstört und selektiv die Lyse maligner Zellen initiiert, ohne dabei das gesunde Gewebe wesentlich zu schädigen (19, 132, 133).

### 1.1.3 TNF-induzierte Toleranz

Es existieren mehrere Untersuchungen *in vivo*, die darauf hindeuten, daß wiederholte TNF-Stimulation einen Toleranzzustand erzeugen kann. Studien an verschiedenen Tierspezies (Mäuse, Meerschweinchen und Ratten) demonstrieren, daß selektiv nur bestimmte TNF-Effekte von dieser Toleranz betroffen sind wie Fieber, Anorexie und Letalität sowie zum Teil die gastrointestinale Toxizität, während andere Wirkungen von TNF (z. B. die Regulation des Lipidstoffwechsels) nicht abgeschwächt sind (45, 94, 121, 128, 130). Eine Vorbehandlung tumortragender Mäuse mit TNF in niedriger Konzentration über einige Tage führt ebenfalls zu Toleranz gegenüber einer nachfolgend applizierten, normalerweise letalen Dosis (38, 128), wobei in einer Studie unter diesen Bedingungen allerdings auch die Anti-Tumor-Effizienz der TNF-Therapie vermindert war (38). Als Ursache der TNF-Toleranz *in vivo* schienen in diesen Experimenten intrazelluläre, TNFRI-vermittelte Mechanismen von Bedeutung zu sein (130),

wohingegen eine Neutralisation von TNF durch Antikörper (121, 127), eine Veränderung seiner Bioverfügbarkeit oder der Rezeptorzahl (127) als wenig wahrscheinlich gelten. Cyclooxygenase-Inhibitoren wie Indometacin verhindern die Toleranzentstehung und verstärken somit die Toxizität von TNF bei wiederholter Applikation (129). Daneben wurde in einigen Untersuchungen eine Quertoleranz zwischen TNF und LPS beobachtet. LPS-induzierte Hypophagie, Letalität und Fieber werden durch Vorbehandlung mit TNF unterdrückt, nicht dagegen TNF-Effekte durch vorangehende Administration von LPS (39, 45, 100). Außerdem bildet sich die TNF-Toleranz im Tierversuch langsamer aus als die Resistenz gegenüber LPS, was auf unterschiedliche zugrundeliegende Mechanismen schließen läßt (100).

Bisher befassen sich nur wenige Studien *in vitro* mit der näheren Charakterisierung der TNF-Toleranz auf molekularer Ebene. Untersuchungen an SV-80-Zellen lieferten Hinweise, daß TNF eine Resistenz gegenüber seinen eigenen Wirkungen induzieren kann (50). Eine Langzeit-Präinkubation (72 h) mit einer niedrigen Dosis TNF (1 ng/ml) erzeugte in einer Arbeit mit SW480-Zellen einen Toleranzzustand gegenüber einer Restimulation sowohl mit TNF (0,1 - 10 ng/ml, 2 h) als auch mit LPS, wobei als molekulare Grundlage eine Hemmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B gefunden wurde (65). THP-1-Zellen waren nach einer 18stündigen Vorbehandlung mit TNF (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  oder LPS refraktär gegenüber einer erneuten Einwirkung des jeweils gleichen Stimulus (im Falle von TNF: 10 ng/ml, 40 min) und es bestanden verschiedene Formen der Quertoleranz (36). Bei diesen Untersuchungen wurde neben einer verminderten Phosphorylierung der MAP („mitogen activated protein“)-Kinasen JNK („c-Jun N-terminal kinase“) und ERK („extracellular signal-regulated kinase“) eine reduzierte Degradierung des NF- $\kappa$ B-Inhibitorproteins I $\kappa$ B $\alpha$  beschrieben. Darüber hinaus wurde eine Zunahme von Homodimeren der transkriptionell inaktiven NF- $\kappa$ B-Untereinheit p50 beobachtet, ein Mechanismus, der auch als eine Ursache für die LPS-Toleranz angesehen wird (166, 167). Eine wiederum eher kurze Präinkubation von FS4-Fibroblasten mit TNF (20 ng/ml, 15 h) führte in einer anderen Studie über eine persistierende Aktivierung des TNF-Signalweges und des IKK-Komplexes zu einem fortwährenden Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  und verhinderte somit dessen vollständige Resynthese. Dadurch entstand ein selektiver Toleranzzustand gegenüber erneuter Stimulation mit TNF, nicht aber mit IL-1 $\beta$  (99). Weiterhin wurde kürzlich demonstriert, daß eine kurzzeitige Vorbehandlung mit TNF die Proteinkinase A (PKA)-vermittelte Phosphorylierung der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 blockiert. Infolgedessen ist eine Assoziation von p65 mit dem Adaptorprotein p300, welche die transkriptionelle Aktivität verstärkt, nicht mehr möglich (44). Die Resultate dieser Untersuchungen *in*

*vivo* sowie *in vitro* zeigen, daß die der TNF-induzierten Toleranz zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bisher erst unvollständig aufgeklärt sind.

## 1.2 Das NF- $\kappa$ B-System

### 1.2.1 Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B/Rel-Familie und I $\kappa$ B-Inhibitorproteine

Transkriptionsfaktoren der Nuklearfaktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)/Rel-Familie sind zentral an der Regulation zahlreicher Gene bei entzündlichen sowie immunologischen Prozessen beteiligt und spielen außerdem bei Proliferation, Differenzierung und Apoptose eine wichtige Rolle (6, 7, 24, 42, 55, 153, 155). Eine Dysregulation des NF- $\kappa$ B-Systems wird sowohl bei akut als auch chronisch entzündlichen Prozessen sowie bei malignen Erkrankungen diskutiert (10, 11, 14, 23, 43, 126, 153, 155).

Das regulatorische NF- $\kappa$ B-Protein ist ein Homo- oder Heterodimer zweier Untereinheiten (7, 9, 81, 119). Am häufigsten wurde bisher ein Komplex aus p50 und p65 (RelA) identifiziert, an deren Stelle auch c-Rel, p52 oder RelB sowie die Vorläuferproteine p105 (p50) und p100 (p52) treten können (6, 7, 9, 47, 81, 119). Allen NF- $\kappa$ B/Rel-Proteinen ist eine C-terminale sogenannte Rel-Homologie-Domäne (RHD, ca. 300 Aminosäuren) gemeinsam. Diese besteht aus einem Helix-Loop-Helix (HLH)-Motiv, das die DNA-Bindung ermöglicht, einer Dimerisierungsdomäne (DD) und einer Sequenz, die für den Transport der Proteine in den Zellkern („nuclear localization sequence“, NLS) verantwortlich ist (81, 95, 119). Im Zytosol unstimulierter Zellen wird diese NLS durch inhibitorische Proteine, unter anderem I $\kappa$ B $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\epsilon$ , maskiert (6, 135, 136, 148). Diese binden über einen zentralen Abschnitt aus mindestens sechs Ankyrin-Motiven („ankyrin repeat domain“, ARD), der für alle Inhibitorproteine charakteristisch ist (7, 9, 81, 95), an die NLS sowie einen C-terminal davon gelegenen Bereich der RHD und verhindern so die nukleäre Translokation der NF- $\kappa$ B-Proteine (9, 81, 95). Bei einigen NF- $\kappa$ B-Untereinheiten wie z. B. p65 trägt außerdem eine sogenannte NF- $\kappa$ B/Rel/dorsal (NRD)-Domäne in der N-terminalen Region ihrer RHD zur Interaktion mit den I $\kappa$ B-Proteinen bei (7, 95). Die Vorläuferproteine p105 (I $\kappa$ B $\gamma$ ) und p100 (I $\kappa$ B $\delta$ ) verfügen neben einer RHD auch über eine C-terminale inhibitorische ARD. Das Vorhandensein dieser beiden strukturellen Motive erklärt die duale Funktion dieser Moleküle als NF- $\kappa$ B-Proteine einerseits und als Inhibitoren andererseits (7, 81, 119).



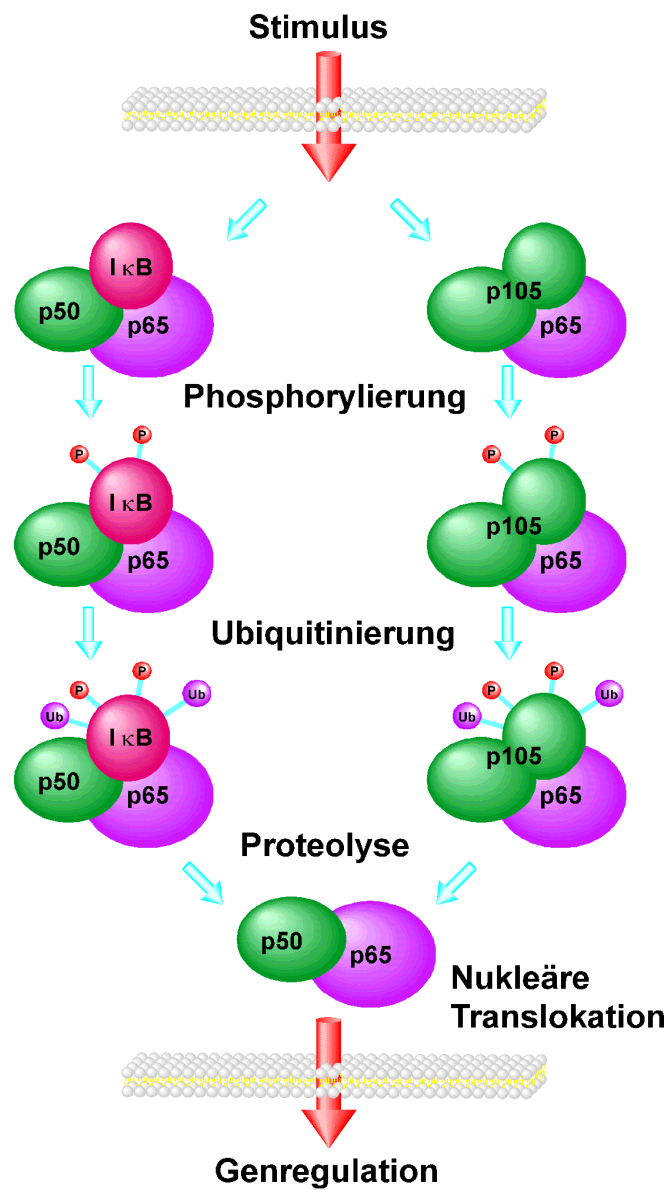
### 1.2.2 Aktivierung und Regulation des NF- $\kappa$ B-Systems

Die NF- $\kappa$ B-Komplexe können durch eine Vielzahl von Stimuli (insgesamt mehr als 150) aktiviert werden (7, 9, 92, 119). Neben proinflammatorischen Zytokinen wie TNF oder IL-1 zählen dazu beispielsweise Bakterien und bakterielle Produkte (v. a. LPS), Viren und virale Produkte, Wachstumsfaktoren sowie verschiedene Formen von zellulärem Streß (7, 9, 47, 92, 119).

Diese Stimuli induzieren zunächst die Phosphorylierung der inhibitorischen I $\kappa$ B-Proteine an spezifischen Serinresten in ihrem N-Terminus, worauf eine Ubiquitinmarkierung an spezifischen Lysinresten folgt (6, 47, 135) (Abb. 1). Daran schließt sich die Proteasom-vermittelte Proteolyse der Inhibitorproteine an (54, 135). Nachdem nun die NLS der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren frei vorliegt, kommt es zur nukleären Translokation des Dimers (7, 47, 54, 135).

Im Zellkern kann der Transkriptionsfaktor an regulatorische  $\kappa$ B-Promotor- und Enhancer-Elemente binden und steuert seinerseits die spezifische Expression von über 150 Genen (6, 7, 9, 54, 81, 92). Diese kodieren unter anderem für Zytokine (z. B. TNF, IL-1, IL-6), Chemokine (z. B. IL-8; MCP-1, „monocyte chemotactic protein-1“), Zelladhäsionsmoleküle (z. B. ICAM-1, „intercellular adhesion molecule-1“; VCAM-1, „vascular cell adhesion molecule-1“), Wachstumsfaktoren (z. B. GM-CSF) sowie Akute-Phase-Proteine (z. B. Angiotensinogen, Serum-Amyloid-A-Precursor) (7, 9, 47, 92). Somit induziert NF- $\kappa$ B die Produktion einiger seiner eigenen Aktivatoren, wie etwa TNF oder IL-1 (92). Außerdem kontrolliert NF- $\kappa$ B auch die Transkription des Inhibitorproteins I $\kappa$ B $\alpha$ , woraus eine strenge Autoregulation des Systems resultiert (7, 42, 81, 92).

Für den initialen Schritt der Aktivierung von NF- $\kappa$ B, die Serinphosphorylierung der I $\kappa$ B-Proteine, ist der sogenannte I $\kappa$ B-Kinase (IKK)-Komplex verantwortlich. Dieser hochmolekulare, zytosolische Komplex (ca. 300 - 900 kDa) setzt sich in seiner „klassischen“ Form zusammen aus den kinaseaktiven Molekülen IKK $\alpha$  (85 kDa) und IKK $\beta$  (87 kDa), die Homo- oder Heterodimere bilden, sowie dem Adaptorprotein IKK $\gamma$  (50 und 52 kDa) (52, 54, 113). IKK $\alpha$  und  $\beta$ , deren Primärstruktur sehr ähnlich ist, verfügen über eine N-terminale Kinase-Domäne (KD) sowie eine Leucin-Zipper (LZ)-ähnliche Struktur, die für ihre Dimerisierung notwendig ist. Über ein C-terminales Helix-Loop-Helix (HLH)-Motiv, das zudem die Aktivität der KD moduliert, erfolgt die Bindung des Adaptorproteins IKK $\gamma$  (122, 151, 160).



**Abbildung 1:** Aktivierungsschema von NF-κB. Eine Stimulierung der Zelle induziert die Phosphorylierung und Ubiquitinmarkierung von IκB sowie p105/100 und liefert damit das Signal für deren Proteolyse. Der aktivierte NF-κB-Komplex tritt in den Zellkern über und steuert nach Bindung an regulatorische κB-Promotor- und Enhancer-Elemente zahlreicher Gene deren Transkription.

Mehreren Untersuchungen nach scheint IKK $\beta$  für die Aktivierung wie auch für die anschließende Inaktivierung des IKK-Komplexes essentiell zu sein (37, 54). IKK $\alpha$ , dessen Bedeutung bisher noch weniger genau bekannt ist, soll dagegen an spezifischen Signalwegen, z. B. an der B-Zellreifung sowie der Proliferation beziehungsweise Differenzierung insbesondere der Keratinozyten, beteiligt sein (33, 51, 52, 114). Assoziiert an IKK $\beta$  könnte IKK $\alpha$  einigen Studien zufolge aber möglicherweise durch IKK $\beta$  phosphoryliert werden und damit zur Einleitung der I $\kappa$ B-Degradierung durch den IKK-Komplex oder zur Erhöhung der transkriptionellen Aktivität verschiedener NF- $\kappa$ B-Proteine durch Phosphorylierung beitragen (75, 120). Das Adaptorprotein IKK $\gamma$  wird als regulatorische Komponente im IKK-Komplex angesehen (41, 54, 110, 113).

Darüber hinaus existieren nur teilweise charakterisierte Mechanismen, welche die transkriptionelle Aktivität beziehungsweise die DNA-Bindungsfähigkeit von NF- $\kappa$ B auf (prä-)transkriptioneller Ebene modulieren. Dazu zählt insbesondere die Phosphorylierung der Untereinheiten (p65, c-Rel, p50) des Dimers (9, 41, 153). So führt die durch TNF oder IL-1 induzierte Aktivierung von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  neben der Degradierung von I $\kappa$ B auch zu einer Phosphorylierung von p65 an verschiedenen Serinresten (75, 111, 143, 144). Wie Studien zeigten, sind an der Übertragung der Phosphatreste unter anderem die Kinasen PI3K (Phosphatidylinositol-3'-Kinase) und Akt/PKB (Proteinkinase B) (75, 120) sowie bei Stimulation mit TNF auch CKII (Caseinkinase II) (144) beteiligt. Zudem wird p65 durch TNF unter Vermittlung von PKAc („cyclic AMP-dependent protein kinase A“) (163), MSK1 („mitogen- and stress-activated kinase 1“) (141) und PKC $\zeta$  (Proteinkinase C  $\zeta$ ) (35) phosphoryliert, wodurch sich jeweils eine stabile Interaktion von p65 mit dem Koaktivator CBP (CREB-bindendes Protein)/p300 ausbilden kann, welche die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B moduliert (35, 163). Neben CBP/p300 und anderen Histon-Acetylasen (117) könnten durch die p65-Phosphorylierung aber auch Histon-Deacetylasen als Korepressoren an nukleäres NF- $\kappa$ B rekrutiert werden (5). Diese posttranskriptionellen Modifikationen sind also von entscheidender Bedeutung für die positive oder negative Regulation der NF- $\kappa$ B-abhängigen Genexpression. Weiterhin haben die variable Kombination der einzelnen NF- $\kappa$ B-Untereinheiten, geringe Unterschiede in den  $\kappa$ B-Bindungssequenzen der DNA sowie die Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren Auswirkungen auf die differentielle Regulierung der Expression der einzelnen NF- $\kappa$ B-abhängigen Gene (6, 9, 81, 124, 125, 145, 153).

### 1.2.3 Der TNF-Signalweg

Stimulation einer Zelle mit TNF induziert die Aktivierung der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 („activator protein-1“) (14, 15). Daneben kann dieses Zytokin über eine Caspase-Kaskade auch apoptoseassoziierte Prozesse fördern (15, 55).

Die TNF-induzierten Signalwege werden durch die Bindung von TNF an zwei unterschiedliche Rezeptoren, TNFRI (p55) und TNFRII (p75), eingeleitet. Dadurch kommt es zu deren jeweiliger Trimerisierung. Dies ermöglicht die Anlagerung mehrerer Signalproteine an die zyttoplasmatische Domäne der Rezeptoren. An TNFRI bindet zunächst TRADD („TNFRI-associated death domain protein“), das mit mindestens drei weiteren Molekülen interagiert, zum einen mit FADD („Fas-associated death domain protein“), das über Caspase 8 und weitere Caspasen zur TNF-vermittelten Apoptose führt, zum anderen mit TRAF2 („TNF-receptor associated factor 2“) und RIP1 („receptor-interacting protein-1“) (15, 105). Bei Besetzung von TNFRII mit TNF lagert sich TRAF2 direkt an den Rezeptor an und assoziiert mit TRAF1 (108, 109). Diese Mechanismen induzieren im folgenden entweder eine Aktivierung des IKK-Komplexes oder von MAP-Kinasen wie insbesondere JNK sowie p38 und bewirken dadurch letztendlich die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Proteine beziehungsweise von AP-1 (15, 54).

Bei der TNFRI-induzierten IKK-Aktivierung stellt TRAF2 den Kontakt von IKK mit dem rezeptorassoziierten Komplex her, während RIP1 auf nichtenzymatischem Weg zur Aktivierung von IKK führt (32, 161), möglicherweise indem es bisher noch unbekannte IKK-Kinasen zum IKK-Komplex rekrutiert (32). Diskutiert als mögliche IKK-Kinasen werden unter anderem MEKK-3 („mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-3“) (156) sowie atypische Proteinkinase C (aPKC)-Kaskaden (112). Jedoch könnte nach einer Untersuchung auch eine Transautophosphorylierung von IKK nach Interaktion von RIP1 und IKK $\gamma$  ohne eine IKK-Kinase im eigentlichen Sinne zur Aktivierung des Komplexes ausreichend sein (101).

## 1.3 Regulation der Genexpression durch NF- $\kappa$ B im Zusammenwirken mit anderen Transkriptionsfaktoren

### 1.3.1 Die Proteine der C/EBP-Familie

Bei der Steuerung der Expression der verschiedenen Gene agieren die NF- $\kappa$ B-Proteine im Kontext mit einem dichten Netzwerk anderer Transkriptionsfaktoren, z. B. C/EBP („CCAAT/enhancer-binding protein“), AP-1, Sp-1 oder Oct-1 (81, 124, 125, 145, 152). Die Mitglieder

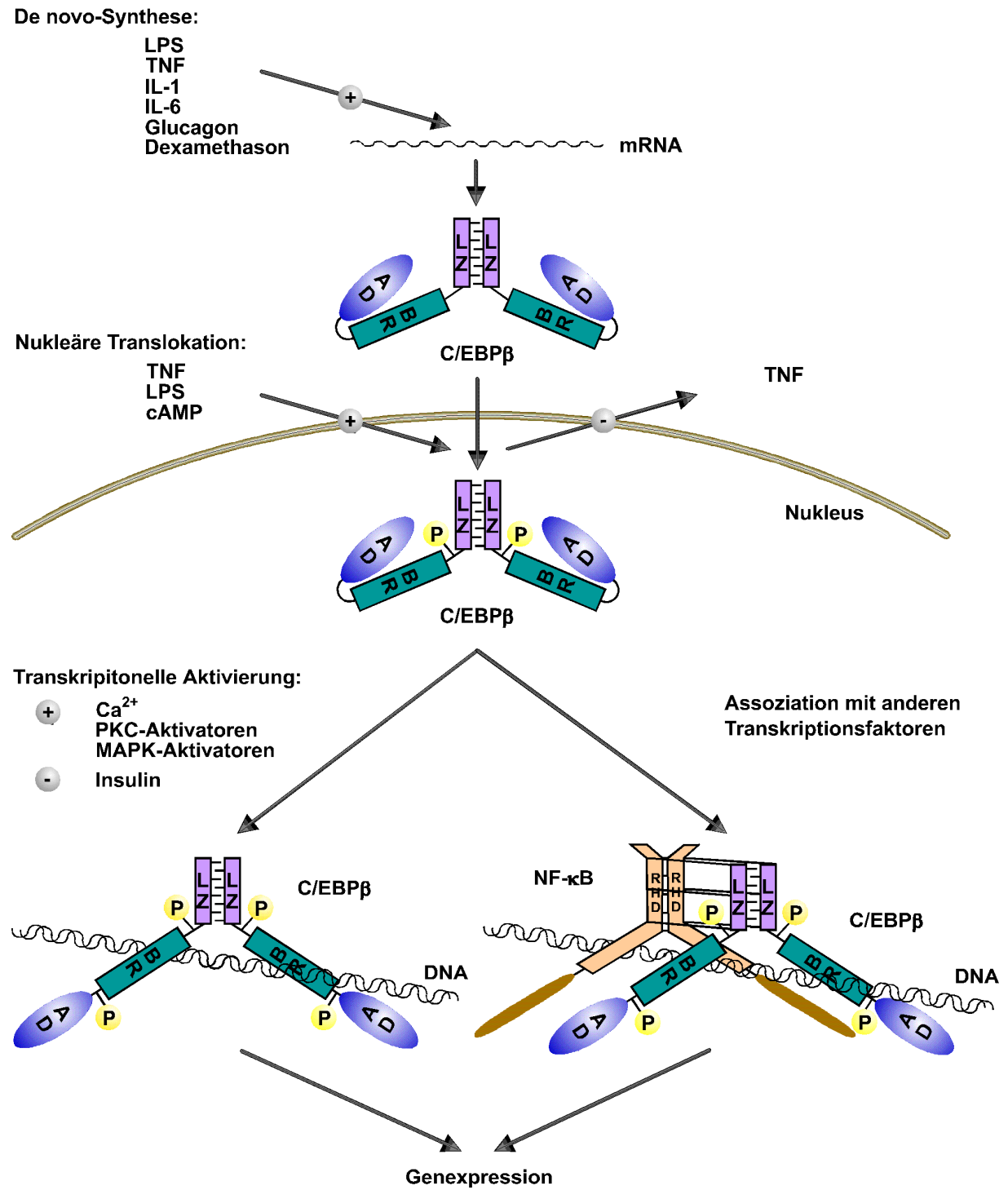
der C/EBP-Familie verfügen über eine N-terminale Transaktivierungsdomäne und sind in ihrem homologen C-Terminus durch eine basische DNA-Bindungsdomäne sowie ein Leucin-Zipper (LZ)-Motiv charakterisiert, weshalb sie als bZIP-Proteine bezeichnet werden (67, 103, 145). Die Leucin-Zipper-Struktur befähigt die C/EBP-Moleküle zur Bildung von Homo- und Heterodimeren (66, 103, 145). Dabei ist eine Assoziation sowohl zwischen verschiedenen C/EBP-Proteinen als auch mit Transkriptionsfaktoren anderer Familien möglich, z. B. mit NF- $\kappa$ B, AP-1, CREB oder STAT („signal transducer and activator of transcription protein“) (2, 103, 145). Die C/EBP-Proteine spielen eine wichtige Rolle im Metabolismus und bei der Differenzierung insbesondere von Adipozyten, Hepatozyten und myelomonozytären Zellen (3, 103, 145). C/EBP $\beta$  (NF-IL6) ist im Rahmen von inflammatorischen und immunologischen Prozessen für die Regulation zahlreicher Gene verantwortlich (103, 145). So induziert es beispielsweise die Produktion von Zytokinen wie IL-1, IL-6, IL-8 oder TNF sowie von Akute-Phase-Proteinen, unter anderem Serum-Amyloid A, Komplement C3 und CRP (C-reaktives Protein), während gleichzeitig die Expression anderer Gene wie Angiotensinogen oder ICAM-1 und einiger viraler Gene, z. B. HPV („human papillomavirus“)-16 oder HPV-18, vermindert wird (2, 16, 64, 103).

