Molekulare Mechanismen der Induktion von Interleukin-10 durch Glukokortikoide

Dissertation
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilian-Universität München
und
GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH,
Neuherberg
Institut für Inhalationsbiologie
Klinische Kooperationsgruppe Entzündliche Lungenerkrankungen,
Gauting

vorgelegt von
Claudia Unterberger

am 07. März 2007

Erstgutachter: **PD Dr. Bettina Kempkes**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Michael Ackmann**

Tag der mündlichen Prüfung: 01. August 2007

Für meine Eltern
und Florian, den ich über alles liebe

I. Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Das Immunsystem 1

1.1.1 Die angeborene Immunität 1

1.1.2 Die erworbene Immunität 1

1.1.3 B-Lymphozyten 2

1.1.4 Die Entzündungsreaktion 3

1.2 Zytokine 3

1.2.1 Interleukin 10 4

1.3 Regulation der Zytokingenexpression 8

1.3.1 Der humane IL-10 Promotor 8

1.4 Der Jak/Stat Signaltransduktionsweg 10

1.4.1 Die Stat Proteine 11

1.5 Glukokortikoide 12

1.5.1 Der Glukokortikoidrezeptor 13

1.5.2 Transkriptionsregulation durch Glukokortikoide 14

1.6 Einfluss von Glukokortikoiden auf die IL-10 Genexpression 16

1.7 Ziel der Arbeit 17

2 Material und Methoden 18

2.1 Material 18

2.1.1 Geräte 18

2.1.2 Verbrauchsmaterialien 18

2.1.3 Chemikalien 19

2.1.4 Kommerzielle Komplettsysteme 21

2.1.5 Enzyme 22

2.1.6 Radionukleotide 22

2.1.7 Antikörper 22

2.1.8 Oligonukleotide 23

2.1.9 Bakterienstämme und Zelllinien 23

2.1.10 Plasmide 24

2.1.11 Lösungen und Puffer 24

2.1.12 Nährmedien 27

2.2	Arbeiten mit Zellen	28
2.2.1	Die humane B-Zelllinie RPMI 8226.1	28
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl	28
2.2.3	Stimulation von Zellen	28
2.2.4	Anfertigen von Lysaten	29
2.3	Molekularbiologische Methoden	29
2.3.1	Isolierung der mRNA	29
2.3.2	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	29
2.3.3	Reverse Transkription: Umschreiben der mRNA in cDNA	30
2.3.4	Quantitative PCR (LightCycler PCR)	30
2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese	32
2.4	Arbeiten mit Bakterien	33
2.4.1	Anfertigen von Agarplatten	33
2.4.2	Transfer von Plasmid DNA in Bakterien	33
2.4.3	Anzucht von Bakterien in LB-Medium	33
2.4.4	Isolierung von Plasmid DNA	34
2.4.5	Restriktionsverdau	34
2.5	Reportergenanalyse	35
2.5.1	Transfektion der Reportergenkonstrukte	35
2.6	Proteinnachweis	38
2.6.1	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	38
2.6.2	Kernextraktion	38
2.6.3	Proteinbestimmung nach Bradford	39
2.6.4	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	40
2.6.5	Supershiftanalysen	42
2.6.6	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	43
2.6.7	Western Blot Analyse	46
2.7	Isolierung primärer B-Zellen	47
2.7.1	Isolierung von PBMC aus humanem Blut	47
2.7.2	Isolierung von B-Zellen mithilfe der magnetischen Zellseparation	47
2.7.3	Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS)	48
2.8	Statistische Auswertungen	49

2.8.1 T-Test 49
3 Ergebnisse 50
3.1 Induktion von IL-10 durch Methylprednisolon 50
3.1.1 Induktion von IL-10 Protein 50
3.2 Kinetik der IL-10 mRNA Induktion 51
3.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehungen der IL-10 mRNA Induktion 52
3.2.2 Ausschluss einer durch LPS vermittelten IL-10 mRNA Induktion 54
3.3 Induktion des IL-10 Promotors 56
3.3.1 Transaktivierung des pIL-10(-1044).luci Promotorkonstrukts 57
3.3.2 Transaktivierung der pIL-10(-195).luci Promotorkonstrukte 58
3.3.3 Transaktivierung des pIL-10(-150) Promotorkonstrukts 61
3.3.4 Analyse des 150 bp langen IL-10 Promotors 62
3.3.5 Transaktivierung des LS4 (3x Stat3) Promotorkonstrukts 64
3.4 Analyse des LS4 Bindeproteins 65
3.5 Nachweis der Bindung von Stat3 an den IL-10 Promotor durch ChIP 67
3.6 Phosphorylierung von Stat3 Protein vor und nach Induktion durch MP 70
3.7 Beteiligung des Glukokortikoidrezeptors an der Induktion durch MP 70
3.8 Blockade der PI3K durch Ly 294,000 und Wortmannin 73
3.9 Induktion von IL-10 mRNA in primären humanen B-Zellen 74
3.10 Methylprednisolon transaktiviert nicht jeden Promotor 75
3.11 Vergleich der Induktion durch MP und LPS 76
4 Diskussion 79
4.1 Induktion von IL-10 in der B-Zelllinie RPMI 8226.1 79
4.2 Induktion des IL-10 Promotors 82
4.3 Analyse des IL-10 Promotors 83
4.4 Analyse der Bindung von Stat3 an die DNA in der LS4 Sequenz 87
4.4.1 Gelshift- und Supershiftanalysen 87
4.4.2 Chromatin-Immunpräzipitationsanalysen 88
4.5 Nachweis der Beteiligung des Glukokortikoidrezeptors an der Induktion von IL-10 durch GC 89
4.6 Induktion von IL-10 mRNA in primären humanen B-Zellen 92
4.7 Vergleich von durch MP und LPS induziertem IL-10 93

5 Zusammenfassung 94
6 Literaturverzeichnis 96
7 Abbildungsverzeichnis 105
8 Danksagung 107
9 Lebenslauf 109

II. Abkürzungsverzeichnis

Ab	Antikörper (antibody)
APC	Antigenpräsentierende Zelle (antigen presenting cell)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
ctl	Kontrolle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescin-Isothiocyanat
GC	Glukokortikoide
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	Glukokortikoid Responsive Element
h	Stunde
IFN-γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-10R	IL-10 Rezeptor
Jak	Januskinase
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
MACS	Magnetische Zellseparation (magnetic cell sorting)
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
M-CSF	Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minute
MP	6α-Methylprednisolon
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NF-κB	Transkriptionsfaktor Nuclear Factor-κB

OD	Optische Dichte
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat Saline Puffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMB	Polymyxin B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RLU	Relative Lichteinheiten (relative light units)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
sek	Sekunde
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
Stat	Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription (Signal transducers and activators of transcription)
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β
TNF	Tumornekrosefaktor
tRNA	Transfer RNA
Vol	Volumen

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Die Immunantwort lässt sich in die angeborene und in die erworbene Immunität unterteilen. An den meisten Immunreaktionen sind jedoch beide beteiligt.

1.1.1 Die angeborene Immunität

Die angeborene Immunität, auch als unspezifische Immunität bezeichnet, wird sofort nach dem Kontakt mit unterschiedlichen Fremdstoffen aktiv. Hierbei werden zwei Abwehrmechanismen unterschieden, die humoralen und die zellulären. Zu den humoralen Mechanismen zählen das Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme, wie z. B. Lysozym und Mediatoren wie Interferone und Interleukine. Zu den zellulären Mechanismen der unspezifischen Immunantwort zählen Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, die Antigene (immunogene Substanzen) phagozytieren und Zytokine freisetzen. Ebenfalls zur angeborenen Immunität zählen natürliche Killerzellen, die bestimmte tumor- oder virusinfizierte Zellen erkennen und abtöten können.

1.1.2 Die erworbene Immunität

Die erworbene, auch als spezifische Immunität bezeichnet, wird, wie der Name bereits andeutet, vom Körper im Laufe des Lebens erworben. Bei ihr spielen T-Zellen (T-Lymphozyten) und antikörperproduzierende B-Zellen (B-Lymphozyten) eine wichtige Rolle. Man unterscheidet zwei große Klassen an T-Zellen: $CD8^+$ T-Zellen (zytotoxische T-Zellen), die virusinfizierte Zellen abtöten, und $CD4^+$ T-Helferzellen, die andere Zellen, wie z. B. B-Zellen oder Makrophagen, aktivieren können. $CD4^+$ T-Helferzellen lassen sich wiederum in T-Helfer 1 (Th1)-, T-Helfer 2 (Th2)- und T-regulatorische (Tr) -Zellen unterscheiden.

1.1.3 B-Lymphozyten

Die für diese Arbeit relevanten B-Lymphozyten entstehen und reifen im Knochenmark. Sie gehen aus der lymphatischen Vorläuferzelle hervor, die ihrerseits aus der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle entsteht. Nach ihrer Reifung gelangen die B-Zellen ins Blut und wandern weiter zu den peripheren lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz und mucosaassoziiertes lymphatisches Gewebe). Auf ihrer Oberfläche tragen reife B-Zellen den sogenannten B-Zell-Rezeptor, eine membrangebundene Form des Antikörpermoleküls. Antikörper (Immunglobuline) sind Plasmaproteine, die von B-Zellen als Reaktion auf eine Infektion gebildet werden. Sie binden spezifisch an Moleküle eines Pathogens (Antigen) um andere Zellen und Moleküle zu mobilisieren und das Pathogen zu zerstören. Jede B-Zelle exprimiert Immunglobuline (Ig) einer Spezifität. Man unterscheidet fünf Hauptklassen (Isotypen) von Antikörpern. Die ersten Antikörper, die bei der humoralen Immunantwort gebildet werden, sind die IgM Antikörper. Diese befinden sich hauptsächlich im Blut und können nach Bindung von Antigenen das Komplementsystem aktivieren. IgG Moleküle werden etwas später gebildet und befinden sich im Blut und in extrazellulären Flüssigkeiten. Sie opsonisieren Pathogene für die Aufnahme durch Phagozyten und aktivieren das Komplementsystem. Die in Schleim, Speichel und Tränen vorkommenden IgA Antikörper wirken neutralisierend und schützen so vor Infektionen. Die bei allergischen Reaktionen eine bedeutende Rolle spielenden IgE Antikörper werden durch Rezeptoren auf den Mastzellen gebunden, die als Antwort auf diese Antigenbindung chemische Mediatoren freisetzen. Bei Allergien, wie z. B. Asthma und Heuschnupfen, kommt es zur Produktion spezifischer IgE Antikörper gegen eigentlich harmlose Antigene (Allergene). Ein erneuter Kontakt mit dem Allergen führt durch Quervernetzung der IgE Antikörper auf den Mastzellen zur Freisetzung von Mediatoren wie Histamin und damit zu einer allergischen Reaktion auf das eigentlich ungefährliche Antigen. Moleküle der Klasse IgD haben als lösliche Antikörper keine Funktion, sie beeinflussen als membranständiges Molekül lediglich die B-Zell-Entwicklung.

1.1.4 Die Entzündungsreaktion

Die frühe Entzündungsreaktion ist ein Beispiel für einen wichtigen unspezifischen Abwehrvorgang. Dringen Bakterien durch Verletzung der Epitheloberfläche in den Körper ein, sind diese zuerst dem humoralen Angriff des Komplementsystems ausgesetzt, das die Bakterien opsonisiert und zerstört. Zweitens können bakterielle Bestandteile von Makrophagen und Neutrophilen, die spezielle Rezeptoren auf ihren Oberflächen tragen, erkannt, gebunden und phagozytiert werden. Dabei werden chemische Mediatoren, wie z. B. Zytokine und Chemokine, freigesetzt um weitere phagozytierende Zellen und Effektormoleküle zum Infektionsherd zu locken. Die sezernierten Zytokine und Chemokine bewirken eine Reihe von Effekten: Wärme (lat. calor), Schmerz (lat. dolor), Rötung (lat. rubor), Schwellung (lat. tumor) und gestörte Funktionen (lat. functio laesa). Gemeinsam verursachen diese einen Zustand, der klinisch als Entzündung bezeichnet wird.

An der späteren Entzündungsreaktion sind die Lymphozyten der erworbenen Immunantwort beteiligt. Sie werden über Antigene, die vom Infektionsherd über afferente Lymphbahnen transportiert werden, aktiviert. Abhängig vom Zytokinmilieu kann eine humoral oder zellulär orientierte Abwehrreaktion folgen.

Um eine überschießende Immunreaktion, bei der es zu einer Zell- und Gewebezerstörung kommen würde, zu vermeiden, wirken nach Beseitigung des infektiösen Agens anti-inflammatorische Mechanismen. Dazu werden vom Körper Glukokortikoide produziert, die anti-inflammatorisch wirken, indem sie die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine inhibieren und die Synthese anti-inflammatorischer Zytokine, wie etwa dem IL-10, aktivieren.

1.2 Zytokine

Zytokine sind definitionsgemäß Botenstoffe, die von Zellen, vor allem des Immunsystems, abgegeben werden und das Verhalten anderer Zellen beeinflussen. Damit spielen sie bei der interzellulären Kommunikation und bei der Vermittlung und Regulation von immunologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Bei Zytokinen handelt es sich um einfache, lösliche Polypeptide oder Glykoproteine mit niedrigem Molekulargewicht (30 kDa und kleiner), die nicht oder nur in geringem Umfang

konstitutiv exprimiert werden. Sie werden auf bestimmte Stimuli de novo synthetisiert und wirken für kurze Zeit über kleine und große Distanzen. Zytokine wirken, indem sie an Oberflächenrezeptoren von Leukozyten und anderen Zellen binden. Zytokinrezeptoren sind hoch-affine Transmembranproteine, die durch ihre Assoziation die Aktivierung von second Messengers, häufig Tyrosinkinasen, die an sie gebunden sind, auslösen und so die Genexpression verändern. Zytokine lassen sich in Lymphokine (= Zytokine, die von Lymphozyten exprimiert werden) und Monokine (= Zytokine, die von Monozyten exprimiert werden) unterteilen. Einige Zytokine werden auch als Interleukine (IL) bezeichnet, da sie die Kommunikation zwischen den Leukozyten vermitteln. Oft wird ein und dasselbe Zytokin von mehreren unterschiedlichen Zelltypen exprimiert oder es wirkt auf unterschiedliche Zellen, was man als Pleiotropie bezeichnet. Ebenso sind Zytokine redundant. Das bedeutet, dass mehrere verschiedene Zytokine dieselbe Wirkung auf Zielzellen besitzen. Zytokine wirken autokrin, parakrin und endokrin. Darüber hinaus können Zytokine sowohl synergistisch als auch antagonistisch wirken.

Zytokine spielen im Entzündungsprozess eine bedeutende Rolle und lassen sich nach ihren Effekten in pro- und anti-inflammatorische Zytokine unterteilen. Pro-inflammatorische Zytokine, wie z. B. Tumornekrosefaktor (TNF), Interferon-γ (IFN-γ), IL-1, IL-2, IL-8, IL-12, Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) und Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) stimulieren den Entzündungsprozess, wohingegen anti-inflammatorische Zytokine, wie z. B. IL-10 und Transformierender Wachstumsfaktor (TGF)-β entgegengesetzt wirken.

1.2.1 Interleukin 10

IL-10 Gen und Protein

Im Jahr 1986 beschrieben Mosmann et al. erstmals in der Maus die beiden $CD4^+$ Subpopulationen Th1 und Th2 (Mosmann *et al.* 1986). Später konnten diese auch im Menschen nachgewiesen werden (Del Prete *et al.* 1991). Die Unterscheidung gelang aufgrund ihrer Zytokinexpressionsmuster. Fiorentino und Kollegen beobachteten dann ein Protein, das von Th2 Zellen produziert wird und die Synthese einiger Th1

Zytokine hemmt, welches sie damals als Cytokine Synthesis Inhibitory Factor (CSIF) bezeichneten (Fiorentino *et al.* 1989). Später wurde es in IL-10 umbenannt (Moore *et al.* 1990). IL-10 wird von T-Zellen, B-Zellen, Monozyten (de Waal Malefyt *et al.* 1991), Tumorzellen (Dummer *et al.* 1996; Gastl *et al.* 1993), Keratinozyten (Enk and Katz 1992) und dendritischen Zellen produziert. Das reife, etwa 18 kDa schwere, nicht-glykosilierte humane IL-10 Protein besteht aus 178 Aminosäuren und ist sehr säurelabil. Die Homologie der Aminosäurensequenz beträgt zwischen Maus und Mensch ca. 73 %. Die biologisch aktive Form von IL-10 ist ein Homodimer, welches aus zwei nicht-kovalent gebundenen Untereinheiten besteht. Darüber hinaus besitzt IL-10 eine hohe Sequenzhomologie zum BCRF1 Protein des Epstein-Barr-Virus (Hsu *et al.* 1990; Moore *et al.* 1990; Vieira *et al.* 1991). Lokalisiert ist das humane IL-10 Gen auf Chromosom 1q31-q32 (Eskdale *et al.* 1997; Kim *et al.* 1992) und besteht aus 5 Exons.

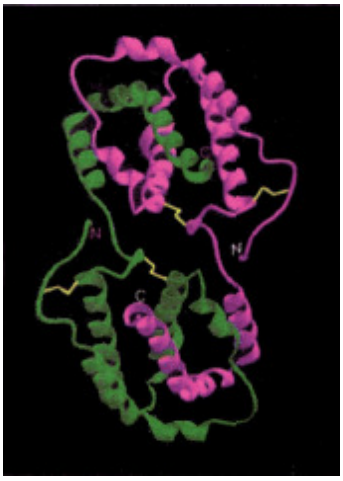

Abbildung 1: Struktur des IL-10 Homodimers: Bänderdarstellung eines IL-10 Dimers. Disulfidbrücken sind in gelb dargestellt nach Zdanov et al., Fig.1 (Zdanov *et al.* 1996).

IL-10 Rezeptor und Signaltransduktion

Der Effekt von IL-10 wird durch die Bindung an einen spezifischen Transmembranrezeptor, den IL-10 Rezeptor (IL-10R), vermittelt (Liu *et al.* 1994). Dieser besteht aus den zwei, zur Familie der Klasse II-Zytokinrezeptoren gehörenden Untereinheiten IL-10R1 und IL-10R2 (oder IL-10Rα und IL-10Rβ). Die den Liganden mit

hoher Affinität bindende Untereinheit IL-10Rα wird von den meisten hämatopoetischen Zellen exprimiert (Ho *et al.* 1993).

Der am besten charakterisierte IL-10 Signalweg ist der Januskinase/Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription (Jak/Stat) Signalweg. Zu den über diesen Weg regulierten Genen zählen z. B. die Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) SOCS-1 und SOCS-3. Die Induktion von SOCS-3 über Stat3, induziert durch IL-10, bewirkt neben einer negativen Feedback Regulation von IL-10 selbst wahrscheinlich auch die Hemmung des IFN-γ Signalwegs (Moore *et al.* 2001). Neben Stat3 spielen auch Stat1 und Stat5 eine Rolle in der IL-10 vermittelten Signaltransduktion, sie sind jedoch nicht an der inhibitorischen Wirkung von IL-10 beteiligt (Wehinger *et al.* 1996). Darüber hinaus beeinflusst IL-10 die Wirkung des Transkriptionsfaktors NF-κB. In Makrophagen und $CD4^+$ T-Zellen inhibiert IL-10 NF-κB, in $CD8^+$ T-Zellen führt es zu einer Induktion dieses Transkriptionsfaktors (Mocellin *et al.* 2004). Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase) Signalweg kann ebenfalls durch IL-10 aktiviert werden (Crawley *et al.* 1996). Die molekularen Mechanismen dieser zusätzlichen IL-10 Signalwege sind weitgehend ungeklärt.

Biologische Wirkung von IL-10

Die Hauptfunktion von IL-10 ist es, die Entzündungsreaktion einzudämmen, d. h. immunsuppressiv zu wirken. Wie wichtig IL-10 dabei ist, wird an IL-10 Knock-out-Mäusen deutlich, die chronische Darmentzündungen entwickeln (Kuhn *et al.* 1993).