Entsprechend seinen vielfältigen Aufgaben unterliegt C/EBP $\beta$  einer komplexen und teilweise noch ungeklärten Regulation. In unstimulierten Zellen existiert das Protein in transkriptionell inaktiver Form, da negativ regulatorische intramolekulare Regionen die N-terminale Transaktivierungsdomäne maskieren (59, 140). C/EBP $\beta$  wird zum einen in vielen Geweben wie vor allem Leber, Intestinaltrakt, Lunge und Fettgewebe konstitutiv exprimiert (103, 145), andererseits können proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF, LPS sowie Glucagon und Dexamethason über die Induktion der mRNA die De novo-Synthese von C/EBP $\beta$  steigern (3, 46, 80). Insbesondere posttranskriptionelle Mechanismen – in erster Linie Phosphorylierungsreaktionen – nehmen jedoch eine Schlüsselstellung bei der Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors ein (2, 103). Den Ergebnissen zweier Studien nach ist eine Phosphorylierung von C/EBP $\beta$  durch eine cAMP-abhängige PKA nach Behandlung von PC12-Zellen mit Forskolin ebenso wie von Kolorektalkarzinomzellen mit Antioxidantien eine essentielle Voraussetzung für die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors (30, 82). LPS und TNF induzieren in myelomonozytären Zellen beziehungsweise in transformierten Hepatozyten gleichfalls eine schnelle Umverteilung von C/EBP $\beta$  in den Zellkern (58, 158). Im Gegensatz dazu wurde aber auch eine TNF-vermittelte Phosphorylierungsreaktion beschrieben, die in Maushepatozyten den nukleären Export von C/EBP $\beta$  fördert (28). Außerdem konnte ge-

zeigt werden, daß eine Phosphorylierung im Bereich der basischen Region durch PKA oder PKC die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors bei Durchführung von Gelretardierungsassays behindert (76, 139). Eine weitere Untersuchung fand mit derselben Methode nach Stimulation von Rattenhepatozyten mit EGF („epidermal growth factor“) ebenfalls eine Reduktion der DNA-Bindung von C/EBP $\beta$ , während TGF $\beta$  („transforming growth factor  $\beta$ “) diese inhibitorische Wirkung antagonisieren und die DNA-Bindungsaffinität erhöhen konnte (104). Schließlich heben *ras*-abhängige MAP-Kinasen die Maskierung der Transaktivierungsdomäne durch Phosphorylierung der inhibitorischen Region auf und überführen C/EBP $\beta$  so in seinen transkriptionell aktiven Zustand (89, 140). Auch eine Phosphorylierung der Aktivierungsdomäne durch PKC nach Stimulation mit LPS oder proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF (138) sowie eine Phosphorylierung des Leucin-Zippers durch eine Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (146) steigern das Transaktivierungspotential. Des Weiteren wurde für C/EBP $\beta$  eine Assoziation mit dem Koaktivator CBP/p300 beschrieben (83). Insulin kann diese Interaktion durch Phosphorylierung der Koaktivatoren über PKB beziehungsweise PI3K verhindern und so die transkriptionelle Aktivität von C/EBP $\beta$  negativ regulieren (48). Das Vorhandensein dieser zahlreichen Regulationsmechanismen erlaubt in Abhängigkeit von Stimulus, Zelltyp und Spezies eine variierende Modulation der C/EBP $\beta$ -induzierten Genexpression (103, 140).

### 1.3.2 Transkriptionelle Regulation der IL-8-Genexpression

Ein Beispiel für das komplexe Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren stellt die Regulation des IL-8-Gens dar (61, 86, 87, 123, 152). Dieses Chemokin der C-X-C-Familie wird von zahlreichen Zellen wie Monozyten, Lymphozyten und Endothelzellen infolge der Einwirkung von proinflammatorischen Stimuli wie TNF und IL-1 $\beta$ , LPS, einigen Bakterien und Viren sowie Chemikalien produziert (79, 107). Zu seinen Funktionen zählen vor allem chemotaktische Effekte auf T-Lymphozyten und neutrophile Granulozyten, die Aktivierung von Leukozyten sowie die Vermittlung ihrer Adhäsion an das Endothel und der Freisetzung unter anderem von Histamin und Proteasen durch Degranulation (8, 62, 79, 107). Durch seine raschen und lang anhaltenden Wirkungen ist IL-8 an akuten inflammatorischen Reaktionen und vermutlich auch an chronisch entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Psoriasis wesentlich beteiligt (8, 87). Darüber hinaus wird dieses Chemokin in verschiedenen malignen Tumoren (z. B. Melanomen, Pankreas-, Bronchial- und Kolonkarzinomen)



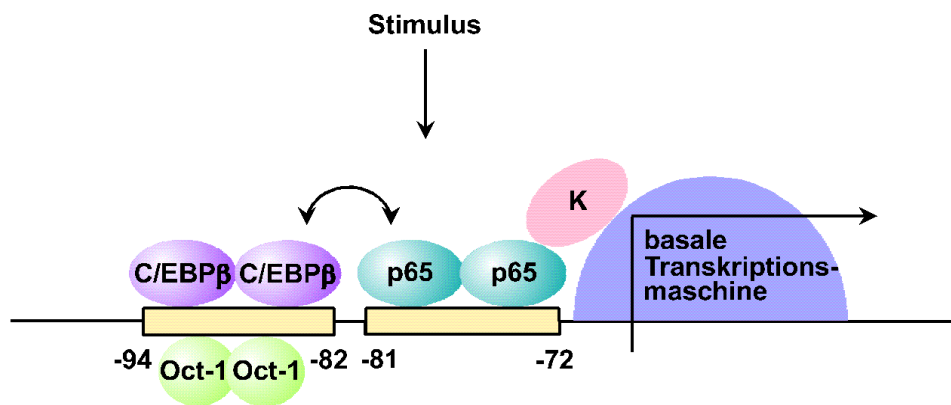
**Abbildung 2:** Aufbau und Regulation von C/EBPβ. C/EBPβ besteht aus einer Aktivierungsdomäne (AD), einer basischen Region (BR), welche die DNA-Bindung vermittelt, und einem Leucin-Zipper (LZ)-Motiv, über das je zwei Moleküle zu einem Dimer assoziieren. Verschiedene Stimuli induzieren die Synthese der C/EBPβ-mRNA und regulieren durch Einflußnahme auf nukleäre Translokation, DNA-Bindungsaffinität und transkriptionelle Aktivität die C/EBPβ-induzierte Genexpression. Außerdem wird diese durch die Interaktion von C/EBPβ mit anderen Transkriptionsfaktoren (beispielhaft dargestellt ist NF-κB) modifiziert.

produziert und trägt durch seine mitogenen, angiogenen und motogenen Effekte zum Wachstum der Tumoren sowie ihrer Metastasierung bei (85, 154).

Die Expression von IL-8 wird in erster Linie auf transkriptioneller Ebene reguliert (86, 107). In der Promotorsequenz des IL-8-Gens finden sich Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, AP-1, C/EBP $\beta$  und Oct-1 (107). NF- $\kappa$ B, das nach seiner stimulusinduzierten nukleären Translokation an den IL-8-Promotor bindet, interagiert dort mit TATA-Box-bindenden Proteinen und ermöglicht dadurch die Formation eines stabilen Präinitiationskomplexes. NF- $\kappa$ B gilt somit als der entscheidende Faktor für die Aktivierung der IL-8-Produktion (25, 107). Hierfür wird aber die Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren benötigt (86, 87, 107). Im Falle der Stimulation durch TNF oder IL-1 $\beta$  ist der Sequenzbereich von -94 bis -72 bp des IL-8-Promotors, bestehend aus den unmittelbar aneinandergrenzenden Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B (-81 bis -72 bp) und C/EBP $\beta$  (-94 bis -82 bp), essentiell und ausreichend für die IL-8-Genexpression (86). Sowohl NF- $\kappa$ B als auch C/EBP $\beta$  binden in dimerer Form an den IL-8-Promotor, wobei die Zusammensetzung der Dimere aus verschiedenen Untereinheiten Einfluß auf ihre transkriptionelle Aktivität hat (62, 63, 107, 123, 125). In mehreren Studien wurde außerdem eine funktionelle Kooperation der beiden Transkriptionsfaktoren in Form einer direkten Protein-Protein-Interaktion nachgewiesen, die über die Assoziation der Rel-Domäne der NF- $\kappa$ B-Proteine mit der Leucin-Zipper-Struktur von C/EBP $\beta$  vermittelt wird (1, 61, 69, 78, 124, 125). Diese Komplexbildung spielt eine wichtige Rolle für die Stimulierung oder die Hemmung der IL-8-Promotoraktivität (61, 78, 123). Eine Untersuchung identifizierte darüber hinaus Oct-1, das an ein DNA-Motiv innerhalb der C/EBP $\beta$ -Stelle bindet, als transkriptionellen Repressor der basalen sowie der induzierten IL-8-Genexpression (152).

Abschließend läßt sich feststellen, daß das Zusammenspiel dieser Transkriptionsfaktoren mit ihren verschiedenen Untereinheiten, ihre DNA-Protein- und Protein-Protein-Interaktionen sowie ihr quantitatives Verhältnis zueinander in einer differenzierten Regulation der transkriptionellen Aktivität am IL-8-Promotor resultieren und die IL-8-Genexpression sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können (2, 61, 62, 107, 123, 125).





**Abbildung 3:** Struktur und Regulation des IL-8-Promotors. Der IL-8-Promotor verfügt über Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B (-81 bis -72 bp), C/EBP $\beta$  (-94 bis -82 bp) und Oct-1 (-91 bis -84 bp, innerhalb des C/EBP $\beta$ -Motivs). Diese Transkriptionsfaktoren regulieren durch funktionelle Kooperation sowie durch die Interaktion von NF- $\kappa$ B mit dem Koaktivator-Komplex (K) und der basalen Transkriptionsmaschine die Expression des IL-8-Gens.

## 1.4 Fragestellung

Die hier vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag dazu leisten, die molekularen Grundlagen für die Entstehung einer Toleranz gegenüber TNF näher zu charakterisieren. Im einzelnen wurden folgende Punkte erarbeitet:

- Zuerst sollten Voraussetzungen für die TNF-induzierte Toleranz unter variierender Exposition gegenüber diesem Zytokin in monozytären sowie in HeLa-Zellen etabliert werden.
- Ziel der folgenden Experimente war es, am Beispiel des IL-8-Promotors, der Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, C/EBP $\beta$  und Oct-1 enthält, die der TNF-Toleranz zugrundeliegenden Mechanismen auf transkriptioneller Ebene darzustellen.
- Als nächstes wurden daher die DNA-Bindungsaffinität und der Aktivierungsstatus von NF- $\kappa$ B sowie die I $\kappa$ B-Proteolyse unter den Bedingungen der TNF-Toleranz untersucht.
- Außerdem sollte in TNF-toleranten Zellen die DNA-Bindung von C/EBP $\beta$  und Oct-1 analysiert und ein möglicher Effekt dieser Transkriptionsfaktoren auf die IL-8-Promotor- und die 3 $\kappa$ B-abhängige Transkription getestet werden.

Aufgrund der Hinweise auf eine klinische Bedeutung der Entstehung einer Toleranz gegenüber TNF in verschiedenen Bereichen wäre es denkbar, daß sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit langfristig Ansätze für neue diagnostische oder therapeutische Strategien entwickeln lassen.

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper (Ak) gegen folgende Antigene eingesetzt:

#### Western Blot

I $\kappa$ B $\alpha$	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
IKK $\alpha$	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
p50	polyklonaler Ziege-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
p65	polyklonaler Ziege-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology), polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus (Biomol, Hamburg) und monoklonaler Maus-Ak gegen N-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
Aktin	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus (Sigma, Deisenhofen)
C/EBP $\beta$	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
Oct-1	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
TRAF1	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen N-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
TRAF2	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
RIP1	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)

Sekundäre Ak: Peroxidase-konjugierter polyklonaler Ziege-Ak gegen Kaninchen-IgG, Peroxidase-konjugierter monoklonaler Ziege-Ak gegen Maus-IgG (Dianova, Hamburg) oder Peroxidase-konjugierter Esel-Ak gegen Ziege-IgG (Santa Cruz Biotechnology)

#### Supershift

p65	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen N-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
p50	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen NLS (Santa Cruz Biotechnology)
c-Rel	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
C/EBP $\beta$	monoklonaler Maus-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
Oct-1	monoklonaler Maus-Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)

### 2.1.2 Reagenzien

Tumornekrosefaktor (TNF) sowie Lipopolysaccharid (LPS, *E. coli* 0111:B4) wurden von Sigma bezogen. Alle weiteren Reagenzien stammten von den Firmen E. Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) sowie Sigma und entsprachen der „Qualität zur Synthese“.

### 2.1.3 Plasmide

In den Transfektionsstudien wurden die Firefly-Luciferase-Reporterplasmide 3xκB.luci (bestehend aus drei Kopien der κB-Konsensussequenz: 5'-GGGACTTTCC-3') (56) sowie pGL2-IL-8 (420 bp der humanen IL-8-Promoterregion) (49) verwendet. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe des Renilla-Luciferaseplasmids pRLTk (HSV-Thymidinkinase-Promotor, Promega) kontrolliert.

Für die Überexpressionsstudien fanden folgende Plasmide anderer Arbeitsgruppen Verwendung: C/EBPβ Wildtyp und mutierte Form (Prof. Richard Pope, North Western University, Chicago, USA) (98) sowie Oct-1 Wildtyp und mutiert (Prof. Harinder Singh, University of Chicago, USA) (115). Als Negativkontrolle diente ein R<sub>c</sub>CMV-Plasmid ohne Insert (Invitrogen, Groningen, Niederlande).

## 2.2 Methodik

### 2.2.1 Zellkultur

Die überwiegende Anzahl der Experimente wurde in monozytären THP-1-Zellen (DSMZ, Braunschweig) durchgeführt, die in RPMI 1640 (Biochrom, Berlin) unter Zusatz von 7,5 % fötalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alle Reagenzien von Biochrom) bis zu einer Dichte von  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen/ml kultiviert wurden (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Der Endotoxingehalt des Mediums und aller Bestandteile war geringer als 10 pg/ml. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Zellen für die Experimente in 6-Well-Kulturplatten (Nunc, Eggenstein) in einer Dichte von  $2 - 3 \times 10^6$  Zellen pro Schale ausgesät.

Für weitere Versuche wurden darüber hinaus epitheliale HeLa-Zellen (DSMZ) verwendet, die in Dulbecco's MEM (Biochrom) unter Zugabe von 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin bis zur Konfluenz kultiviert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) und alle 2 - 3 Tage nach Ablösen mittels EDTA/Trypsin gesplittet wurden. Zur Durchführung der Ex-

perimente wurden die HeLa-Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten (Nunc) ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz wurde mit dem jeweiligen Versuch begonnen.

### **2.2.2 Endotoxin-Test**

Alle eingesetzten Medien und Reagenzien wurden vor ihrer Verwendung bezüglich ihres Gehalts an Endotoxinen kontrolliert. Mit dem quantitativen chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat Assay (Bio Whittaker, Verviers, Belgien) wurde die Endotoxin-abhängige Spaltung des Substrats Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA bei 405 nm bestimmt. Es kamen ausschließlich Substanzen zum Einsatz, deren Pyrogen-Konzentration unter 10 pg/ml lag.

### **2.2.3 Zytotoxizitätstest (WST-1-Test)**

Im kolorimetrischen WST-1-Test (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde die Viabilität der Zellen überprüft. Nach Präinkubation von  $1,5 \times 10^5$  THP-1-Zellen pro 150  $\mu$ l Medium mit den zu testenden Bedingungen in Mikrotiterplatten (Nunc) wurde das Tetrazolium-Salz 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat (WST-1) zugegeben und dessen Spaltung zu Formazan durch Dehydrogenasen intakter Zellen bei 405 nm photometrisch gemessen. Über die so erhaltene optische Dichte (OD) konnte die Stoffwechselaktivität der Zellen quantitativ erfaßt werden. Es wurden jeweils 6fach-Bestimmungen durchgeführt. Darüber hinaus wurde routinemäßig die Morphologie der Zellen beurteilt und das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen mittels Trypanblau-Färbung bestimmt.

### **2.2.4 Isolierung zytosolischer und nukleärer Extrakte**

Zelluläre Extrakte wurden nach einem in der Literatur beschriebenen und leicht modifizierten Verfahren isoliert (74, 91). THP-1-Zellen wurden dafür zunächst abzentrifugiert (200 x g, 7 min, 4 °C) und einmal in PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (2.000 x g, 2 min, 4 °C) wurden die Zellpellets in Puffer A (0,1 % Nonidet P-40; 10 mM HEPES, pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM Dithiothreitol (DTT); 300 mM Saccharose; je 0,75  $\mu$ g/ml Pepstatin A, Antipain, Chymostatin, Aprotinin und Leupeptin sowie 0,5 mM PMSF) resuspendiert und 5 min inkubiert, um die äußeren Zellmembranen aufzubrechen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (15.800 x g, 30 sec, RT), woraufhin der

Überstand mit der zytosolischen Fraktion von den noch intakten Zellkernen abgenommen und auf Eis gelagert wurde. Um eine Kontamination der anschließend gewonnenen nukleären Extrakte durch zytosolische Proteine zu vermeiden, wurden die Kerne einmal in Puffer A gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgenommen, mit der zuvor erhaltenen zytosolischen Fraktion vereint und bei -80 °C aufbewahrt. Danach wurden die Pellets in Puffer B (20 mM Hepes, pH 7,9; 100 mM KCl; 100 mM NaCl; 20 % Glycerin; 0,5 mM DTT; Proteaseinhibitoren wie in Puffer A) aufgenommen und die Kernmembranen mittels eines Ultraschalldesintegrators zerstört. Durch Zentrifugation (15.800 x g, 30 sec, RT) ließen sich die Membranfragmente abtrennen. Die extrahierten nukleären Proteine wurden ebenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Bei der Herstellung der Extrakte aus HeLa-Zellen kam das gleiche Verfahren zum Einsatz, allerdings mußten diese adhärenenten Zellen vor dem ersten Zentrifugationsschritt nach Entfernen des Mediums mit Hilfe von Zellschabbern in PBS vom Boden der 6-Well-Kulturplatten abgeschabt werden.

Die Proteinkonzentrationen der zytosolischen und nukleären Extrakte wurden mit Hilfe des Bradford-Assays (Biorad, München) bestimmt (20). Als Meßgröße diente hierbei die Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blau G 250 von 465 nm zu 595 nm, die durch dessen Bindung an Proteine bewirkt wird.

### **2.2.5 Transfektion und Luciferase-Assay**

Für die transienten Transfektionen wurden die Firefly-Luciferase-Indikatorgenplasmide 3xκB.luci, das aus 3 Kopien einer prototypischen κB-Erkennungssequenz besteht, beziehungsweise pGL2-IL-8, welches 420 bp aus der 5'-Region des IL-8-Promotors trägt, eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein Renilla-Luciferase-Plasmid (pRLTk) kotransfiziert, dessen konstitutive Expression durch den HSV-Thymidinkinase-Promotor reguliert wird. Die THP-1-Zellen, deren Transfektion nach einem Protokoll basierend auf DEAE-Dextran (75) erfolgte, wurden zunächst in STBS (25 mM Tris-HCl, pH 7,4; 5 mM KCl; 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>; 137 mM NaCl; 0,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen, in einem zuvor hergestellten DNA-Mix (4 µg Indikatorgenplasmid; 0,2 µg pRLTk; 15 µg/ml DEAE-Dextran; STBS) resuspendiert und 15 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe des 10fachen Volumens an STBS wurde die Reaktion gestoppt. Nicht aufgenommene DNA trennte die folgende Zentrifugation (200 x g, 5 min, RT) von den transfizierten Zellen ab, die daraufhin einmal in RPMI 1640

(ohne Zusatz von FKS und Penicillin/Streptomycin) gewaschen wurden. Die Zellen wurden dann in 6-Well-Kulturplatten in Medium ohne oder mit Zusatz von TNF ausgesät und bei 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. 72 h nach der Transfektion blieben einzelne Ansätze unbehandelt oder wurden mit verschiedenen TNF-Dosen stimuliert und weitere 5 h bei 37 °C aufbewahrt. Nach Zentrifugieren (200 x g, 7 min, RT) und einmaligem Waschen der Zellen in PBS erfolgte die Gewinnung der zellulären Extrakte durch Inkubation (15 min, Schütteln bei RT) in Lysis-Puffer (Promega). Danach wurde durch erneute Zentrifugation (14.000 x g, 1 min, 4 °C) der Zelldebris entfernt, anschließend mit Hilfe eines Luminometers die Aktivität der induzierten Firefly-Luciferase mit dem Luciferase-Reporter-Assay (Promega) quantitativ bestimmt und das Ergebnis unter Einbeziehung der ebenfalls ermittelten Aktivität der konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase normalisiert.

Adhärente HeLa-Zellen wurden mittels SuperFect-Transfektionsreagenz nach einem Protokoll von Qiagen (Hilden) transient transfiziert, indem sie nach einmaligem Waschen in PBS mit einer Mischung aus DNA, SuperFect-Transfektionsreagenz und serumfreiem Medium resuspendiert wurden. 2 h später wurde diese Mischung durch Medium (10 % FKS, 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin) ohne beziehungsweise mit TNF-Zugabe ersetzt. Im Gegensatz zu den THP-1-Zellen mußte hier das Medium täglich gewechselt werden. Um in beiden Zelllinien möglichst vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde das dafür benötigte Medium bereits zu Beginn der 72stündigen Inkubationsphase soweit nötig mit TNF versetzt und bis zur Verwendung ebenso wie die Zellen bei 37 °C (5 % CO<sub>2</sub>) aufbewahrt. Die Stimulation der Zellen sowie die Erstellung der Extrakte erfolgte wie oben für die THP-1-Zellen ausgeführt.

### 2.2.6 Überexpressionsstudien

In den Überexpressionsstudien fanden die unter 2.1.3 beschriebenen Plasmide Verwendung. Mit diesen Plasmiden sowie 0,2 µg pRLTk (Promega) und 1 µg pGL2-IL-8 beziehungsweise 3xκB.luci wurden HeLa-Zellen kotransfiziert. Nach Inkubation über Nacht (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden einzelne Ansätze mit TNF stimuliert (20 ng/ml, 5 h), anschließend gemäß derselben Methode wie bei den Transfektionsstudien (siehe 2.2.5) zelluläre Extrakte mittels Lysis-Puffer (Promega) gewonnen und die Luciferaseaktivität gemessen. Um die Effizienz der Überexpression zu kontrollieren, wurden HeLa-Zellen mit den entsprechenden Überexpressionsplasmiden transient transfiziert beziehungsweise blieben unbehandelt. Am nächsten Tag

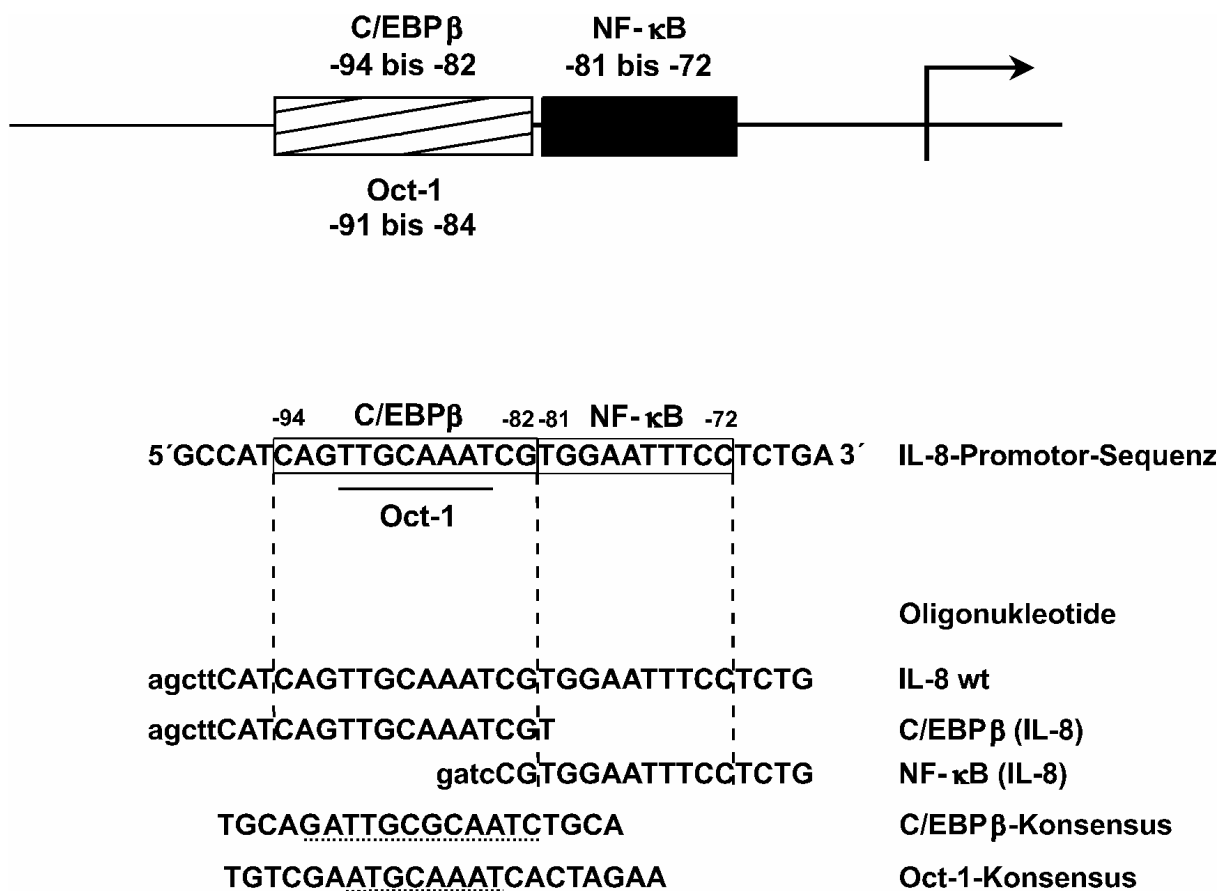
wurden aus diesen Ansätzen, nachdem sie zum Teil mit TNF (20 ng/ml, 15 min) stimuliert worden waren, zytosolische sowie nukleäre Extrakte wie in 2.2.4 beschrieben isoliert. Mit Hilfe der Western Blot-Analyse (siehe 2.2.9) wurde die Menge der überexprimierten Proteine im Vergleich zur untransfizierten beziehungsweise CMV-transfizierten Kontrolle bestimmt und im Gelretardierungsassay (siehe 2.2.7) ihre Bindung an geeignete DNA-Sequenzen überprüft.

### 2.2.7 Gelretardierungsassay

Nukleäre Extrakte wurden mittels Gelretardierungsassay auf die Anwesenheit DNA-bindender Transkriptionsfaktoren untersucht. Hierfür kamen doppelsträngige Oligonukleotide mit Erkennungssequenzen für die jeweiligen Transkriptionsfaktoren zum Einsatz. Als NF- $\kappa$ B-Konsensussequenz diente ein Oligonukleotid mit dem prototypischen Ig  $\kappa$ -Motiv (5'-CAGAG GGGACTTTCCGAGA-3', MWG-Biotech, Ebersberg). Dieses wurde unter Zugabe der erforderlichen Nukleotide durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (Roche Diagnostics) mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (> 3000 Ci/mmol) (Perkin Elmer Life Sciences, Zaventem, Belgien) markiert. Als Kontrolle für Qualität und gleichmäßige Proteinladung im Gelretardierungsassay wurde routinemäßig parallel ein Oligonukleotid mit der Erkennungssequenz für den konstitutiv aktivierten Transkriptionsfaktor Sp-1 (5'-TTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3', Sp-1, Promega) eingesetzt, das mittels T4-Polynukleotidkinase (Promega) mit [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (> 5000 Ci/mmol) (Perkin Elmer Life Sciences) markiert wurde. Daneben fanden für die IL-8-Bindungsstudien die in Abbildung 4 dargestellten Oligonukleotide Verwendung. Die Markierung der Erkennungssequenzen IL-8 wt, C/EBP $\beta$  (IL-8) und NF- $\kappa$ B (IL-8) (Eurogentec, Seraing, Belgien) erfolgte mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I, die der Sequenzen Oct-1-Konsensus (Promega) und C/EBP $\beta$ -Konsensus (Santa Cruz Biotechnology) durch die T4-Polynukleotidkinase. Nicht gebundene Nukleotide konnten jeweils mittels Sephadex G50- (Klenow-markierte Oligonukleotide) beziehungsweise G25-Säulen (Nukleotide markiert mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase) (Roche Diagnostics) abgetrennt werden. Zur Durchführung der Gelretardierungsassays wurden gleiche Proteinmengen nukleärer Extrakte (2 - 4  $\mu$ g) im entsprechenden Bindepuffer (NF- $\kappa$ B- und Sp-1-Oligonukleotid: 20 mM HEPES, pH 7,9; 50 mM KCl; 1 mg/ml BSA; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,1 % Nonidet P-40; 5 % Glycerin; 50 ng Poly[d(I-C)]/ $\mu$ l (Roche Diagnostics) beziehungsweise alle übrigen Oligonukleotide: 12 mM HEPES, pH 7,9; 4 mM Tris, pH 7,9; 60 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>;



0,6 mM EDTA; 5 mM DTT; 12 % Glycerin; 50 ng Poly[d(I-C)]/μl) aufgenommen und 30 min mit dem jeweiligen radioaktiv markierten Oligonukleotid (10 ng, 10<sup>5</sup> cpm) inkubiert (133). Nach Zugabe des Ladepuffers (0,25 x TBE-Puffer [10 x TBE: 890 mM Tris; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA, pH 8,0]; 40 % Glycerin; 0,2 % Bromphenolblau) wurden die Proteine mittels Gelelektrophorese in einem 4 beziehungsweise 6 %igen Polyacrylamidgel in 0,25 x TBE-Puffer aufgetrennt. Als positive Kontrollen dienten routinemäßig nukleäre Extrakte LPS-stimulierter THP-1-Zellen. Die quantitative Auswertung der getrockneten Gele erfolgte mittels Autoradiographie.



**Abbildung 4:** Struktur des IL-8-Promotors und Sequenzen der Oligonukleotide, die im Gelretardierungsassay eingesetzt wurden. Die IL-8-Promotorregion ist schematisch und in ihrer Nukleotidsequenz (bp -99 bis -67) dargestellt. Die Bindungsstellen der an der Regulation beteiligten Transkriptionsfaktoren sind durch Kästchen markiert (C/EBPβ, NF-κB) bzw. unterstrichen (Oct-1). Die Sequenzen der in dieser Studie verwendeten IL-8-Oligonukleotide sowie zwei zusätzliche Konsensussequenzen (Konsensus) sind unterhalb aufgelistet. Die Extension der Oligonukleotide um einige Basen für das Labeling nach Klenow ist durch kleingeschriebene Buchstaben angedeutet.

### 2.2.8 Supershift-Analyse und Kompetitionsstudien

Eine Charakterisierung der Bestandteile der aktivierten DNA-Protein-Komplexe gelang mit Hilfe der Supershift-Analyse. Durch spezifische Bindung von Antikörpern an die entsprechende Untereinheit konnte die Wanderungsgeschwindigkeit des DNA-gebundenen Komplexes in der nativen Gelelektrophorese verringert werden. Dazu wurden 2 - 4 µg der nukleären Extrakte mit jeweils 2 µl des betreffenden Supershift-Antikörpers (alle von Santa Cruz Biotechnology; siehe 2.1.1) für 1 h bei 4 °C präinkubiert und anschließend mit Hilfe des Gelretardierungsassays weiter analysiert (siehe 2.2.7). Zur Kontrolle wurde gleichzeitig dieselbe Menge nukleären Extraktes ohne Antikörper-Vorinkubation elektrophoretisch aufgetrennt.

Zudem wurden in Konkurrenzexperimenten die nukleären Extrakte mit einem 100fachen Überschuß unmarkierter Oligonukleotide (IL-8 wt, C/EBPβ (IL-8), NF-κB (IL-8), C/EBPβ-Konsensus, Oct-1-Konsensus oder Sp-1) als spezifischen Kompetitoren inkubiert und anschließend im Gelretardierungsassay untersucht. Auch hier diente die elektrophoretische Auftrennung einer gleichen Menge nukleären Extraktes ohne Zugabe eines Kompetitors als Kontrolle.

### 2.2.9 Zytokin-Bestimmung

Zur Quantifizierung des IL-8-Zytokingehalts der Zellkulturüberstände von THP-1-Zellen wurde ein chromogener Sandwich-Immunoassay („ELISA“, R&D Systems, Wiesbaden) gemäß den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Alle Proben wurden in Doppelbestimmungen analysiert.

### 2.2.10 Western Blot-Analyse

Mittels Western Blot-Analyse wurde in zytosolischen und nukleären Extrakten das Vorhandensein bestimmter Proteine untersucht. Nach Zugabe von SDS-Probenpuffer (20,8 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1,27 % SDS; 4 % Glycerin; 1,25 % Mercaptoethanol; 330 µM EDTA; 0,2 % Bromphenolblau) wurden 5 - 10 µg der jeweiligen Proteinextrakte 5 min bei 95 °C denaturiert. Diese wurden nun, ebenso wie vorgefärbte Molekulargewichtsstandards (Rainbow, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg; Low Range, Biorad), die zur Identifizierung der Proteingrößen dienten, auf 12 %ige Polyacrylamid-Fertiggele (Novex<sup>TM</sup> Pre-Cast Gel, Invitrogen) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach anschließendem Äqui-

librieren der Gele für 15 min in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 0,2 M Glycin) erfolgte im Wet Blot-Verfahren der Transfer der Proteine auf eine ebenfalls äquilibrierte Nitrocellulosemembran (PALL Gelman Sciences, Dreieich). Die gewaschenen Membranen wurden mit Ponceau S (Sigma) gefärbt, um eine gleichmäßige Übertragung der Proteine aus den Gelen zu überprüfen. Nach 10 min wurde die Färbelösung abgespült, das Proteinmuster zur Dokumentation fotografiert und die Membranen durch einstündige Inkubation in PBST (PBS + 0,05 % Tween 20) mit 5 % Magermilchpulver abgesättigt, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Die Membranen wurden daraufhin mit dem entsprechenden primären Antikörper (siehe 2.1.1; Verdünnung je nach Antikörper 1 : 200 bis 1 : 2.000, jeweils in PBST + 1 % Milchpulver) 1 h bei RT beziehungsweise über Nacht bei 4 °C behandelt und nach Waschen mit PBST + 1 % Milchpulver (3 x 10 min, RT) mit dem entsprechenden sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörper (siehe 2.1.1; Verdünnungen in PBST + 1 % Milchpulver: Anti-Kaninchen und Anti-Ziege je 1 : 20.000; Anti-Maus: 1 : 7.500) inkubiert (1 h, RT). Im Anschluß an weitere Waschschritte in PBST (1 x 15 min, 4 x 5 min, RT) wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe mit Hilfe des ECL-Verfahrens auf Röntgenfilmen (beides von Perkin Elmer Life Sciences) sichtbar gemacht und je nach Fragestellung mittels Densitometrie ausgewertet beziehungsweise direkt gescannt.

### **2.2.11 Immunpräzipitation und Assoziationsassay**

Nukleäre Extrakte toleranter Zellen wurden einer Immunpräzipitation (IP) in TN-Puffer (200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 % BSA; 1 mM DTT; 0,5 µM 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid (AEBSF) sowie jeweils 0,75 µg/ml Leupeptin, Antipain, Aprotinin, Pepstatin A und Chymostatin) unterzogen. Die Fällung (über Nacht bei 4 °C) wurde mit 2 µg des jeweiligen Antikörpers (siehe 2.1.1) und 70 µl 6 %iger Protein-A-Agarose durchgeführt. Nach 5maligem Waschen in TN-Puffer (ohne Zusatz von BSA) und anschließender Zugabe von SDS-Probenpuffer (+ 10 % Glycerin) wurden die Proteine, wie in 2.2.9 beschrieben, im Polyacrylamidgel aufgetrennt und die mit dem gefällten Antigen assoziierten Proteine mittels Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen im Western Blot-Verfahren detektiert.

### **2.2.12 Statistische Auswertung**

Zur statistischen Auswertung wurde Microsoft Excel 5.0/95 eingesetzt. Unterschiede bezüglich der transkriptionellen Aktivität wurden mit Hilfe des zweiseitigen t-Tests bewertet, wobei Abweichungen bei einem p-Wert  $< 0,05$  als signifikant anerkannt wurden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (MW  $\pm$  SD) angegeben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung der Bedingungen für die TNF-Toleranz

Im Rahmen der hier präsentierten Studie wurden THP-1- und HeLa-Zellen mit TNF in niedriger Konzentration über 72 h präinkubiert, um, wie in der Literatur beschrieben (65), einen toleranzähnlichen Zustand zu erzeugen. Auf diese Weise vorbehandelte Zellen werden daher in den vorliegenden Ausführungen als „tolerante Zellen“ bezeichnet. Anschließend erfolgte eine Restimulation der Zellen mit einer deutlich höheren Dosis TNF, woraufhin die Auswirkungen der Toleranzsituation auf die TNF-induzierte IL-8-Promotor- sowie die 3κB-abhängige Transkription beurteilt wurden. Darüber hinaus wurde der Effekt dieser Behandlung auf die Produktion des IL-8-Proteins analysiert. Aufgabe der in den weiteren Kapiteln dargestellten Experimente war es, die der TNF-Toleranz zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu identifizieren.

##### 3.1.1 TNF-Toleranz in monozytären THP-1-Zellen

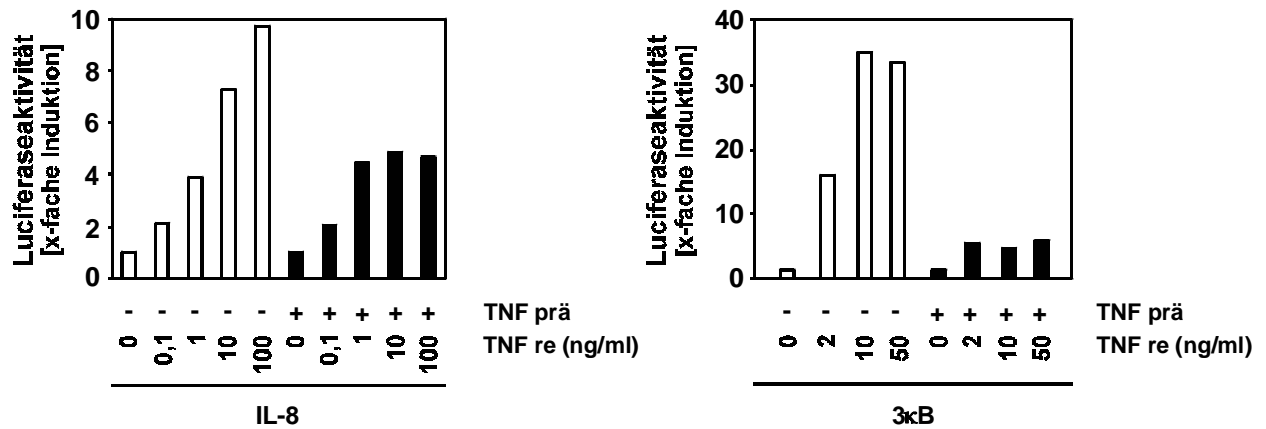
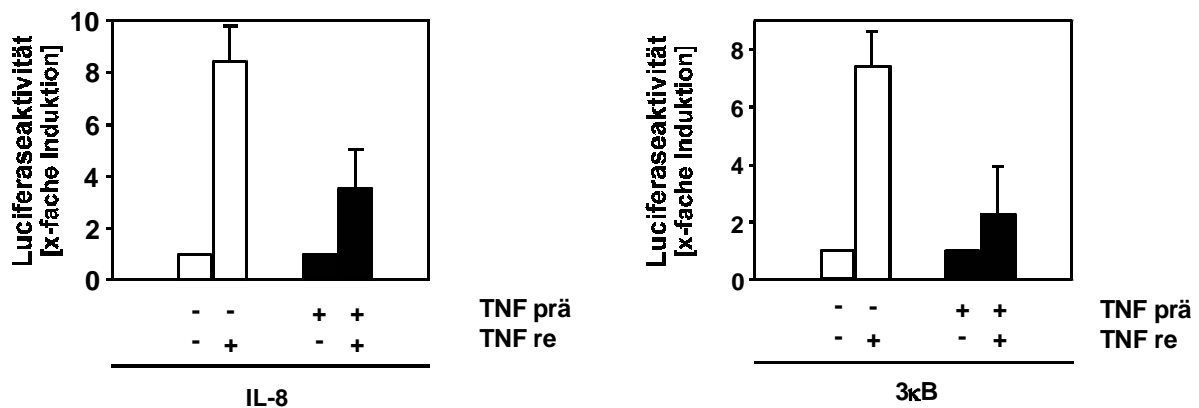
Zu Beginn wurden in monozytären THP-1-Zellen Studien zur Dosis-Wirkungs-Beziehung von TNF durchgeführt, um einen Bereich zu definieren, in dem TNF seinen Einfluß auf die IL-8-Promotor- sowie die 3κB-abhängige Transkription ausübt. Dafür wurden die Zellen in einem ersten Ansatz mit einem IL-8-Promotor-abhängigen Indikatorgenkonstrukt (pGL2-IL-8), in einem zweiten mit einem 3κB-abhängigen Reporterplasmid (3xκB.luci) und jeweils einem konstitutiv exprimierten Kontrollplasmid (pRLTk) transient kotransfiziert. Nachdem diese Zellen daraufhin mit ansteigenden TNF-Konzentrationen stimuliert worden waren, erfolgte nach einer Inkubation von 5 h die Quantifizierung der transkriptionellen Aktivität. Dabei war eine weitgehend dosisabhängige Zunahme der Transkription beider Indikatorgene innerhalb einer Spanne von 0,1 bis 100 ng/ml TNF (bei IL-8) beziehungsweise 2 bis 50 ng/ml TNF (bei 3κB) zu beobachten (Abb. 5A).

Ziel der nächsten Experimente war es, die Zellen in einen Zustand der Toleranz gegenüber TNF zu versetzen. Dafür wurden in identischer Weise wie zuvor transfizierte Zellen zunächst über 72 h mit TNF in variabler Dosis vorbehandelt. Um zu überprüfen, ob dies die Reaktions-

fähigkeit der Zellen auf eine erneute TNF-Stimulation beeinflusst, wurden sie über 5 h mit unterschiedlichen TNF-Konzentrationen restimuliert und danach die transkriptionelle Aktivität gemessen. In diesen Untersuchungen ergab sich in den TNF-präinkubierten Zellen gegenüber den mit reinem Medium vorbehandelten Kontrollzellen eine signifikante Hemmung der IL-8-Promotor- ebenso wie der 3κB-abhängigen Transkription (Abb. 5A).

Ausgehend von den erhaltenen Resultaten wurden für weitere Untersuchungen folgende Bedingungen festgelegt: Die Zellen sollten 72 h mit 1 ng/ml TNF oder TNF-freiem Medium präinkubiert (in den Abbildungen mit *prä* bezeichnet) und danach über 5 h mit einer 20fach höheren Konzentration dieses Zytokins (20 ng/ml) restimuliert werden (in den Abbildungen mit *re* angegeben). Bei der Behandlung von Zellen nach diesem Schema wurde in den mit TNF präinkubierten Zellen hinsichtlich des IL-8-Promotor-abhängigen Indikatorgenkonstrukts eine Abnahme der transkriptionellen Aktivität um etwa 59 % ( $p < 0,01$ ) gefunden, bezüglich des 3κB-abhängigen Plasmids eine Reduktion um circa 70 % ( $p < 0,02$ ), jeweils verglichen mit in reinem Medium vorbehandelten Zellen (Abb. 5B). Es war also in beiden Fällen gelungen, durch die gewählte Vorbehandlung einen Zustand der Toleranz gegenüber TNF zu erzeugen. Waschen der Zellen nach 48 h während der Präinkubationsphase zur Entfernung des TNF beeinträchtigte die Entwicklung der Toleranz nicht (Daten nicht gezeigt).

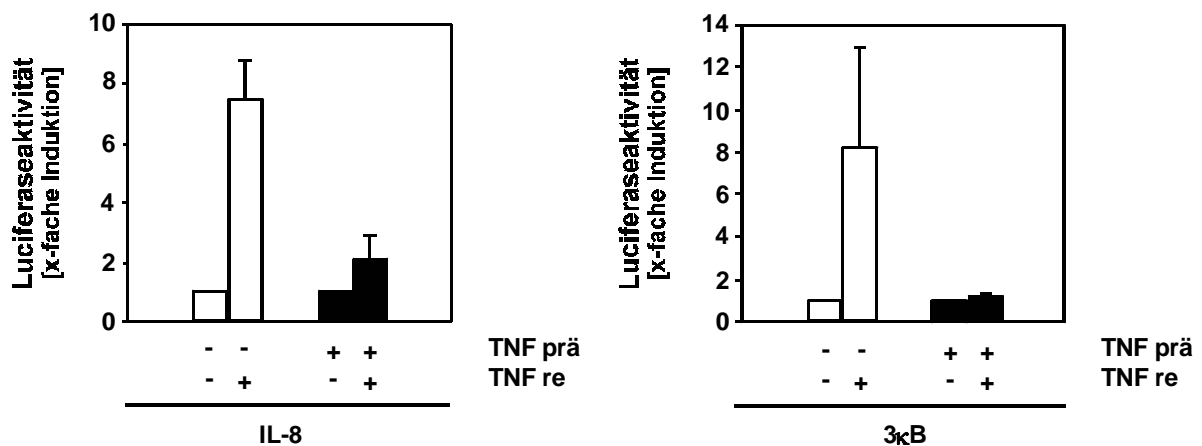
Darüber hinaus wurde in THP-1-Zellen die Expression des IL-8-Proteins unter den oben definierten Toleranzbedingungen bestimmt. Zur Quantifizierung der Proteinsynthese im Zellkulturüberstand diente ein Immunoassay. Während die Stimulation mit TNF die Produktion des IL-8-Proteins in Kontrollzellen erheblich über das Basalniveau erhöhte, war die Veränderung des IL-8-Spiegels in Zellen, die über 72 h mit TNF (1 ng/ml) vorbehandelt und anschließend mit diesem Zytokin (20 ng/ml, 5 h) restimuliert worden waren, demgegenüber um 70 % geringer (Daten nicht gezeigt). Somit standen diese Werte im Einklang mit denjenigen, die auf transkriptioneller Ebene gemessen worden waren.

**A****B**

**Abbildung 5:** Die IL-8-Promotor- und die 3κB-abhängige Transkription sind in TNF-toleranten THP-1-Zellen inhibiert. A) Monozytäre THP-1-Zellen wurden mit einem IL-8-Promotor-abhängigen bzw. einem 3κB-abhängigen Indikatorgenkonstrukt (pGL2-IL-8 bzw. 3κB.luci) sowie jeweils dem Renilla-Luciferase-Plasmid pRLTk transient kotransfiziert. Daraufhin wurden sie teils mit TNF-freiem (weiße Säulen), teils mit TNF-haltigem Medium (schwarze Säulen) über 72 h hinweg inkubiert (*TNF prä*) und anschließend während 5 h mit steigenden TNF-Dosen (*TNF re*) stimuliert. Die Luciferaseaktivität (Firefly/Renilla) als Maß für die transkriptionelle Aktivität wurde in den unstimulierten Kontrollen als 1 definiert und ausgehend davon der Faktor der transkriptionellen Aktivierung nach TNF-Behandlung berechnet. Abgebildet ist ein repräsentatives Experiment mit einer Präinkubationsdosis von 1 ng/ml TNF ( $n = 3$ ). B) Entsprechend der für weitere Experimente festgelegten Bedingungen wurden THP-1-Zellen, nachdem sie wie in A transfiziert worden waren, über 72 h mit Medium ohne bzw. mit 1 ng/ml TNF behandelt (*TNF prä*) und ein Teil davon danach mit 20 ng/ml TNF 5 h re-stimuliert (*TNF re*). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte wie in A (MW  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten).

### 3.1.2 Toleranz in HeLa-Zellen

Des Weiteren wurden Untersuchungen zur Toleranzentwicklung gegenüber TNF in HeLa-Zellen vorgenommen. Nachdem diese ihrerseits mit dem IL-8-Promotor- beziehungsweise dem 3κB-abhängigen Indikatorgenkonstrukt sowie dem Kontrollplasmid (pRLTk) transient transfiziert worden waren, zeigten anfängliche Studien zur Ermittlung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach 5stündiger Inkubation mit TNF wiederum einen konzentrationsabhängigen Anstieg der transkriptionellen Aktivität (Daten nicht gezeigt). Daher konnten dieselben experimentellen Bedingungen wie in den THP-1-Zellen angewandt werden. Nach vorausgehender 72stündiger Präinkubation mit TNF (1 ng/ml) und anschließender Restimulation der HeLa-Zellen mit diesem Zytokin (20 ng/ml, 5 h) resultierte im Vergleich zu Kontrollzellen ebenfalls eine deutliche Abnahme sowohl der IL-8-Promotor- als auch der 3κB-abhängigen Transkription (Abb. 6). Bei Verwendung des Plasmids, das die IL-8-Promotor-Region enthält, betrug sie 28 %, bei Einsatz des 3κB-abhängigen Indikatorgens sogar nur noch 14 % des in nicht vorbehandelten Zellen erreichten Wertes.



**Abbildung 6:** Hemmung der IL-8-Promotor- und der 3κB-abhängigen Transkription in HeLa-Zellen im Zustand der TNF-Toleranz. HeLa-Zellen wurden mit dem IL-8-Promotor- bzw. dem 3κB-abhängigen Indikatorgenplasmid sowie dem Renilla-Luciferase-Plasmid kotransfiziert, mit Medium (weiße Säulen) oder TNF-haltigem Medium (1 ng/ml, schwarze Säulen) über 72 h vorbehandelt (*TNF prä*) und schließlich während 5 h mit TNF (20 ng/ml) restimuliert (*TNF re*). Die Ergebnisse wurden berechnet wie in Abbildung 5 beschrieben (MW ± SD, n = 3).