IL-10 wirkt anti-inflammatorisch indem es die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-10 selbst, TNF, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LIF, PAF), CC Chemokine (z. B. MCP-1, MCP-5, Rantes) und CXC Chemokine (IL-8, IP-10, MIP-2) durch Makrophagen und Monozyten inhibiert. Daneben reduziert IL-10 die Expression von MHC II Molekülen und der kostimulatorischen Faktoren CD86 und CD80 auf antigenpräsentierenden Zellen (APC). Dadurch können diese weniger Antigen präsentieren, was zu einer verminderten Aktivierung von T-Zellen führt. Als Folge bleibt die Zytokinexpression und Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen aus. Die Inhibierung des CD28 Signalwegs durch IL-10 führt außerdem zur Anergie dieser Zellen. Damit ist IL-10 ein starker Inhibitor der antigenvermittelten T-Zell Antwort. Auf $CD8^+$ T-Zellen wirkt IL-10 aktivierend, indem es ihre Zytotoxizität

und Proliferation steigert. IL-10 fördert durch die Induktion der Expression des anti-apoptotischen Gens bcl-2 das Überleben von B-Zellen. Daneben führt es zu einer gesteigerten Antikörperproduktion dieser Zellen (Moore *et al.* 2001). In der B-Zell-Proliferation stellt IL-10 einen wichtigen Kofaktor dar, da es die Expression des hoch affinen Rezeptors für IL-2 auf B-Zellen induziert. Außerdem ist es am Isotypwechsel beteiligt. In humanen Zellen konnte andererseits eine Blockade der IgE-Produktion durch IL-10 gezeigt werden (Punnonen *et al.* 1993). Auch ist die Desensibilisierung bei Allergikern, die eine IgE-vermittelte Reaktion zeigen, mit einer erhöhten IL-10 Produktion verbunden (Akdis *et al.* 1998).
IL-10 inhibiert die IFN-γ und TNF Produktion durch NK Zellen. Weiter induziert es die Lyse von infizierten Zellen (Mocellin *et al.* 2004).

IL-10 und Erkrankungen

IL-10 spielt aufgrund seiner anti-inflammatorischen Eigenschaften bei der Entwicklung von Infektionen eine wichtige Rolle. Sowohl zu viel als auch zu wenig IL-10 führen zu einer unausgeglichenen Immunantwort und damit zur Krankheit. In IL-10-transgenen Mäusen bzw. Mäusen, denen IL-10 verabreicht wurde, ist die Immunantwort auf Pathogene stark beeinträchtigt. Die Neutralisation von IL-10 durch Antikörper führt in den Tieren jedoch wieder zu einer Immunantwort, bei der die Erreger beseitigt werden. Patienten mit chronischen Entzündungen, wie z. B. AIDS, Malaria und Candidiasis, besitzen hohe Mengen an IL-10 in Blut und Gewebe, was dazu führt, dass ihre Leukozyten nicht hinreichend auf eine Infektion reagieren. Ebenfalls trägt IL-10 zur Toleranz von Selbstantigenen bei. In Autoimmunerkrankungen, wie z. B. der Insulinabhängigen Diabetes mellitus (IDDM) und der rheumatoiden Arthritis (RA), die durch eine Hyperaktivität von Th1 Zellen verursacht wird, wirkt IL-10 durch seinen hemmenden Effekt auf Th1 Zellen protektiv. Auch bei Transplantationen spielt IL-10 eine wichtige Rolle. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass IL-10 eine Abstoßung des Transplantates verhindert. Asthma und Allergien sind durch eine von Th2 Zellzytokinen verursachte Infiltration von Eosinophilen, Basophilen und Mastzellen in die Schleimhaut und einer erhöhten Produktion von IgE Antikörpern gekennzeichnet. Betroffene exprimieren weniger IL-10 als Gesunde. IL-10 Knock-out-Mäuse entwickeln eine experimentelle

allergische Encephalomyelitis (EAE) und sind gegen Infektionen resistent (Bettelli *et al.* 1998; Dai *et al.* 1997). Schließlich treten bei Karzinomen, Melanomen und Lymphomen erhöhte IL-10 Expressionsspiegel auf, die möglicherweise die Immunabwehr gegen die maligne Erkrankung inhibieren und so das Tumorwachstum fördern (Mocellin *et al.* 2004; Zhou *et al.* 2005).

1.3 Regulation der Zytokingenexpression

Die Regulation der Zytokinexpression kann a) transkriptionell, b) durch Beeinflussung der mRNA Stabilität oder c) post-translational wie z. B. durch proteolytische Spaltung erfolgen (Black *et al.* 1991 ; Powell *et al.* 2000). Dabei erfolgt die Transkriptionsregulation vieler pro-inflammatorischer Gene (z. B. TNF, IL-1β, GM-CSF) und induzierbarer Enzyme (z. B. COX-2 und iNOS) über den ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktor Nuclear Factor-κB (NF-κB). Weitere Signaltransduktionswege durch die die Transkription von Zytokinen erfolgt sind der Smad- und der Januskinase/Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription (Jak/Stat) Signaltransduktionsweg (Hanada and Yoshimura 2002).

1.3.1 Der humane IL-10 Promotor

Die Expression von IL-10 wird weitgehend über seinen Promotor geregelt. Die Arbeitsgruppe von Kube veröffentlichte 1994 die 2700 bp lange Promotorsequenz des humanen IL-10 Gens (hIL-10). Bei ihrer Suche nach Sequenzmotiven, die für die Regulation der Transkription von Bedeutung sein könnten, fanden sie eine Reihe potenzieller Bindemotive, wie z. B. AP-1, PEA1, YY1, SP1 und GRE. Darüber hinaus definierten sie durch die Untersuchung der konstitutiven IL-10 Expression im Burkitt Lymphom den MinimalPromotor und zwei weitere regulatorische Sequenzbereiche (Kube *et al.* 1995). Im gleichen Jahr untersuchten Platzer et al. den hIL-10 Promotor. Da sie keine NF-κB Bindestelle finden konnten, beschrieben sie einen NF-κB unabhängigen Mechanismus für die Induktion des IL-10 Gens durch TNF. Sie beobachteten jedoch, dass Substanzen, die die intrazelluläre cAMP Menge erhöhen, in LPS stimulierten Makrophagen zu einer gesteigerten IL-10 Expression führten (Platzer *et al.* 1995). In einer späteren Arbeit beschrieben sie vier cyclische

Adenosin-Monophosphat (cAMP)-Responsive Elements (CRE1-4) im IL-10 Promotor. Sie postulierten, dass die durch intrazelluläres cAMP aktivierten Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 an die CRE1 und CRE4 Bindemotive im IL-10 Promotor binden und dadurch die Genexpression beeinflussen (Platzer *et al.* 1999). Bondeson et al. stützten durch ihre Studie, in der sie den Transkriptionsfaktor NF-κB durch adenovirales IκBα in Makrophagen hemmten, die These einer NF-κB unabhängigen Induktion der IL-10 Genexpression (Bondeson *et al.* 1999). Erstmals zeigten Benkhart et al., dass in der B-Zelllinie RPMI 8226.1, die Expression von IL-10 nach Stimulation mit LPS durch den Transkriptionsfaktor Stat3 reguliert wird, der direkt an eine Sequenz bei -120 bp im Promotor an die DNA bindet. Die Induktion erfolgte auch hier ohne die Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF-κB. Der Promotor enthält ein SP1 Bindemotiv bei -145 bp vom Transkriptionsstart. Mutationsanalysen zeigen jedoch, dass dieses keine Rolle für die Induktion von IL-10 in der B-Zelle spielt (Benkhart *et al.* 2000). Die Beteiligung von Sp1 an der Induktion von IL-10 scheint speziesabhängig und gewebsspezifisch zu sein. Ma et al zeigten kurze Zeit später in Transfektionsexperimenten in der myelo-monozytären Zelllinie THP-1, dass der Transkriptionsfaktor SP1 maßgeblich an der Induktion des hIL-10 Promotors durch LPS beteiligt ist (Ma *et al.* 2001). In der gleichen Zelllinie beschrieben Huang et al., dass nach Stimulation mit LPS IRAK1 den Transkriptionsfaktor Stat3 aktiviert und dieser dann vermehrt an den Promotor bindet. Auch IRAK1 selbst kann an den Promotor binden (Huang *et al.* 2004). Brenner et al. zeigten in einer ihrer Arbeiten, dass die durch β-Adrenergika induzierte Transkription von IL-10 stark von c/EBP-α abhängig ist (Brenner *et al.* 2003). Während IFN-γ die IL-10 Genexpression inhibiert (Chomarat *et al.* 1993), wird sie durch IFN-α induziert (Aman *et al.* 1996). Hierbei wirkt IFN-α hauptsächlich über den Transkriptionsfaktorkomplex ISGF (Stat1 + Stat2 + p48) und den IFN regulatorischen Faktor-1 (IRF-1) (Darnell *et al.* 1994). Daneben wurde aber auch gezeigt, dass IFN-α Stat3 durch Phosphorylierung am Tyrosin-Rest aktiviert und in Folge Protein-DNA-Komplexe entstehen, welche Stat3 enthalten (Yang *et al.* 1996). Cao et al, identifizierten c-Maf als einen indirekter Faktor, der die IL-10 Genexpression nach Stimulation mit IFN-γ bzw. LPS über andere Transkriptionsfaktoren beeinflusst (Cao *et al.* 2002). An diese Ergebnisse anknüpfend, identifizierten Ziegler-Heitbrock et al.

im IL-10 Promotor ein IRF-1 Bindemotiv (-180 bp vom Transkriptionsstart). Aufgrund der Induktion der B-Zelllinie RPMI 8226.1 durch IFN-α, binden die Transkriptionsfaktoren IRF und Stat3 an den IL-10 Promotor. IRF allein kann jedoch den Promotor nicht transaktivieren, da eine Transaktivierung nur in Kooperation mit Stat3 erfolgt (Ziegler-Heitbrock *et al.* 2003).

1.4 Der Jak/Stat Signaltransduktionsweg

Der Januskinase/Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription (Jak/Stat) Signalweg überträgt die Signale vieler Zytokine und Wachstumsfaktoren und ist deshalb von großer Bedeutung für die Regulation des Immunsystems. Im einfachsten Fall setzt er sich aus den folgenden drei Komponenten zusammen: einem membrangebundenen Zelloberflächenrezeptor der Zytokinrezeptor-Superfamilie, einer rezeptorassoziierten Tyrosinkinase der Familie der Januskinasen (Jaks) und einem Stat (Signal transducers and activators of transcription) Transkriptionsfaktor (Abbildung 2). Die membrangebundenen Zelloberflächenrezeptoren der Zytokinrezeptor-Superfamilie bestehen aus mehreren Untereinheiten, die als Homodimere oder Heteromultimere vorliegen und an ihrer ins Zytoplasma reichenden Domäne mit Januskinasen assoziiert sind. Durch die Bindung eines Liganden multimerisieren die Rezeptoruntereinheiten, die Kinasen phosphorylieren sich gegenseitig. Die so aktivierten Kinasen phosphorylieren im Anschluss weitere Proteine, darunter hauptsächlich Stat Transkriptionsfaktoren, die im Zytoplasma vorliegen. Diese können im Anschluss dimerisieren, in den Kern wandern, an spezifische regulatorische Sequenzen binden und die Transkription ihrer Zielgene aktivieren oder reprimieren (Hanada and Yoshimura 2002; Rawlings *et al.* 2004).

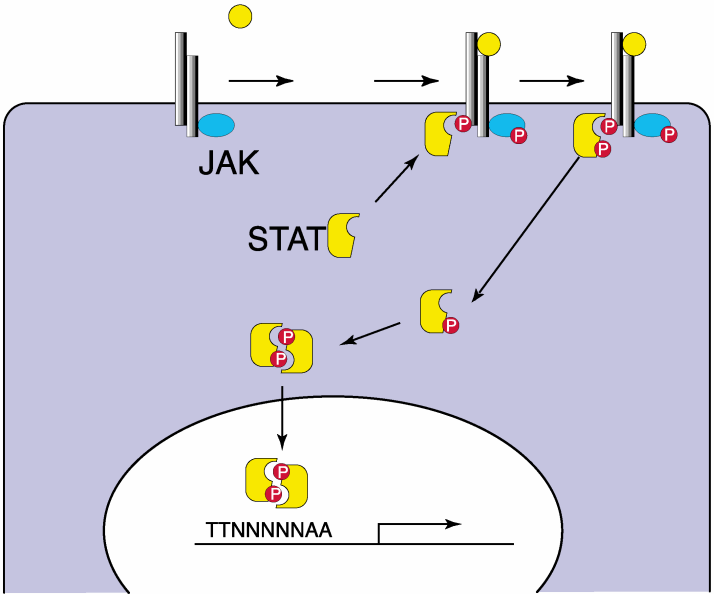

Abbildung 2: Der Jak/Stat Signalweg nach Aktivierung durch ein Zytokin. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ziegler-Heitbrock.

1.4.1 Die Stat Proteine

Die Familie der Stat Transkriptionsfaktoren umfasst sieben Mitglieder (Stat1, -2, -3, -4, -5a, -5b und -6). Alle Mitglieder sind zwischen 750 und 800 Aminosäuren lang und bestehen aus fünf Domänen (Abbildung 3). Die N-terminale Domäne ist an Wechselwirkungen mit Koaktivatoren der Transkription, wie z. B. CBP/p300, und dem nukleären Import beteiligt. Die coiled-coiled Domäne ist für Protein-Protein Interaktionen, die Bindung an den Rezeptor und den nukleären Export wichtig. Für die Bindung der Stat Moleküle an die DNA in der Promotorregion der Zielgene ist die DNA-Bindedomäne (DBD) unerlässlich. Die sich anschließende Linker-Domäne ist für die Tertiärstruktur verantwortlich. Die SH2-Domäne vermittelt zusammen mit der Phosphorylierung eines konservierten Tyrosinrests durch Jaks die Dimerisierung von Stat Proteinen. Daneben vermittelt die SH2-Domäne die Bindung an den Rezeptor. Die C-terminale Transaktivierungsdomäne ist an der Aktivierung der Transkription beteiligt. Vermutlich ist die Phosphorylierung eines konservierten Serinrests in dieser Domäne mit an der Regulation der Transkription beteiligt. Ob dies jedoch für alle Stat Proteine gilt, ist noch unklar (Imada and Leonard 2000; Kisseleva *et al.* 2002).

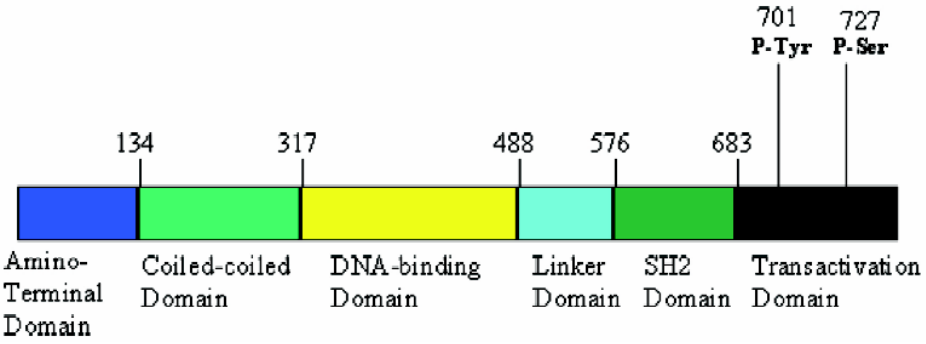

Abbildung 3: Stat Protein Struktur nach Stephanou, Fig. 1 (Stephanou 2004).

Das für diese Arbeit wichtige Stat3 Protein wird von den meisten Zelltypen exprimiert und durch eine Vielzahl verschiedener Zytokine (Mitglieder der IL-6 Familie, Leptin, IL-10, IFNs), Wachstumsfaktoren und Onkogene aktiviert. Je nach Zelltyp werden unterschiedliche Gensets durch Stat3 aktiviert. Besonders wichtig scheint der Transkriptionsfaktor in der embryonalen Entwicklung zu sein, da Stat3 Knock-out-Mäuse nicht lebensfähig sind. Es existieren zwei Isoformen von Stat3, die durch alternatives Splicen entstehen: Stat3α und Stat3β. Letzteres ist um die C-terminale Aktivierungsdomäne verkürzt. Dennoch zeigten Maritano et al., dass beide Isoformen in der Lage sind, die Transkription zu aktivieren (Maritano *et al.* 2004).

1.5 Glukokortikoide

Glukokortikoide (GC) sind für die Behandlung vieler Krankheitsbilder von großer Bedeutung. Sie werden in den Zellen der Nebennierenrinde aus Cholesterol synthetisiert. Aufgrund ihrer entzündungshemmenden und immunsuppressiven, bzw. immun modulierenden Eigenschaften spielen sie bei der Eindämmung der Entzündungsreaktion eine bedeutende Rolle. Daneben regulieren sie weitere physiologische Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Zusammen mit den Gestagenen, den Androgenen, den Östrogenen und den Mineralkortikoiden gehören Glukokortikoide zu den fünf Hauptklassen der Steroidhormone. Ihre Wirkung entfalten Glukokortikoide, die aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaft durch die Plasmamembran diffundieren, über die Bindung an Glukokortikoidrezeptoren (GR) im Zytoplasma der Zelle.

Das in dieser Arbeit verwendete Methylprednisolon ist ein synthetisch hergestelltes Cortisolanalogon. Prednisolon unterscheidet sich von Cortisol durch eine zusätzliche Doppelbindung im Ring A (Δ`-Dehydrocortisol). Durch Methylierung entsteht Methylprednisolon (Abbildung 4).

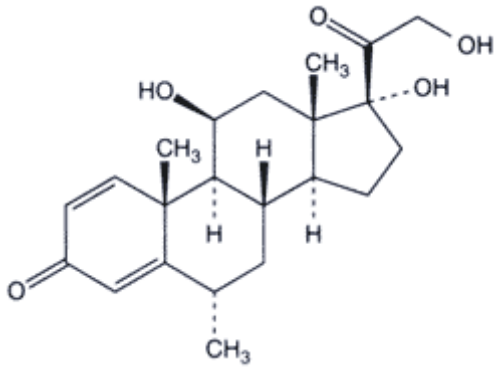

Abbildung 4: Strukturformel des verwendeten 6α-Methylprednisolons.

1.5.1 Der Glukokortikoidrezeptor

Der Glukokortikoidrezeptor (GR) ist ein nukleärer Rezeptor und gehört zur Familie der Steroidhormonrezeptoren. Die zwei Isoformen GRα und GRβ entstehen durch alternatives Splicen desselben Gens. GRα besteht aus 777 Aminosäuren, kann Glukokortikoide binden und in Folge die Transkription von Genen beeinflussen. Im Gegensatz dazu bindet der nur 742 Aminosäuren lange GRβ keine Glukokortikoide. Die genaue Funktion von GRβ ist noch unklar, es gibt aber Hinweise darauf, dass er die Wirkung von GRα blockiert und somit zu einer Glukokortikoid Resistenz beiträgt (Smoak and Cidlowski 2004). GRα wird von fast jeder Säugetierzelle exprimiert und besteht aus drei Domänen (Abbildung 5). Die Transaktivierungsdomäne am N-Terminus, die eine Aktivierungsdomäne (AF-1) enthält, eine DNA-Bindedomäne in der Mitte, die unter den Rezeptoren hoch konserviert ist und zwei Zinkfinger-motive enthält und eine Hormon-Bindedomäne am C-Terminus. Letztere ist für die Bindung von Heatshockproteinen verantwortlich, die den Rezeptor in einem inaktiven Zustand halten. Daneben enthält sie auch eine Kernlokalisierungssequenz und eine Liganden abhängige Aktivierungsdomäne (AF-2) (Kumar and Thompson 1999).

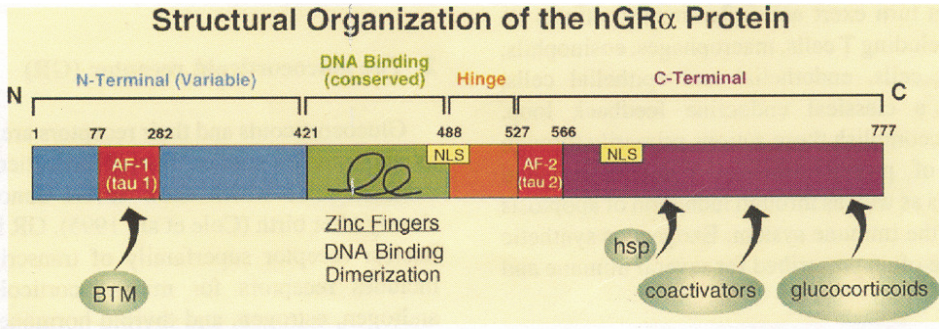

Abbildung 5: Struktur des GRα Proteins nach Smoak et al. Fig 1 (Smoak and Cidlowski 2004).