## 3.2 Untersuchung des NF- $\kappa$ B-Systems

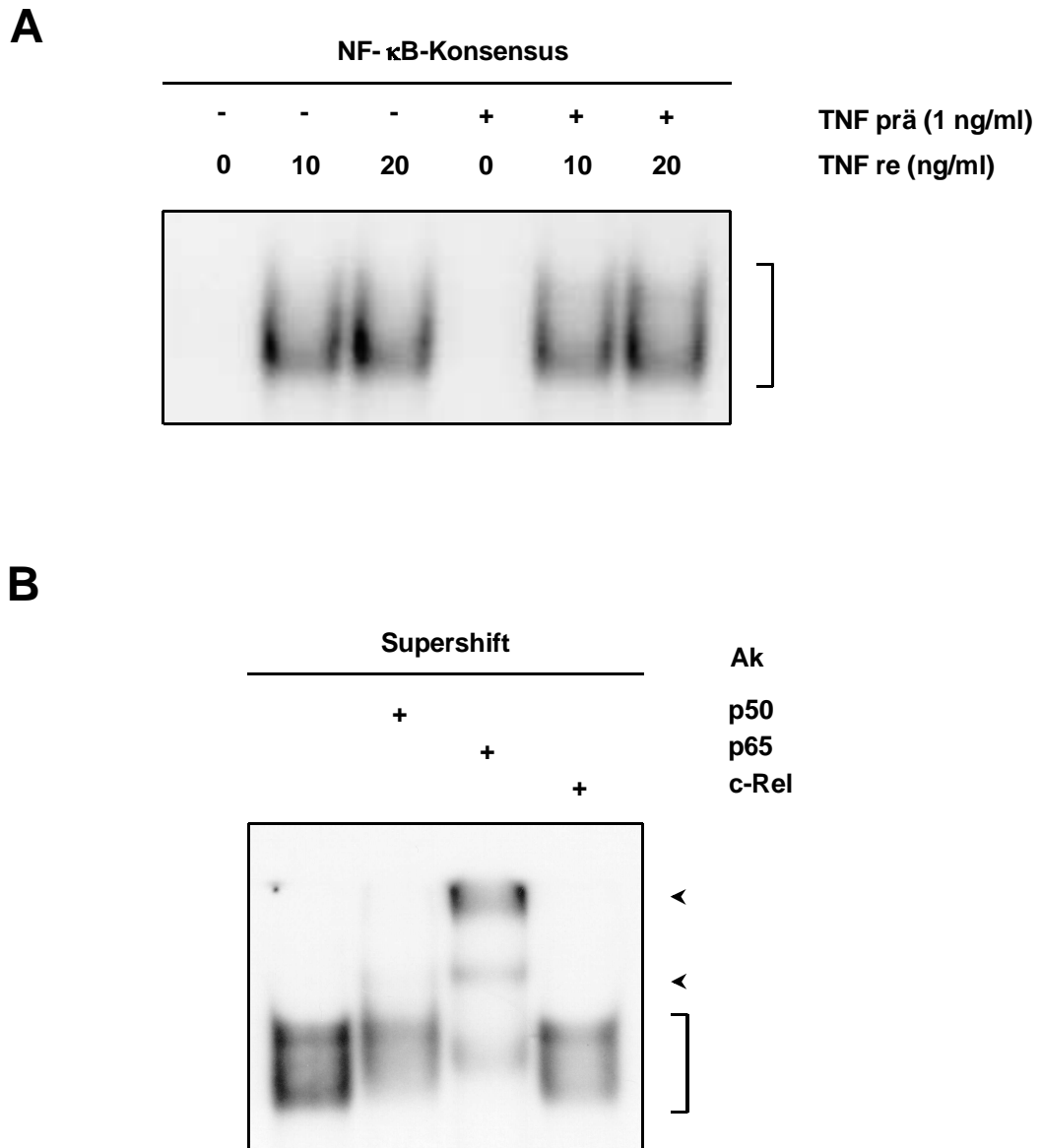
Die Ergebnisse der bisher beschriebenen Experimente legten eine Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B bei der Entstehung der TNF-Toleranz nahe, da NF- $\kappa$ B ja auch an der Steuerung der Expression des IL-8-Gens auf transkriptioneller Ebene wesentlich beteiligt ist (86, 107). Deshalb sollte analysiert werden, ob die Vorbehandlung mit einer niedrigen TNF-Dosis die Aktivierung von NF- $\kappa$ B beeinflusst.

### 3.2.1 Aktivierung von NF- $\kappa$ B

Nach 72stündiger Präinkubation mit TNF beziehungsweise Medium wurden monozytäre THP-1-Zellen über 15 min mit diesem Zytokin restimuliert und daraufhin die nukleären Proteinfractionen isoliert. In diesen wurde mittels Gelretardierungsassay die Bindungsfähigkeit von NF- $\kappa$ B-Komplexen an ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid, bestehend aus einer prototypischen  $\kappa$ B-Sequenz, untersucht. Die Restimulation der Zellen mit TNF hatte eine erhebliche Zunahme der DNA-Bindung zur Folge (Abb. 7A). Dabei fand sich jedoch kein Unterschied zwischen nicht vorbehandelten Zellen und solchen, die mit niedriger TNF-Dosis präinkubiert worden waren.

Als nächstes sollte durch eine Supershift-Analyse geklärt werden, ob die Zusammensetzung der Komplexe im Gelretardierungsassay unter Toleranzbedingungen verändert ist. Es ergab sich allerdings unabhängig von einer TNF-Vorbehandlung ein einheitliches Bild des Bandenmusters (Abb. 7B). So bewirkte die Präinkubation der Extrakte mit Antikörpern gegen p65 eine Verlangsamung des Laufverhaltens der DNA-Protein-Komplexe in der Gelelektrophorese. Bei Zugabe von Anti-p50 war dieses Phänomen nur sehr schwach sichtbar, der Antikörper führte aber zu einer deutlichen Verminderung der Bandenbildung am NF- $\kappa$ B-Konsensus-Oligonukleotid. Anti-c-Rel dagegen beeinflusste das Signalverhalten nicht. Demzufolge bestehen die aktivierten NF- $\kappa$ B-Komplexe unter beiden Bedingungen vorwiegend aus den Untereinheiten p65 und p50.

Analoge Experimente wurden unter Verwendung eines Oligonukleotids durchgeführt, welches das  $\kappa$ B-Motiv des humanen IL-8-Promotors (NF- $\kappa$ B (IL-8), siehe auch Abb. 4 in Material und Methodik) beinhaltet. Wiederum induzierte die Stimulation mit TNF eine signifikante NF- $\kappa$ B-Aktivierung. In diesem Fall war sie in präinkubierten Zellen sogar etwas stärker ausgeprägt als in nicht vorbehandelten Kontrollen (Abb. 8A).



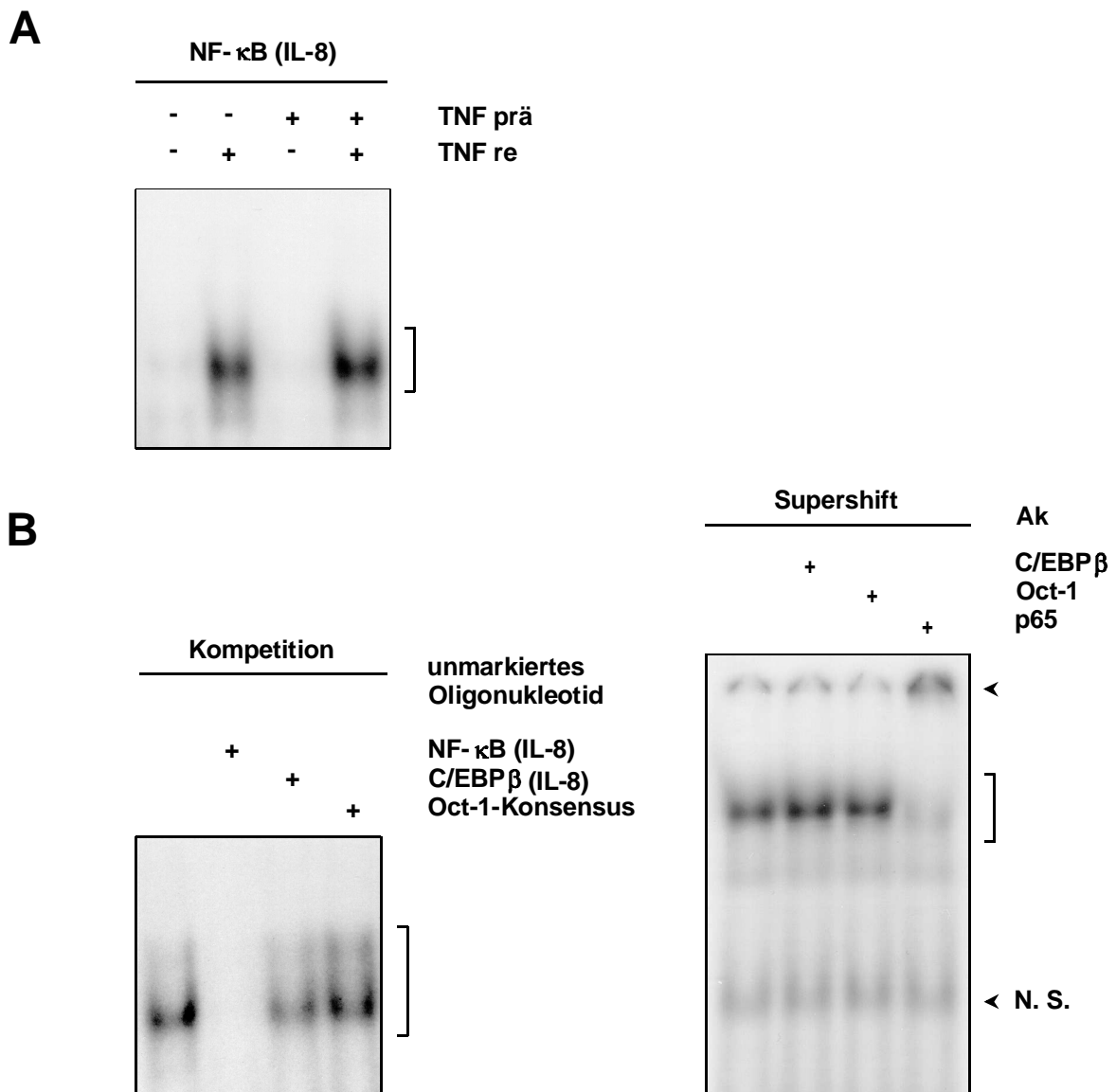
**Abbildung 7:** In TNF-toleranten Zellen ist die NF- $\kappa$ B-Aktivierung unbeeinflusst. Monozytäre THP-1-Zellen wurden mit Medium ohne Zusatz von TNF oder mit TNF-haltigem Medium (1 ng/ml, *TNF prä*) für die Dauer von 72 h inkubiert und blieben anschließend unbehandelt oder wurden erneut über 15 min mit TNF stimuliert (*TNF re*; 0, 10 bzw. 20 ng/ml). A) Nukleäre Extrakte wurden mittels Gelretardierungsassay analysiert. Verwendet wurde hierfür ein prototypisches NF- $\kappa$ B-Konsensus-Oligonukleotid (NF- $\kappa$ B-Konsensus). Die Klammer zeigt die Position der NF- $\kappa$ B-enthaltenden Komplexe an. B) Die präinkubierte und restimulierte (20 ng/ml TNF, 15 min) Probe wurde des weiteren mit Hilfe der Supershift-Analyse untersucht. Dabei kamen Antikörper (Ak) gegen p50, p65 und c-Rel zum Einsatz. Die Pfeile markieren die durch die Antikörperbindung verlangsamten p50- bzw. p65-enthaltenden Komplexe. Es sind jeweils repräsentative Experimente dargestellt, die mindestens fünfmal durchgeführt wurden.

Mit Hilfe von Kompetitionsstudien, bei denen die Extrakte vor der Auftrennung in der Gelelektrophorese mit einem Überschuß an nicht radioaktiv markierten Oligonukleotiden präinkubiert wurden, ließ sich die Spezifität der Bindung von NF- $\kappa$ B nachweisen. Nur mit dem NF- $\kappa$ B (IL-8)-Oligonukleotid wurde in diesen Untersuchungen eine Abschwächung des Signals erzielt, nicht aber mit Oligonukleotiden, die Sequenzen von Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren des IL-8-Promotors tragen (Abb. 8B). Die NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 konnte auch hier mittels Supershift-Analyse infolge der Entstehung einer langsamer laufenden Bande als Bestandteil der aktivierten NF- $\kappa$ B-Komplexe bestätigt werden, während keiner der anderen eingesetzten Antikörper das Signal des Gelretardierungsassays veränderte (Abb. 8B).

### 3.2.2 I $\kappa$ B-Proteolyse und nukleäre Translokation von p50/p65-Komplexen

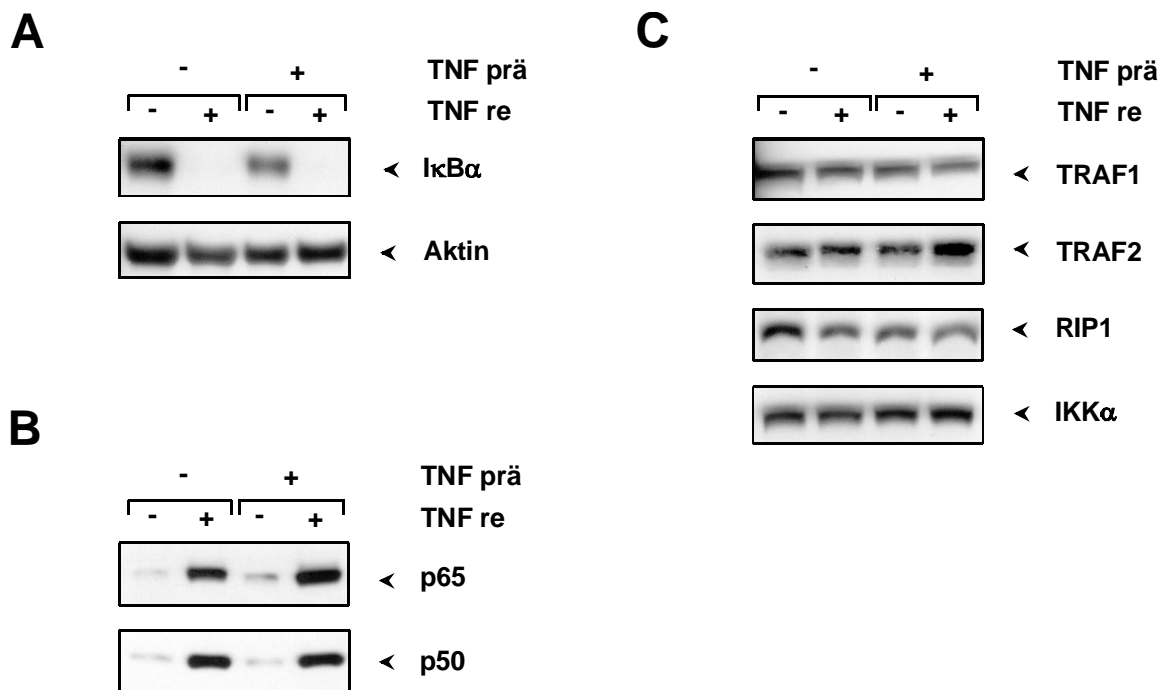
Ferner wurden in zytosolischen Extrakten, die ebenfalls im Anschluß an die oben beschriebene Behandlung der Zellen gewonnen worden waren, die Konzentrationsveränderungen von I $\kappa$ B $\alpha$  unter den Bedingungen der TNF-Toleranz untersucht. Erwartungsgemäß bewirkte eine Stimulation mit TNF den proteolytischen Abbau dieses NF- $\kappa$ B-Inhibitorproteins (Abb. 9A). Auch nach TNF-Präinkubation wurde in diesen Experimenten keine Beeinträchtigung der Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  durch Restimulation mit TNF beobachtet. Es sei erwähnt, daß zudem in Zellen, die über 72 h mit TNF vorbehandelt worden waren, der Bestand an I $\kappa$ B $\alpha$  bereits ohne Restimulation – wenngleich nur geringfügig – reduziert war, verglichen mit Zellen, die keinerlei Kontakt mit TNF hatten. Die Konzentration von Aktin wurde als Kontrolle der Ladung sowie der Qualität der analysierten zytosolischen Extrakte bestimmt. Sie blieb unabhängig von der Behandlung der Zellen stets konstant.

Die Proteolyse des Inhibitorproteins I $\kappa$ B ermöglicht die nukleäre Translokation der freigesetzten NF- $\kappa$ B-Komplexe (6, 47, 54, 135). Dementsprechend resultierte, wie sich bei der Untersuchung der nukleären Extrakte mittels Western Blot-Verfahren zeigte, nach Stimulation mit TNF eine Zunahme des Niveaus der NF- $\kappa$ B-Untereinheiten p65 und p50 im Zellkern. Hierbei ließ sich kein wesentlicher Unterschied zwischen TNF-präinkubierten und nicht vorbehandelten Zellen feststellen (Abb. 9B).



**Abbildung 8:** TNF-Toleranz beeinträchtigt nicht die DNA-Bindung NF- $\kappa$ B-enthaltender Komplexe am IL-8-Promotor-Oligonukleotid. Die THP-1-Zellen wurden über 72 h ohne bzw. mit TNF (1 ng/ml) präinkubiert (*TNF prä*) und ein Teil davon daraufhin mit TNF (15 min, 20 ng/ml) stimuliert (*TNF re*). A) Nukleäre Extrakte wurden mit Hilfe des Gelretardierungsassays untersucht, wobei ein Oligonukleotid eingesetzt wurde, welches das NF- $\kappa$ B-Motiv des IL-8-Promotors enthält (NF- $\kappa$ B (IL-8)), siehe auch Abb. 4 in Material und Methodik). Die Position der NF- $\kappa$ B-haltigen Komplexe ist durch eine Klammer gekennzeichnet. B) Mit einem Extrakt präinkubierter und restimulierter Zellen wurden außerdem Wettbewerbs- und Supershift-Analysen durchgeführt. In den Wettbewerbstudien wurden die Extrakte mit einem 100fachen Überschuß nicht markierter Oligonukleotide (NF- $\kappa$ B (IL-8), C/EBP $\beta$  (IL-8) bzw. Oct-1-Konsensus), für die Supershift-Analysen mit Antikörpern (Ak) gegen p65, Oct-1 sowie C/EBP $\beta$  präinkubiert. Der Pfeil zeigt die Position verlangsamerter, p65-enthaltender Komplexe an. Gezeigt sind repräsentative Experimente (n = 5). N. S.: nichtspezifische Bande.

In den zytosolischen Extrakten wurden außerdem Moleküle wie TRAF1, TRAF2, RIP1 und IKK $\alpha$  betrachtet. Diese sind an durch TNF initiierten Signalwegen beteiligt, welche zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen (15). Aus den Ergebnissen der Western Blot-Analyse ging hervor, daß weder die Stimulation noch die Präinkubation mit TNF die Konzentration dieser Moleküle signifikant verändern konnte (Abb. 9C).



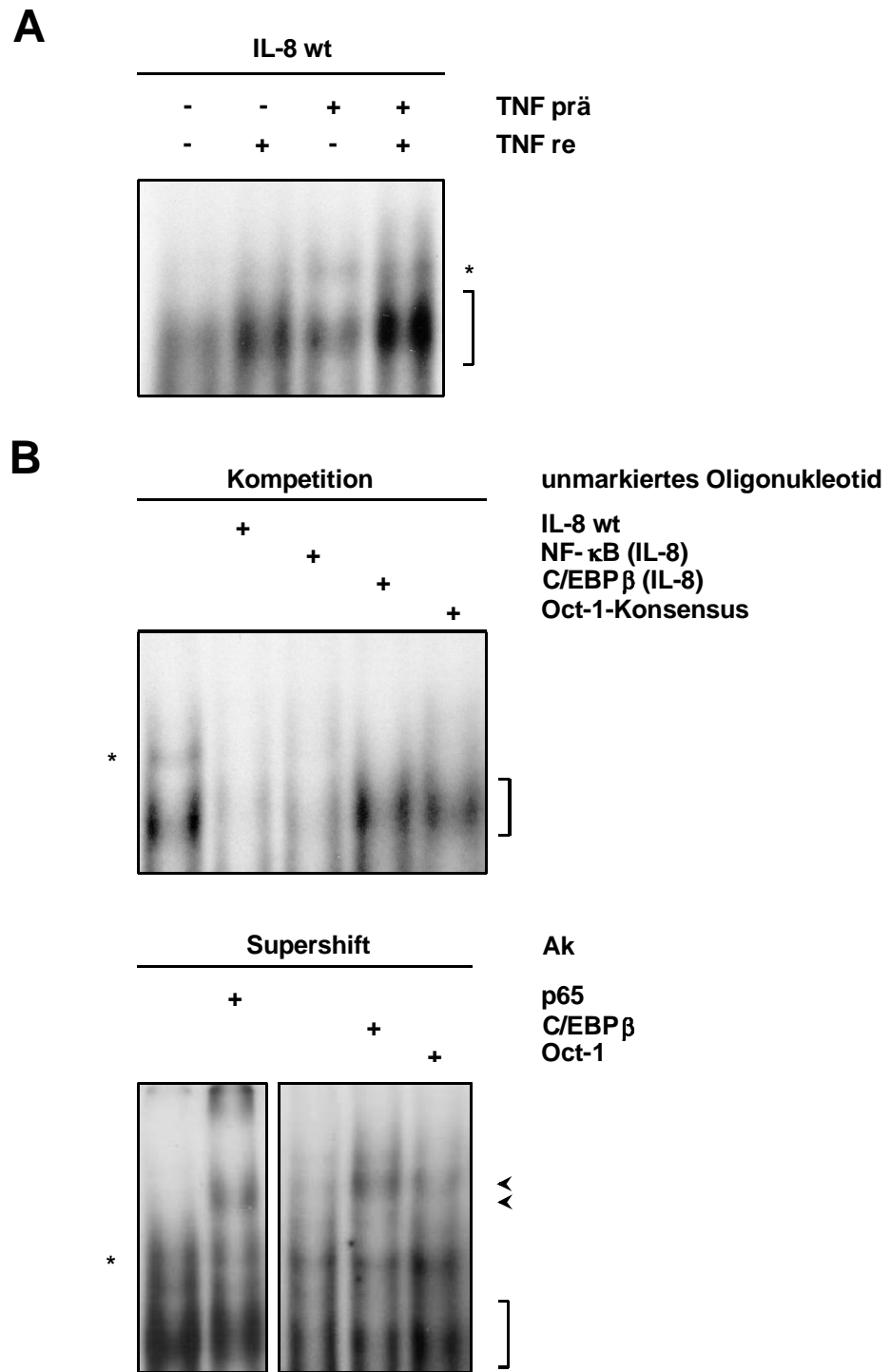
**Abbildung 9:** I $\kappa$ B-Proteolyse und nukleäre Translokation von p50/p65-Komplexen in TNF-toleranten Zellen. THP-1-Zellen wurden wie in Abbildung 8 beschrieben mit TNF vorbehandelt und restimuliert. Zytosolische (A und C) und nukleäre (B) Extrakte wurden mittels Western Blot-Verfahren auf die Anwesenheit der angegebenen Proteine (Pfeile) untersucht. Die abgebildeten Experimente wurden jeweils mindestens fünfmal durchgeführt.

### 3.3 Die Rolle von C/EBP $\beta$ bei der TNF-Toleranz

#### 3.3.1 C/EBP $\beta$ als Komponente DNA-bindender Komplexe am IL-8-Promotor-Oligonukleotid unter TNF-Toleranz-Bedingungen

NF- $\kappa$ B reguliert die Expression des IL-8-Gens im Zusammenwirken mit weiteren Transkriptionsfaktoren, darunter C/EBP $\beta$  und Oct-1 (107, 123, 152). Daher wurden nun Gelretardierungsassays durchgeführt, bei denen ein aus 35 DNA-Basenpaaren bestehendes Oligonukleotid eingesetzt wurde, das sowohl die NF- $\kappa$ B- als auch die C/EBP $\beta$ - und die Oct-1-Bindungsstelle des IL-8-Promotors umfaßt (IL-8 Wildtyp (wt), vergleiche Abb. 4 in Material und Methodik). Wie bereits in den vorausgehenden Experimenten (siehe Abb. 8) ließ sich auch bei Verwendung dieses Oligonukleotids eine erhöhte Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B-enthaltenden Komplexen in TNF-stimulierten THP-1-Zellen nachweisen, unabhängig davon, ob eine Präinkubation mit TNF in niedriger Dosis vorgenommen worden war (Abb. 10A). Bemerkenswerterweise wurde hier außerdem eine höher laufende Bande detektiert (in Abb. 10A mit einem Stern markiert), die in den vorbehandelten und anschließend restimulierten Zellen am intensivsten ausfiel.

Kompetitionsstudien belegten die Spezifität der Banden, da das IL-8 wt-Oligonukleotid als Kompetitor das Signal dieser Probe (*TNF prä +*, *TNF re +*) auslöschte (Abb. 10B). Auch die Zugabe von Oligonukleotiden, die entweder die NF- $\kappa$ B- beziehungsweise die C/EBP $\beta$ - Bindungsregion des IL-8-Promotors oder eine Oct-1-Konsensussequenz enthalten (Oligonukleotide wie in Abb. 4 in Material und Methodik beschrieben), rief jeweils eine Abschwächung hervor. Durch alle Oligonukleotide konnte darüber hinaus eine Hemmung insbesondere der erwähnten zusätzlichen Bande erzielt werden. In der Supershift-Analyse erschienen beim Einsatz von Antikörpern gegen C/EBP $\beta$  und Oct-1 ebenso wie gegen p65 langsamer laufende Banden. Die Resultate der Kompetitions- und Supershift-Studien legen somit nahe, daß die Proteine C/EBP $\beta$ , Oct-1 und p65 an das IL-8 wt-Oligonukleotid binden (Abb. 10B). Dabei sei darauf hingewiesen, daß C/EBP $\beta$  gleichfalls als Komponente des Signals identifiziert werden konnte, wenn Extrakte präinkubierter, aber nicht stimulierter Zellen (*TNF prä +*, *TNF re -*) mit Hilfe des Supershift-Verfahrens analysiert wurden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 10:** C/EBPβ ist ein Bestandteil des am IL-8 wt-Oligonukleotid bindenden Komplexes unter TNF-Toleranzbedingungen. Monozytäre THP-1-Zellen wurden mit Medium ohne TNF oder TNF-haltigem Medium (1 ng/ml) für 72 h inkubiert (*TNF prä*) und ein Teil davon anschließend erneut mit TNF (20 ng/ml) stimuliert (*TNF re*). A) Nukleäre Extrakte wurden mit dem radioaktiv markierten IL-8 wt-Oligonukleotid inkubiert und daraufhin mit Hilfe des Gelretardierungsassays analysiert. Die Klammer gibt die Position NF-κB-enthaltender Komplexe an. \* bezeichnet einen Komplex mit geringerer Wanderungsgeschwindigkeit. B) Der Extrakt präinkubierter und restimulierter Proben wurde zusätzlich mittels Kompetitions- und Supershift-Analyse untersucht. In den Kompetitionsstudien wurde ein 100facher Überschuß nicht markierter Oligonukleotide (IL-8 wt, NF-κB (IL-8), C/EBPβ (IL-8) oder Oct-1-Konsensus) verwendet. Bei der Durchführung der Supershift-Analyse kamen Antikörper (Ak) gegen p65, C/EBPβ oder Oct-1 zum Einsatz. Die durch die Antikörperbindung in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit verlangsamten Komplexe sind mit Pfeilen markiert. Die Abbildung zeigt Beispiele von je fünf unabhängigen Experimenten.

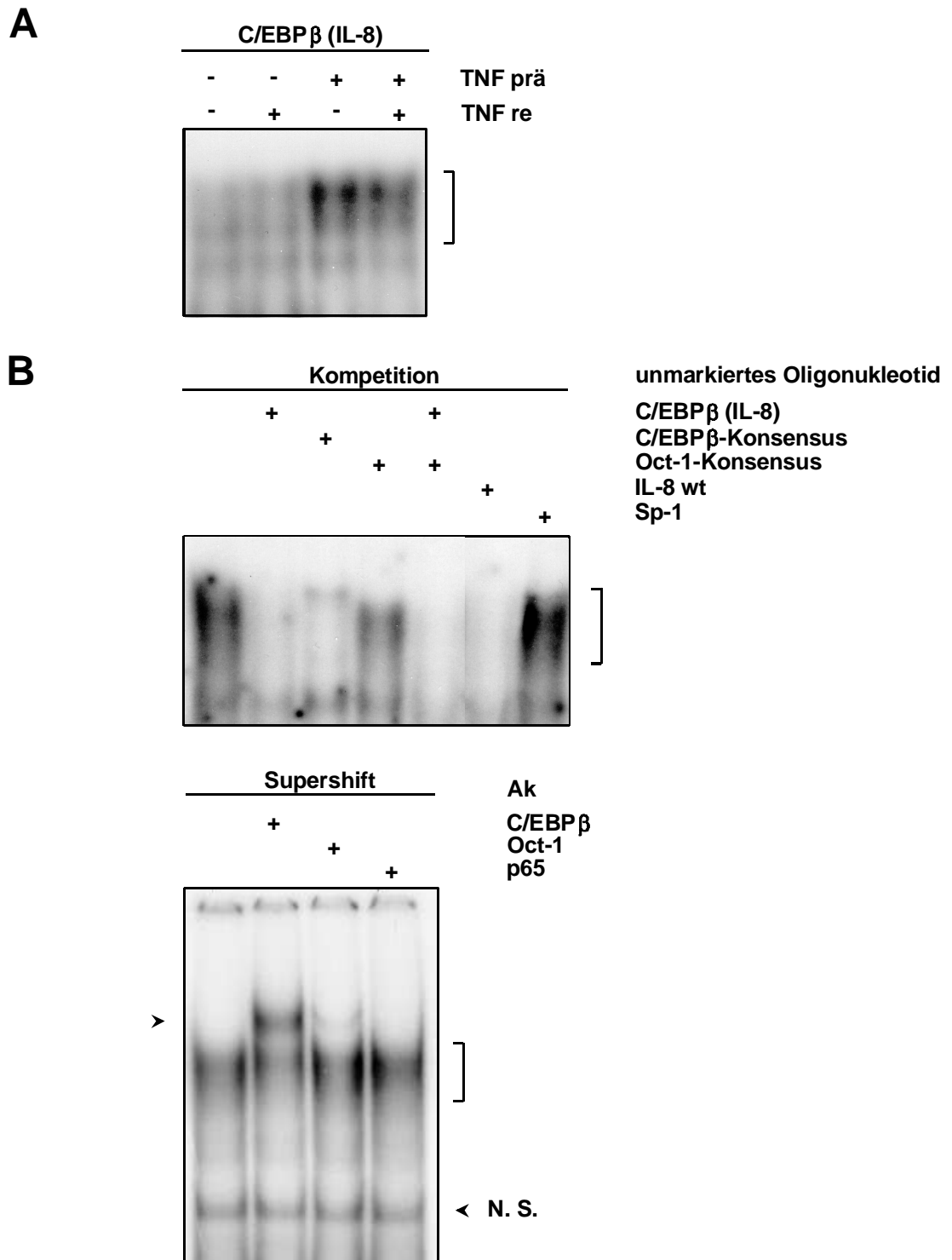
### 3.3.2 Erhöhte DNA-Bindungsaktivität von C/EBP $\beta$ sowie vermehrte Assoziation dieses Proteins mit p65 in TNF-toleranten Zellen

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde daraufhin die Affinität von C/EBP $\beta$  zum IL-8-Promotor-Oligonukleotid in toleranten Zellen unter Verwendung eines Oligonukleotids untersucht, das nur die C/EBP $\beta$ -Bindungsstelle des IL-8-Promotors umfaßt (C/EBP $\beta$  (IL-8), siehe Abb. 4 in Material und Methodik). Bei der Auftrennung der Extrakte nicht vorbehandelter Zellen sowohl mit als auch ohne TNF-Stimulation war im Gelretardierungsassay nur eine relativ schwache DNA-Protein-Komplexbildung sichtbar (Abb. 11A). In TNF-toleranten Zellen ließ sich demgegenüber eine erheblich stärkere Bindung nukleärer Proteine an die C/EBP $\beta$ -Stelle beobachten.

In Kompetitionstudien verschwand das Signal nach Präinkubation mit dem C/EBP $\beta$  (IL-8)-Oligonukleotid ebenso wie mit der IL-8 wt-Sequenz vollständig (Abb. 11B). Zusätzlich wurde ein C/EBP $\beta$ -Konsensus-Oligonukleotid als Kompetitor eingesetzt, das die DNA-Protein-Komplexbildung, abgesehen von einer diskreten Restbande, ebenfalls komplett verhinderte. Auch ein kompetitierendes Oct-1-Oligonukleotid schwächte das Signal ab. Die Hemmung war hier allerdings deutlich geringer ausgeprägt und zeigte sich insbesondere im obersten Anteil der Bande, entsprechend dem Bereich, der durch das C/EBP $\beta$ -Konsensus-Oligonukleotid nicht vollständig ausgelöscht wurde. In der Supershift-Analyse traten nach Zugabe von C/EBP $\beta$ - und Oct-1-Antikörpern höher laufende Banden auf (Abb. 11B). Dies bestätigte die Beteiligung der beiden Proteine an der Komplexbildung mit dem C/EBP $\beta$  (IL-8)-Oligonukleotid. Eine Inkubation der Extrakte mit p65-Antikörpern veränderte das Signal in der Supershift-Analyse dagegen nicht.

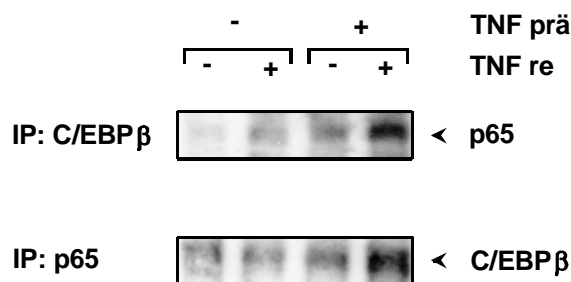
In analogen Studien wurde ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid benutzt, das eine C/EBP $\beta$ -Konsensussequenz trägt (siehe Abb. 4 in Material und Methodik; Daten nicht gezeigt). In diesem Fall bestand in gleicher Weise wie bei den Untersuchungen am C/EBP $\beta$  (IL-8)-Oligonukleotid in toleranten Zellen eine erhöhte Bindungsaffinität. Kompetition- und Supershift-Analysen konnten die Spezifität dieses Oligonukleotids für C/EBP $\beta$  zeigen, während neben p65 auch Oct-1 nicht in den DNA-bindenden Komplexen vorhanden zu sein schien.





**Abbildung 11:** Erhöhte DNA-Bindungsaktivität von C/EBP $\beta$  in toleranten Zellen. Monozytäre Zellen wurden wie in Abbildung 10 beschrieben präinkubiert und restimuliert. A) Nukleäre Extrakte wurden unter Verwendung des radioaktiv markierten C/EBP $\beta$  (IL-8)-Oligonukleotids inkubiert und mittels Gelretardierungsassay analysiert. Die Klammer zeigt die Position C/EBP $\beta$ -enthaltender Komplexe an. B) Kompetitionstudien mit einem 100fachen Überschuß unmarkierter Oligonukleotide (C/EBP $\beta$  (IL-8), C/EBP $\beta$ -Konsensus, Oct-1-Konsensus, IL-8 wt oder Sp-1) wurden mit nukleären Extrakten der vorbehandelten und restimulierten Probe durchgeführt. Die gleichen Extrakte wurden mit Hilfe des Supershift-Verfahrens untersucht und hierfür vor der Auftrennung mittels Gelretardierungsassay mit Antikörpern (Ak) gegen C/EBP $\beta$ , Oct-1 oder p65 präinkubiert. Der Pfeil kennzeichnet verlangsamt laufende Komplexe (Darstellung repräsentativer Experimente;  $n \geq 5$ ; N. S.: nichtspezifische Bande).

In früheren Studien wurde mehrfach eine funktionelle und physikalische Assoziation zwischen Mitgliedern der NF- $\kappa$ B- und der C/EBP-Protein-Familie demonstriert (69, 102, 123, 125). Deshalb wurde in den folgenden Experimenten die Assoziation von C/EBP $\beta$  mit NF- $\kappa$ B-enthaltenden Komplexen in nicht präinkubierten sowie in toleranten Zellen überprüft. Dazu wurde C/EBP $\beta$  in nukleären Extrakten von wie oben beschrieben behandelten Zellen durch Immunpräzipitation gefällt. Im erhaltenen Präzipitat wurde mittels Western Blot-Technik das Vorhandensein von p65 quantifiziert. In einem reziproken Ansatz wurde in entsprechenden Zellextrakten p65 immunpräzipitiert. Hier wurde anschließend C/EBP $\beta$  mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens detektiert (Abb. 12). In beiden Experimenten fand sich übereinstimmend eine vermehrte Assoziation von C/EBP $\beta$  mit p65-enthaltenden Komplexen in TNF-toleranten gegenüber nicht vorbehandelten Zellen, die nach erneuter Stimulation mit TNF am intensivsten ausgeprägt war.



**Abbildung 12:** Zunahme der Assoziation von C/EBP $\beta$  mit p65-enthaltenden Komplexen unter den Bedingungen der TNF-Toleranz. Mit den nukleären Fraktionen der für die Experimente in Abbildung 11 verwendeten Extrakte wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt, in der ein Antikörper gegen C/EBP $\beta$  (im oberen Teil) oder p65 (im unteren Teil) eingesetzt wurde. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens auf die Anwesenheit von p65 (im oberen Teil) bzw. C/EBP $\beta$  (im unteren Teil) untersucht. Drei unabhängige Wiederholungen der Experimente führten zum selben Ergebnis.

### 3.3.3 Hemmung der TNF-induzierten IL-8-Promotor- und 3κB-abhängigen Transkription durch Überexpression von C/EBPβ

Um zu beurteilen, ob C/EBPβ an der Regulation der TNF-induzierten IL-8-Promotor- und 3κB-abhängigen Transkription beteiligt ist, wurden Überexpressionsstudien durchgeführt. Dafür wurden HeLa-Zellen zunächst mit dem IL-8-Promotor-abhängigen Indikatorgenkonstrukt sowie jeweils dem Renilla-Kontrollplasmid (pRLTk) transient transfiziert, die auch in den unter 3.1.1 aufgeführten Experimenten verwendet worden waren. Nun aber wurden gleichzeitig Expressionsplasmide, die für das C/EBPβ-Protein als Wildtyp beziehungsweise in mutierter Form kodieren, oder ein CMV-Vektor als negative Kontrolle kotransfiziert. Nach 24 h blieb ein Teil der Zellen unbehandelt, der andere wurde über 5 h mit 20 ng/ml TNF stimuliert und danach mit Hilfe von Luciferase-Reporter-Assays die transkriptionelle Aktivität bestimmt.

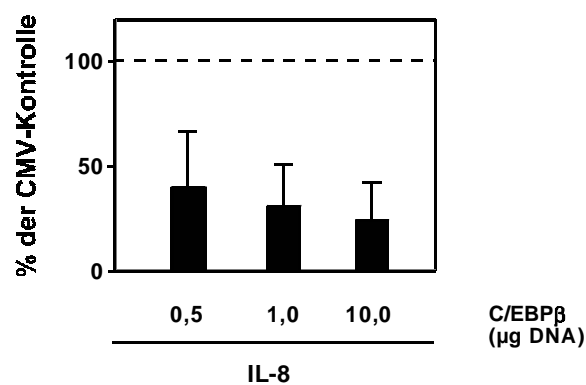
In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, daß die TNF-induzierte Zunahme der IL-8-Promotor-abhängigen Transkription durch die Überexpression des C/EBPβ-Wildtyp-Proteins erheblich abgeschwächt wurde (Abb. 13A). Im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Beziehung verstärkte sich der Effekt bei ansteigender Menge an transfiziertem C/EBPβ-Plasmid, jeweils verglichen mit CMV-transfizierten Kontrollzellen. Bei Einsatz von 10 µg Plasmid reduzierte das C/EBPβ Wildtyp-Protein die transkriptionelle Aktivität auf 24 % des Wertes, der in mit dem CMV-Kontrollplasmid transfizierten Zellen erzielt wurde (Abb. 13B, links). Bei Überexpression des mutierten Proteins dagegen wurde keinerlei Hemmung der IL-8-Promotor-abhängigen Transkription beobachtet.

In analoger Weise wurde das 3κB-abhängige Indikatorgenkonstrukt in HeLa-Zellen gemeinsam mit den C/EBPβ-Expressionsplasmiden sowie den Renilla- und CMV-Kontrollplasmiden kotransfiziert. In diesen Experimenten resultierte bei der Überexpression des C/EBPβ-Wildtyp-Proteins ebenfalls eine deutliche Abnahme der TNF-induzierten 3κB-abhängigen Transkription. Diese sank im betrachteten Dosisbereich bis auf 20 % (10 µg transfiziertes Plasmid) des bei der Analyse CMV-transfizierter Zellen erhaltenen Wertes (Abb. 13B, rechts). Das mutierte Plasmid hatte wiederum keinen Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität.

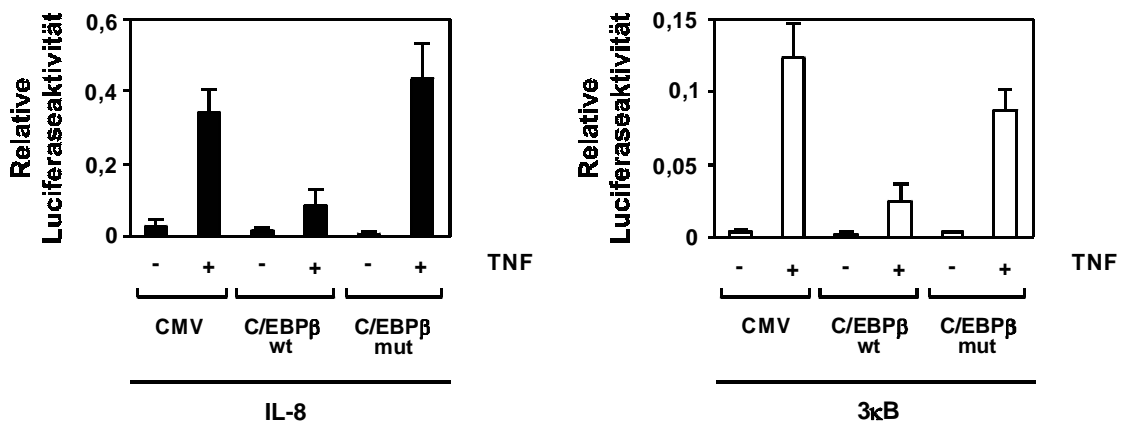
Der Erfolg der Überexpression wurde in beiden Ansätzen auf zwei Ebenen überprüft. Dazu wurden aus jeweils identisch transfizierten HeLa-Zellen, die am nächsten Tag teils nicht stimuliert, teils über 15 min mit 20 ng/ml TNF inkubiert worden waren, zytosolische und nukleäre Extrakte gewonnen. In diesen konnte zum einen mittels Western Blot-Analyse eine

signifikant höhere Konzentration der überexprimierten Proteine gegenüber nicht beziehungsweise CMV-transfizierten Zellen nachgewiesen und somit die Effizienz des Verfahrens kontrolliert werden (Daten nicht gezeigt). Zum anderen ergaben sich in Zellen, in denen die C/EBP $\beta$ -Proteine exprimiert worden waren, im Vergleich zu den Kontrollen verstärkte Signale bei der Durchführung von Gelretardierungsassays unter Verwendung des IL-8 wt- sowie des C/EBP $\beta$  (IL-8)-Oligonukleotids (Daten nicht gezeigt).

A



B



**Abbildung 13:** Die TNF-induzierte IL-8-Promotor- und 3 $\kappa$ B-abhängige Transkription wird durch Überexpression von C/EBP $\beta$  inhibiert. A) HeLa-Zellen wurden mit pGL2-IL-8, pRLTk und einer zunehmenden Menge eines für C/EBP $\beta$  Wildtyp (wt) kodierenden Überexpressionsplasmids bzw. eines CMV-Kontrollplasmids kotransfiziert. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen mit TNF stimuliert (20 ng/ml, 5 h). Die TNF-induzierte transkriptionelle Aktivität der CMV-transfizierten Kontrolle wurde jeweils als 100 % definiert (gestrichelte Linie) und die Aktivität der C/EBP $\beta$  wt-transfizierten Zellen im Verhältnis dazu dargestellt (MW  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten). B) HeLa-Zellen wurden mit dem IL-8-Promotor- bzw. dem 3 $\kappa$ B-abhängigen Indikatorgenplasmid, pRLTk und 10  $\mu\text{g}$  der Überexpressionsplasmide für C/EBP $\beta$  wt bzw. C/EBP $\beta$  in mutierter Form (mut) oder des CMV-Kontrollplasmids kotransfiziert. Am folgenden Tag wurden diese nicht behandelt (-) bzw. mit TNF stimuliert (20 ng/ml, 5 h, +). Die Ergebnisse sind als relative Luciferaseaktivitäten (Firefly/Renilla) abgebildet (MW  $\pm$  SD, n = 3).

### **3.4 Charakterisierung von Oct-1 in TNF-toleranten Zellen**

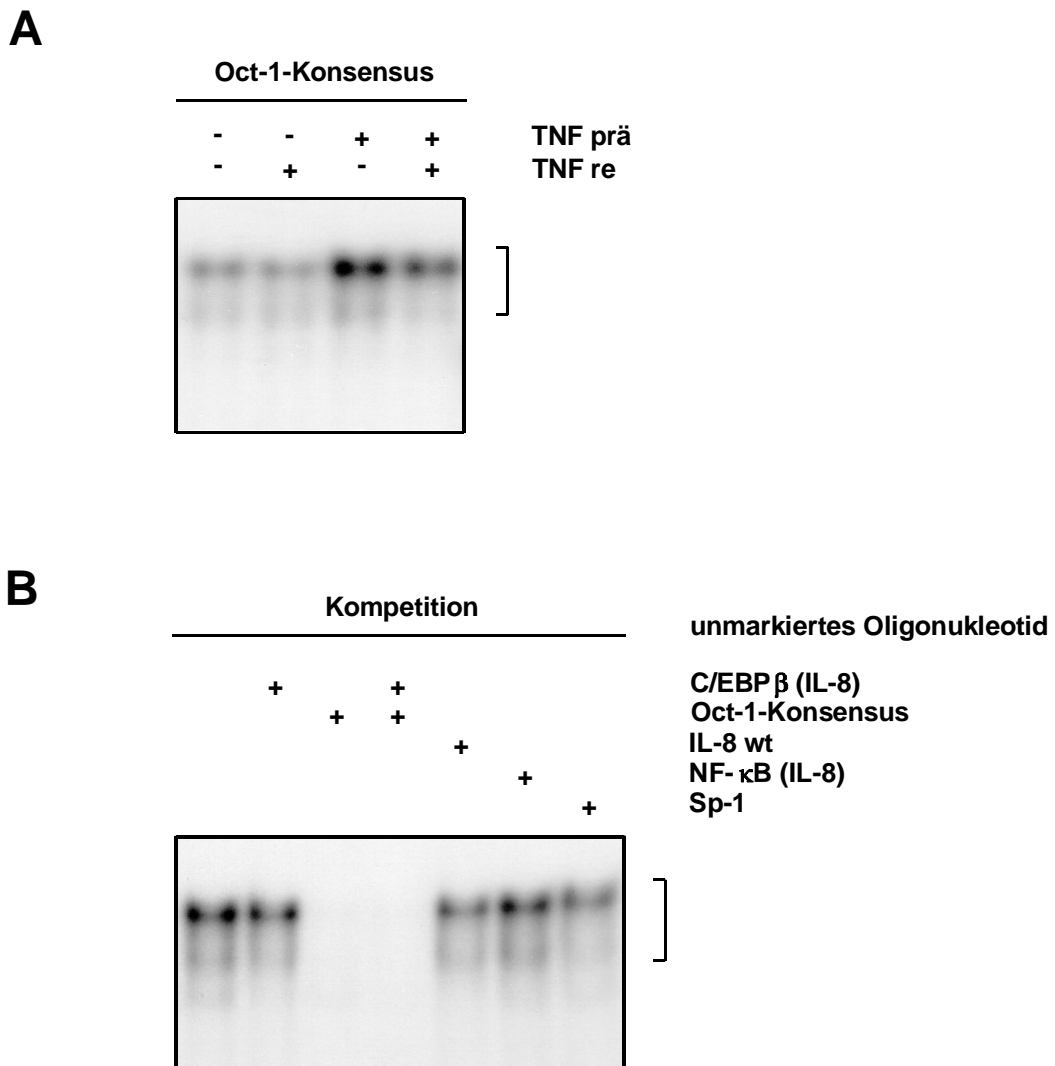
#### **3.4.1 Zunahme der DNA-Bindungsaktivität von Oct-1 in TNF-toleranten Zellen**

Auch der Transkriptionsfaktor Oct-1 war in den am IL-8 wt-Oligonukleotid bindenden DNA-Protein-Komplexen identifiziert worden (vergleiche 3.3.1). Seine DNA-Bindungsaktivität in den Extrakten der THP-1-Zellen wurde daher anhand eines Oligonukleotids, das nur eine Oct-1-Konsensussequenz trägt (siehe Abb. 4 in Material und Methodik), näher beleuchtet. Hier fand sich ebenfalls eine gesteigerte DNA-Bindung in TNF-toleranten Zellen sowohl mit als auch ohne Restimulation (Abb. 14A). Die Analyse von Extrakten nicht vorbehandelter Zellen lieferte demgegenüber nur schwache Signale.

In Konkurrenzexperimenten verhinderte die Koinkubation mit einem Überschuß an nicht radioaktiv markiertem Oct-1-Konsensus-Oligonukleotid die Entstehung einer sichtbaren Bande. Dadurch wurde die weitgehende Spezifität des verwendeten Oligonukleotids für Oct-1 belegt, denn durch die Zugabe des C/EBP $\beta$  (IL-8)- sowie des IL-8 wt-Oligonukleotids wurde nur eine sehr leichte Abnahme und durch das NF- $\kappa$ B (IL-8)-Oligonukleotid keinerlei Effekt hervorgerufen (Abb. 14B). Bei der Durchführung der Supershift-Analyse ergab sich lediglich bei Einsatz des Oct-1-Antikörpers eine Veränderung der Wanderungsgeschwindigkeit des Komplexes, nicht aber bei Inkubation mit C/EBP $\beta$ - und p65-Antikörpern (Daten nicht gezeigt). Daraus läßt sich schließen, daß Oct-1 im Gegensatz zu den anderen untersuchten Transkriptionsfaktoren in den DNA-bindenden Komplexen enthalten war.