1.5.2 Transkriptionsregulation durch Glukokortikoide

In Abwesenheit eines Liganden liegt der Glukokortikoidrezeptor im Zytoplasma in einem inaktiven Multiproteinkomplex vor, der aus den Heatshockproteinen 90 (hsp90), hsp70, hsp56, hsp40, einem niedrig molekularen Protein (p23) und einigen Immunophilinen besteht (Pratt and Toft 1997). Die Bindung des Liganden (GC) verursacht eine Konformationsänderung des Rezeptors, der daraufhin vom beschriebenen Komplex dissoziiert und in den Kern wandert. Dort bindet er entweder als Homodimer allein oder zusammen mit anderen Proteinen (Koaktivatoren) direkt an eine als Glukokortikoid Responsive Element (GRE) bezeichnete DNA Sequenz in der Promotor Region des zu regulierenden Gens. Das GRE ist eine palindromische Sequenz aus 15 bp (AGAACAnnnTGTTCT; n steht für ein beliebiges Nukleotid) (Almawi and Melemedjian 2002). Für die Aktivierung der Transkription durch Glukokortikoide ist die Anzahl der GREs und ihr Abstand zur TATA-Box von Bedeutung (Jantzen *et al.* 1987; Wieland *et al.* 1990). Die zusätzliche Bindung von Koaktivatoren wie CBP/p300, P/CAF und SRC-1 vermitteln die Bindung an die basale Transkriptionsmaschinerie und erleichtern so die Transkription.

Die Inhibierung der Transkription durch GC kann wie im Fall des Osteocalcin Gens durch die Bindung an negative GRE Elemente (nGRE) erfolgen. Dadurch wird die Bindung des TATA Box Binding Proteins (TBP) verhindert, da dessen Bindestelle mit dem nGRE überlappt. Nur wenige durch GC regulierte pro-inflammatorische Gene enthalten jedoch ein nGRE (Meyer *et al.* 1997; Morrison and Eisman 1993). Häufiger erfolgt die Inhibierung der Transkription aber durch Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen dem GRα und Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und

NF-κB. Auf diesem Weg werden die Zytokine TNF, GM-CSF, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8 und IL-11 (Almawi and Melemedjian 2002), die Chemokine MIP und Rantes, die Enzyme iNOS und Cox-2 sowie die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 reguliert. Darüber hinaus können Glukokortikoide auch die Signaltransduktion über andere Signalwege wie z. B. den p38/MAPK Signalweg (Lasa *et al.* 2002; Shuto *et al.* 2002) beeinflussen. Durch die Interaktion des GRα mit Mitgliedern der Stat Familie können GC neben einer Repression auch zu einer Aktivierung von Genen der Immunantwort führen. Daneben können Glukokortikoide zusammen mit dem GR die Phosphatidylinositol-3-hydroxykinase (PI3K) aktivieren (Hafezi-Moghadam *et al.* 2002). Schließlich konnten Interaktionen des GRα mit Transkriptionsfaktoren der Smad Familie, die häufig durch den TGF-β Signaltransduktionsweg aktiviert werden, nachgewiesen werden (Smoak and Cidlowski 2004).

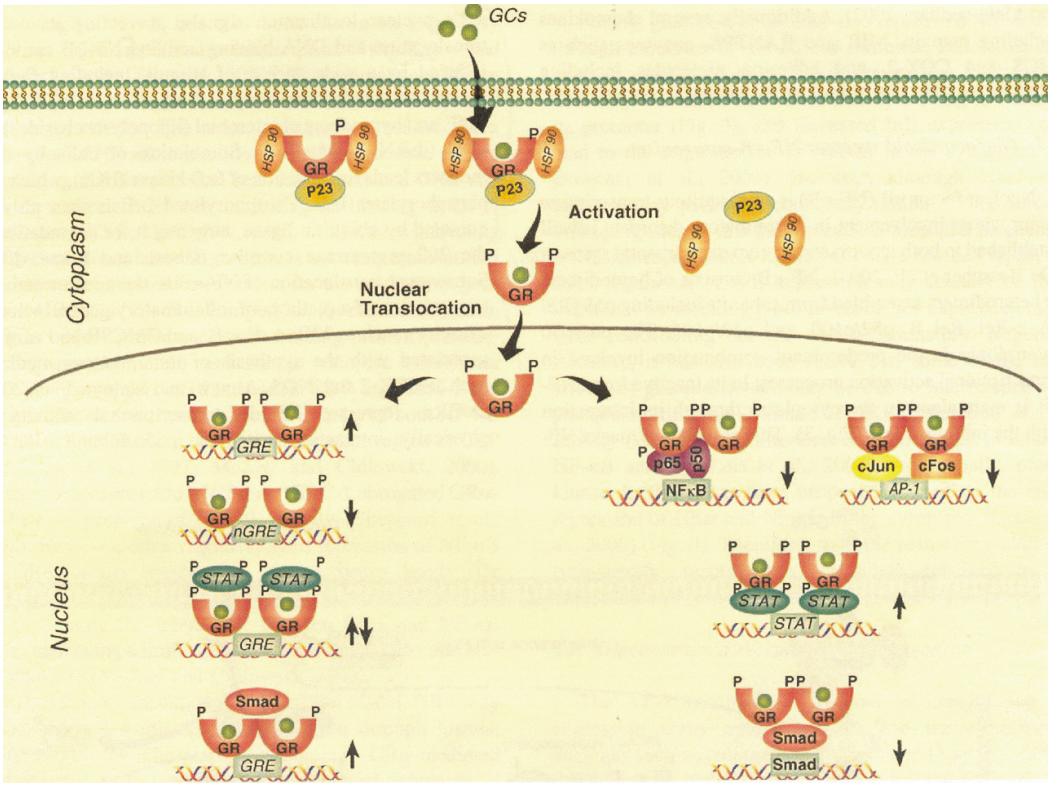

Abbildung 6: Aktivierung und Repression der Transkription durch GRα nach Smoak et al. Fig 2 (Smoak and Cidlowski 2004)

1.6 Einfluss von Glukokortikoiden auf die IL-10 Genexpression

Gayo et al. konnten in ihrer Studie an Patienten mit Multipler Sklerose zeigen, dass die Verabreichung von Steroiden (Methylprednisolon) zu einer Induktion von IL-10 mRNA in den PBMC, sowie zu einer erhöhten Menge von IL-10 Protein im Serum der Patienten führt. Die Induktion von IL-10 mRNA und Protein konnten sie ebenfalls *in vitro* an PBMC von gesunden Personen, nach Stimulation mit Methylprednisolon zeigen (Gayo *et al.* 1998). In *in vitro* Experimenten von Richards et al. wurde demonstriert, dass Glukokortikoide (Dexamethason) die Produktion von IL-10 mRNA und Protein in menschlichen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen induzieren. Verstärkt wird der Effekt durch Zugabe von IL-4 (Richards *et al.* 2000). Barrat et al. zeigten, dass naive $CD4^+$ T-Zellen, die mit Vitamin D3 und Dexamethasone stimuliert werden, zu IL-10 produzierenden regulatorischen T-Zellen differenzieren (Barrat *et al.* 2002). In LPS stimulierten Alveolarmakrophagen induzierte inhaliertes Budesonid sowohl IL-10 Protein als auch IL-10 mRNA (John *et al.* 1998). Visser et al. beschrieben in ihrer Arbeit, abhängig vom jeweiligen Spender, einen stimulatorischen Effekt von physiologischen Mengen an Glukokortikoiden auf IL-10 nach LPS Stimulation der PBMC (Visser *et al.* 1998). Mozo et al. konnten zeigen, dass in PBMC und Monozyten, nicht aber in T- und B-Zellen, nach Vorinkubation mit Dexamethasone eine erhöhte IL-10 Proteinmenge nachweisbar war. In Monozyten konnte auch eine Induktion der IL-10 mRNA Menge nachgewiesen werden. Diese Effekte wurden auch für andere Glukokortikoide, darunter Methylprednisolon, gezeigt (Mozo *et al.* 2004). Hodge et. al. zeigten, dass hohe Prednisolonkonzentrationen (10^{-5} M) in mit LPS stimulierten Makrophagen zu einer Unterdrückung der IL-10 Genexpression führen. Im Gegensatz dazu führen jedoch niedrige Prednisolonkonzentrationen (10^{-9} M und 10^{-11} M) zu einer Induktion der Expression von IL-10 (Hodge *et al.* 1999). Alveolarmakrophagen, die mit Methylprednisolon inkubiert wurden, zeigten nach Stimulation mit LPS eine deutlich erhöhte Menge an IL-10 Protein und IL-10 mRNA. Allein durch die Induktion durch Methylprednisolon konnte aber nur eine erhöhte IL-10 mRNA, nicht jedoch IL-10 Protein Produktion nachgewiesen werden (Frankenberger *et al.* 2005). Bei all diesen

Untersuchungen bleibt unklar, über welchen molekularen Mechanismus Glukokortikoide das IL-10 Gen induzieren.

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, den Mechanismus der Induktion von IL-10 durch Glukokortikoide anhand des Modells einer B-Zelllinie näher zu charakterisieren. Dabei sollen die an der Induktion durch Glukokortikoide beteiligten Transkriptionsfaktoren und DNA Motive identifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Firma
Bakterienschüttler (Thermoshake)	Gerhardt, Königswinter
β- Counter (2100TR)	Packard, Leipzig
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Elektrophoresekammer Horizon® 11 14	Gibco, Karlsruhe
Elektrophoresekammer (15-17)	Gibco, Karlsruhe
ELISA Reader (Spectra Count™)	Packard, Leipzig
Geltrockner (583)	Bio Rad, München
Kamera (MP-4)	Polaroid, Dreieich-Sprendlingen
LightCycler	Roche, Mannheim
Luminometer	Berthold, Pforzheim
Mikroskop (ID 03)	Zeiss, Jena
Röntgenfilmkassette	Kisker, Steinfurt
Spannungsgerät (LNG 350-03)	Heinzinger, Rosenheim
Spannungsgerät (ST606T)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Spectrophotometer (ND-1000)	NanoDrop®, Kisker, Steinfurt
Thermomixer (S436)	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler Touch Down	Hybaid, Heidelberg
Ultraschallgerät (Sonopuls GM70)	Bandelin, Berlin
Ultraschall Wasserbad (Sonarex RK 100H)	Bandelin, Berlin
UV-Transilluminator (TS-20E)	Uniequip, Martinsried
Vortexer (MS 2 Minishaker)	IKA®, Staufen
Zählkammer	Neubauer improved, Hecht Assistent, Sondheim
Zentrifuge (3K15)	Sigma, Osterode
Zentrifuge (1K15)	Sigma, Osterode
Zentrifuge (1-15)	Sigma, Osterode
Zentrifuge (Avanti J-25)	Beckmann Coulter, Krefeld

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Bestellnummer	Firma
Blotting-Papier	#3030-347	Schleicher & Schuell, Würzburg
Einmalreaktionsgefäß 0,5 ml	#0030120086	Eppendorf, Hamburg
Einmalreaktionsgefäß 1,5 ml	#0030121023	Eppendorf, Hamburg
Einmalreaktionsgefäß 15 ml	#188261	Greiner, Frickenhausen
Einmalreaktionsgefäß 50 ml	#227.261	Greiner, Frickenhausen

Einmalspritze 20 ml	#4200.000V0	Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen
Einmalspritze 50 ml	#300865	Becton Dickinson, Heidelberg
LightCycler Kapillaren	#11909339001	Roche, Mannheim
LS Säule (MidiMACS)	#130-042-401	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Nylonsieb (100 µm)	#35236	BD Falcon, Heidelberg
Röntgenfilm (18 x 24 cm)	#XA09.180240100	Dieter Lindhardt, München
Polaroid Film	#F4638-2EA	Sigma, Taufkirchen
Ultrafilter (Ultra Steriset)	#8394189	Gambro Hospal GmbH, Martinsried
Zellkulturflaschen (75cm^2)	#3275	Costar, Bodenheim
Zellkulturlochplatten 6-Loch	#3506	Costar, Bodenheim
Zellschaber	#3010	Costar, Bodenheim

2.1.3 Chemikalien

Chemikalien	**Bestellnr.**	**Firma**
$Aqua_{dest.}$	#82479E	B. Braun, Melsungen
Acrylamid/Bisacrylamid	#130301	Appligene, Heidelberg
Agarose	#161-3102	BioRad, München
ALLN (Calpain Inhibitor 1)	#A-6185	Sigma, Taufkirchen
Antipain	#A-6191	Sigma, Taufkirchen
Aprotinin	#A-6279	Sigma, Taufkirchen
APS (=Ammoniumperoxodisulfat)	#1.01201.01400	Merck, Darmstadt
Borsäure	#B-6768	Sigma, Taufkirchen
Bradford-Reagenz	#500-0006	BioRad, München
BSA (Bovines Serum Albumin)	#A-2153	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	#C-2432	Sigma, Taufkirchen
Chloroform/Isoamylalkohol	#P-2069	Sigma, Taufkirchen
DEPC (= Diethylpyrocarbonat)	#D-5758	Sigma, Taufkirchen
DMSO (= Dimethylsulfoxid)	#D-8418	Sigma, Taufkirchen
DNA Marker VI 0,15-2.1 kbp	#1062590	Roche, Mannheim
DNA Marker XVII 500 bp ladder	#1855646	Roche, Mannheim
DTT (=Dithiothreitol)	#19474	Merck, Darmstadt
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	#RPN2106	Amersham Biosciences, Freiburg
EDTA (=Ethylendiamintetra-essigsäure)	#E-5143	Sigma, Taufkirchen
EGTA	#E-3889	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	#1.00983.1000	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	#E-2515	Sigma, Taufkirchen
FCS (= Fötales Kälberserum Lot 371S, 477U)	#S 0115	Biochrom, Berlin
Formaldehyd	#F-8775	Sigma, Taufkirchen
dATP	#58002027-01	Roche, Mannheim
dCTP	#58002028-01	Roche, Mannheim

dGTP	#58002030-01	Roche, Mannheim
dTTP	#58002031-01	Roche, Mannheim
Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder	#SM0243	Fermentas, St. Leonrot
Glycerin	#G-5516	Sigma, Taufkirchen
Glycine	#G-7403	Sigma, Taufkirchen
Glycogen	#G-0885	Sigma, Taufkirchen
Heparin-Natrium	#2047217 N1	B. Braun, Melsungen
HEPES	#1.10110.0025	Merck, Darmstadt
Hyperfilm™ ECL, 18 x 24 cm	#RPN3103,	Amersham Biosciences, Freiburg
Igepal CA-630	#I-3021	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	#I-9516	Sigma, Taufkirchen
KH_2PO_4	#04873	Merck, Darmstadt
Leupeptin- Acetat	#L-2023	Sigma, Taufkirchen
Leupeptin- Propionyl	#L-3402	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin	#25030-024	Gibco®, Karlsruhe
LiCl	#L-9650	Sigma, Taufkirchen
LPS (=Lipopolysaccharid, aus *S. minnesota*)	#L-6261	Sigma, Taufkirchen
LymphoPrep	#1053980	Nycomed Pharma, Oslo
2-Mercaptoethanol	#M-3148	Sigma, Taufkirchen
6α-Methylprednisolon	#M-0639	Sigma, Taufkirchen
Magermilchpulver	#1.15363	Merck, Darmstadt
Methanol	#1.06009.2500	Merck, Darmstadt
$MgCl_2$ Solution	#E05274	Roche, Mannheim
Mifepristone (= RU-486)	#M-8046	Sigma, Taufkirchen
Mineralöl	#M-5904	Sigma, Taufkirchen
NaAc	#S-5636	Sigma, Taufkirchen
NaCl	#S-9625	Sigma, Taufkirchen
NaDOC	#D-6750	Sigma, Taufkirchen
$NaHCO_3$	#S-8875	Sigma, Taufkirchen
Nicht-essenzielle-Aminosäuren	#11140-35	Gibco®, Karlsruhe
Nitrocellulosemembran Hybond™ECL™	#RPN78D	Amersham Biosciences, Freiburg
N,N,N`,N` Tetramethylethylene-diamine (TEMED)	#T-9281	Sigma, Taufkirchen
NuPage™ Bis-Tris-Gele (4-12 %)	#NP0329BOX	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage™ MOPS-SDS Puffer	#NP0001	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage™ Transferpuffer	#NP0006	Invitrogen, Karlsruhe
Oligo $d(T)_{16}$	#N8080128	Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
OPI-Supplement	#O-5003	Sigma, Taufkirchen
10 x PCR Buffer II	#D03434	Roche, Mannheim
PCR Reagent iQ™ SYBR® Green	#10003253RevA	BioRad, München
Penicillin/Streptomycin	#15140-114	Gibco®, Karlsruhe
Pepstatin A	#P-4265	Sigma, Taufkirchen
Phenol Solution	#P-4557	Sigma, Taufkirchen

Protease Inhibitor Cocktail (=PIC)	#11697498001	Roche, Mannheim
PMSF (= Phenylmethylsulfonyl-fluorid)	#P-7626	Sigma, Taufkirchen
Poly(dI-dC)	#27-7880-02	Amersham,Freiburg
Polymyxin B Sulfate	#P-1004	Sigma, Taufkirchen
Protein A/G Plus-Agarose	Sc-2003	Santa Cruz Biotec, Heidelberg
Puffer B (10 x)	#1417967	Roche, Mannheim
RNase Inhibitor	#58002110-01	Roche, Mannheim
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	#00011	Adefo Chemie GmbH, Nürnberg
Röntgen-Fixierer-Konzentrat	#00064	Adefo Chemie GmbH, Nürnberg
RPMI 1640-Medium	#F1415	Biochrom KG, Berlin
SDS	#L-5750	Sigma, Taufkirchen
SeeBlue® Plus2-Marker	LC5925	Invitrogen, Karlsruhe
TRI Reagent	#T-9424	Sigma, Taufkirchen
TRIS-Base (= Tris (hydroxymehyl)-aminomethan)	#T-6791	Sigma, Taufkirchen
Triton X-100 (= Octyl Phenoxy Poly-ethoxyethanol)	#T-6878	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau	#T-8154	Sigma, Taufkirchen
Tween® 20Àtlas	#2323003	Wasserfuhr, Bonn

2.1.4 Kommerzielle Komplettsysteme

Kits	**Firma**	
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	#E1910	Promega, Mannheim
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit	#12239264004	Roche, Mannheim
PeliKine Compact™ Human IL-10 ELISA Kit	#M1910	Sanquin, Amsterdam
ProFection®Mammalian Transfection System		
DEAE-Dextran	#E1210	Promega, Mannheim
QIAquick Nucleotide Removal Kit	#28304	Quiagen, Hilden

2.1.5 Enzyme

Enzym	Bestellnr.	Firma
Klenow-Enzym	#1008404	Roche, Mannheim
MuLV Reverse Transkriptase	#G00272	Roche, Mannheim
RNase Inhibitor	#E12852	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme:	BamH I #220612	Roche, Mannheim
	Eco RI #1175084	Roche, Mannheim
	Hind III #656313	Roche, Mannheim
	Kpn I #899186	Roche, Mannheim
	Pvu I #650137	Roche, Mannheim
	Sal I #348783	Roche, Mannheim
	Xho I #R6161	Promega, Mannheim

2.1.6 Radionukleotide

Radionukleotid	Bestellnr.	Firma
[α-^{32}P]-dATP	#AA0004	Amersham, Freiburg

2.1.7 Antikörper

Antikörper	Bestellnr.	Firma
anti-Actin, anti-human, Kaninchen, polyclonal	#A-2066	Sigma, Taufkirchen
anti-Kaninchen IgG (ganzes Molekül)	#A-0545	Sigma, Aldrich
anti-mouse CD19 MicroBeads	130-052-201	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
anti-mouse CD19-FITC	130-092-042	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
anti-human CD19 MicroBeads	130-050-301	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
anti-mouse CD19-FITC IgG_1,κ	#555412	BD Pharmingen^{TM}, Heidelberg
anti-IgG	sc-2027	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Stat3 (C-20):	sc-482	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-TATA Box binding protein (anti-TBP)		(Ruppert *et al.* 1996)

2.1.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von AG BIODV an der GSF in Neuherberg bzw. von der Firma MWG in Ebersberg synthetisiert. Das Lyophilisat wurde in 200 µl H_2O_{dest} gelöst und auf 15 µM verdünnt.

Anwendung	Sequenz in 5`->3`Orientierung	Produktlänge
ChIP	human H2B Promotor	76 bp
	TTGCATAAGCGATTCTATATAAAAGCG	
	ATAAAGCGCCAACGAAAAGG	
	human IL-10 Promotor	80 bp
	TAG AGA AGG AGG AGC TCT AAG CAG	
	AGG CCT CTT CAT TCA TTA AAA AGC C	
	human Myoglobin	76 bp
	AAG TTT GAC AAG TTC AAG CAC CTG	
	TGG CAC CAT GCT TCT TTA AGT C	
EMSA	LS4	
	AGC TAT CCT GTG CCG GGA AAC C	
	TCG AGG TTT CCC GGC ACA GGA T	
LightCycler PCR	α-Enolase	619 bp
	GTT AGC AAG AAA CTG AAC GTC ACA	
	TGA AGG ACT TGT ACA GGT CAG	
	IL-10	204 bp
	GCC TAA CAT GCT TCG AGA TC	
	TGA TGT CTG GGT CTT GGT TC	

2.1.9 Bakterienstämme und Zelllinien

XL1-Blue Supercomptent Cells	#200236	Stratagene
RPMI 8226.1		Humane B-Zelllinie aus einem Patienten mit multiplem Myelom. Die λ- leichte Kette positiven Zellen wachsen adhärent.