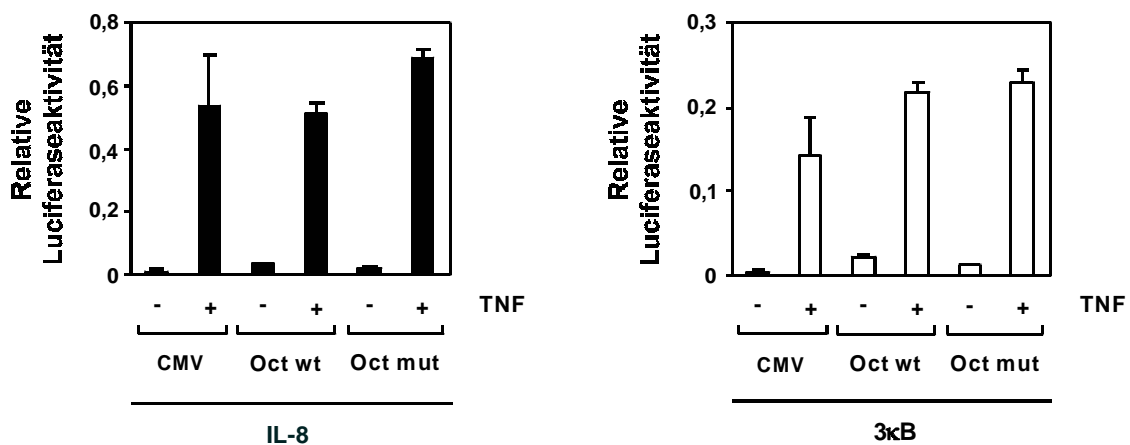
#### **3.4.2 Effekt von Oct-1 auf die TNF-induzierte IL-8-Promotor- und 3 $\kappa$ B-abhängige Transkription**

Zur Klärung der funktionellen Bedeutung des Transkriptionsfaktors Oct-1 im Rahmen der TNF-Toleranz wurden in Überexpressionsstudien erneut HeLa-Zellen mit je einem der beiden Indikatorgenplasmide, dem Renilla-Kontrollplasmid sowie entweder dem CMV-Kontrollvektor oder Expressionsplasmiden für Oct-1 in Wildtyp- beziehungsweise mutierter Form kotransfiziert. Zunächst wurden nukleäre und zytosolische Extrakte isoliert, die wiederum mit Hilfe sowohl des Western Blot-Verfahrens als auch des Gelretardierungsassays analysiert wurden. In den entsprechend transfizierten Zellen konnten so die vermehrte Expression der Oct-1-Proteine und ihre Fähigkeit zur Bildung von DNA-Protein-Komplexen mit geeigneten Oligonukleotiden nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 14:** Die DNA-Bindungsaktivität von Oct-1 ist in TNF-toleranten Zellen erhöht. Monozytäre THP-1-Zellen wurden mit Medium oder Medium mit Zusatz von 1 ng/ml TNF über 72 h präinkubiert (*TNF prä*) und blieben anschließend unbehandelt oder wurden mit TNF (20 ng/ml, 15 min) stimuliert (*TNF re*). A) Nukleäre Extrakte wurden mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid bestehend aus einer Oct-1-Konsensussequenz inkubiert und mittels Gelretardierungsassay analysiert. Die Klammer gibt die Position Oct-1-enthaltender Komplexe an. B) Die präinkubierte und restimulierte Probe wurde mit Hilfe von Wettbewerbsstudien untersucht. Dabei wurden unmarkierte Oligonukleotide (C/EBP $\beta$  (IL-8), Oct-1-Konsensus, IL-8 wt, NF- $\kappa$ B (IL-8), Sp-1) in 100fachem Überschuß als spezifische Wettbewerber eingesetzt. Abgebildet ist je ein repräsentatives Experiment ( $n = 5$ ).

Anschließend wurde in identisch transfizierten Zellen, nachdem sie über 5 h mit TNF inkubiert worden waren, mittels Luciferase-Reporter-Assay die transkriptionelle Aktivität quantifiziert. In diesen Experimenten ließ sich nach TNF-Stimulation bei Überexpression des Oct-1-Wildtyp-Proteins keine Hemmung der IL-8-Promotor-abhängigen Transkription beobachten (Abb. 15). Ebenso wenig konnte ein negativer Effekt auf die 3κB-abhängige Transkription gezeigt werden. Die gemessenen Werte unterschieden sich jeweils nicht wesentlich von denjenigen, die sich in mit dem CMV- oder in mit dem mutierten Oct-1-Plasmid transfizierten Zellen nach Behandlung mit TNF ergaben. Anders als C/EBPβ übte somit Oct-1 weder auf die IL-8-Promotor- noch die 3κB-abhängige Transkription nach TNF-Stimulation einen inhibitorischen Einfluß aus.



**Abbildung 15:** Überexpression von Oct-1 beeinflusst die IL-8-Promotor- und die 3κB-abhängige Transkription nach TNF-Stimulation nicht. HeLa-Zellen wurden mit dem IL-8-Promotor- bzw. dem 3κB-abhängigen Indikatorgenplasmid, dem Renilla-Luciferase-Plasmid sowie 10 μg des CMV-Kontrollplasmids oder eines für Oct-1 kodierenden Überexpressionsplasmids als Wildtyp (wt) bzw. in mutierter Form (mut) kotransfiziert. Nach Inkubation über Nacht blieben diese Zellen unbehandelt (-) oder wurden mit TNF stimuliert (20 ng/ml, 5 h, +). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als relative Luciferaseaktivität (Firefly/Renilla, MW ± SD aus zwei unabhängigen Experimenten).

## 4 Diskussion

Die Entwicklung eines Toleranzzustandes gegenüber TNF konnte sowohl bei *in vivo* als auch bei *in vitro* durchgeführten Experimenten bereits mehrfach nachgewiesen werden (36, 39, 65, 99, 100, 121, 130), und es existieren Studien, die eine mögliche Bedeutung der TNF-Toleranz in verschiedenen klinischen Bereichen aufzeigen (siehe 4.7). Die molekularen und zellulären Mechanismen, auf denen dieses Phänomen beruht, sind bisher noch unzureichend bekannt.

### 4.1 Hemmung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Transkription in TNF-toleranten Zellen

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte in monozytären THP-1- ebenso wie in HeLa-Zellen durch eine langfristige Präinkubation über 72 h mit einer niedrigen Dosis TNF ein Zustand der Toleranz erzeugt werden. In auf diese Weise vorbehandelten Zellen war nach Restimulation mit einer deutlich höheren TNF-Dosis die NF- $\kappa$ B-vermittelte IL-8-Promotor-abhängige Transkription signifikant vermindert. Gleichzeitig fand sich unter den gewählten Bedingungen eine reduzierte Proteinproduktion dieses Chemokins im Zellkulturüberstand der THP-1-Zellen. Während der IL-8-Promotor DNA-Motive für mehrere Transkriptionsfaktoren enthält, ergab sich auch hinsichtlich der Transkription eines 3 $\kappa$ B-abhängigen Indikatorgenkonstrukts nach entsprechender Präinkubation und Restimulierung der Zellen eine Abnahme der transkriptionellen Aktivität, die zudem in ihrem Ausmaß dem Rückgang der IL-8-Promotor-abhängigen Transkription vergleichbar war. Daraus läßt sich schließen, daß die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsstelle allein für die Vermittlung des hier vorliegenden Mechanismus der TNF-Toleranz ausreichend ist.

Diese Beobachtungen legen somit eine wesentliche Bedeutung von Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B-Familie bei der Entstehung der Toleranz gegenüber TNF nahe. In TNF-toleranten Zellen waren jedoch die NF- $\kappa$ B-Aktivierung und die Proteolyse des Inhibitorproteins I $\kappa$ B $\alpha$  nicht beeinträchtigt. Vielmehr wiesen mit TNF präinkubierte, aber nicht restimulierte Zellen sogar einen gegenüber dem Ausgangsniveau etwas erniedrigten I $\kappa$ B $\alpha$ -Spiegel auf. Ein ähnliches Resultat einer Studie, in der FS-4-Fibroblasten über 15 h mit TNF präinkubiert worden waren, wurde dort mit einer persistierenden, geringgradigen IKK-Aktivierung und einer kontinuierlichen Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  infolge der ständigen Präsenz von TNF erklärt (99). Den Ergebnissen der hier dargestellten Experimente nach laufen bei der Entwicklung der



TNF-Toleranz also offenbar Regulationsvorgänge auf transkriptioneller Ebene ab. Dies scheint einer früheren Studie zu widersprechen, in der eine Langzeitpräinkubation von humanen Adenokarzinom-Zellen (SW480) mit TNF über 72 h zu einer Inhibierung der durch Restimulation mit diesem Zytokin induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung, gemessen mittels Gelretardierungsassay, führte (65). Die voneinander abweichenden Resultate sind möglicherweise in Zelltyp-spezifischen Eigenschaften der hier untersuchten Zellen und der SW480-Linie begründet. Allerdings wurde in einer weiteren Studie nach einer 18stündigen Vorbehandlung mit TNF in THP-1-Zellen ebenfalls ein reversibler Verlust der Empfindlichkeit gegenüber diesem Zytokin nachgewiesen, der durch eine Hemmung der nukleären Translokation von p65 sowie der Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  bedingt war (36). Dies läßt vermuten, daß deutliche Differenzen in der Dauer der Präinkubation eine weitere Ursache für unterschiedliche molekulare Mechanismen der TNF-Toleranz sein können.

Auch hinsichtlich der besser erforschten Toleranz gegenüber LPS wurden mehrere Formen beschrieben. Beispielsweise wurde einerseits insbesondere bei kürzeren Vorbehandlungszeiten eine verminderte NF- $\kappa$ B-Aktivierung mit reduzierter Degradierung beziehungsweise erhöhter Syntheserate von I $\kappa$ B $\alpha$  beobachtet (40, 68, 167), andererseits existiert ein Mechanismus auf transkriptioneller Ebene, der auf einer Verschiebung der Zusammensetzung der Untereinheiten des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zugunsten der transkriptionell inaktiven p50/p50-Homodimere beruht (40, 57, 165 - 167). Letzteres Phänomen wurde auch bei der erwähnten 18stündigen Vorbehandlung von THP-1-Zellen mit TNF gefunden (36), während sich in der vorliegenden Arbeit nach 72 h Präinkubation mit TNF in toleranten Zellen weder für p50 noch für p65 eine wesentliche Veränderung bezüglich ihrer Aktivierung und DNA-Bindung ergab. In Untersuchungen zur LPS-Toleranz konnte gezeigt werden, daß die p50/p50-Komplexe zwar an  $\kappa$ B-Motive in der Promotorregion verschiedener proinflammatorischer Gene binden, deren Transkription jedoch inhibieren (21, 57, 165, 166). In einer Studie, in der eine Präinkubation muriner Makrophagen mit CpG-DNA-enthaltenden Oligonukleotiden einen Toleranzzustand gegenüber Restimulation mit LPS erzeugte, wurde zudem eine p50/p50-vermittelte Abnahme der Transkription eines 3 $\kappa$ B-abhängigen Reporterplasmids demonstriert (53). Dies belegt, daß auch hier das NF- $\kappa$ B-Motiv im Promotor für die Toleranzentstehung von entscheidender Bedeutung ist.

## 4.2 Untersuchung der Rolle von Oct-1 bei der TNF-Toleranz

Der Transkriptionsfaktor Oct-1 fungiert als Repressor der Expression einer Reihe von Genen, unter anderem von IL-8 (73, 118, 131, 152, 162). So konnte eine frühere Arbeit eine inhibitorische Wirkung von Oct-1 auf die IL-8-Promotor-abhängige Transkription durch seine Bindung an eine DNA-Stelle innerhalb der C/EBP $\beta$ -DNA-Sequenz demonstrieren (152). Während Oct-1 am HPV-18- (74) und vermutlich auch am HPV-16-Promotor (118) die transkriptionelle Aktivierung blockiert, indem es die aktivierenden Transkriptionsfaktoren KRF-1 beziehungsweise PEF-1 kompetitiv von DNA-Motiven verdrängt, welche mit der Oct-1-Stelle überlappen, war in der Studie am IL-8-Promotor die Bindung von Oct-1 und C/EBP $\beta$  unabhängig voneinander möglich (152). Der hemmende Effekt ging in diesem Fall mit einer höheren DNA-Bindungsaktivität von Oct-1 einher. Dementsprechend nahm die DNA-Bindung von Oct-1 in einer weiteren Untersuchung ab, in der die IL-8-Sekretion infolge der Transfektion des Retinoblastoma-Gens in Blasenkarzinom-Zellen verstärkt war (162). In der hier präsentierten Arbeit fand sich mittels Gelretardierungsassay in TNF-toleranten Zellen zwar ebenfalls eine vermehrte Komplexbildung an einem Oligonukleotid, welches das Oct-1-DNA-Motiv des IL-8-Promotors enthält, jedoch ließ sich durch Überexpression von Oct-1 bei der Durchführung von Transfektionsexperimenten in HeLa-Zellen keine Veränderung der IL-8-Promotor-abhängigen Transkription erzielen. Da hier allerdings TNF-aktivierte Zellen betrachtet wurden, mag dies insofern mit obigen Studien am IL-8-Promotor zu vereinbaren sein, als dort eine negative Rolle von Oct-1 insbesondere in ruhenden Zellen beschrieben wurde, während der Einfluß dieses Transkriptionsfaktors auf die Stimulus-induzierte Genexpression, das heißt bei gleichzeitigem Vorhandensein aktivierender Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und C/EBP $\beta$ , geringer zu sein schien (152). Außerdem bestand auch in einer anderen Untersuchung an *Mycobacterium tuberculosis*-infizierten Monozyten eine intensive DNA-Protein-Komplexbildung am Oct-1-DNA-Motiv, obwohl diese Zellen eine hohe IL-8-Sekretion aufweisen (4). Ein indirekter, über NF- $\kappa$ B vermittelter inhibitorischer Effekt von Oct-1 konnte in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden, da die Transkription des 3 $\kappa$ B-abhängigen Indikatorgenkonstrukts durch die Überexpression von Oct-1 ebenfalls nicht beeinträchtigt war. Demzufolge kann Oct-1 nicht für die durch die Bedingungen der TNF-Toleranz verminderte IL-8-Genexpression und 3 $\kappa$ B-abhängige Transkription verantwortlich sein.

### 4.3 Analyse der Funktion von C/EBP $\beta$ in toleranten Zellen

Des Weiteren wurde in der präsentierten Studie mittels Gelretardierungsassay eine verstärkte DNA-Bindungsaktivität von C/EBP $\beta$  an das für diesen Transkriptionsfaktor spezifische Motiv in der Promotorregion des IL-8-Gens nach Präinkubation der Zellen mit TNF in niedriger Dosis gezeigt. C/EBP $\beta$  ist als transkriptionell aktives Protein an der positiven, aber auch der negativen Regulation zahlreicher Gene einschließlich IL-8 beteiligt (86, 103, 123, 145). Stimulation mit TNF kann die Bindung von C/EBP $\beta$  am IL-8-Promotor induzieren (107, 123), und es wurde beschrieben, daß diese durch Bindung von NF- $\kappa$ B an das der C/EBP $\beta$ -Stelle benachbarte DNA-Motiv intensiviert wird (61, 107, 123). In den hier dargestellten Experimenten wurde eine Zunahme der Komplexbildung an der C/EBP $\beta$ -DNA-Sequenz insbesondere in toleranten, kaum jedoch in nur kurzfristig mit TNF stimulierten Zellen beobachtet. Bei der Durchführung von Gelretardierungsassays unter Verwendung eines Oligonukleotids, das die NF- $\kappa$ B- ebenso wie die C/EBP $\beta$ -DNA-Bindungsstelle des IL-8-Promotors umfaßt, trat außerdem eine zusätzliche Bande mit geringerer Wanderungsgeschwindigkeit auf, die in mit TNF präinkubierten, restimulierten Zellen am deutlichsten sichtbar war (siehe Abb. 10). Sowohl C/EBP $\beta$  als auch p65 konnten als Komponenten dieses Komplexes nachgewiesen werden. In einer Studie, in der C/EBP-Proteine mit dem Ziel überexprimiert wurden, die NF- $\kappa$ B-abhängige Aktivität des IE1/2-Enhancer/Promotors nach TNF-Stimulation zu hemmen, wurde gleichfalls ein langsamer wandernder Komplex gefunden (102). Auch in diesem Fall gelang es, p65 und C/EBP $\beta$  als dessen Bestandteile zu identifizieren.

Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen ließ sich darüber hinaus eine Zunahme der Assoziation von C/EBP $\beta$  mit p65-enthaltenden Komplexen im Nukleus TNF-toleranter Zellen zeigen. Eine funktionelle Kooperation ebenso wie direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Untereinheiten der NF- $\kappa$ B-Familie und C/EBP-Proteinen sowie weiteren Proteinen mit basischer Leucin-Zipper (bZIP)-Struktur (z. B. ATF, „activating transcription factor“; AP-1) wurden in der Vergangenheit bereits mehrfach beschrieben (34, 69, 123 - 125). Diese Interaktionen kommen über die RHD der NF- $\kappa$ B-Proteine einerseits und andererseits die bZIP-Struktur zustande, die gleichzeitig für die Dimerisierung und die DNA-Bindung der bZIP-Proteine verantwortlich ist (66, 69, 124, 125). Mit Hilfe von Transfektionsstudien konnte in den hier präsentierten Experimenten schließlich auch eine funktionelle Bedeutung von C/EBP $\beta$  demonstriert werden. So hatte die Überexpression von C/EBP $\beta$  im Gegensatz zu Oct-1 und p65 (Daten nicht gezeigt) eine signifikante Hemmung

der TNF-induzierten IL-8-Promotor-abhängigen Transkription zur Folge, die mit ansteigender Dosis an C/EBP $\beta$  zunahm. Diese Resultate deuten auf eine mögliche Schlüsselrolle für C/EBP $\beta$  bei der negativen Regulation der IL-8-Genexpression in TNF-toleranten Zellen hin.

#### 4.4 Regulation der Expression NF- $\kappa$ B- und C/EBP $\beta$ -abhängiger Gene

Im allgemeinen aktivieren Proteine der NF- $\kappa$ B- und der C/EBP-Familie Promotoren mit C/EBP $\beta$ -Bindungsstellen synergistisch, jedoch üben sie eine inhibitorische Wirkung auf Promotoren mit  $\kappa$ B-Motiven aus (125). Bei der Regulation von Genen, deren Promotoren wie auch der des IL-8-Gens Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B- und zugleich für C/EBP-Proteine aufweisen, resultieren daher komplexe Verhältnisse. Ein Beispiel für einen hemmenden Einfluß ist die Antagonisierung der NF- $\kappa$ B-vermittelten Transaktivierung des Akute-Phase-Response-Elements im Angiotensinogen-Gen durch Mitglieder der C/EBP-Familie, die konkurrierend an ein die NF- $\kappa$ B-Sequenz überlappendes DNA-Motiv binden (26). Ebenso schwächt C/EBP $\beta$  am CMV IE1/2-Enhancer/Promotor die TNF-induzierte, NF- $\kappa$ B-abhängige Aktivität signifikant ab, erhöht aber das Basalniveau der Genexpression (102). Die Transkription des ICAM-1-Gens durch p65 in Astrozyten kann durch eine funktionelle Interaktion dieses NF- $\kappa$ B-Proteins mit C/EBP $\beta$  erheblich reduziert werden, ohne daß dabei die Expression und Aktivierung von p65 verändert wären (70). Eine weitere Studie schließlich beschreibt, daß sich in pankreatischen  $\beta$ -Zellen von Ratten die p65-induzierte Aktivierung des Fas-Promotors, die möglicherweise mitverantwortlich für die apoptotische Zerstörung dieser Zellen bei der Entstehung des Typ-1-Diabetes ist, durch C/EBP $\beta$  vermindern läßt, wenn beide Transkriptionsfaktoren gleichzeitig überexprimiert werden (31). Dieser Effekt verstärkte sich zudem mit zunehmender Dosis von C/EBP $\beta$ .

Am IL-8-Promotor, der ebenso wie die IE1/2-Enhancer/Promotor-Region sowie der ICAM-1- und der Fas-Promotor direkt benachbarte C/EBP $\beta$ - und NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen enthält (31, 70, 87, 102, 107), scheint gleichfalls ein fein reguliertes Zusammenspiel zwischen NF- $\kappa$ B und C/EBP $\beta$  darüber zu entscheiden, ob es zu einer Aktivierung oder einer Inhibierung der Transkription kommt (123). Demzufolge sind zum einen nach mehreren Studien sowohl die NF- $\kappa$ B- als auch die C/EBP $\beta$ -Bindungsstelle für die volle Aktivierung des IL-8-Promotors essentiell erforderlich (61, 86, 87), zum anderen wurde, übereinstimmend mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Untersuchungen, bereits in einer früheren Arbeit eine durch Über-

expression von C/EBP $\beta$  vermittelte Hemmung der p65-gesteuerten transkriptionellen Aktivität an einem IL-8-Promotorfragment mit Bindungsstellen für C/EBP $\beta$  und NF- $\kappa$ B nachgewiesen (123). Somit besteht Grund zu der Annahme, daß die Interaktion von C/EBP $\beta$  und p65 an der Reduktion der IL-8-Promotor-abhängigen Transkription unter den Bedingungen der TNF-Toleranz ursächlich beteiligt ist.

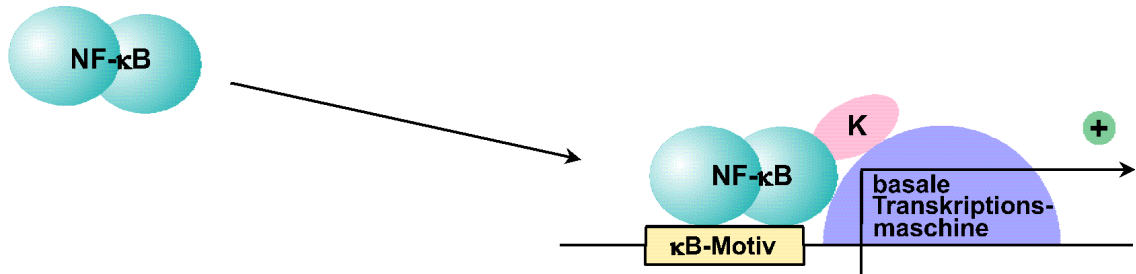
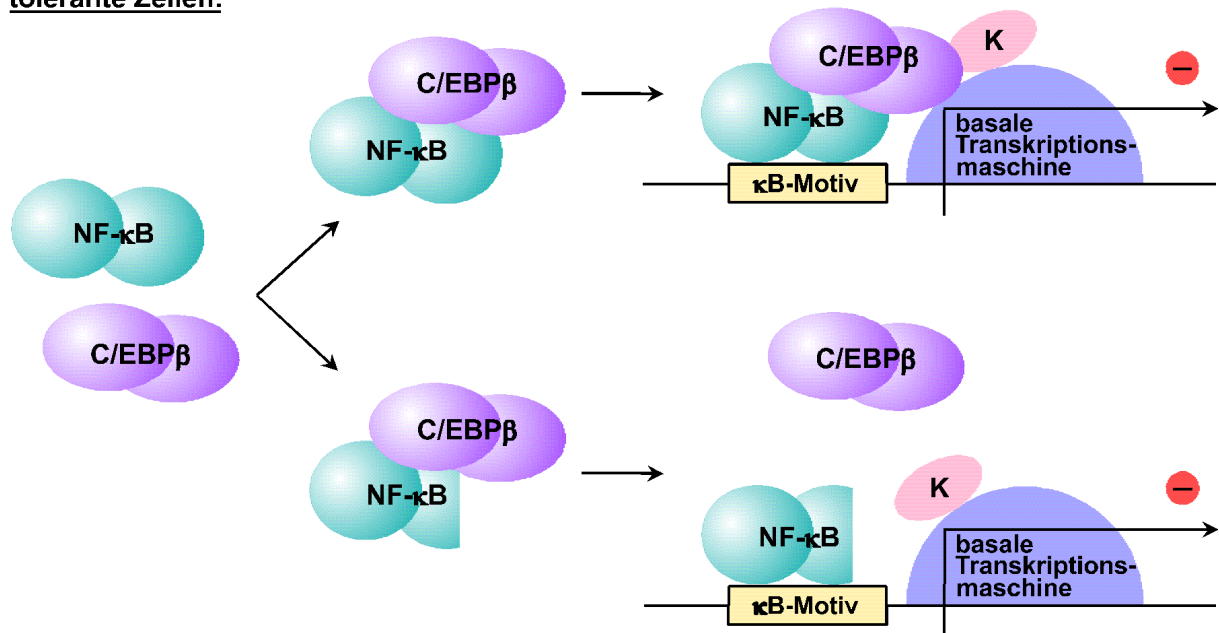
#### 4.5 Inhibitorischer Einfluß von C/EBP $\beta$ auf die NF- $\kappa$ B-vermittelte Transkription

In der präsentierten Studie ließ sich durch Überexpressionsstudien belegen, daß C/EBP $\beta$  auch einen inhibitorischen Einfluß auf die Transkription eines 3 $\kappa$ B-abhängigen Reporterplasmids hat, obwohl in diesem Indikatorgenkonstrukt keine DNA-Bindungssequenz für den Transkriptionsfaktor vorhanden ist. Dieser Effekt von C/EBP $\beta$  könnte durch die vermehrte Komplexbildung mit p65 in den TNF-toleranten Zellen zu erklären sein und demnach über die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsstelle vermittelt werden. Infolgedessen wäre eine direkte DNA-Bindung für die negative Wirkung von C/EBP $\beta$  prinzipiell nicht notwendig. So wurde in einer Untersuchung am Ig  $\gamma$ 1-Promotor in B-Zellen der Maus eine Verminderung der Transkription durch C/EBP $\beta$  gezeigt, die über die  $\kappa$ B-Stelle des Promotors zustande kam, wohingegen das gleichzeitig vorhandene bZIP-DNA-Element hierfür verzichtbar war (77). Dieses Phänomen wurde auch in der bereits oben zitierten Studie am IE1/2-Enhancer/Promotor beobachtet (102). Hier intensivierte die zusätzliche DNA-Bindung von C/EBP $\beta$  die Abnahme der Transkription, ein Ergebnis, das in der vorliegenden Arbeit, vergleicht man die Resultate für die IL-8-Promotor- und die 3 $\kappa$ B-abhängige Transkription bei Überexpression von C/EBP $\beta$ , nicht nachvollzogen werden kann. Darüber hinaus hemmte C/EBP $\beta$  die PMA-induzierte HIV-Promotoraktivität in Glioblastom- und Neuroblastomzellen, indem es die DNA-Protein-Komplexbildung an einem NF- $\kappa$ B-DNA-Motiv erhöhte, ohne selbst Bestandteil des Komplexes zu sein (84). Die unmittelbar benachbarte C/EBP $\beta$ -Bindungsstelle wurde wiederum nicht benötigt. Dabei ist zu erwähnen, daß in den Experimenten der hier beschriebenen Studie mittels Kompetitions- und Supershiftanalysen im Gegensatz zum IL-8-Promotor-Oligonukleotid keine Beteiligung von C/EBP $\beta$  an der DNA-Protein-Komplexbildung gezeigt werden konnte, wenn das Oligonukleotid verwendet wurde, das lediglich die NF- $\kappa$ B-Sequenz des IL-8-Promotors umfaßt. Diese Ergebnisse lassen ebenfalls eine Bedeutung der Assoziation von C/EBP $\beta$  und NF- $\kappa$ B, die unabhängig von der DNA-Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren

ren möglich ist (69, 125), für die inhibitorische Rolle von C/EBP $\beta$  unter den Bedingungen der TNF-Toleranz vermuten. In diesem Kontext sei schließlich auf eine Studie am ICAM-1-Promotor in Ratten-Astrozyten hingewiesen, in der eine 72stündige Vorbehandlung mit TNF oder Ceramid, einem Sphingolipidmediator des TNF-Weges, einen Toleranzzustand bei unbeeinträchtigtter NF- $\kappa$ B-Aktivierung erzeugen konnte, wobei die zur Interaktion mit dem Adaptorprotein p300 notwendige Phosphorylierung von NF- $\kappa$ B verhindert war (44). Da die negative Wirkung von C/EBP $\beta$  auf die NF- $\kappa$ B-vermittelte transkriptionelle Aktivität, wie in einer früheren Arbeit postuliert wurde, möglicherweise auf einer Behinderung der Interaktion von NF- $\kappa$ B mit Koaktivatoren der basalen Transkriptionsmaschine beruht (125) und zudem auch C/EBP $\beta$  in der Lage ist, mit p300 zu assoziieren (83), könnte sich aus diesen oder ähnlichen Beziehungen vielleicht ein Ansatzpunkt für die weitergehende Erforschung der TNF-Toleranz ergeben.

#### 4.6 NF- $\kappa$ B und C/EBP $\beta$ als Vermittler der TNF-Toleranz: ein Modell

Die vorliegende Studie berichtet von einem neuen molekularen Mechanismus auf transkriptioneller Ebene für die Regulation der Expression des IL-8-Gens ebenso wie anderer NF- $\kappa$ B-abhängiger Gene unter den Bedingungen der TNF-Toleranz, bei dem die Assoziation des NF- $\kappa$ B-Proteins p65 mit C/EBP $\beta$  von Bedeutung zu sein scheint. Ausgehend von den beschriebenen Ergebnissen ließe sich für das Zustandekommen des demonstrierten inhibitorischen Effekts von C/EBP $\beta$  auf  $\kappa$ B-DNA-Bindungsstellen etwa folgendes Modell, dargestellt in Abbildung 16, entwerfen: In TNF-toleranten Zellen entsteht eine vermehrte Assoziation von C/EBP $\beta$  mit der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65. Diese Interaktion könnte zwei verschiedene Mechanismen der hemmenden Wirkung von C/EBP $\beta$  ermöglichen. Im ersten Fall wäre der gebildete Komplex zu einer direkten Bindung an NF- $\kappa$ B-DNA-Motive in der Lage, wobei C/EBP $\beta$  die Interaktion von NF- $\kappa$ B mit dem Koaktivatorkomplex und der basalen Transkriptionsmaschine blockiert und so die Aktivierung der Transkription verhindert. Ebenso ist es jedoch vorstellbar, daß die beiden Proteine bereits vor der DNA-Bindung wieder dissoziieren. NF- $\kappa$ B vermag in diesem Fall daraufhin zwar noch an entsprechende DNA-Sequenzen zu binden, hat aber durch den transienten Einfluß von C/EBP $\beta$  seine aktivierenden Fähigkeiten verloren, woraus gleichfalls eine reduzierte Expression NF- $\kappa$ B-abhängiger Gene resultiert.

**nicht-tolerante Zellen:****tolerante Zellen:**

**Abbildung 16:** Hemmung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Transkription durch C/EBP $\beta$  in TNF-toleranten Zellen. In diesem Modell sind zwei verschiedene mögliche inhibitorische Mechanismen dargestellt. Während in nicht mit TNF vorbehandelten Zellen keine nennenswerte Assoziation von C/EBP $\beta$ - und NF- $\kappa$ B-Proteinen stattfindet und infolgedessen die Expression NF- $\kappa$ B-abhängiger Gene ungehindert ablaufen kann (oben), erfolgt in TNF-toleranten Zellen eine verstärkte Komplexbildung der beiden Transkriptionsfaktoren (unten). Bei der anschließenden Bindung der Komplexe an NF- $\kappa$ B-DNA-Motive behindert C/EBP $\beta$  die Interaktion von NF- $\kappa$ B mit dem Koaktivator-Komplex (K) und der basalen Transkriptionsmaschine. Als Alternative dazu könnten die beiden Proteine bereits vor der DNA-Bindung wieder dissoziieren. In diesem Fall bindet NF- $\kappa$ B daraufhin allein an die entsprechende DNA-Sequenz, hat jedoch durch die transiente Interaktion mit C/EBP $\beta$  seine transkriptionell aktivierenden Fähigkeiten verloren.

Bei Promotoren, die wie der des IL-8-Gens neben der NF- $\kappa$ B-Stelle ein C/EBP $\beta$ -Motiv aufweisen, ist eine zusätzliche direkte DNA-Bindung von C/EBP $\beta$  möglich, was auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Sie scheint jedoch die Toleranzentwicklung, vergleicht man die Ergebnisse für die IL-8-Promotor- und die 3 $\kappa$ B-abhängige Transkription, nicht wesentlich zu beeinflussen und wurde daher im beschriebenen Modell nicht berücksichtigt. Aufgrund dieser Beobachtung, daß eine direkte DNA-Bindung von C/EBP $\beta$  für seine negative Wirkung auf  $\kappa$ B-DNA-Motive nicht notwendig ist, wäre es interessant, den Effekt von C/EBP $\beta$  auf die Transkription weiterer NF- $\kappa$ B-gesteuerter Gene unter den Bedingungen der TNF-Toleranz zu untersuchen. Vielleicht wird man feststellen können, ob im Zustand der TNF-Toleranz die Transkription bestimmter NF- $\kappa$ B-abhängiger Gene gehemmt ist, während andere weiterhin aktivierbar bleiben.

#### **4.7 Klinische Bedeutung der TNF-Toleranz**

Eine klinische Bedeutung der TNF-Toleranz wurde in mehreren Bereichen nachgewiesen. Bei akut entzündlichen Prozessen wie Sepsis stellt sie einen protektiven Mechanismus dar, der den Organismus vor wirkungsvollen proinflammatorischen Zytokinen schützen kann (96, 142). Gleichzeitig ist die TNF-Toleranz ein Paradigma für einen paralytischen Zustand des Immunsystems (60, 88, 96, 142). Beide auf den ersten Blick gegensätzlichen Konzepte sind bei septischen Erkrankungen denkbar und können unter Umständen parallel ablaufen (96, 142). So zeigten einerseits klinische Studien, daß persistierend erhöhte TNF-Spiegel im Blut septischer Patienten mit der Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines Multiorganversagens und vermehrter Letalität korrelieren, nicht dagegen das initiale maximale TNF-Niveau (97, 147). Andererseits berichtet eine Untersuchung über Adenovirus-infizierte Mäuse, in denen eine LPS-Stimulation zwar zu einer gesteigerten TNF-Konzentration führte, die aber im Sinne einer Toleranzentwicklung gegenüber TNF mit verminderter IL-6-Produktion und geringerer Mortalität einherging (157). Als interessanter Aspekt sei erwähnt, daß der IL-6-Promotor ebenso wie der des IL-8-Gens eng benachbarte DNA-Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B und C/EBP $\beta$  enthält (2). Außerdem wurden im Blut septischer Patienten desensitivierte Leukozyten beschrieben, in denen nach TNF-Stimulation trotz intakter Aktivierung von NF- $\kappa$ B die Produktion proinflammatorischer Zytokine deutlich reduziert war (96). Somit liegen Hinweise vor, daß Entzündungsmediatoren ihre eigene Synthese herabregulieren können und dadurch einen Mechanismus zur Wiederherstellung der Homöostase liefern. Bei überschießender



antiinflammatorischer Reaktion resultiert aus diesem Prozeß jedoch Anergie mit möglicherweise tödlichem Ausgang (22, 96, 142).

In einem anderen Zusammenhang ließ sich eine positive Folgeerscheinung der TNF-Toleranz demonstrieren. Den Ergebnissen verschiedener Studien nach wirkt eine Vorbehandlung von Ratten- und Mäuse-Nervenzellen (44, 72, 90) ebenso wie von Rattenherzen (27) mit TNF in gleichem Maße wie eine ischämische Präkonditionierung protektiv gegenüber einer anschließenden normalerweise letalen zerebralen beziehungsweise kardialen Ischämie, verringert Reperfusionsschäden und reduziert dadurch die Infarktgröße. In einer Arbeit konnte in diesem Kontext auch eine verminderte Expression von TNF-induzierten Adhäsionsmolekülen und Zytokinen beobachtet werden (159). Einer weiteren klinischen Untersuchung von Patienten mit Schlaganfall zufolge verbesserte der Ablauf einer transitorischen ischämischen Attacke (TIA) innerhalb von 72 h vor Einsetzen der Symptome des Apoplexes gemäß dem Prinzip einer ischämischen Präkonditionierung die Prognose (29). Auch hier wurden im Blut der Patienten erhöhte TNF-Konzentrationen bei erniedrigten IL-6-Plasmaspiegeln gefunden.

Ein mehr spekulatives Konzept hinsichtlich der Rolle der TNF-Toleranz existiert im Rahmen der Tumorbiologie. So kann eine Toleranzentwicklung gegenüber TNF durch antiapoptotische Wirkung sowie Abschwächung der Immunabwehr in der Tumorumgebung die malignen Zellen schützen und ihre Ausbreitung fördern (12, 13). Entsprechend wird eine chronisch erhöhte TNF-Produktion, die im Bereich vieler Tumoren nachgewiesen werden konnte, als prognostisch ungünstig bewertet (12). Demgegenüber konnte TNF in einigen Studien die Wirkung chemotherapeutischer Substanzen verstärken, sein therapeutischer Einsatz ist jedoch nicht zuletzt aufgrund seiner ausgeprägten Toxizität erheblich eingeschränkt (71, 132, 133). Allerdings wurden auch Untersuchungen an tumortragenden Mäusen und Ratten durchgeführt, bei denen wiederholte TNF-Gabe eine selektive Toleranz gegenüber den unerwünschten Effekten, insbesondere der Kachexieentwicklung, auslöste (38, 116, 130, 134). Dies ermöglichte die Applikation höherer TNF-Dosen und verlängerte die Überlebenszeit bei zum Teil zudem verbesserter Antitumorwirkung der Therapie.

Weitere Studien werden zeigen müssen, welche neuen Aspekte sich aus den Erkenntnissen über die molekularen Mechanismen der TNF-Toleranz hinsichtlich ihrer klinischen Bedeutung ergeben werden und ob sich daraus therapeutische oder diagnostische Strategien entwickeln lassen.

## 5 Zusammenfassung

Der Verlust der Empfindlichkeit einer Zelle bei wiederholter Stimulation mit derselben Substanz wird als Toleranz bezeichnet. Mehrere Studien *in vivo* sowie *in vitro* konnten demonstrieren, daß das Zytokin TNF toleranzähnliche Phänomene hervorrufen kann. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die für die Entwicklung der Toleranz gegenüber TNF verantwortlich sind, insbesondere im Hinblick auf die beteiligten Transkriptionsfaktoren.

Monozytäre THP-1-Zellen sowie HeLa-Zellen wurden zunächst mit TNF in niedriger Konzentration für die Dauer von 72 h vorbehandelt. Nach anschließender Restimulation mit einer 20fach höheren Dosis dieses Zytokins war eine Hemmung der IL-8-Promotor-abhängigen Transkription ebenso wie eine verminderte Proteinproduktion des NF- $\kappa$ B-Zielgens IL-8 zu beobachten. Unter diesen Bedingungen bestand zudem eine abgeschwächte transkriptionelle Aktivität an einem 3 $\kappa$ B-abhängigen Indikatorgenkonstrukt. Die nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B und die proteolytische Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  waren im Zustand der TNF-Toleranz nicht beeinträchtigt. Die Zusammensetzung der Untereinheiten der NF- $\kappa$ B-Dimere veränderte sich ebenfalls nicht. Auch C/EBP $\beta$  konnte als Bestandteil von Komplexen, die an IL-8-Promotor-Sequenzen binden, identifiziert werden, wobei sich seine DNA-Bindungsaktivität interessanterweise im Zustand der TNF-Toleranz verstärkte. Außerdem zeigte sich im Nukleus TNF-toleranter Zellen eine Zunahme der Assoziation von C/EBP $\beta$  mit der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65. Eine Überexpression von C/EBP $\beta$  bewirkte darüber hinaus eine signifikante Reduktion der IL-8-Promotor-abhängigen Transkription. Schließlich hatte ein Überschuß von C/EBP $\beta$  einen inhibitorischen Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität am 3 $\kappa$ B-abhängigen Indikatorgenkonstrukt. Oct-1 als ein weiterer Transkriptionsfaktor, für den ein DNA-Bindungselement im Promotor des IL-8-Gens existiert, ließ sich zwar in Komplexen an IL-8-Promotor-spezifischen DNA-Motiven nachweisen, hatte aber keinen negativen Einfluß auf die IL-8-Promotor- oder die 3 $\kappa$ B-abhängige Transkription.

Die präsentierte Studie beschreibt somit einen neuen molekularen Mechanismus der TNF-Toleranz, der zu einer Hemmung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Transkription führt. Dabei ergaben sich Anhaltspunkte für eine negativ regulatorische Funktion des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$ . Bemerkenswerterweise ist diese unabhängig von einer direkten DNA-Bindung von

C/EBP $\beta$  und kommt möglicherweise durch die Komplexbildung mit p65 über die NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsstelle zustande.

Die Resultate dieser Arbeit leisten somit einen Beitrag zum besseren Verständnis des Phänomens der TNF-Toleranz. Aufgrund deren Bedeutung bei entzündlichen, ischämischen und malignen Erkrankungen könnten sich hieraus Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer diagnostischer und/oder therapeutischer Konzepte ergeben.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Adams, D.S., Nathans, R., Pero, S.C., Sen, A. und Wakshull, E. Activation of a Rel-A/CEBP-beta-related transcription factor heteromer by PGG-glucan in a murine monocytic cell line. *J Cell Biol* (2000) 77: 221-233.
2. Akira, S. und Kishimoto, T. NF-IL6 and NF-kappaB in cytokine gene regulation. *Adv Immunol* (1997) 65: 1-46.
3. Alam, T., An, M.R. und Papaconstantinou, J. Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response. *J Biol Chem* (1992) 267: 5021-5024.
4. Ameixa, C. und Friedland, J.S. Down-regulation of interleukin-8 secretion from *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes by interleukin-4 and -10 but not by interleukin-13. *Infect Immun* (2001) 69: 2470-2476.
5. Ashburner, B.P., Westerheide, S.D. und Baldwin, A.S. The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol Cell Biol* (2001) 21: 7065-7077.
6. Baeuerle, P.A. und Baltimore, D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* (1996) 87: 13-20.
7. Baeuerle, P.A. und Henkel, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* (1994) 12: 141-179.
8. Baggiolini, M. und Clark-Lewis, I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* (1992) 307: 97-101.
9. Baldwin, A.S., Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* (1996) 14: 649-681.
10. Baldwin, A.S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* (2001) 107: 241-246.
11. Baldwin, A.S., Jr. The transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* (2001) 107: 3-6.
12. Balkwill, F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev* (2002) 13: 135-141.

13. Balkwill, F. und Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* (2001) 357: 539-545.
14. Barnes, P.J. und Karin, M. Nuclear factor-kappaB – a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Eng J Med* (1997) 336: 1066-1071.
15. Baud, V. und Karin, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* (2001) 11: 372-377.
16. Bauknecht, T. und Shi, Y. Overexpression of C/EBP-beta represses human papillomavirus type 18 upstream regulatory region activity in HeLa cells by interfering with the binding of TATA-binding protein. *J Virol* (1998) 72: 2113-2124.
17. Beeson, P.B. Tolerance to bacterial pyrogens. I. Factors influencing its development. *J Exp Med* (1947) 86: 29-44.
18. Beutler, B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Investig Med* (1995) 43: 227-235.
19. Beutler, B.A. The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol* (1999) 26: 16-21.
20. Biorad, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal Biochem* (1976) 72: 248-254.
21. Bohuslav, J., Kravchenko, V.V., Parry, G.C.N., Ehrlich, J.H., Gerondakis, S., Mackman, N. und Ulevtich, R.J. Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. *J Clin Invest* (1998) 102: 1645-1652.
22. Bone, R.C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* (1996) 24: 1125-1128.
23. Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Brandl, R., Knuechel, R., Page, M., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P.A. und Neumeier, D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the arteriosclerotic lesion. *J Clin Invest* (1996) 97: 1715-1722.
24. Brand, K., Page, S., Walli, A.K., Neumeier, D. und Baeuerle, P.A. Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis. *Exp Physiol* (1997) 82: 297-304.

25. Brasier, A.R., Jamaluddin, M., Casola, A., Duan, W., Shen, Q. und Garofalo, R.P. A promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of Rel A, NF-kappaB1, and c-Rel transcription factors. *J Biol Chem* (1998) 273: 3551-3561.
26. Brasier, A.R., Ron, D., Tate, J.E. und Habener, J.F. A family of constitutive C/EBP-like DNA binding proteins attenuate the IL-1 $\alpha$  induced, NF kappa B mediated transactivation of the angiotensinogen gene acute-phase response element. *EMBO J* (1990) 9: 3933-3944.
27. Brown, J.M., Anderson, B.O., Repine, J.E., Shanley, P.F., White, C.W., Grosso, M.A., Banerjee, A., Bensard, D.D. und Harken, A.H. Neutrophils contribute to TNF induced myocardial tolerance to ischaemia. *J Mol Cell Cardiol* (1992) 24: 485-495.
28. Buck, M., Zhang, L., Halasz, N.A., Hunter, T. und Chojkier, M. Nuclear export of phosphorylated C/EBPbeta mediates the inhibition of albumin expression by TNF-alpha. *EMBO J* (2001) 20: 6712-6723.
29. Castillo, J., Moro, M.A., Blanco, M., Leira, R., Serena, J., Lizasoain, I. und Dávalos, A. The release of tumor necrosis factor-alpha is associated with ischemic tolerance in human stroke. *Ann Neurol* (2003) 54: 811-819.
30. Chinery, R., Brockman, J.A., Dransfield, D.T. und Coffey, R.J. Antioxidant-induced nuclear translocation of CCAAT/enhancer-binding protein beta. A critical role for protein kinase A-mediated phosphorylation of Ser299. *J Biol Chem* (1997) 272: 30356-30361.
31. Darville, M.I. und Eizirik, D.L. Cytokine induction of Fas gene expression in insulin-producing cells requires the transcription factors NF-kappaB and C/EBP. *Diabetes* (2001) 50: 1741-1748.
32. Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M. und Liu, Z.-g. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* (2000) 12: 419-429.
33. DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E. und Karin, M. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* (1997) 388: 548-554.

34. Du, W., Thanos, D. und Maniatis, T. Mechanisms of transcriptional synergism between distinct virus-inducible enhancer elements. *Cell* (1993) 74: 887-898.
35. Duran, A., Diaz-Meco, M.T. und Moscat, J. Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-kappaB transcriptional activation. *EMBO J* (2003) 22: 3910-3918.
36. Ferlito, M., Romanenko, O.G., Ashton, S., Squadrito, F., Halushka, P.V. und Cook, J.A. Effect of cross-tolerance between endotoxin and TNF-alpha or IL-1beta on cellular signaling and mediator production. *J Leukoc Biol* (2001) 70: 821-829.
37. Fischer, C., Page, S., Weber, M., Eisele, T., Neumeier, D. und Brand, K. Differential effects of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor on monocytic IkappaB kinase signalsome activation and IkappaB proteolysis. *J Biol Chem* (1999) 274: 24625-24632.
38. Fraker, D.L., Sheppard, B.C. und Norton, J.A. Impact of tolerance on antitumor efficacy of tumor necrosis factor in mice. *Cancer Res* (1990) 50: 2261-2267.
39. Fraker, D.L., Stovroff, M.C., Merino, M.J. und Norton, J.A. Tolerance to tumor necrosis factor in rats and the relationship to endotoxin tolerance and toxicity. *J Exp Med* (1988) 168: 95-105.
40. Fujihara, M., Wakamoto, S., Ito, T., Muroi, M., Suzuki, T., Ikeda, H. und Ikebuchi, K. Lipopolysaccharide-triggered desensitization of TNF-alpha mRNA expression involves lack of phosphorylation of IkappaBalpha in a murine macrophage-like cell line, P388D1. *J Leukoc Biol* (2000) 68: 267-276.
41. Ghosh, S. und Karin, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* (2002) 109: S81-S96.
42. Ghosh, S., May, M.J. und Kopp, E.B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* (1998) 16: 225-260.
43. Gilmore, T.D., Koedood, M., Piffat, K. und White, D.W. Rel/NF-kappaB/IkappaB-proteins and cancer. *Oncogene* (1996) 13: 1367-1378.
44. Ginis, I., Jaiswal, R., Klimanis, D., Liu, J., Greenspon, J. und Hallenbeck, J.M. TNF-alpha-induced tolerance to ischemic injury involves differential control of NF-kappaB transactivation: the role of NF-kappaB association with p300 adaptor. *J Cerebr Blood Flow Metab* (2002) 22: 142-152.

45. Goldbach, J.-M., Roth, J., Störr, B. und Zeisberger, E. Repeated infusions of TNF-alpha cause attenuation of the thermal response and influence LPS fever in guinea pigs. *Am J Physiol* (1996) 270: R749-R754.
46. Granger, R.L., Hughes, T.R. und Ramji, D.P. Stimulus- and cell-type-specific regulation of CCAAT-enhancer binding protein isoforms in glomerular mesangial cells by lipopolysaccharide and cytokines. *Biochim Biophys Acta* (2000) 1501: 171-179.
47. Grilli, M., Chiu, J.J.-S. und Lenardo, M.J. NF-kappaB and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol* (1993) 143: 1-62.
48. Guo, S., Chichy, S.B., He, X., Yang, Q., Ragland, M., Ghosh, A.K., Johnson, P.F. und Unterman, T.G. Insulin suppresses transactivation by CAAT/enhancer-binding proteins-beta (C/EBP-beta). Signaling to p300/CREB-binding protein by protein kinase B disrupts interaction with the major activation domain of C/EBPbeta. *J Biol Chem* (2001) 276: 8516-8523.
49. Haas, M., Page, S., Page, M., Neumann, F.-J., Marx, N., Adam, M., Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Neumeier, D. und Brand, K. Effect of proteasome inhibitors on monocytic IkappaB-alpha and -beta depletion, NF-kappaB activation, and cytokine production. *J Leukoc Biol* (1998) 63: 395-404.
50. Hahn, T., Toker, L., Budilovsky, S., Aderka, D., Eshhar, Z. und Wallach, D. Use of monoclonal antibodies to a human cytotoxin for its isolation and for examining the self-induction of resistance to this protein. *Proc Natl Acad Sci USA* (1985) 82: 3814-3818.
51. Hu, Y., Baud, V., Oga, T., Kim, K.I., Yoshida, K. und Karin, M. IKKalpha controls formation of the epidermis independently of NF-kappaB. *Nature* (2001) 410: 710-714.
52. Israëli, A. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol* (2000) 10: 129-133.
53. Jin, L., Raymond, D.P., Crabtree, T.D., Pelletier, S.J., Rudy, C.K., Pruett, T.L. und Sawyer, R.G. Preexposure of murine macrophages to CpG-containing oligonucleotides results in nuclear factor kappaB p50 homodimer-associated hyporesponsiveness. *Surgery* (2002) 132: 245-251.
54. Karin, M. und Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity. *Annu Rev Immunol* (2000) 18: 621-663.



55. Karin, M. und Lin, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature Immunol* (2002) 3: 221-227.
56. Kastenbauer, S., Wedel, A., Frankenberger, M., Wirth, T. und Ziegler-Heitbrock, H.W.L. Analysis of promoter activity by polymerase chain reaction amplification of reporter gene mRNA. *Anal Biochem* (1996) 233: 137-139.
57. Kastenbauer, S. und Ziegler-Heitbrock, H.W.L. NF-kappaB1 (p50) is upregulated in lipopolysaccharide tolerance and can block tumor necrosis factor gene expression. *Infect Immun* (1999) 67: 1553-1559.
58. Katz, S., Kowenz-Leutz, E., Muller, C., Meese, K., Ness, S.A. und Leutz, A. The NF-M transcription factor is related to C/EBP beta and plays a role in signal transduction, differentiation and leukemogenesis of avian myelomonocytic cells. *EMBO J* (1993) 12: 1321-1332.
59. Kowenz-Leutz, E., Twamley, G., Ansieau, S. und Leutz, A. Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: activation through derepression. *Genes Dev* (1994) 8: 2781-2791.
60. Kox, W.J., Volk, T., Kox, S.N. und Volk, H.-D. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med* (2000) 26: 124-128.
61. Kunsch, C., Lang, R.K., Rosen, C.A. und Shannon, M.F. Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J Immunol* (1994) 153: 153-164.
62. Kunsch, C. und Rosen, C.A. NFkappaB subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol* (1993) 13: 6137-6146.
63. Kunsch, C., Ruben, S.M. und Rosen, C.A. Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* (1992) 12: 4412-4421.
64. Kyo, S., Inoue, M., Nishio, Y., Nakanishi, K., Akira, S., Inoue, H., Yutsudo, M., Tanizawa, O. und Hakura, A. NF-IL6 represses early gene expression of human papillomavirus type 16 through binding to the noncoding region. *J Virol* (1993) 67: 1058-1066.
65. Laegreid, A., Thommesen, L., Gullstein Jahr, T.G., Sundan, A. und Espevik, T.G. Tumor necrosis factor induces lipopolysaccharide tolerance in a human adeno-

- carcinoma cell line mainly through the TNF p55 receptor. *J Biol Chem* (1995) 270: 25418-25425.
66. Landschulz, W.H., Johnson, P.F. und McKnight, S.L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* (1988) 240: 1759-1764.
67. Landschulz, W.H., Johnson, P.F., Adashi, E.Y., Graves, B.J. und McKnight, S.L. Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes Dev* (1988) 2: 786-800.
68. LaRue, K.E.A. und McCall, C.E. A labile transcriptional repressor modulates endotoxin tolerance. *J Exp Med* (1994) 180: 2269-2275.
69. LeClair, K.P., Blonar, M.A. und Sharp P.A. The p50 subunit of NF-kappa B associates with the NF-IL6 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89: 8145-8149.
70. Lee, S.J., Hou, J. und Benveniste, E.N. Transcriptional regulation of intercellular adhesion molecule-1 in astrocytes involves NF-kappa B and C/EBP isoforms. *J Neuroimmunol* (1998) 92: 196-207.
71. Lejeune, F.J., Rüegg, C. und Liénard, D. Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Opin Immunol* (1998) 10: 573-580.
72. Liu, J., Ginis, I., Spatz, M. und Hallenbeck, J.M. Hypoxic preconditioning protects cultured neurons against hypoxic stress via TNF-alpha and ceramide. *Am J Physiol Cell Physiol* (2000) 278: C144-C153.
73. Mack, D.H. und Laimins, L.A. A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP-1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) 88: 9102-9106.
74. Mackman, N., Brand, K. und Edington, T.S. Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor-kappa B binding sites. *J Exp Med* (1991) 174: 1517-1526.
75. Madrid, L.V., Mayo, M.W., Reuther, J.Y. und Baldwin, A.S., Jr. Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem* (2001) 276: 18934-18940.