2.1.10 Plasmide

Alle Konstrukte sind in Benkhart et al. und Ziegler-Heitbrock et al. (Benkhart *et al.* 2000; Ziegler-Heitbrock *et al.* 2003) beschrieben.

Plasmid	**eingesetzte Konzentration**
phRG-TK Vector	200 ng/ml
pIL-10(-1044).luci	500 ng/ml
LS4(Stat3 Trimer)	1 µg/ml
pIL-10(-195)wt.luci	1 µg/ml
pIL-10(-195)$Stat_m$.luci	1 µg/ml
pIL-10(-195)IRF_m.luci	1 µg/ml
pIL-10(-195)$Stat_m$+IRF_m.luci	1 µg/ml
pIL-10(-150)wt.luci	1 µg/ml
3xκB.luci	200 ng/ml
pIL-10(-150 (LS1m-LS9m).luci	1 µg/ml

2.1.11 Lösungen und Puffer

Lösung / Puffer	**Zusammensetzung**
Ablösepuffer (Western Blot)	62,5 mM Tris/HCL 2 % SDS H_2O reinst pH 6,7, vor Gebrauch autoklavieren 2-Mercaptoethanol 800 µl/100 ml Ablösepuffer
Bindepuffer (10 x BB)	1 M TrisHCl pH 7,5 5 M NaCl 0,5 M EDTA 50 % Glycerol autoklavieren
ChIP Puffer A	0,1 M NaCl 1 mM EDTA pH 8 0,5 mM EGTA pH 8 50 mM HEPES pH 7,6 ad 200 ml H_2O_{dest} vor Gebrauch HCHO (Endkonz. 11 %) zufügen

ChIP Puffer B	0,25 % Triton X-100 10 mM EDTA pH 8 0,5 mM EGTA pH 8 20 mM HEPES pH 7,6 ad 1000 ml H_2O_{dest}
ChIP Puffer C	0,15 M NaCl 1 mM EDTA pH 8 0,5 mM EGTA pH 8 50 mM HEPES ad 1000 ml H_2O_{dest}
ChIP Waschpuffer 1	0,1 % SDS 0,1 % NaDOC 1 % Triton X-100 0,15 mM NaCl 1 mM EDTA pH 8 0,5 mM EGTA pH 8 20 mM HEPES pH 7,6 ad 400 ml H_2O_{dest}
ChIP Waschpuffer 2	0,1 % SDS 0,1 % NaDOC 1 % Triton X-100 0,5 M NaCl 1 mM EDTA pH 8 0,5 mM EGTA pH 8 20 mM HEPES pH 7,6 ad 200 ml H_2O_{dest}
ChIP Waschpuffer 3	0,25 M LiCl 0,5 % NaDOC 0,5 % Igepal 1 mM EDTA pH 8 0,5 mM EGTA pH 8 20 mM HEPEs pH 7,6 ad 200 ml H_2O_{dest}
ChIP Waschpuffer 4 (10x)	10 mM EDTA pH 8 5 mM EGTA pH 8 200 mM HEPES pH 7,6 ad 200 ml H_2O_{dest}; vor Gebrauch verdünnen
ChIP Elutionspuffer	1 % SDS 0,1 M $NaHCO_3$ ad 200 ml H_2O_{dest}

ChIP Inkubationspuffer (5x)	0,75 % SDS 5 % Triton X-100 0,75 M NaCl 5 mM EDTA pH 8 2,5 mM EGTA pH 8 100 mM HEPES pH 7,6 ad 50 ml H_2O_{dest}; vor Gebrauch verdünnen
D-PBS	PBS 0,5 mM EDTA 0,025 % Humanserum
EDTA 0,5 M	18,6 g EDTA ad 100 ml H_2O_{dest}; pH 8,0 vor Gebrauch autoklavieren
H_2O/ 0,1 % DEPC	über Nacht bei RT inkubieren vor Gebrauch autoklavieren
Kernextraktionspuffer A	10 mM HEPES pH 7,9 10 mM KCL 1,5 mM $MgCl_2$ ad 100 ml H_2O_{dest} autoklavieren
Kernextraktionspuffer B	20 mM HEPES pH 7,9 25 % Glycerol 0,42 M NaCl 1,5 mM $MgCl_2$ 0,2 mM EDTA pH 8 ad 100 ml H_2O_{dest} autoklavieren
Kernextraktionspuffer D	20 mM HEPES pH 7,9 25 % Glycerol 0,1 M KCL 0,05 mM EDTA pH 8 ad 100 ml H_2O_{dest} autoklavieren
Kernextraktionspuffer D^+	5 ml Puffer D 0,2 % Igepal
Laufpuffer (Western Blot)	50 ml MOPS-SDS Puffer, Invitrogen ad 1 l H_2O
Mix A	je 0,5 mM dTTP, dGTP und dCTP

NF-κB Dye	50 µl 10 x BB 50 µl D^+ 20 µl Bromphenolblau 20 µl Xylenxyanol 360 µl H_2O_{dest}
PBS (1 x)	Na_2HPO_4 x 2 H_2O 57 mM 18 mM KH_2PO_4 75 mMNaCl H_2O/reinst pH 7,4, vor Gebrauch autoklavieren
TBE Puffer (10x)	108 g Tris/Base 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1 l H_2O_{dest} autoklavieren
TEN/50 mM NaCl	10 mM Tris HCL pH 8 1 mM EDTA pH 8 50 mM NaCl autoklavieren
Transferpuffer (Western Blot)	17 ml Transferpuffer, Invitrogen 33,5 ml Methanol Ad 330 ml H_2O
Trypanblau	Trypanblau 1:2 in PBS

2.1.12 Nährmedien

Nährmedium	**Zusammensetzung**
Mono Mac 6-Medium	RPMI 1640 (1 l) 2 mM L-Glutamin 200 U/ml Penicillin 200 µg/ml Streptomycin 1 vial/l OPI-Supplement 5 ml Nicht-essenzielle Aminosäuren (1-2 x) Das Medium wird über eine Gambro-Säule ultrafiltriert. 10 % FCS
LB-Medium	40 g Pepton 20 g Hefeextrakt 40 g NaCl ad 4 l H_2O_{dest} autoklavieren

2.2 Arbeiten mit Zellen

2.2.1 Die humane B-Zelllinie RPMI 8226.1

Die humane B-Zelllinie RPMI 8226.1 (Matsuoka *et al.* 1967; Ziegler-Heitbrock *et al.* 1994), stammt von einem Patienten mit multiplem Myelom. Die Zellen sind λ- leichte Kette positiv und wachsen leicht adhärent.
Die Kultivierung der Zellen erfolgt in 75 cm^2-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2. Zweimal wöchentlich werden die Zellen mithilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden gelöst und für 6 min bei 400 g pelletiert. Anschließend wird die Zellzahl bestimmt. Zur weiteren Kultivierung werden 5 x 10^6 Zellen in 25 ml Mono Mac 6 (MM6) -Medium + 10 % FCS aufgenommen. Die restlichen Zellen können für Versuche (Stimulation, RNA-Isolierung, Transfektion, Kernextraktion) verwendet werden.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen 1:16 mit Trypanblau verdünnt und in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Diese ist in vier Großquadrate, die wiederum aus je 16 Kleinquadraten mit einem Gesamtvolumen von 0,1 µl bestehen, unterteilt. Da Trypanblau nur in tote Zellen eindringen kann, werden zur Bestimmung der Lebendzellzahl die ungefärbten Zellen gezählt. Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension berechnet sich nun nach der Formel:

Mittelwert x Verdünnungsfaktor = Zellzahl x 10^4/ml

2.2.3 Stimulation von Zellen

Zur Untersuchung der Regulation der IL-10 Expression durch MP werden die IL-10 mRNA, die IL-10 Proteinexpression und die IL-10 Promotoraktivität in stimulierten und unstimulierten Zellen untersucht. Dazu werden 1 x 10^6 Zellen in 1 ml MM6-Medium + 10 % FCS aufgenommen und für definierte Zeiten mit verschiedenen Stimuli inkubiert. Die genauen Bedingungen sind in den jeweiligen Versuchsbeschreibungen im Abschnitt Ergebnisse aufgeführt.

2.2.4 Anfertigen von Lysaten

Die Isolierung von RNA erfolgt aus stimulierten und unstimulierten Zellen. Dem Stimulationsansatz (1 x 10^6 Zellen in 1 ml MM6-Medium + 10 % FCS) werden zum gewünschten Zeitpunkt 20 µl (2 x 10^4 Zellen) entnommen und in 200 µl TRI Reagent gegeben. Nach Durchmischen des Lysats kann dieses bei -20 °C gelagert werden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung der mRNA

Zur Isolierung der mRNA werden dem Lysat 3 µl tRNA (5,67 µg/µl) zugegeben. Nach Zugabe von 40 µl Chloroform (1/5 Vol) wird der Ansatz für 15 sek gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die Probe für 15 min bei 12000 g zentrifugiert. Die farblose, wässrige Phase die die RNA enthält, wird in ein neues Gefäß überführt und unter Zugabe von 110 µl Isopropanol (1 Vol) für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Zentrifugation des Ansatzes für 12 min bei 12000 g wird der Überstand abgenommen, das RNA-Pellet mit 150 µl EtOH 75 % versetzt und bei 12000 g für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wird erneut abgenommen und das Pellet getrocknet. Anschließend wird es in 20 µl H_2O/0,1 % DEPC gelöst. Die gesamte Isolierung erfolgt auf Eis bzw. in einer gekühlten Zentrifuge. Um RNAse-Kontaminationen zu vermeiden, wird mit speziell für diesen Zweck autoklavierten Gefäßen und Spitzen gearbeitet. Zusätzlich wird ein ebenfalls nur zur Isolierung der mRNA verwendeter Pipettensatz benutzt.
Die isolierte mRNA wird nach Bestimmung der Konzentration revers transkribiert. Die so gewonnene cDNA kann für LightCycler Analysen verwendet werden.

2.3.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Menge isolierter mRNA wird fotometrisch bestimmt. Einzelne biologische Substanzen, bzw. einzelne Atomgruppen oder Bindungen absorbieren Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt im UV-Bereich bei 260 nm. Wie viel Licht adsorbiert wird, ist abhängig von der eingesetzten Substanz und der Molekülmenge. Mithilfe des NanoDrop Spektrofoto-

Spektrofotometers wird die Absorption von 1 µl RNA bei 260 nm gemessen. Da eine Extinktion (= OD, Maß der Abschwächung einer Strahlung infolge von Absorption und Streuung) von eins, 0,04 µg/µl RNA entspricht, wird die gemessene Extinktion mit 0,04 multipliziert, um die RNA-Menge zu berechnen.

2.3.3 Reverse Transkription: Umschreiben der mRNA in cDNA

Für den Nachweis einer spezifischen mRNA wird die aus den Zellen isolierte mRNA mit dem Enzym reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Damit von jeder Probe gleich viel mRNA in cDNA umgeschrieben wird, wird vorher die Konzentration fotometrisch bestimmt. In die Reaktion werden 4 µl der Probe, in der am wenigsten mRNA enthalten war, eingesetzt. Die anderen Proben werden in der gleichen Konzentration eingesetzt (Volumenausgleich mit H_2O/0,1 % DEPC).

Um die Bildung von Sekundärstrukturen zu unterbinden wird die mRNA, bevor ihr 17 µl des Transkriptionsmixes zugegeben werden, in einem Heizblock für 20 min bei 67 °C denaturiert.

Transkriptionsmix:
- 4 µl $MgCl_2$
- 2 µl 10xPCR
- 1 µl Oligo $d(T)_{16}$
- 8 µl dNTP
- 1 µl RNAse Inhibitor
- 1 µl reverse Transkriptase

Der Ansatz wird mit 35-40 µl Mineralöl überschichtet und im Thermoblock bei 42 °C für 30 min umgeschrieben. Das Enzym wird am Ende der Reaktion bei 99 °C für 5 min denaturiert und dabei inaktiviert. Die cDNA kann bei -20 °C für eine spätere quantitative PCR aufbewahrt werden.

2.3.4 Quantitative PCR (LightCycler PCR)

Die Real-time PCR, auch „quantitative PCR“, beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion. Mit ihrer Hilfe ist es im Gegensatz zur herkömmlichen PCR möglich, eine exakte Quantifizierung der in einer Probe vorhandenen Ziel-DNA

vorzunehmen. So kann die relative mRNA-Menge eines bestimmten Gens aus stimulierten Zellen nach Umschreiben in cDNA mit der von unstimulierten Zellen verglichen werden. Auf diese Weise kann eine Änderung der Genexpression aufgrund eines definierten Stimulus festgestellt werden.

Der PCR-Ansatz enthält den an Doppelstrang-DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. SYBR Green I bindet mit hoher Affinität an Doppelstrang-DNA, wodurch seine Fluoreszenzintensität in der Probe mit steigender DNA-Menge zunimmt. Am Ende jeder Elongationsphase erfolgt eine Messung des Fluoreszenzsignals. Diese wird bei einer Temperatur unterhalb der Schmelztemperatur der Amplifikate durchgeführt, so dass nur das Produkt doppelsträngig vorliegt. Je mehr dsDNA am Anfang der Reaktion vorhanden ist, desto weniger PCR-Zyklen sind notwendig um einen Punkt zu erreichen, an dem das Fluoreszenzsignal signifikant höher ist als der Fluoreszenzhintergrund. Diesen Punkt bezeichnet man als Threshold Cycle (C_t-Wert). Das Fluoreszenzsignal ist proportional zur zunehmenden Menge an doppelsträngiger DNA in der Probe. In der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative Real-time PCR mit dem LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit von Roche durchgeführt.

PCR-Ansatz:
- 10,8 µl H_2O
- 3,2 µl $MgCl_2$ (25 mM)
- 0,5 µl 3`Primer (15 µM)
- 0,5 µl 5`Primer (15 µM)
- 2 µl SYBR Green I Master-Mix

17 µl des PCR-Ansatzes werden auf je 3 µl cDNA in eine Kapillare pipettiert. Der Ansatz wird zentrifugiert, in das LightCycler Karussell eingeordnet und nachstehendes Programm gestartet.

Vorgang	Zyklus	Temperatur (°C)	Zeit (sek)
Denaturierung	1	95	600
Amplifikation	40	95	0
		60	10
		72	25
Schmelzen	1	95	0
		60	10
		95	0
Kühlen	1	40	30

Auswertung

Als externe Kontrolle wird stets das Haushaltsgen α-Enolase amplifizert. Unterschiede in der Genexpression werden bestimmt, in dem die Differenz der Zykluszahl der unstimulierten und der stimulierten Probe als Potenz von 2 berechnet wird, da man von einer Verdopplung der DNA nach jedem Zyklus ausgeht. Anschließend werden die Ergebnisse den Schwankungen der Zykluszahlen für die α-Enolase angeglichen, da angenommen wird, dass in jeder Probe die gleiche Menge an α-Enolase enthalten ist.

2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen, wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Zur Herstellung des Gels wird 2 % Agarose in 0,5 x TBE Puffer geschmolzen. Nach kurzem Abkühlen des Gemisches gibt man Ethidiumbromid (10 µg/ml), das in die DNA interkaliert und im UV-Licht orange fluoresziert, zu und gießt die Flüssigkeit in die Plastikwanne einer Gelkammer. Wenn die Agarose, die aus glykosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose besteht, erkaltet, bildet sie ein engmaschiges Netzwerk. Die Dichte des Netzwerkes kann durch die eingesetzte Agarosemenge variiert werden. Um kleine DNA-Fragmente aufzutrennen, wählt man ein hochprozentiges, um große DNA-Fragmente aufzutrennen ein niedrigprozentiges Agarosegel.

Das erkaltete Gel wird mit Laufpuffer (0,5 x TBE Puffer) bedeckt und 10 - 20 µl der Probe, werden vermischt mit 2 µl Auftragspuffer in die Taschen des Gels gegeben. Die Auftrennung der DNA-Moleküle erfolgt in einem elektrischen Feld (ca. 120 V). Da die DNA negativ geladen ist, wird sie in Richtung der positiv geladenen Anode durch das Gel gezogen. Kleine Moleküle wandern dabei schneller als große Moleküle. Unter UV-Licht werden die Banden sichtbar, wobei jede Bande einem DNA-Fragment bestimmter Länge entspricht. Anhand des aufgetragenen Fragmentlängenstandards kann diese genau bestimmt werden. Es wird ein Foto vom Bandenmuster angefertigt.

2.4 Arbeiten mit Bakterien

2.4.1 Anfertigen von Agarplatten

Für 250 ml Agar werden 8 g LB-Agar (Lenox L Agar) in 250 ml H_2O_{dest} gelöst. Wenn das Gemisch nach dem Autoklavieren auf ca. 60 °C abgekühlt ist, wird das für die Selektion wichtige Ampicillin (Endkonz. 100 mg/ml) zugefügt und je 25-30 ml in eine Petrischale (9 cm Durchmesser) gegossen. Nach Erkalten des Agars werden die Schalen mit Parafilm verschlossen und mit Deckel nach bei 4 °C gelagert.

2.4.2 Transfer von Plasmid DNA in Bakterien

Für den Transfer von Plasmid DNA in Bakterien werden superkompetente Bakterien (XL1-Blue supercompetent cells) der Firma Stratagene verwendet. Wie im mitgelieferten Protokoll beschrieben, werden diese auf Eis aufgetaut und geschüttelt. Anschließend werden pro Transformationsansatz 100 µl der Bakteriensuspension in ein 25-ml-Röhrchen mit rundem Boden überführt und 0,8 µl 1,42 M β-Mercaptoethanol (25 mM Endkonzentration) zugegeben, sanft gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert, wobei alle 2 min geschüttelt wird. Anschließend werden 50 ng DNA auf die Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Die eigentliche Transformation erfolgt für 45 sek bei 42 °C im Wasserbad. Hinterher werden die Zellen erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien werden in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Agarplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Wenn die Transformation erfolgreich war, kommt es im Brutschrank über Nacht zur Koloniebildung.

2.4.3 Anzucht von Bakterien in LB-Medium

Mithilfe einer Pipettenspitze wird eine Kolonie von der Agarplatte gepickt, in 5 ml kaltes LB-Medium + 50 µl Ampicillin (100 mg/ml) überführt und für ca. 8 h bei 37 °C geschüttelt. Diese Vorkultur wird anschließend in 250 ml LB-Medium + 2,5 ml Ampicillin (100 mg/ml) aufgenommen und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Durch das Schütteln wird das Medium mit Sauerstoff durchmischt.

2.4.4 Isolierung von Plasmid DNA

Die Isolierung der DNA aus der Bakteriensuspension erfolgt mithilfe des EndoFree Plasmid Maxi Kits von Quiagen® unter Anwendung des mitgelieferten Protokolls. Da das fertig isolierte Plasmid später in B-Zellen transfiziert werden soll und es durch LPS zu einer Stimulation der Zellen kommen kann, muss unter LPS-freien Bedingungen gearbeitet werden. Dazu wird ein Endotoxin bindender Puffer verwendet.

Die Zellen werden durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Die Plasmid DNA bindet an eine Anionenaustauschersäule bei niedrigem Salzgehalt und pH-Wert. Die Bindung entsteht durch die Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und des positiven DEAE auf der Oberfläche der Säule. In mehreren Waschschritten werden Proteine, RNA und Verunreinigungen niedrigen Molekulargewichts bei mittlerem Salzgehalt entfernt. Die DNA wird schließlich mit einem Hochsalzpuffer eluiert. Die Isolierung der DNA erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

2.4.5 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Enzyme bakteriellen Ursprungs, die spezifisch 4-8 bp lange Sequenzen (Restriction sites) erkennen und die DNA-Stränge an diesen Stellen schneiden. Mithilfe dieser Enzyme kann z. B. überprüft werden, ob aus Bakterien das richtige Plasmid isoliert wurde, da man aufgrund von Plasmidkarten weiß, wie groß das jeweilige Plasmid ist und an welchen Stellen es von welchen Restriktionsenzymen geschnitten wird.

Der Verdau findet in einem Gesamtvolumen von 25 µl statt. Es werden 1 µg DNA, der entsprechende Puffer (1/10 Endvol.), 10 U/µl Restriktionsenzym und, je nach Enzym, BSA zugefügt. Mit H_2O wird auf 25 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend, um den Verdau zu stoppen, auf Eis gestellt.

Ein Verdau mit mehreren Restriktionsenzymen ist in einem Ansatz möglich, wenn alle verwendeten Enzyme im gleichen Puffer aktiv sind. Ist dies nicht der Fall, müssen unabhängige Verdauansätze durchgeführt und die Plasmid DNA nach jedem Verdau gefällt werden.

2.5 Reportergenanalyse

Die Aktivität eines Promotors kann mithilfe eines Reportergens untersucht werden. Als Reportergen werden artfremde Gene bezeichnet, die für gut detektierbare, bzw. quantifizierbare Produkte, wie z. B. Luziferase, codieren. In einem geeigneten Vektor wird das Gen, das der Transkriptionsregulation des zu untersuchenden Promotors unterliegt, durch ein Reportergen ersetzt. Nach der Transfektion des Promotor-Reportergenkonstruktes in die Zielzellen reguliert der zu untersuchende Promotor die Transkription des Reportergens. Die dazu nötigen Transkriptionsfaktoren liegen im Kern der Zellen vor. Nach der Transkription wird die mRNA prozessiert und ins Zytoplasma transportiert, wo sie dann translatiert wird. Für den Nachweis der Promotoraktivität werden die Zellen lysiert und das Enzym über Biolumineszenz nachgewiesen. Die Stärke des Signals lässt Rückschlüsse auf die Stärke des Promotors zu. Als interne Kontrolle der Transfektionseffizienz wird zusätzlich ein Plasmid mit einem Luziferase Enzym anderen Ursprungs transfiziert.

2.5.1 Transfektion der Reportergenkonstrukte

Transfektion der Zellen

In dieser Arbeit wird mittels transienter Transfektion Fremd-DNA in eukaryotische Zellen eingeschleust. Die Transfektion der B-Zelllinie RPMI 8226 mit unterschiedlichen Plasmiden erfolgt nach Shakov et al. (Shakhov *et al.* 1990). Danach wird mithilfe von Diethylaminoethyldextran (DEAE-Dextran) transfiziert. Durch Inkubation von DNA mit DEAE-Dextran werden DNA-haltige Komplexe erzeugt, die sich an die Zelloberfläche heften und von der Zelle durch Endozytose aufgenommen werden.

Am Tag 0 werden die Zellen geerntet und die Zellzahl bestimmt. Pro Transfektionsansatz werden 1 x 10^7 Zellen in 1 ml Transfermedium, bestehend aus 5 ml LPS-freiem RPMI 1640 Medium, 2 mM L-Glutamin und 66,6 µg/ml DEAE-Dextran, aufgenommen. Der Ansatz wird in ein 10-ml-Reaktionsgefäß gegeben, das bereits das zu testende IL-10 Promotor Reportergenkonstrukt (enthält Firefly Luziferase) und das Kontrollplasmid (pRL-CMV; codiert für Renilla Luziferase) enthält und zur

enthält und zur Durchmischung einmal kräftig geschüttelt. Der Ansatz wird für 90 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, wobei jeweils nach 30 und nach 60 min zur Durchmischung von Zellen und Plasmid geschüttelt wird. Anschließend werden für 2,5 min 100 µl DMSO (10 % Endkonzentration) zugegeben, um die Transfektionseffizienz durch ein kurzes Öffnen der Zellporen zu erhöhen. Um das DMSO, das für die Zellen toxisch ist, schnell wieder zu verdünnen, werden 9 ml Medium (10 ml RPMI 1640 und 2 mM L-Glutamin) auf den Ansatz gegeben und dieser für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 4 ml MM6-Medium + 10 % FCS aufgenommen. Nun wird je 1 ml Zellsuspension in je eine Vertiefung einer 6 Well Platte gegeben und je Well 4 ml MM6-Medium + 10 % FCS zugegeben. Der Ansatz wird für 3 Tage im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Aufarbeitung transfizierter Zellen

Nachdem man die Reportergenkonstrukte mittels der DEAE-Dextran Methode in die Zellen gebracht hat, werden die Zellen am dritten Tag für 6 h stimuliert.
Um am Ende des Versuches die konstitutive Expression von unstimulierten Zellen mit der von stimulierten Zellen vergleichen zu können, wird eines der Wells bereits zum Zeitpunkt 0 geerntet und mit der Aufarbeitung dieser Zellen begonnen. Das Lysat der Zellen bleibt, bis alle Proben aufgearbeitet sind, auf Eis stehen.
Die restlichen Zellen in den verbleibenden 3 Wells werden, nachdem die Hälfte des Mediums (2,5 ml) durch Neues ersetzt wurde, stimuliert. Ein Well bleibt ohne Stimulus und gibt Auskunft über die Expression nach 6 h.
Die Zellen werden mit einem Zellschaber vorsichtig von der Platte gelöst und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 100 µl Lysepuffer (1 ml Passive-Lysis-Puffer von Promega + 4 ml H_2O_{dest}) resuspendiert und in ein Eppendorf Gefäß überführt. Die Lyse erfolgt durch 3-maliges, abwechselndes Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei 37 °C. Die Zellwandbestandteile werden durch kurzes Abzentrifugieren sedimentiert und je 20 µl vom Überstand in Duplikaten für die Messung am Luminometer eingesetzt.

Nachweis der Luziferaseaktivität

Die Reportergenexpression wird mithilfe des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems von Promega nachgewiesen. Als interne Kontrolle wird neben den zu testenden Reportergenkonstrukten der Kontrollvektor Renilla Luziferase (phRG-TK Vector, #E6291, Promega) transfiziert. Durch das Verhältnis des Reporters Firefly (Leuchtkäfer) Luziferase zur internen Kontrolle Renilla (Seefeder) Luziferase können experimentelle Schwankungen rechnerisch ausgeglichen werden. Die Unterscheidung beider Enzyme in einem Reaktionsgefäß gelingt aufgrund ihrer Struktur und Substratspezifität. Das Translationsprodukt Leuchtkäfer Luziferase katalysiert die Oxidation von Luziferin in Gegenwart von ATP, Magnesium und Sauerstoff unter Freisetzung eines Photons:

$$\text{Luziferin} + \text{ATP} + O_2 \rightarrow \text{Oxy} \xrightarrow{Mg_2 + \text{Firefly Luziferase}} \text{Luziferin} + \text{AMP} + \text{PPi} + CO_2 + \text{Licht} (562\text{nm})$$

Das Translationsprodukt Renilla Luziferase im Kontrollvektor katalysiert die Oxidation von Coelenterazine ebenfalls unter Freisetzung eines Photons:

$$\text{Coelenterazine} + O_2 \xrightarrow{\text{Renilla Luziferase}} \text{Coelenteramide} + CO_2 + \text{Licht (460 nm)}$$

Da die Umsetzung des Substrates durch das Enzym sehr schnell in Form eines kurzen Lichtblitzes erfolgt, wird für die Messung der Photonenproduktion ein automatisches Injektionsluminometer verwendet.

Zu den 20 µl der Probe (entspricht 5 x 10^5 Zellen), bzw. des Passive-Lysis-Puffers (als Leerwert) werden vom Luminometer hintereinander für beide Enzyme 150 µl Kit-Substrat injiziert. Die Messung erfolgt für 10 sek im Dunkeln.

Auswertung

Bei der Versuchsauswertung werden die Ergebnisse für die zu testenden Plasmide an die Schwankungen des Kontrollplasmids angeglichen. Der Stimulationsfaktor wird berechnet in dem zunächst der RLU/5 x 10^5 Zellen Wert der unstimulierten Probe zum Zeitpunkt 0 h von dem, der unstimulierten Probe nach 6 h abgezogen wird (= Anstieg des unspezifischen Hintergrundes nach 6 h). Anschließend wird der RLU/5 x 10^5 Zellen Wert der unstimulierten Probe zum Zeitpunkt 0 h vom RLU/5 x

10^5 Zellen Wert der stimulierten Probe abgezogen. Dieser Wert wird dann durch den, des unspezifischen Hintergrundes nach 6 h geteilt.

2.6 Proteinnachweis

2.6.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zur Bestimmung der IL-10 Proteinmenge im Zellkulturüberstand wird ein ELISA durchgeführt. Hierzu wird der PeliKine compact™ human IL-10 ELISA Kit der Firma Sanquin verwendet. Die mitgelieferten Platten sind mit einem humanen IL-10 Antikörper beschichtet. Das IL-10 Protein aus dem Zellüberstand bindet an den Antikörper, nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein an Biotin gebundener Sekundärantikörper zugegeben, der an den Antikörper-Proteinkomplex bindet, wobei überschüssiger Antikörper erneut durch Waschen entfernt wird. Nun wird die an Streptavidin, das an Biotin bindet, gekoppelte Meerrettich Peroxidase (HRP) zugegeben. Durch Zugabe einer Substratlösung entsteht ein farbiges Produkt, dessen Intensität vom IL-10 Proteingehalt der Probe abhängig ist. Parallel wird immer eine Standardreihe mit rekombinanten IL-10 mitgeführt. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgt im Spectra Count™ der Firma Packard bei 450 nm.
Alle verwendeten Lösungen wurden vom Hersteller geliefert. Die Durchführung des ELISAs erfolgt genau wie im Protokoll des Herstellers beschrieben.

2.6.2 Kernextraktion

Die Isolierung von Proteinen aus dem Kern erfolgt nach der Methode von Dignam et al. (Dignam *et al.* 1983). Um einem Proteinabbau durch Proteasen vorzubeugen, wird den verwendeten Puffern ein Protease-Inhibitor-Mix (PIC) zugefügt. Zusätzlich erfolgen alle Arbeitsschritte auf Eis. Soll die konstitutive Expression eines nukleären Faktors bestimmt werden, bleiben die Zellen unbehandelt. Soll aber die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren auf bestimmte Reize untersucht werden, werden die Zellen entsprechend stimuliert.

Protease-Inhibitor-Mix (PIC):	Aprotinin (10 µg/ml)
	PMSF (1 mM)
	Leupeptin-Propionyl (40 µg/ml)
	Leupeptin-Acetat (20 µg/ml)
	Antipain (20 µg/ml)
	Pepstatin (20 µg/ml)
	ALLN (400 µM)
	DTT (2 mM)

In je 5 ml Puffer A, B und D^+ werden 336 µl PIC gegeben. Vor Gebrauch werden dem Puffer D 10 µl Igepal CA-630 zugefügt (= Kernextraktionspuffer D^+).
Zur Anfertigung von Kernextrakten werden 5 x 10^6 Zellen bei 400 g sedimentiert. Nach Abnahme des Überstandes wird das trockene Pellet in einem vierfachen Volumen Puffer A (entspricht 100 µl bei einer Zellzahl von 5 x 10^6 Zellen) aufgenommen, resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Durch die hypotone Pufferlösung quellen die Zellen in dieser Zeit auf. Um die Zellen aufzuschließen, werden die Reaktionsgefäße einmal 5 sek und einmal 3 sek in ein Ultraschallwasserbad getaucht. Die Proben werden nun bei 14000 g für 10 sek zentrifugiert und der Überstand (Zytosol) abgenommen. Das verbliebene Zellkern-Pellet wird mit einem halben Volumen der ursprünglichen Puffer A-Menge (100 µl) mit Puffer B (50 µl) versetzt und 30-60 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 8000 g befinden sich die Kernproteine im Überstand. Dieser wird in ein neues Gefäß überführt und mit dem gleichen Volumen an Puffer D^+ (50 µl) versetzt. Der Kernextrakt kann nun bei -80 °C aufbewahrt oder gleich weiterverarbeitet werden. Zuletzt wird die Proteinkonzentration bestimmt.

2.6.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt nach der Methode von Bradford. Bei dieser Methode macht man sich zunutze, dass das Adsorptionsmaximum von Coomassie brillant blue G-250 im sauren Milieu bei 465 nm liegt und sich, wenn Protein an die Farblösung gebunden ist, auf 595 nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm nimmt man als Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Zu 2 µl Probe werden 150 µl Farblösung gegeben und nach 10 min bei Raumtemperatur deren Absorption bei 595 nm im Spektralfotometer gemessen. Gleichzeitig wird als Referenz BSA gemessen. Dazu wird die erste Reihe einer 96-Loch-Platte mit einem Standard nach folgendem Muster belegt: 0, 2, 4, 6 und 10 µl BSA 1 mg/ml, in 150 µl BioRad Farblösung (jeweils in Doppelwerten). Die nachfolgenden Reihen werden mit den zu messenden Proben, ebenfalls mit Doppelwerten, belegt.

2.6.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Aneinanderlagern (annealing) von Oligonukleotiden

Oligonukleotide, die in Gelshift Experimente eingesetzt werden sollen, müssen doppelsträngig sein, da Transkriptionsfaktoren nur an dsDNA binden können. Dies wird durch das Aneinanderlagern (annealing) zweier komplementärer ssDNA Stränge erreicht. Die lyophilisierten Oligonukleotide werden in 200 µl TEN/50 mM NaCl gelöst. Anschließend wird die Konzentration bestimmt. Für das Annealing werden 20 µg des codierenden und 20 µg des nicht codierenden Stranges in ein Reaktionsgefäß gegeben und für 5 min in einem Heizblock bei 95 °C inkubiert. Anschließend werden die Proben im Heizblock über Nacht auf RT abgekühlt.

Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Vom doppelsträngigen Oligo werden 100 ng mit nachstehendem Markierungsansatz versetzt und für 30-60 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 µl TEN/50 mM NaCl gestoppt. Überschüssiges [α-^{32}P]-dATP wird mithilfe des QIAquick Nucleotide Removal Kits entfernt. Dabei wird das Oligo im letzten Schritt in 80 µl Elutionspuffer eluiert. Die Messung der radioaktiven Markierung des Oligos erfolgt im β-Counter mithilfe von Szintillationsflüssigkeit. Hierzu werden 2 µl des markierten Oligos in 2 ml der Flüssigkeit gegeben. Das Ergebnis wird in Counts per Minute (= cpm) angegeben.

Markierungsansatz: 100 ng Oligo (50 ng/µl)
1 µl 10 x BB
3 µl Mix A
4 µl [α-^{32}P]-dATP (10 mCi/ml)
1 µl Klenow-Enzym

Durchführung eines Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)

Für den Nachweis sequenzspezifischer Bindung eines Proteins an die DNA wird beim EMSA der Zellkernextrakt mit dem radioaktiv markierten Oligo inkubiert. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wird ein synthetischer repetitiver DNA-Strang (Poly(dI/dC)) hinzugefügt. Die Proben werden auf ein natives, nicht-denaturierendes 4 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Radioaktiv markierte DNA-Fragmente, an die Proteine gebunden sind, sind elektrophoretisch weniger mobil, d. h., sie laufen langsamer im Gel als markierte DNA-Fragmente ohne Protein.

Polyacrylamidgel (4 %): 6 ml 40 % Polyacrylamid
1,5 ml 10 x TBE
51,92 ml H_2O_{dest}
540 µl 10 %APS
42 µl TEMED

Der Ansatz wird luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und der Kamm für die Auftragstaschen gesteckt. Nach 30 min ist das Gel auspolymerisiert. Die radikalische Polymerisierung der AA Monomere zu einem dreidimensionalen Maschennetzwerk wird durch APS und TEMED katalysiert. TEMED katalysiert die Bildung von Radikalen aus Persulfat ($S_2O_8^{2-}$ -> $2SO_4^{2-}$). Diese katalysiert dann die radikalische Polymerisierung der AA Monomere. Das Gel wird vertikal in der zugehörigen Kammer befestigt, die beiden Puffertanks werden mit Laufpuffer (0,25 x TBE) gefüllt. Anschließend wird der Kamm gezogen und die Taschen werden mit Puffer ausgespült. Bevor die Proben aufgetragen werden, lässt man das Gel für 10 min bei 115 V und 16 mA vorlaufen.

Probenansatz: 3 µg Protein des Kernextrakts
0,5 µl Poly(dI/dC) 1 mg/ml
2 µl 10 mg/ml BSA
2 µl 10 % D^+
2 µl 10 x BB

Pro Ansatz werden 50000 cpm radioaktiv markiertes Oligonukleotid mit TEN 50 auf 11 µl aufgefüllt. Das Gesamtvolumen von 20 µl wird durch Zugabe von H_2O_{dest} erreicht. Zusätzlich werden dem Gesamtansatz für alle Auftragstaschen noch 3 µl DTT, 4 µl Aprotinin und 4 µl PMSF zugefügt. Der Ansatz wird für 20 min bei RT inkubiert, auf das Gel geladen und anschließend bei 16 mA und 115 V ca. 2 h elektrophoretisch getrennt. Der Gellauf wird gestoppt, wenn der Bromphenolblaumarker 10 cm Weg zurückgelegt hat. Auf diese Weise können später unterschiedliche Gele miteinander verglichen werden, da bestimmte Banden im Bezug auf den Marker immer gleiche Strecken zurücklegen. Das Gel wird anschließend auf ein Filterpapier gelegt, mit einer Frischhaltefolie bedeckt und unter Vakuum in einem Geltrockner für 1 h bei 80 °C getrocknet. Die Autoradiografie erfolgt über Nacht bei -80 °C nach Auflegen eines XRay 90 Films und einer Verstärkerfolie.

2.6.5 Supershiftanalysen

Um zu klären, welches Protein wirklich an ein bestimmtes Stück DNA bindet, wird eine Supershiftanalyse durchgeführt. Hierzu werden kommerziell erhältliche mono- und polyklonale Antikörper eingesetzt. Bindet ein Transkriptionsfaktor an die DNA, erhält man nach Zugabe des für diesen Faktor spezifischen Antikörpers einen größeren Protein/DNA-Komplex. Im Gel ist dieser Komplex als Bande oberhalb des ursprünglichen Komplexes zu erkennen. Bei der Wahl des Antikörpers ist es wichtig, dass dieser nicht die DNA-Bindungsstelle des Proteins blockiert. Ist dies der Fall, verschwindet die gesamte Bande. Um auch ein durch unspezifische Antikörperbindungen verursachtes, falsch positives Ergebnis zu vermeiden, werden stets Proben mit Kontrollantikörpern mitgeführt.
Die Supershiftanalyse unterscheidet sich von der Gelshiftanalyse in der Zusammensetzung und der Inkubation des Probenansatzes:

Probenansatz (Supershift): 3 µg Protein aus dem Kernextrakt
1 µl Antikörper
ad 11 µl H_2O_{dest}

Der Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert, anschließend werden noch zugefügt:

0,5 µl Poly(dI/dC) 1 mg/ml
2 µl 10 mg/ml BSA
2 µl 10 % D^+
2 µl 10 x BB
1 µl (50000 cpm) ^{32}P-Oligo

Dem ganzen Ansatz werden wie im EMSA 3 µl DTT, 4 µl Aprotinin und 4 µl PMSF zugefügt. Der gesamte Ansatz wird nun für 20 min bei RT inkubiert und dann auf das Gel aufgetragen und bei 115 V für ca. 3 h elektrophoretisch getrennt. Gestoppt wird, wenn der Marker am unteren Ende des Gels angelangt ist.

2.6.6 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Mithilfe der ChIP Methode können in Zellen *in vivo*-Bindungen von Proteinen an genomische Kern-DNA nachgewiesen werden. Durch die Fixierung mit Formaldehyd werden Nukleinsäuren mit Proteinen und Proteine mit Proteinen kovalent verknüpft. Die durch Formaldehyd induzierten kovalenten Bindungen können durch Erhitzen in Tris/HCl-Puffern revertiert werden (Orlando et al., 1997).

Herstellung von Chromatin

Zu Beginn eines ChIP Experimentes werden je 2 x 10^7 RPMI 8226.1 Zellen mit und ohne 6α-Methylprednisolon für 2 h in 5 ml Medium stimuliert. Der Stimulationsansatz wird anschließend in ein 50-ml-Röhrchen überführt und durch Zugabe von 500 µl Puffer A + 11 % Formaldehyd (Endkonz. 1 % Formaldehyd) für 30 min auf einem Schüttler bei RT fixiert. Durch Zugabe von 2 M Glycin (Endkonzentration 125 mM) und Inkubation für 5 min bei RT wird die Fixierungsreaktion gestoppt. Das fixierte Material wird mit 25 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend wird es für 10 min mit 25 ml Puffer B bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert, für 6 min mit 1600 g zentrifugiert, in 25 ml Puffer C aufgenommen, für 10 min bei 4 °C auf einem

Schüttler inkubiert und für 6 min bei 1600 g zentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml ChIP Inkubationspuffer + 40 µl/ml PIC aufgenommen und in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Mit dem Bioruptor der Firma Diagenode wird das Chromatin anschließend für 15 min (30 sek an, 30 sek Pause) bei 4 °C fragmentiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 13000 rpm, 4 °C für 5 min, pelletiert. Der Überstand wird abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und in flüssigem Stickstoff Schock gefroren. Das Chromatin kann bei -80 °C aufbewahrt werden.