76. Mahoney, C.W., Shuman, J., McKnight, S.L., Chen, H.-C. und Huang, K.-P. Phosphorylation of CCAAT-enhancer binding protein by protein kinase C attenuates site-selective DNA binding. *J Biol Chem* (1992) 267: 19396-19403.
77. Mao, C.-s. und Stavnezer, J. Differential regulation of mouse germline Ig gamma 1 and epsilon promoters by IL-4 and CD40. *J Immunol* (2001) 167: 1522-1534.
78. Matsusaka, T., Fujikawa, K., Nishio, Y., Mukaida, N., Matsushima, K., Kishimoto T. und Akira, S. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) 90: 10193-10197.
79. Matsushima, K., Morishita, K., Yoshimura, T., Lavu, S., Kobayashi, Y., Lew, W., Appella, E., Kung, H.F., Leonard, E.J. und Oppenheim, J.J. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* (1988) 167: 1883-1893.
80. Matsuno, F., Chowdhury, S., Gotoh, T., Iwase, K., Matsuzaki, H., Takatsuki, K., Mori, M. und Takiguchi, M. Induction of the C/EBP beta gene by dexamethasone and glucagon in primary-cultured rat hepatocytes. *J Biochem* (1996) 119: 524-532.
81. May, M.J. und Ghosh, S. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Cancer Biol* (1997) 8: 63-73.
82. Metz, R. und Ziff, E. cAMP stimulates the C/EBP-related transcription factor rNFIL-6 to trans-locate to the nucleus and induce c-fos transcription. *Genes Dev* (1991) 5: 1754-1766.
83. Mink, S., Haenig, B. und Klempnauer, K.-H. Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta. *Mol Cell Biol* (1997) 17: 6609-6617.
84. Mondal, D., Alam, J. und Prakash, O. NF-kappa B site-mediated negative regulation of the HIV-1 promoter by CCAAT/enhancer binding proteins in brain-derived cells. *J Mol Neurosci* (1995) 5: 241-258.
85. Mukaida, N. Interleukin-8: An expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol* (2000) 72: 391-398.
86. Mukaida, N., Mahe, Y. und Matsushima, K. Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in

- activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J Biol Chem* (1990) 265: 21128-21133.
87. Mukaida, N., Okamoto, S.-i., Ishikawa, Y. und Matsushima, K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* (1994) 56: 554-558.
88. Munford, R.S. und Pugin, J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med* (2001) 163: 316-321.
89. Nakajima, T., Kinoshita, S., Sasagawa, T., Sasaki K., Naruto, M., Kishimoto, T. und Akira, S. Phosphorylation at threonine-235 by a *ras*-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) 90: 2207-2211.
90. Nawashiro, H., Tasaki, K., Ruetzler, C.A. und Hallenbeck, J.M. TNF-alpha pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* (1997) 17: 483-490.
91. Page, S., Fischer, C., Baumgartner, B., Haas, M., Kreusel, U., Loidl, G., Hayn, M., Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Neumeier, D. und Brand, K. 4-Hydroxynonenal prevents NF-kappaB activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting IkappaB phosphorylation and subsequent proteolysis. *J Biol Chem* (1999) 274: 11611-11618.
92. Pahl, H.L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* (1999) 18: 6853-6866.
93. Papadakis, K.A. und Targan, S.R. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology* (2000) 119: 1148-1157.
94. Patton, J.S., Peters, P.M., McCabe, J., Crase, D., Hansen, S., Chen, A.B. und Liggitt, D. Development of partial tolerance to the gastrointestinal effects of high doses of recombinant tumor necrosis factor-alpha in rodents. *J Clin Invest* (1987) 80: 1587-1596.
95. Phelps, C.B., Sengchanthalangsy, L.L., Huxford, T. und Ghosh, G. Mechanism of I kappa B alpha binding to NF-kappa B dimers. *J Biol Chem* (2000) 275: 29840-29846.
96. Pinsky, M.R. Sepsis: A pro- and anti-inflammatory disequilibrium syndrome. *Crit Care Med* (2001) 132: 354-366.

97. Pinsky, M.R., Vincent, J.-L., Deviere, J., Alegre, M., Kahn, R.J. und Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* (1993) 103: 565-575.
98. Pope, R., Mungre, S., Liu, H. und Thimmapaya, B. Regulation of TNF-alpha expression in normal macrophages: the role of C/EBPbeta. *Cytokine* (2000) 12: 1171-1181.
99. Poppers, D.M., Schwenger, P. und Vilcek, J. Persistent TNF signaling in normal human fibroblasts prevents the complete resynthesis of I kappa B-alpha. *J Biol Chem* (2000) 275: 29587-29593.
100. Porter, M.H., Arnold, M. und Langhans, W. TNF-alpha tolerance blocks LPS-induced hypophagia but LPS tolerance fails to prevent TNF-alpha-induced hypophagia. *Am J Physiol* (1998) 274: R741-R745.
101. Poyet, J.-L., Srinivasula, S.M., Lin, J.-h., Fernandes-Alnemri, T., Yamaoka, S., Tschlis, P.N. und Alnemri, E.S. Activation of the Ikappa B kinases by RIP via IKKgamma/NEMO-mediated oligomerization. *J Biol Chem* (2000) 275: 37966-37977.
102. Prösch, S., Heine, A.-K., Volk, H.-D. und Krüger D.H. CCAAT/enhancer-binding proteins alpha and beta negatively influence the capacity of tumor necrosis factor alpha to up-regulate the human cytomegalovirus IE1/2 enhancer/promotor by nuclear factor kappaB during monocyte differentiation. *J Biol Chem* (2001) 276: 40712-40720.
103. Ramji, D.P. und Foka, P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* (2002) 365: 561-575.
104. Rana, B., Xie, Y., Mischoulon, D., Bucher, N.L.R. und Farmer, S.R. The DNA binding activity of C/EBP transcription factors is regulated in the G1 phase of the hepatocyte cell cycle. *J Biol Chem* (1995) 270: 18123-18132.
105. Rath, P.C. und Aggarwal, B.B. TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol* (1999) 19: 350-364.
106. Rink, L. und Kirchner, H. Recent progress in the tumor necrosis factor-alpha field. *Int Arch Allergy Immunol* (1996) 111: 199-209.
107. Roebuck, K.A. Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res* (1999) 19: 429-438.

108. Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V.M. und Goeddel, D.V. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* (1995) 269: 1424-1427.
109. Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J. und Goeddel, D.V. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* (1994) 78: 681-692.
110. Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G. und Karin, M. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature* (1998) 395: 297-300.
111. Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T. und Toriumi, W. IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem* (1999) 274: 30353-30356.
112. Sanz, L., Sanchez, P., Lallena, M.-J., Diaz-Meco, M.T. und Moscat, J. The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation. *EMBO J* (1999) 18: 3044-3053.
113. Scheidereit, C. Signal transduction: Docking IkappaB kinases. *Nature* (1998) 395: 225-226.
114. Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krähn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.-C. und Karin, M. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappaB signaling pathway. *Science* (2001) 293: 1495-1499.
115. Shah, P.C., Bertolino, E. und Singh, H. Using altered specificity Oct-1 and Oct-2 mutants to analyze the regulation of immunoglobulin gene transcription. *EMBO J* (1997) 16: 7105-7117.
116. Sheppard, B.C., Venzon, D., Fraker, D.L., Langstein, H.N., Jensen, J.C. und Norton, J.A. Prolonged survival of tumor-bearing rats with repetitive low-dose recombinant tumor necrosis factor. *Cancer research* (1990) 50: 3928-3933.
117. Sheppard, K.-A., Rose, D.W., Haque, Z.K., Kurokawa, R., McInerney, E., Westin, S., Thanos, D., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K. und Collins, T. Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators. *Mol Cell Biol* (1999) 19: 6367-6378.
118. Sibbet, G.J., Cuthill, S. und Campo, M.S. The enhancer in the long control region of human papillomavirus type 16 is up-regulated by PEF-1 and down-regulated by Oct-1. *J Virol* (1995) 69: 4006-4011.

119. Siebenlist, U., Franzoso, G. und Brown, K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* (1994) 10: 405-455.
120. Sizemore, N., Lerner, N., Dombrowski, N., Sakurai, H. und Stark, G.R. Distinct roles of the Ikappa B kinase alpha and beta subunits in liberating nuclear factor kappa B (NF-kappa B) from Ikappa B and in phosphorylating the p65 subunit of NF-kappa B. *J Biol Chem* (2002) 277: 3863-3869.
121. Socher, S.H., Friedman, A. und Martinez, D. Recombinant human tumor necrosis factor induces acute reductions in food intake and body weight in mice. *J Exp Med* (1988) 167: 1957-1962.
122. Stancovski, I. und Baltimore, D. NF-kappa B activation: the I kappaB kinase revealed? *Cell* (1997) 91: 299-302.
123. Stein, B. und Baldwin, A.S., Jr. Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B. *Mol Cell Biol* (1993) 13: 7191-7198.
124. Stein, B., Baldwin, A.S., Jr., Ballard, D.W., Greene, W.C., Angel, P. und Herrlich, P. Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J* (1993) 12: 3879-3891.
125. Stein, B., Cogswell, P.C. und Baldwin A.S., Jr. Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Mol Cell Biol* (1993) 13: 3964-3974.
126. Tak, P.P. und Firestein, G.S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* (2001) 107: 7-11.
127. Takahashi, N., Brouckaert, P., Bemelmans, M.H.A., Buurman, W.A. und Fiers, W. Mechanism of induction of tolerance to tumor necrosis factor (TNF): no involvement of modulators of TNF bioavailability or receptor binding. *Cytokine* (1994) 6: 235-242.
128. Takahashi, N., Brouckaert, P. und Fiers, W. Induction of tolerance allows separation of lethal and antitumor activities of tumor necrosis factor in mice. *Cancer Res* (1991) 51: 2366-2372.
129. Takahashi, N., Brouckaert, P. und Fiers, W. Cyclooxygenase inhibitors prevent the induction of tolerance to the toxic effects of tumor necrosis factor. *J Immunotherapy* (1993) 14: 16-21.

130. Takahashi, N., Brouckaert, P. und Fiers, W. Mechanism of tolerance to tumor necrosis factor: receptor-specific pathway and selectivity. *Am J Physiol* (1995) 269: R398-R405.
131. Tanaka, M. und Herr, W. Differential transcriptional activation by Oct-1 and Oct-2: interdependent activation domains induce Oct-2 phosphorylation. *Cell* (1990) 60: 375-386.
132. ten Hagen, T.L.M., Eggermont, A.M.M. und Lejeune, F.J. TNF is here to stay – revisited. *Trends Immunol* (2001) 22: 127-129.
133. Terlikowski, S.J. Local immunotherapy with rhTNF-alpha mutein induces strong antitumor activity without overt toxicity – a review. *Toxicology* (2002) 174: 143-152.
134. Terlikowski, S., Nowak, H.F. und Lotocki, W. Evaluation of biometric parameters of Morris hepatoma after application of human recombinant tumor necrosis factor. *Neoplasma* (1995) 42: 83-87.
135. Thanos, D. und Maniatis, T. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* (1995) 80: 529-532.
136. Thompson, J.E., Phillips, R.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Ghosh, S. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* (1995) 80: 573-582.
137. Tracey, K.J. und Cerami, A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* (1994) 45: 491-503.
138. Trautwein, C., Caelles, C., van der Geer, P., Hunter, T., Karin, M. und Chojkier, M. Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. *Nature* (1993) 364: 544-547.
139. Trautwein, C., van der Geer, P., Karin, M., Hunter, T. und Chojkier, M. Protein kinase A and C site-specific phosphorylations of LAP (NF-IL6) modulate its binding affinity to DNA recognition elements. *J Clin Invest* (1994) 93: 2554-2561.
140. Twamley-Stein, G., Kowenz-Leutz, E., Ansieau, S. und Leutz, A. Regulation of C/EBP beta/NF-M activity by kinase oncogenes. *Curr Top Microbiol Immunol* (1996) 211: 129-136.



141. Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W. und Haegeman, G. Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J* (2003) 22: 1313-1324.
142. Volk, H.-D., Reinke, P. und Döcke, W.D. Clinical Aspects: From systemic inflammation to 'immunoparalysis'. *Chem Immunol* (2000) 74: 162-177.
143. Wang, D. und Baldwin, A.S., Jr. Activation of NF-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J Biol Chem* (1998) 273: 29411-29416.
144. Wang, D., Westerheide, S.D., Hanson, J.L. und Baldwin, A.S. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J Biol Chem* (2000) 275: 32592-32597.
145. Wedel, A. und Ziegler-Heitbrock, H.W.L. The C/EBP family of transcription factors. *Immunobiol* (1995) 193: 171-185.
146. Wegner, M., Cao, Z. und Rosenfeld, M.G. Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP beta. *Science* (1992) 256: 370-373.
147. Wenzel, R.P., Pinsky, M.R., Ulevitch, R.J. und Young, L. Current understanding of sepsis. *Clin Infect Dis* (1996) 22: 407-413.
148. Whiteside, S.T., Epinat, J.-C., Rice, N.R. und Israël, A. I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *EMBO J* (1997) 16: 1413-1426.
149. Wilson, J. und Balkwill, F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Semin Cancer Biol* (2002) 12: 113-120.
150. Woltmann, A., Hamann, L., Ulmer, A.J., Gerdes, J., Bruch, H.-P. und Rietschel, E.T. Molecular mechanisms of sepsis. *Langenbecks Arch Surg* (1988) 383: 2-10.
151. Woronicz, J.D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M. und Goeddel, D.V. IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science* (1997) 278: 866-869.
152. Wu, G.D., Lai, E.J., Huang, N. und Wen, X. Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor. *J Biol Chem* (1997) 272: 2396-2403.

153. Wulczyn, F.G., Krappmann, D. und Scheidereit, C. The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med* (1996) 74: 749-769.
154. Xie, K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev* (2001) 12: 375-391.
155. Yamamoto, Y. und Gaynor, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* (2001) 107: 135-142.
156. Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z. und Su, B. The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nature Immunol* (2001) 2: 620-624.
157. Yarovinsky, T.O., Powers, L.S., Butler, N.S., Bradford, M.A., Monick, M.M. und Hunninghake, G.W. Adenoviral infection decreases mortality from lipopolysaccharide-induced liver failure via induction of TNF-alpha tolerance. *J Immunol* (2003) 171: 2453-2460.
158. Yin, M., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Lane, M.D., Chatterjee, S. und Diehl, A.M. Tumor necrosis factor alpha promotes nuclear localization of cytokine-inducible CCAAT/enhancer binding protein isoforms in hepatocytes. *J Biol Chem* (1996) 271: 17974-17978.
159. Zahler, S., Kupatt, C. und Becker, B.F. Endothelial preconditioning by transient oxidative stress reduces inflammatory responses of cultured endothelial cells to TNF-alpha. *FASEB J* (2000) 14: 555-564.
160. Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M. und Karin, M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* (1997) 91: 243-252.
161. Zhang, S.Q., Kovalenko, A., Cantarella, G. und Wallach, D. Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity* (2000) 12: 301-311.
162. Zhang, H., Shepherd, A.T., Eason, D.D., Wei, S., Diaz, J.I., Djeu, J.Y., Wu, G.D. und Blanck, G. Retinoblastoma protein expression leads to reduced Oct-1 DNA binding activity and enhances interleukin-8 expression. *Cell Growth Differ* (1999) 10: 457-465.

163. Zhong, H., Voll, R.E. und Ghosh, S. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* (1998) 1: 661-671.
164. Ziegler-Heitbrock, H.W.L. Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. *J Inflamm* (1995) 45: 13-26.
165. Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Frankenberger, M. und Wedel, A. Tolerance to lipopolysaccharide in human blood monocytes. *Immunobiol* (1995) 193: 217-223.
166. Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Wedel, A., Schraut, W., Ströbel, M., Wendelgass, P., Sternsdorf, T., Baeuerle, P.A., Haas, J.G. und Riethmüller, G. Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. *J Biol Chem* (1994) 269: 17001-17004.
167. Ziegler-Heitbrock, L. The p50-homodimer mechanism in tolerance to LPS. *J Endotoxin Res* (2001) 7: 219-222.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl-
AD	Aktivierungsdomäne
AEBSF	4-(1-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid
Ak	Antikörper
Akt/PKB	Proteinkinase B
Ala	Alanin
AP-1	activator protein-1
aPKC	atypische Proteinkinase C
ARD	ankyrin repeat domain
Arg	Arginin
ATF	activating transcription factor
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BR	basische Region
BSA	Rinderserumalbumin
bZIP	basischer Leucin-Zipper
bzw.	beziehungsweise
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-bindendes Protein
Ci	Curie
CKII	Caseinkinase II
CMV	Cytomegalievirus
cpm	counts per minute
CRE	cAMP response element
CREB	CRE-bindendes Protein
CRP	C-reaktives Protein
CTP	Cytidintriphosphat

C-X-C	Cystein – beliebige Aminosäure – Cystein
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DD	Dimerisierungsdomäne
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
ERK	extracellular signal-related kinase
FADD	Fas-associated death domain protein
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
Glu	Glutaminsäure
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde
HIV	human immunodeficiency virus
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-Ethansulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix
HPV	human papilloma virus
HSV	Herpes <i>simplex</i> Virus
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IE1/2	immediate early1/2-Gen des CMV
Ig	Immunglobulin
Ig κ	Immunglobulin κ-leichte Kette
Ig γ1	Immunglobulin γ1-schwere Kette
IκB	Inhibitor-kappa B
IKK	IκB-Kinase
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
IP	Immunpräzipitation
JNK	c-Jun N-terminal kinase

---

K	Koaktivatorkomplex
KD	Kinasedomäne
kDa	Kilodalton
KRF-1	keratinocyte-specific transcription factor 1
LPS	Lipopolysaccharid
LZ	Leucin-Zipper
M	Molekulargewicht
MAPK	mitogen activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MEKK-3	mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-3
$\mu\text{Ci}$	Mikrocurie
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
MSK1	mitogen- and stress-activated kinase 1
mut	mutierte Form
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Experimente
NF-IL6	Nuklearfaktor-Interleukin 6
NF- $\kappa\text{B}$	Nuklearfaktor-kappa B
ng	Nanogramm
NIK	NF- $\kappa\text{B}$ -induzierende Kinase
NLS	nuclear localization sequence
nm	Nanometer
NRD	NF- $\kappa\text{B}$ /Rel/dorsal-Domäne
N. S.	nichtspezifische Bande
Oct-1	octamer transcription factor-1
OD	optische Dichte

p	kurzer Chromosomenarm
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEF-1	papillomavirus enhancer binding factor 1
pg	Picogramm
PI3K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKAc	cyclic AMP-dependent protein kinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
pNA	p-Nitroanilin
<i>prä</i>	präinkubierte Zellen
<i>re</i>	restimulierte Zellen
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RIP1	receptor-interacting protein-1
RL	Renilla-Luciferase
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec	Sekunde
Sp-1	Transkriptionsfaktor Sp-1
STAT	signal transducer and activator of transcription
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF $\beta$	transforming growth factor $\beta$
TIA	transitorische ischämische Attacke
Tk	Thymidinkinase
TNF / TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor
TNFR I/II	TNF-Rezeptor I/II
TRADD	TNFR-associated death domain protein
TRAF1/2	TNFR-associated factor 1/2
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat

---

U	units
UV	ultraviolett
v. a.	vor allem
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldi- sulfonat
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel



## 7.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität München in der molekularbiologischen Forschungsgruppe von Herrn Prof. Dr. K. Brand durchgeführt. Dem Direktor des Instituts, Herrn Prof. Dr. D. Neumeier, sowie Herrn Prof. Dr. Brand möchte ich an dieser Stelle Dank sagen für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Brand für die interessante Themenstellung und die wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertation. Durch sein Engagement und seine Begeisterungsfähigkeit gelang es ihm immer wieder, mich bei Problemen neu zu motivieren, und mit großem Ideenreichtum fand er stets neue Lösungsansätze.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Brand bedanken. Allen voran gilt mein Dank Frau Dr. Marion Wagner für die Einführung in das Thema, die hervorragende Zusammenarbeit, zahlreiche produktive Diskussionen und Anregungen, ihre große Geduld und ihre stete sowohl fachliche als auch moralische Hilfestellung.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Dr. Martina Quirling, die uns allen mit ihrem durch nichts zu erschütternden fröhlichen Wesen immer wieder Mut gab, für ihre großartige Unterstützung. Insbesondere danke ich ihr auch für die Hilfe bei der Fertigstellung der Publikation sowie dafür, daß sie Zeit für die Korrektur dieses Manuskripts gefunden hat.

Frau Dr. Sharon Page und Frau Dr. Claudia Fischer danke ich herzlich für die Einweisung in molekularbiologische Methoden sowie viele interessante Diskussionen.

Mein Dank gilt auch Frau Tamara Eisele für die Einarbeitung in die Zellkultur sowie andere gängige Labortechniken und Frau Christine Grubmüller für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente der vorliegenden Arbeit.

Besonders bedanke ich mich zudem bei Herrn Nikolaus Jilg für zahlreiche aufmunternde Gespräche und seine kameradschaftliche Hilfe nicht nur im Labor.

Darüber hinaus möchte ich meinen Dank für die kollegiale Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Gespräche Frau Dr. Caroline Nothdurfter, Herrn Peter Heiß, Herrn Dr. Christian Hafner, Frau Ursula Schmitz, Herrn Andreas Zwergal und Frau Katharina Plenagl aussprechen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie für ihre Unterstützung.

Meinen Eltern, die mir meinen bisherigen Werdegang ermöglicht haben, und meiner Schwester danke ich sehr für ihre ständige Unterstützung und ihren intensiven Zuspruch, mit dem sie immer für mich da waren und mir mit Rat und Tat zur Seite standen, sowie ihre Hilfe bei Computerproblemen. Zudem danke ich ihnen für das Nachlesen dieser Arbeit.

Die vorliegenden Studien wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Kommission für Klinische Forschung der TU München gefördert.

### 7.3 Lebenslauf

Carmen Sydlik

#### Persönliche Angaben

Geboren am: 02. Mai 1978 in Altötting  
Familienstand: ledig  
Adresse: Winherstr. 4, 84543 Winhöring

#### Schulbesuch

1984 – 1988 Grundschole Winhöring  
1988 – 1997 König-Karlmann-Gymnasium Altötting  
Abitur Mai 1997

#### Studium

WS 1997 – SS 1999 vorklinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der Universität Regensburg  
WS 1999 – SS 2004 klinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der Technischen Universität München  
04/2003 – 03/2004 Praktisches Jahr  
1. Tertial: Chirurgie am Kantonsspital Bruderholz, Basel  
2. Tertial: Innere Medizin am Krankenhaus Bogenhausen, München  
3. Tertial: Pädiatrie an der Kinderklinik Dritter Orden, Passau  
04/2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
01.10.2004 Approbation zur Ärztin

#### Promotion

seit 09/2000 Wissenschaftliche Tätigkeit am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München (Doktorvater Herr Prof. Dr. K. Brand)

#### Berufliche Tätigkeit

06/2004 – 09/2004 Ärztin im Praktikum an der Kinderklinik Dritter Orden, Passau  
seit 10/2004 Assistenzärztin an der Kinderklinik Dritter Orden, Passau

#### 7.4 Publikationen und Kongreßbeiträge

1. Weber, M.\*, Sydlik, C.\*, Quirling, M.\*, Bell, S., Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Neumeier, D. und Brand, K. Transcriptional inhibition of IL-8 expression in TNF-tolerant cells – evidence for the involvement of C/EBP $\beta$ . *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 23586-23593.
2. Zwergal, A., Quirling, M., Saugel, B., Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Sydlik, C., Huth, K.C., Neumeier, D. und Brand, K. Molecular mechanisms of TNF-tolerance. H.J. Staudinger Symposium, Forschung in Pathobiochemie, Klinischer Chemie und Laboratoriumsmedizin. Bad Staffelstein. Abstract Book (2004).
3. Zwergal, A., Quirling, M., Saugel, B., Huth, K., Sydlik, C., Poli, V., Neumeier, D., Ziegler-Heitbrock, H.W.L. und Brand, K. Phosphorylation of p65 is reduced following association with C/EBP $\beta$  in TNF tolerant cells. In Vorbereitung.

\* geteilte Erstautorschaft