Immunpräzipitation (IP)

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, werden pro ChIP Ansatz 50 µl Beadsuspension (Protein A und G Plus-Agarose) zweimal mit je 200 µl Inkubationspuffer + 0,1 % BSA gewaschen und anschließend in 1 ml desselben Puffers aufgenommen und für 2 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Danach werden die Beads in 25 µl Inkubationspuffer + BSA 0,1 % pro IP Ansatz aufgenommen. Die Immunpräzipitation erfolgt über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler.

IP Ansatz:
- 6 µl BSA
- 10 µl PIC
- 97 µl H_2O
- 36 µl 5 x Inkubationspuffer
- 120 µl Chromatin
- 1-2 µg/µl Antikörper
- 30 µl Protein A und G Beads

Vom Chromatin werden zusätzlich 100 µl (für die Input-Kontrolle) bei 4 °C aufbewahrt. Der Antikörper anti-Stat3 (c-20) von Santa Cruz Biotechnologie wird in einer Konzentration von 6 µg/µl eingesetzt, wobei der Volumenausgleich über H_2O erfolgt. Vom Antikörper anti-TATA Box binding Protein wird 1 µg/µl eingesetzt.
Am nächsten Tag werden die Beads für je 5 min mit 400 µl des jeweiligen Waschpuffers (siehe Tabelle) bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Sedimentiert werden die Beads nach jedem Waschschritt durch Zentrifugation bis max. 8000 rpm.

Waschprotokoll: 2 x Waschpuffer 1
1 x Waschpuffer 2
1 x Waschpuffer 3
2 x Waschpuffer 4

Eluieren des Chromatins und Lösen der Vernetzung durch Formaldehyd

Für die Elution von Protein-DNA-Komplexen werden die Beads in 400 µl Elutionspuffer aufgenommen und für 20 min bei RT geschüttelt. Nach Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm wird der Überstand (Protein-DNA-Komplexe) abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und anschließend die durch Formaldehyd verursachte Vernetzung der Proteine mit der DNA durch Inkubation für 5 h bei 65 °C unter Schütteln gelöst. Für die Input Kontrolle werden 100 µl Chromatin mit 300 µl Elutionspuffer versetzt und ebenfalls für 5 h bei 65 °C inkubiert.

Isolierung der DNA durch Phenol/Chloroform

Den Proben (incl. Input) wird 1 Volumen (400 µl) Phenol/Chloroform Isoamylalkohol zugegeben. Nach kurzem Mischen und 10-minütiger Rotation bei RT werden sie für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und mit 1 Volumen (400 µl) Chloroform/Isoamylalkohol für 10 min unter Rotation inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm wird die obere Phase abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Nach Zugabe von 2 µg/µl Glycogen, 40 µl 3 M NaAc pH 5,2 und 1ml 100 % EtOH wird die DNA über Nacht bei -20 °C gefällt.
Am nächsten Tag wird die DNA in 70 % EtOH gewaschen und anschließend in 100 µl (Input) und 200 µl (Probe) H_2O/0,01 % DEPC für 1,5 h bei RT gelöst.

PCR Analyse und Auswertung

Die PCR erfolgt mit dem „single-colour detection MyIQ iCycler“ von BioRad entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die Primer wurden so gewählt, dass die Bindungsstelle des untersuchten Transkriptionsfaktors eingeschlossen wurde. Mithilfe der Zykluszahl (Ct Wert) wurde für jede Probe berechnet, wieviel der

ursprünglich eingesetzten Input DNA nach Immunpräzipitation wieder gewonnen werden konnte (Recovery [%]).

$$\frac{1}{2^{(C_t IP - C_t Input)} \times Verdünnungsfaktor(Input / IP)} \times 100 = \text{Recovery}[\%]$$

Als Negativkontrolle wurde das humane Myoglobin Gen im gleichen Ansatz amplifiziert. Die Immunpräzipitation mit dem Antikörper gegen das TATA Box binding Protein (TBP) und dem anschließenden Nachweis dessen Bindung an den H2B Promotor, dient als Positivkontrolle. Die Detektion der Produkte in einem 2 %-igen Agarosegel erfolgte nach 30 Zyklen mit Ethidiumbromid unter UV-Licht.

2.6.7 Western Blot Analyse

Für diese Methode werden RPMI 8226.1 Zellen für 2 h mit und ohne 6α-MP inkubiert und anschließend Kernextrakte angefertigt. Zwanzig µg der Kernextrakte werden zusammen mit einem viertel Volumen Sample Puffer für 10 min auf 70 °C erhitzt und anschließend auf ein NuPage™ Bis-Tris-Gel (4-12 %, Invitrogen) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt in einer NOVEX EI9001-XCELL™ II Mini Cell mit NuPage™ MOPS-SDS Laufpuffer. Als Marker wird SeeBlue® Plus2 von Invitrogen eingesetzt. Das Blotten des Gels erfolgt für 1,5 h auf eine Nitrocellulose-membran (Hybond™ECL™) mit NuPage™ Transferpuffer.

Immundetektion von Stat3 und pStat3

Die getrocknete Membran wird zum Blocken über Nacht in PBS/0,1 % Tween 20 und 5% Magermilchpulver bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird der Primär-antikörper für 1 h im Verhältnis 1:1000 zugegeben (10 µl auf 10 ml frisches PBS/0,1 % Tween 20 1 % und 5 % Magermilchpulver). Um Antikörper zu entfernen, die nicht gebunden haben, wird die Membran 3-mal für 20 min mit PBS/0,1 % Tween 20 gewaschen. Im Anschluss wird die Membran für 30 min in PBS/0,1 % Tween 20 und 5 % Magermilchpulver geblockt und der Sekundärantikörper im Verhältnis 1:2000 für 1 h zugegeben. Nach erneutem 3-maligen Waschen mit PBS/0,1 % Tween 20 erfolgt die Detektion mit dem ECL™ Western Blotting Detection Reagents nach

Anleitung. Die Exposition des Hyperfilm™ ECL auf der Membran erfolgt im Dunkeln in einer Röntgenfilmkassette.

Entfernen der Antikörper von der Membran

Zum Entfernen der Antikörper von der Nitrocellulosemembran wird diese für 30 min bei 80° C in Ablösepuffer mit 2-Mercaptoethanol (800 µl auf 100 ml Ablösepuffer) inkubiert. Anschließend wird dreimal für 20 min mit PBS/0,1 %Tween 20 gewaschen.

2.7 Isolierung primärer B-Zellen

2.7.1 Isolierung von PBMC aus humanem Blut

Die peripheren mononukleären Zellen (PBMC) werden über Dichtegradientenzentrifugation aus 50 ml Heparin-Blut von gesunden Spendern isoliert. In ein 50 ml Röhrchen werden 13 ml LymphoPrep vorgelegt. Das Heparin-Blut wird mit einem gleichen Volumen an LPS-freien PBS [im Verhältnis 1:2] gemischt. Von diesem Gemisch werden 26 ml vorsichtig über das LymphoPrep geschichtet. Damit es zur Ausbildung eines Gradienten kommt, wird das Röhrchen bei 20 °C mit 800 g (Beschleunigung 5 und Bremse 2) für 30 min zentrifugiert. An der Grenzschicht zwischen LymphoPrep und verdünntem Blut wird nach Zentrifugation ein weißer Ring sichtbar, der aus Lymphozyten und Monozyten besteht. Dieser wird abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und erneut für 10 min bei 800 g zentrifugiert. Die Zellen werden anschließend zweimal mit PBS gewaschen, das Zellpellet in D-PBS (PBS + 0,2% EDTA) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.7.2 Isolierung von B-Zellen mithilfe der magnetischen Zellseparation

Mithilfe der magnetischen Zellseparation (MACS) können Zellen, die gleiche Oberflächenmoleküle tragen, aus einer heterogenen Zellsuspension mit hoher Reinheit angereichert werden. Den Zellen werden monoklonale Antikörper, die direkt an paramagnetische Mikropartikel (MACS MicroBeads) gebunden sind, zugegeben. Anschließend wird der Ansatz auf eine Trennsäule gegeben, die sich in

einem Permanentmagnetfeld befindet. In der Matrix der Säule entsteht ein starkes Magnetfeld welches markierte Zellen zurückhält, wohingegen nicht markierte Zellen durch die Säule laufen. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld können die zurückgehaltenen Zellen eluiert werden (= positive Selektion).

Zur Isolierung von B-Zellen wird der CD19 MicroBead Antikörper (CD 19 MB) gewählt, da CD19 ein für B-Zellen spezifisches Oberflächenmolekül ist. Je 15 x 10^6 PBMC werden in 80 µl D-PBS (PBS + 0,4 % EDTA) aufgenommen, mit 20 µl CD19-MB Antikörper versetzt und für 30 min auf Eis im Kühlschrank inkubiert. Nach Waschen der Probe mit PBS wird diese für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Das Pellet wird in 1,5 ml entgasten D-PBS aufgenommen. Die LS-Säule wird im Magneten plaziert und mit 2 ml D-PBS vorequilibriert. Anschließend wird die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Wenn diese vollständig durch die Säule gelaufen ist, wird die Säule 4-mal mit je 2 ml D-PBS nachgespült. Um die CD 19 positiven Zellen aus der Säule zu lösen, wird diese aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen mit Druck aus der Säule gewaschen (mit dem Stempel 5 x je 2 ml PBS durch die Säule drücken). Nach Zentrifugation wird die Zellzahl bestimmt. Die Reinheit wird anschließend im Durchflusszytometer bestimmt.

2.7.3 Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Mithilfe des FACS-Gerätes (Fluorescence Activated Cell Sorter) können Zellen nach Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität quantifiziert und aufgetrennt werden. Die Zellen werden mit Antikörper, die an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe, wie z. B. FITC (Fluorescin-Isothiocyanat) und PE (Phycoerythrin), gekoppelt sind, gefärbt. So können auch bestimmte Zellpopulationen innerhalb eines Gemisches detektiert werden. Die Zellen werden von einer Kapillare angesaugt und durch diese hindurchgedrückt, wobei ein feiner Flüssigkeitsstrahl entsteht, in dem die Zellen einzeln vorliegen. Während dieser Flüssigkeitsstrahl einen Laserstrahl passiert, kommt es an den Zellen zu einer Lichtstreuung und die Farbstoffmoleküle, die über die monoklonalen Antikörper an die Zelle gebunden sind, werden zur Fluoreszenz angeregt. Empfindliche Photodetektoren messen sowohl das gestreute als auch das emittierte Licht, wobei Ersteres Informationen über die Größe und Granularität der Zelle liefert. Die Fluoreszenz ermöglicht dagegen Aussagen über die Bindung der

monoklonalen Antikörper und damit über die Expression der Oberflächenproteine auf jeder untersuchten Zelle. Für die Bestimmung der Reinheit der isolierten B-Zellen wird ein mit FITC markierter Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD19 verwendet. Dieser wird den Zellen für 20 min im Verhältnis 1:20 zugegeben. Nach Waschen der Zellen werden diese in 750 µl PBS + 2 % FCS aufgenommen und am Epics XL-Durchflusszytometer gemessen. Die Färbung der Negativkontrolle erfolgt mit dem entsprechenden Isotyp.

2.8 Statistische Auswertungen

2.8.1 T-Test

Zur Berechnung der Signifikanz wurde mithilfe des Excel Programms ein Student`s t-Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Induktion von IL-10 durch Methylprednisolon

3.1.1 Induktion von IL-10 Protein

Zunächst wurde untersucht, ob Zellen der B-Zelllinie RPMI 8226.1, die für 24 h mit dem Glukokortikoid 6α-Methylprednisolon (MP) in einer Konzentration von 10^{-6} M stimuliert wurden, mehr IL-10 Protein synthetisieren als unstimulierte Zellen. Da fertig synthetisierte Proteine von der Zelle abgegeben werden, wurde die IL-10 Proteinmenge mithilfe eines ELISAs aus dem Zellüberstand bestimmt. Zur weiteren Analyse wurde ein gepaarter Student`s t-Test durchgeführt. Unstimulierte Zellen produzierten nach 24 h im Mittel 93 ± 58 pg/ml IL-10 Protein wohingegen die mit MP stimulierten Zellen im Mittel 2122 ± 508 pg/ml IL-10 Protein produzierten. Die Sensitivität des Assays betrug 2 pg/ml. Die mit MP stimulierten Zellen synthetisierten nach 24 h ca. 23-mal mehr IL-10 Protein als unstimulierte Zellen. Die Induktion war gegenüber der unstimulierten Probe signifikant erhöht. In Abbildung 7 ist der Mittelwert aus fünf unabhängigen Experimenten dargestellt.

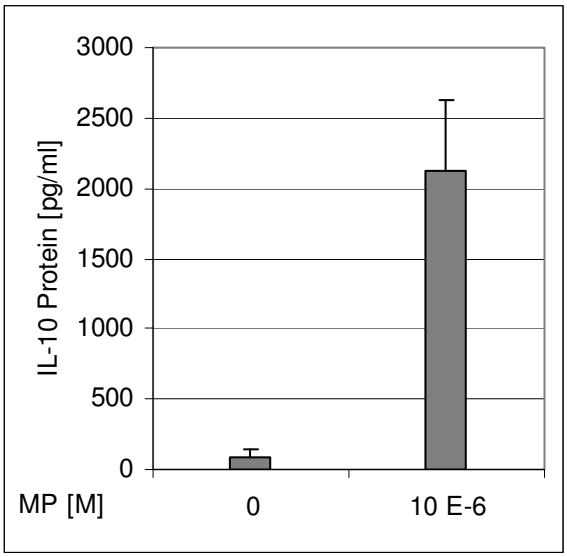

Abbildung 7: Induktion von IL-10 Protein durch MP

Legende zu Abbildung 7:

Zellen der Zelllinie RPMI 8226.1 wurden für 24 h mit MP 10^{-6} M stimuliert. Anschließend wurde wie im Methodenteil beschrieben ein ELISA Assay durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert +/- SD aus fünf unabhängigen Versuchen. Zur weiteren Analyse wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt. Die Induktion ist im Vergleich zum unstimulierten Wert mit ($p < 0.05$) signifikant.

3.2 Kinetik der IL-10 mRNA Induktion

Um herauszufinden, ob und nach welcher Zeit, eine deutliche Induktion der IL-10 mRNA Menge durch MP zu beobachten ist, wurde eine Kinetik erstellt. Dazu wurden die Zellen der B-Zelllinie RPMI 8226.1 für 1, 2, 4, 6 und 24 h mit MP stimuliert. Das Cortison wurde in einer physiologischen Konzentration von 10^{-6} M eingesetzt. Nach den entsprechenden Zeiten wurden je 2 x 10^4 Zellen entnommen und mithilfe von TRI-Reagent Lysate angefertigt. Nach isolieren der RNA und umschreiben dieser in cDNA, wurde eine quantitative PCR für IL-10 und das Haushaltsgen α-Enolase durchgeführt. Die Ergebnisse wurden an α-Enolase angeglichen und relativ zum unstimulierten 0 h Wert (= 1) unter Verwendung der LightCycler Relquant Software angegeben. Zur weiteren Analyse wurde ein gepaarter Student`s t-Test durchgeführt. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse aus 3 verschiedenen Experimenten zusammengefasst. Nach einer Stunde konnte 11,3-fach ± 5,7 mehr IL-10 mRNA nachgewiesen werden als nach 0 h. Nach 2 und 4 h stieg die produzierte IL-10 mRNA um das 15,5-fach ± 11,4 (nach 2 h) und ± 10,3 (nach 4 h) an. Nach 6 h betrug die fache Steigerung gegenüber der unstimulierten Probe nur noch 7,3 ± 4,9 und nach 24 h nur noch 0,3 ± 0,1. Die optimale Inkubationszeit für MP 10^{-6} M liegt folglich zwischen 2 und 4 h.

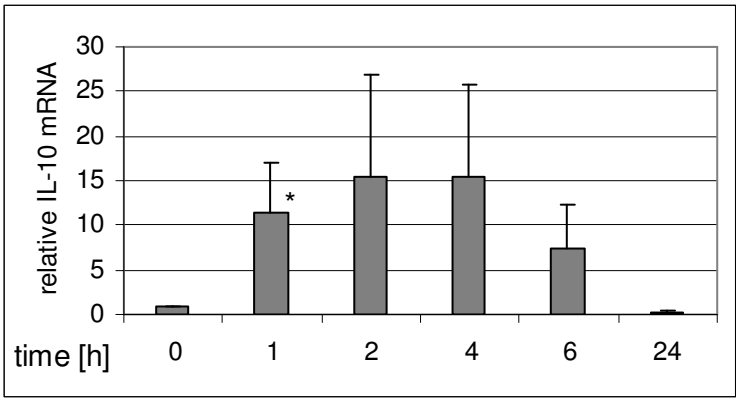

Abbildung 8: Kinetik der IL-10 mRNA Induktion durch MP

Zellen der Zelllinie RPMI 8226.1 wurden für 0, 1, 2, 4, 6 und 24 Stunden mit MP 10^{-6} M stimuliert. Die mRNA wurde wie im Methodenteil beschrieben isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine quantitative PCR für IL-10 und Enolase durchgeführt. Die Ergebnisse wurden an Enolase angeglichen und relativ zum unstimulierten 0 Stunden Wert (= 1) unter Verwendung der Light Cycler Relquqant Software angegeben. Dargestellt ist der Mittlewert aus drei Experimenten +/- SD. Der mit * markierte Wert ist im Vergleich zum unstimulierten Wert mit ($p < 0.05$) signifikant.

3.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehungen der IL-10 mRNA Induktion

Im anschließenden Experiment wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von MP (10^{-6} M, 10^{-7} M und 10^{-8} M) für 4 h stimuliert. Dadurch sollte ermittelt werden, bis zu welcher Konzentration das Cortison noch zu einer Induktion der IL-10 mRNA führt. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Das Ergebnis der quantitativen PCR zeigte nach einer 4-stündigen Stimulation mit MP in einer Konzentration von 10^{-6} M, eine 17,4-fache ± 13 Induktion der IL-10 mRNA Menge im Vergleich zur unstimulierten Probe. Die Induktion ist gegenüber dem unstimulierten Wert signifikant erhöht. Bei einer Konzentration von MP 10^{-7} M betrug die fache Induktion 8,3 ± 4,4 und bei einer Konzentration von MP 10^{-8} M nur noch 4,7 ± 4,8. Die größte Induktion ist folglich nach einer Stimulation mit MP 10^{-6} M zu beobachten.

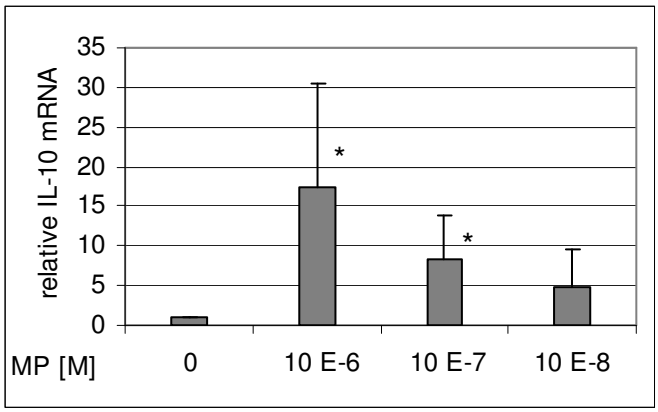

Abbildung 9: Titration: Induktion von IL-10 mRNA nach Stimulation mit unterschiedlichen MP Konzentrationen

Zellen der Zelllinie RPMI 8226.1 wurden für 4 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von MP stimuliert. Die mRNA wurde wie im Methodenteil beschrieben isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine quantitative PCR für IL-10 und Enolase durchgeführt. Die Ergebnisse wurden an Enolase angeglichen und relativ zum unstimulierten 0 Stunden Wert (= 1) mit der Basis von 2 berechnet. Dargestellt ist der Mittlewert aus vier Experimenten +/- SD. Die mit * markierten Werte sind im Vergleich zum unstimulierten Wert mit ($p < 0.05$) signifikant.

Da das verwendete MP in EtOH gelöst ist, muss eine EtOH vermittelte Stimulation der Zellen ausgeschlossen werden. Dazu wurden die Zellen mit einer EtOH Konzentration von 0,01 %, welche der EtOH Konzentration im Stimulationsansatz mit MP 10^{-6} M entspricht, für 4 h stimuliert und Lysate genommen. Die Ergebnisse wurden in Prozent, relativ zum LPS-Wert (100 %), angegeben. Abbildung 10 zeigt die Mittelwerte von fünf unabhängigen Experimenten. Nach Stimulation mit MP 10^{-6} M wurden 54 ± 19,3 % der IL-10 mRNA Menge, die nach der Stimulation mit LPS 1 µg/ml für 4 h beobachtet werden konnte, erhalten. Wie aus Abbildung 10 hervorgeht, konnte nach Stimulation mit EtOH 0,01 % nur 2,2 ± 3,7 % der mRNA nachgewiesen werden. In der unstimulierten Probe konnten nach 4 h 2 ± 3,3 % beobachtet werden. Diese Daten zeigen, dass die Stimulation durch EtOH 0,01 % nicht zu einer Induktion der IL-10 mRNA führt. Die im Experiment durch MP 10^{-6} M erzielte Induktion ist also auf MP selbst zurückzuführen.

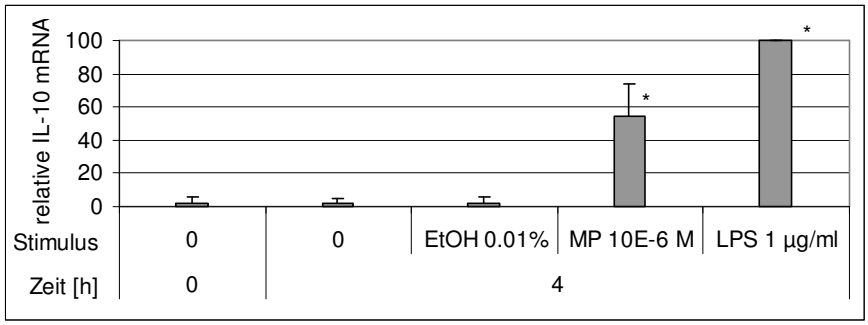

Abbildung 10: Qualitätskontrolle: Die Induktion der IL-10 mRNA erfolgt nicht durch EtOH, in dem MP gelöst ist.

Zellen der Zelllinie RPMI 8226.1 wurden für 4 Stunden mit Lipopolysaccharid (LPS) 1 µg/ml, EtOH 0,01 % und MP 10^{-6} M stimuliert. Die mRNA wurde wie im Methodenteil beschrieben isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine quantitative PCR für IL-10 und Enolase durchgeführt. Die Ergebnisse wurden an Enolase angeglichen und relativ zum unstimulierten 0 Stunden Wert (= 1) mit der Basis von 2 berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert von drei Experimenten +/- SD. Die mit * markierten Werte sind im Vergleich zum unstimulierten Wert mit ($p < 0.05$) signifikant.

3.2.2 Ausschluss einer durch LPS vermittelten IL-10 mRNA Induktion

Daneben sollte ausgeschlossen werden, dass die Stimulation mit MP durch eine mögliche Kontamination mit LPS verursacht wurde. Dies kann untersucht werden, indem man dem Stimulationsansatz Polymyxin B (PMB), das LPS neutralisiert, zugibt. Um die Wirkung von PMB zu überprüfen, wurden die Zellen mit LPS 1 µg/ml bzw. 100 ng/ml plus PMB 10 µg/ml für 4 h stimuliert und Lysate gewonnen. Abbildung 11 fasst die Ergebnisse aus drei Versuchen in Prozent, relativ zu LPS 1µg/ml (100 %), zusammen. Durch die Stimulation mit der niedrigeren LPS Konzentration von 100 ng/ml, reduzierte sich die IL-10 mRNA-Menge auf 78 ± 13,4 %. In dem Probenansatz, der zusätzlich PMB 10 µg/ml enthielt, konnten nur noch 0,3 ± 0,3 % der mRNA Menge nachgewiesen werden. PMB erwies sich folglich als wirksamer Neutralisator von LPS.

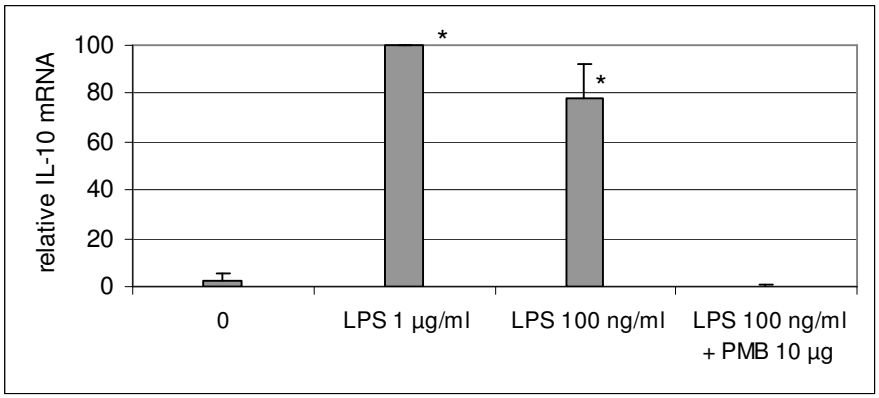

Abbildung 11: Polymyxin B (PMB) ist ein wirksamer Neutralisator von Lipopolysaccharid (LPS)

Zellen der Zelllinie RPMI 8226.1 wurden für 4 Stunden mit LPS 1 µg/ml bzw. 100 ng/ml und PMB 10 µg/ml stimuliert. Die mRNA wurde wie im Methodenteil beschrieben isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine quantitative PCR für IL-10 und Enolase durchgeführt. Die Ergebnisse wurden an Enolase angeglichen und relativ zum unstimulierten 0 Stunden Wert (= 1) mit der Basis von 2 berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Experimenten +/- SD. Die mit * markierten Werte sind im Vergleich zum unstimulierten Wert mit ($p < 0.05$) signifikant.

Um zu zeigen, dass die Induktion von IL-10 mRNA durch MP und nicht durch eine Kontamination mit LPS zustande kommt, wurden die Zellen zusätzlich zu MP 10^{-6} M mit PMB 10 µg/ml für 4 h stimuliert. Abbildung 12 zeigt die Mittelwerte aus drei Experimenten in Prozent, relativ zum LPS-Wert (100 %).

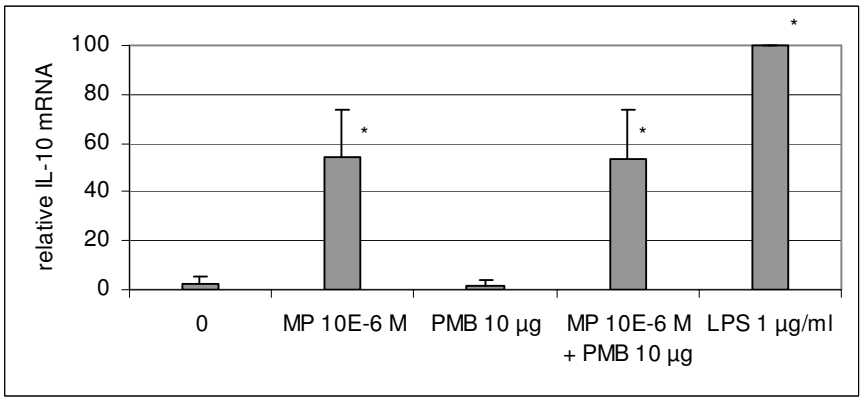

Abbildung 12: Qualitätskontrolle: MP ist nicht mit LPS kontaminiert.

RPMI 8226.1 Zellen wurden für 4 Stunden mit LPS 1µg/ml und MP 10^{-6} M ohne bzw. mit PMB 10 µg/ml stimuliert. Die mRNA wurde wie im Methodenteil beschrieben isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine quantitative PCR für IL-10 und

Enolase durchgeführt. Die Ergebnisse wurden an Enolase angeglichen und relativ zum unstimulierten 0 Stunden Wert (= 1) mit der Basis von 2 berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Experimenten +/- SD. Die mit * markierten Werte sind im Vergleich zum unstimulierten Wert mit ($p < 0.05$) signifikant.

Die Induktion durch die Kombination von MP 10^{-6} M und PMB 10 µg/ml, betrug 53 ± 20,1 % der Induktion durch LPS 1 µg/ml. Damit war diese der 54 ± 19,3 %-igen Induktion durch MP 10^{-6} M in etwa gleich. Eine in diesem Fall mögliche, durch PMB 10 µg/ml verursachte Induktion konnte ausgeschlossen werden, da nach Stimulation mit dem Inhibitor allein nur eine 1,5 ± 2 %-ige Induktion der IL-10 mRNA erfolgte, die der konstitutiven Expression nach 4 h entspricht. Auch mithilfe dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass die Induktion der IL-10 mRNA allein auf die Wirkung von MP zurückzuführen ist.

3.3 Induktion des IL-10 Promotors

Transkriptionsfaktoren binden im Promotor entweder direkt an die DNA oder an andere DNA-bindende Proteine und beeinflussen so die Transkription. Um die für die Transkription des IL-10 Promotors durch Glukokortikoide essenziellen Faktoren im Promotor zu identifizieren, wurden die Zellen mit unterschiedlich langen Luziferase Promotorkonstrukten getestet. Die Konstrukte wurden in allen beschriebenen Experimenten mithilfe von DEAE-Dextran in die Zelllinie RPMI 8226.1 eingebracht. Als interne Kontrolle wurde gleichzeitig zum Reporter Firefly Luziferase ein Kontrollvektor mit einer Renilla Luziferase transfiziert. Nach 70 h wurden die Zellen für 6 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von MP (von 10^{-6} M – 10^{-8} M) oder mit LPS 1µg/ml stimuliert, wobei immer eine unstimulierte Probe mitgeführt wurde. Die Luziferase-Aktivität wurde anschließend in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen und an Renilla Luziferase angeglichen. Die gemessenen RLUs beziehen sich auf eine Zellmenge von 5×10^5 Zellen. Die Auswertung erfolgte wie unter Punkt 2.5.1 beschrieben.

3.3.1 Transaktivierung des pIL-10(-1044).luci Promotorkonstrukts

Zunächst wurde untersucht, ob nach Transfektion des pIL-10(-1044).luci Konstrukts, das den ganzen IL-10 Promotor umfasst, eine Transaktivierung durch MP erfolgt. Das 1044 bp lange Promotorkonstrukt enthält Bindemotive für den Transkriptionsfaktor Specificity Protein 1 (SP1) bei -601 bp, für den Glukokortikoidrezeptor-Komplex, das sogenannte Glukokortikoid Responsive Element (GRE), bei -316 bp, für den Interferon Regulatory Factor (IRF) bei -181 bp und für den Signal transducer and activator of transcription3 (Stat3) bei -120 bp, berechnet vom Transkriptionsstart (Abbildung 13).

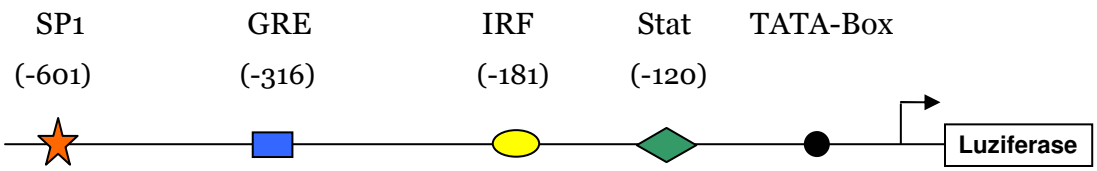

Abbildung 13: Schematische Darstellung des pIL-10(-1044) Luziferase Reportergenkonstrukts mit potentiellen Bindemotiven.

Abbildung 14 fasst die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten zusammen. Nach Stimulation der RPMI 8226.1 Zellen mit MP 10^{-6} M konnten 73233 ± 35613 RLU/5 x 10^5 Zellen gemessen werden. Die Zahl der RLU/5 x 10^5 Zellen betrug in der unstimulierten Probe 5347 ± 3303. Folglich konnte eine um Faktor 18,5 gesteigerte Transaktivierung des IL-10 Promotors durch MP demonstriert werden. Im Vergleich dazu, konnte mit MP 10^{-7} M mit 46432 ± 24050 RLU/5 x 10^5 Zellen im Mittel nur eine 11,2-fache, und mit 18067 ± 14450 RLU/5 x 10^5 Zellen nach Stimulation mit MP 10^{-8} M nur eine 2,5-fache Steigerung der Transkription erzielt werden. Diese Daten belegen eine deutliche und schnelle Induktion des IL-10 Promotors durch MP.

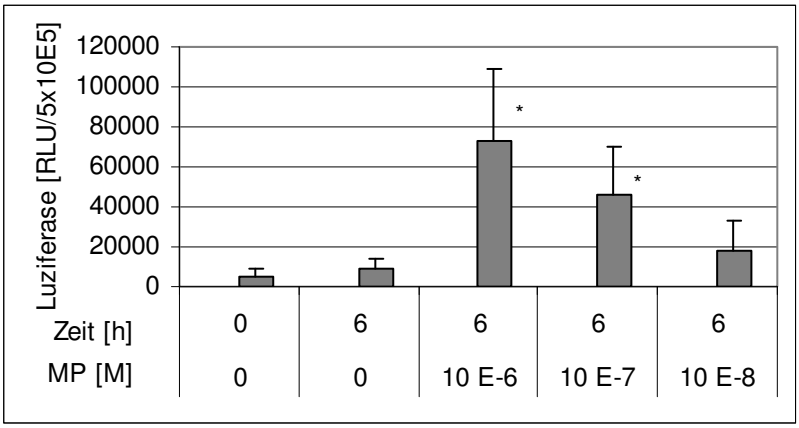

Abbildung 14: Titration: Transaktivierung des pIL-10(-1044) Luziferase Reportergenkonstrukts durch verschiedene MP Konzentrationen.

RPMI 8226.1 Zellen wurden mit dem pIL-10(-1044) Luziferase Reportergenkonstrukt und dem Renilla Luziferase Kontrollvektor kotransfiziert. Nach 70 Stunden wurden die Zellen für 6 h mit verschiedenen Konzentrationen von MP stimuliert. Die Luziferaseaktivität wurde in RLU gemessen und an Renilla Luziferase angeglichen. Dargestellt ist der Mittelwert aus fünf Experimenten +/- SD. Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind mit ($p < 0.05$) signifikant.

3.3.2 Transaktivierung der pIL-10(-195).luci Promotorkonstrukte

Um herauszufinden, ob das GRE Bindemotiv für die Transaktivierung des IL-10 Promotors durch GCs von Bedeutung ist, wurden die Zellen im nachfolgenden Experiment mit einem 195 bp langen IL-10 Promotorkonstrukt transfiziert, das kein potentielles GRE enthält, aber die IRF und Stat Bindemotive (siehe Abbildung 15).

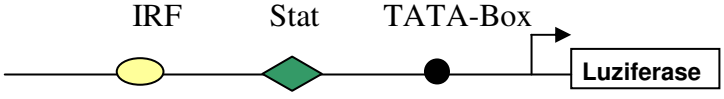

Abbildung 15: Schematische Darstellung des pIL-10(-195) Luziferase Reportergenkonstrukts

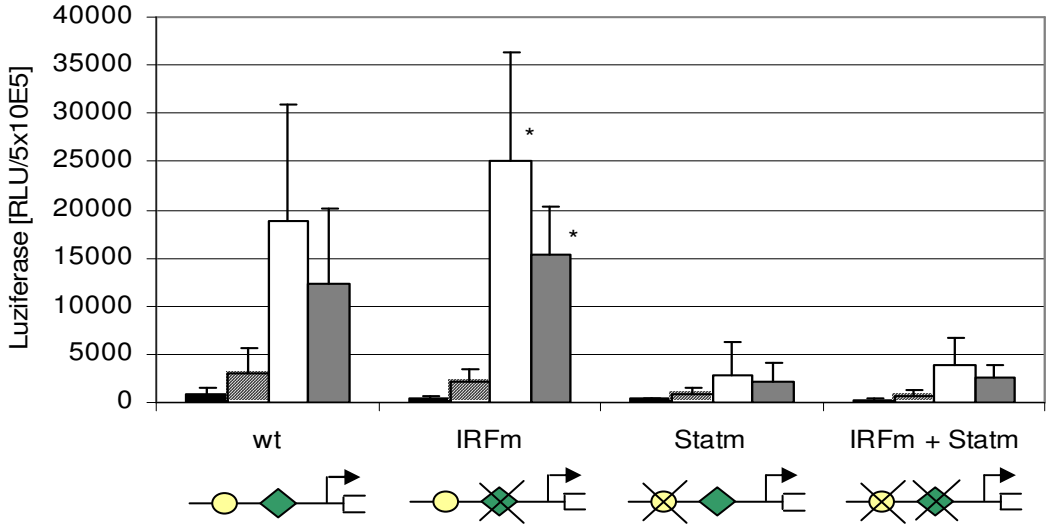

Abbildung 16: Deletionsserie: Transaktivierung der pIL-10(-195) LuziferaseReportergenkonstrukte mit und ohne Mutation durch MP.

RPMI 8226.1 Zellen wurden mit dem pIL-10(-195) Luziferase Reportergenkonstrukt mit und ohne Mutation und dem Renilla Luziferase Kontrollvektor kotransfiziert. Nach 70 Stunden wurden die Zellen mit MP in den Konzentrationen 10^{-6} M und 10^{-7} M für 6 Stunden stimuliert. Die Luziferaseaktivität wurde in RLU gemessen und an Renilla Luziferase angeglichen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Experimenten +/- SD. Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind mit ($p < 0.05$) signifikant. (■) 0 h unstimuliert, (▨) 6 h unstimuliert, (□) 6 h MP 10^{-6} M und (▩) 6 h MP 10^{-7} M.

Wie Abbildung 16 zeigt, war das Wildtyp Konstrukt (pIL-10(-195)wt) durch Glukokortikoide gut induzierbar. Es zeigte in drei Experimenten im Mittel 18761 ± 12215 RLU/5 x 10^5 Zellen. Im Vergleich zur unstimulierten Probe, in der im Mittel 929 ± 487 RLU/5 x 10^5 Zellen messbar waren, bedeutet dies eine 8,8-fache Steigerung der Promotoraktivität nach Stimulation mit MP 10^{-6} M. In der mit MP 10^{-7} M stimulierten Probe konnten 12322 ± 7817 RLU/5 x 10^5 Zellen gemessen werden und damit eine 5,6-fache Steigerung gezeigt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass das GRE keine große Bedeutung für die Transaktivierung des IL-10 Promotors durch GCs hat.

Um herauszufinden, welches der beiden verbliebenen Motive für die Transaktivierung durch GCs von Bedeutung ist, wurden die Zellen mit 195 bp langen

IL-10 Promotorkonstrukten transfiziert, die Mutationen im IRF Motiv, bzw. im Stat3 Motiv oder in beiden enthalten.

Das Konstrukt mit der Mutation im IRF Bindemotiv (pIL-10(-195)IRFm) ist mit MP 10^{-6} M 14-fach und durch MP 10^{-7} M 8,5-fach induzierbar. Dabei betrugen die maximalen Absolutwerte der RLU/5 x 10^5 Zellen nach Stimulation mit MP 10^{-6} M im Mittel 25133 ± 11106 RLU/5 x 10^5 Zellen und mit MP 10^{-7} M 15428 ± 4876 RLU/5 x 10^5 Zellen, während der Mittelwert der RLU/5 x 10^5 Zellen der unstimulierten Probe bei 474 ± 130 lag. Somit scheint das IRF Bindemotiv für die Transaktivierung des IL-10 Promotors durch Glukokortikoide nicht relevant zu sein.

Das Konstrukt mit der Mutation des Stat Motivs (pIL-10(-195)Statm) zeigte nach Stimulation mit MP 10^{-6} M mit im Mittel 2852 ± 3407 RLU/5 x 10^5 Zellen nur noch eine 5,4-fache und durch MP 10^{-7} M mit im Mittel 2089 ± 2105 RLU/5 x 10^5 Zellen nur noch eine 2,5-fache Steigerung gegenüber der unstimulierten Probe, in der im Mittel 386 ± 94 RLU/5 x 10^5 Zellen messbar waren. Aus dem deutlich reduzierten Induktionsniveau kann man schließen, dass das Stat3 Bindemotiv für die Transaktivierung eine wichtige Rolle spielt.

In dem Konstrukt mit der Doppelmutante (pIL-10(-195)IRFm+ Statm) waren nach Stimulation mit MP 10^{-6} M im Mittel 3953 ± 2825 RLU/5 x 10^5 Zellen und nach Stimulation mit MP 10^{-7} M im Mittel 2488 ± 1490 RLU/5 x 10^5 Zellen messbar. Da in der unstimulierten Probe im Mittel nur 412 ± 311 RLU/5 x 10^5 Zellen nachgewiesen werden konnten, ergibt sich durch MP 10^{-6} M eine 8,3-fache Steigerung und durch MP 10^{-7} M eine 5-fache Steigerung der Promotoraktivität. Dies findet jedoch ebenfalls auf einem stark reduzierten Niveau statt.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass das GRE für die Induktion des IL-10 Promotors nicht unbedingt gebraucht wird und dass das Stat Motiv eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Bemerkenswert ist, dass GCs auch in Abwesenheit eines Stat Motivs den Promotor immer noch induzieren, wenn auch auf niedrigen Aktivitätsniveau.

3.3.3 Transaktivierung des pIL-10(-150) Promotorkonstrukts

Da im vorangegangenen Versuch eine Induktion nach Transfektion des 195 bp langen IL-10 Promotor Konstrukts nachgewiesen werden konnte und Stat3 eine wichtige Rolle bei der Induktion von IL-10 durch Glukokortikoide zu spielen scheint, wurde im folgenden Versuch ein 150 bp langes IL-10 Promotorkonstrukt, das nur noch das Stat3 Bindemotiv enthält, transfiziert (Abbildung 17). Dieses sollte aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse durch MP induzierbar sein.

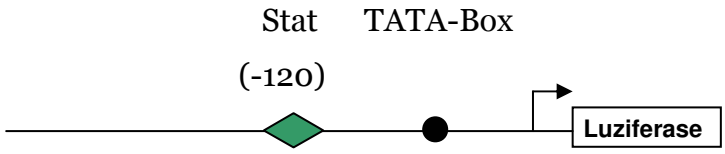

Abbildung 17: Schematische Darstellung des pIL-10(-150) Luziferase Reportergen-konstrukts

.

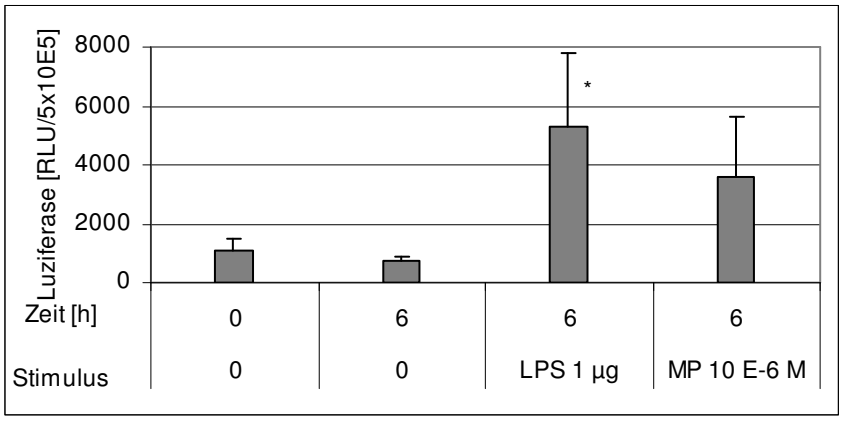

Abbildung 18: Transaktivierung des pIL-10(-150) Luziferase Reportergenkonstrukts durch MP und LPS

RPMI 8226.1 Zellen wurden mit dem pIL-10(-150) Luziferase Reportergen-konstrukt und dem Renilla Luziferase Kontrollvektor kotransfiziert. Nach 70 Stunden wurden die Zellen mit MP 10^{-6} M und LPS 1 µg/ml für 6 Stunden stimuliert. Die Luziferaseaktivität wurde in RLU gemessen und an Renilla Luziferase angeglichen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Experimenten +/- SD. Das mit * gekennzeichneten Ergebnis ist mit ($p < 0.05$) signifikant.

Abbildung 18 ist zu entnehmen, dass das Konstrukt durch Glukokortikoide gut induzierbar ist. Nach Stimulation der RPMI 8226.1 Zellen mit MP in einer Konzentration von 10^{-6} M konnten in 3 Experimenten im Mittel 3592 ± 2069 RLU/5 x 10^5 Zellen gemessen werden und damit eine um den Faktor 2,7 gesteigerte Transaktivierung des IL-10 Promotors im Gegensatz zur unstimulierten Probe mit im Mittel 1112 ± 411 RLU/5 x 10^5 Zellen gezeigt werden. Als Kontrolle für die Induktion wurde eine Probe mit LPS 1 µg/ml stimuliert, in der im Mittel 5298 ± 2493 RLU/5 x 10^5 Zellen messbar waren. Folglich konnte durch Stimulation mit LPS im Mittel eine 4,5-fache Steigerung der Transkription erzielt werden.

3.3.4 Analyse des 150 bp langen IL-10 Promotors

Da trotz der Mutation des Stat Motivs noch immer eine Induktion des IL-10 Promotors zu sehen war, wurden im nächsten Versuch Plasmide transfiziert, die eine 10 bp lange Linkersequenz an unterschiedlichen Stellen im pIL-10(-150).luci Promotorkonstrukt enthalten. Auf diese Weise sollten weitere Motive entdeckt werden, die an einer GC Induktion des Promotors beteiligt sind.

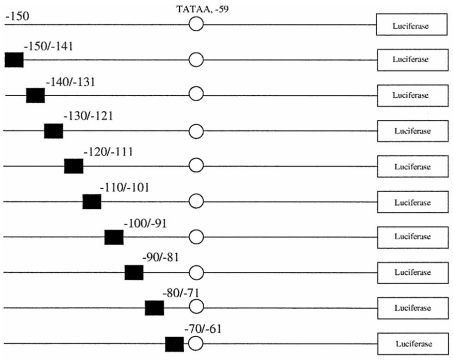

Abbildung 19: Schematische Darstellung der Linkerscanningserie

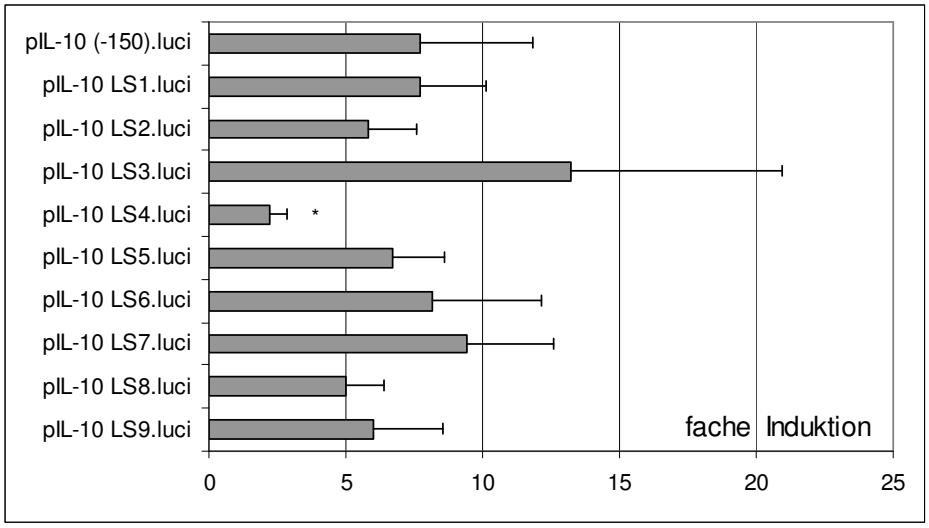

Abbildung 20: Transaktivierung der Linkerscanninserie durch MP

Eine 10 bp lange Linkersequenz wurde an unterschiedlichen Stellen in das -150 Konstrukt eingefügt und anschießend in pβTATA.luci kloniert. 70 Stunden nach der Transfektion in RPMI 8226.1 Zellen wurden diese für 6 Stunden mit MP 10^{-6} M stimuliert. Die Luziferaseaktivität wurde in RLU gemessen und an Renilla Luziferase angeglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte der fachen Steigerung, berechnet aus drei unterschiedlichen Experimenten. Das mit * gekennzeichnete Ergebnis ist mit ($p < 0.05$) signifikant.

Nach Transfektion des pIL-10(-150)wt und des pIL-10 LS1 Konstruktes konnte eine 7,7 ± 4,1-fache (für wt) und ± 2,4 (für LS1) Steigerung der Promotoraktivität beobachtet werden. Mit der Transfektion des pIL-10 LS2 Konstrukts konnte eine 5,8 ± 1,8-fache und mit pIL-10 LS3 eine 13,2 ± 7,7-fache Steigerung nachgewiesen werden. Einen deutlichen Rückgang der Promotoraktivität konnte mit dem pIL-10 LS4 Konstrukt beobachtet werden, das nur noch zu einer 2,2 ± 0,6-fachen Steigerung führte. Mit dem pIL-10 LS5 Konstrukt konnte wieder eine 6,7 ± 1,9-fache, mit dem pIL-10 LS6 Konstrukt eine 8,1 ± 4-fache, mit dem pIL-10 LS7 Konstrukt eine 9,4 ±3,2-fache, mit dem pIL-10 LS8 Konstrukt eine 5 ± 1,4-fache und mit dem pIL-10 LS9 Konstrukt eine 6 ± 2,5-fache Induktion beobachtet werden.

Diese Daten zeigen deutlich, dass nur die Mutation im LS4 Konstrukt, welche das Stat Motiv umfasst, die Promotoraktivität senkt. Es wurden also keine weiteren cis-Elemente, die an der GC Aktivierung des IL-10 Gens beteiligt sind, gefunden.

3.3.5 Transaktivierung des LS4 (3x Stat3) Promotorkonstrukts

Um die Rolle des Stat3 Bindemotivs genauer zu untersuchen, wurde das Plasmid pLS4 (3x Stat3) eingesetzt, welches drei hintereinander klonierte Stat3 Bindemotive enthält.

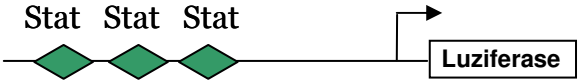

Abbildung 21: Schematische Darstellung des LS4(3x Stat3) Luziferase Reportergenkonstrukts

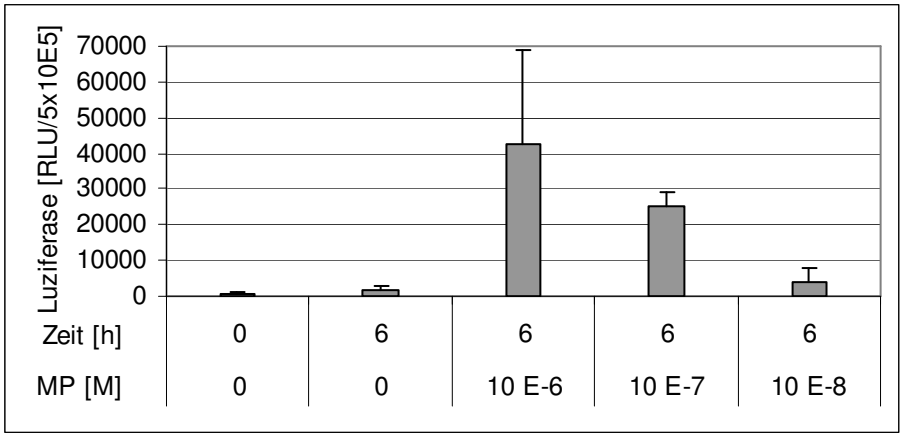

Abbildung 22: Transaktivierung des LS4 Trimers durch MP

RPMI 8226.1 Zellen wurden mit dem LS4 Trimer, das drei Stat3 Bindemotive aus dem humanen IL-10 Promotor enthält und dem Renilla Luziferase Kontrollvektor kotransfiziert. Nach 70 Stunden wurden die Zellen mit MP 10^{-6} M für 6 h stimuliert. Die Luziferaseaktivität wurde in RLU gemessen und an Renilla Luziferase angeglichen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Experimenten +/- SD.

Abbildung 22 zeigt die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten. Nach Stimulation mit MP 10^{-6} M erfolgte eine 28,8-fache, mit MP 10^{-7} M eine 17-fache und mit MP 10^{-8} M eine 2,4-fache Transaktivierung des Promotors. Dabei waren nach Stimulation mit MP 10^{-6} M 42452 ± 16965 RLU/5 x 10^5 Zellen, nach Stimulation mit MP 10^{-7} M 25321 ± 16966 RLU/5 x 10^5 Zellen und nach Stimulation mit MP 10^{-8} M 4053 ± 3915 RLU/5 x 10^5 Zellen messbar. In der unstimulierten Probe waren nur 497 ± 434 RLU/5 x 10^5 Zellen messbar. Wie auch schon in den

Transferexperimenten mit den anderen Konstrukten, zeigte auch hier MP 10^{-6} M die stärkste Induktion. Das Experiment verdeutlicht nochmals die Bedeutung des Stat3 Bindemotivs.

3.4 Analyse des LS4 Bindeproteins

Mithilfe eines EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) soll nun die Bindung von Stat3 an die LS4 Sequenz nachgewiesen werden. Für dieses Experiment wurden die Zellen ohne und mit LPS 1 µg/ml bzw. MP 10-6 M für 1, 2 und 4 h stimuliert und die Kernextrakte gewonnen. Diese wurden anschließend mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid mit der LS4 Sequenz inkubiert. DNA-Moleküle, an die ein Protein gebunden hat, wandern im anschließenden Polyacrylamidgel langsamer als freie Fragmente. Kommt es durch die Stimulation mit Methylprednisolon zu einer gesteigerten Transkription, an der Stat3 im Wesentlichen beteiligt ist, müsste im Kernextrakt mehr Stat3 Protein vorhanden sein - folglich mehr Protein an das Oligonukleotid binden und dies im Gel durch eine stärkere Bande zu sehen sein. Die Stimulation mit LPS dient als Positivkontrolle. Abbildung 23 zeigt einen von drei repräsentativen EMSA.

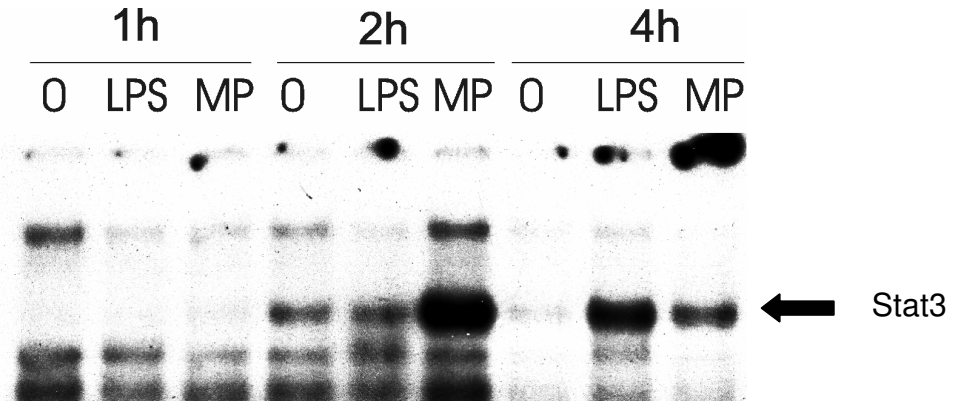

Abbildung 23: Gelshiftanalyse: Stat3 bindet nach Stimulation mit LPS und MP vermehrt an die LS4 Sequenz im IL-10 Promotor

RPMI Zellen wurden für 1, 2 und 4 Stunden mit LPS 1 µg/ml und MP 10^{-6} M stimuliert. Anschließend wurden wie im Methodenteil beschrieben Kernextrakte angefertigt und mit dem radioaktiv markierten LS4 Oligonukleotid inkubiert. Die Proben wurden auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und

ein Röntgenfilm aufgelegt. Gezeigt ist eines von insgesamt drei repräsentativen Experimenten.

Wie aus Abbildung 23 zu lesen ist, ließ sich nach 1 h weder in der mit LPS 1 µg/ml noch in der mit Methylprednisolon in einer Konzentration von 10^{-6} M stimulierten Probe eine starke Bindeaktivität nachweisen. Nach 2 h jedoch lässt sich in der mit Methylprednisolon 10^{-6} M stimulierten Probe eine starke Bindeaktivität zeigen, die nach 4 h jedoch wieder deutlich zurückgeht. Anders verhielt sich die mit LPS 1 µg/ml stimulierte Probe, in der erst nach 4 h eine erhöhte Bindeaktivität beobachtet werden konnte.

Um zu zeigen, dass wirklich Stat3 an die DNA bindet, wurde eine Supershiftanalyse durchgeführt. Die Kernextrakte von RPMI Zellen, die für 2 und 4 h mit und ohne 6α-Methylprednisolon stimuliert wurden, wurden ohne Antikörper, mit einem Stat3 Antikörper oder mit einem unspezifischen IgG, als Kontrolle, für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe des radioaktiv markierten Oligos werden die Proben auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch die Bindung eines Antikörpers an den DNA-Protein-Komplex wird dieser größer und die Bande im Gel verschiebt sich nach oben. Abbildung 24 zeigt ein Repräsentatives von drei Experimenten.

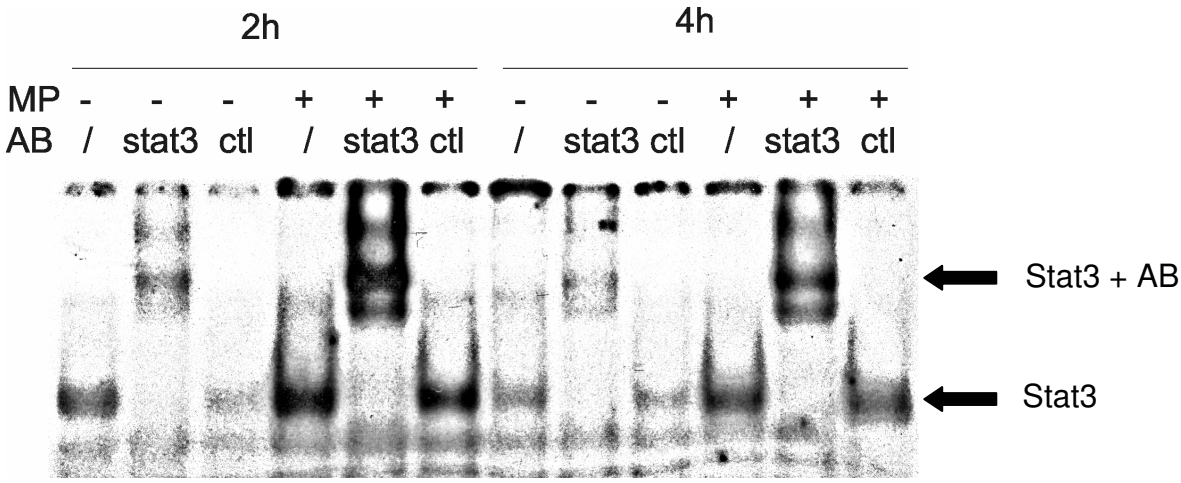

Abbildung 24: Supershiftanalyse: Stat3 bindet an die LS4 Sequenz im IL-10 Promotor

RPMI Zellen wurden für 2 und 4 Stunden mit MP 10^{-6} M stimuliert und anschließend wie im Methodenteil beschrieben Kernextrakte angefertigt. Vor der Inkubation mit dem radioaktiv markierten LS4 Oligonukleotid werden die Extrakte mit einem Anti-Stat3 Antikörper (AB) (stat3) und einem Kontrollantikörper (ctl)

inkubiert. Daneben wurde eine Probe ohne AK (/) mitgeführt. Im Anschluss wurden die Proben auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Gezeigt ist eines von insgesamt drei repräsentativen Experimenten.

Nach zwei Stunden war in der unstimulierten Probe ohne die Zugabe von Antikörper eine schwache Bande zu erkennen. Diese zeigte die konstitutive Bindeaktivität von Stat3. Dass es sich hierbei wirklich um Stat3 handelt, wurde in der Probe deutlich, der zusätzlich der Stat3 Antikörper zugegeben wurde. Die Bande ist nach oben verschoben. In der Kontrollprobe mit dem unspezifischen IgG war die Bande auf gleicher Höhe wie in der Probe ohne Antikörper, da dieser nicht an Stat3 bindet. Die Bindeaktivität in den für 2 h mit MP stimulierten Proben war, wie bereits im EMSA Experiment gezeigt wurde, deutlich stärker. Nach Stimulation mit 6α-Methylprednisolon hatte mehr Stat3 an die LS4 Sequenz gebunden als in der unstimulierten Probe. Dass es sich auch hierbei um Stat3 handelt, zeigte sich im Gel durch die nach oben verschobene Bande in der Probe mit dem Stat3 Antikörper.
Das gleiche Experiment wurde auch für eine Stimulation von 4 h durchgeführt. Insgesamt war nach 4 h, wie auch im EMSA Experiment bereits gezeigt, eine geringere Bindeaktivität von Stat3 zu beobachten als nach 2 h. Doch auch nach 4-stündiger Stimulation konnte durch die Verschiebung der Bande in der Probe mit dem Stat3 Antikörper gezeigt werden, dass es sich um Stat3 handelt, das an die LS4 Sequenz bindet.

3.5 Nachweis der Bindung von Stat3 an den IL-10 Promotor durch ChIP

Mithilfe der ChIP (Chromatin-Immunpräzipitation) Methode sollte die Bindung von Stat3 an die LS4 Sequenz im IL-10 Promotor *in vivo* nachgewiesen werden. Aus den für 2 h mit und ohne 6α-Methylprednisolon in einer Konzentration von 10^{-6} M stimulierten Zellen wurde nach Vernetzung der Proteine mit der DNA durch Formaldehyd das Chromatin gewonnen. Über Nacht wurde dieses dann, durch Zugabe des anti-Stat3 Antikörpers oder des anti-TATA binding Protein Antikörpers (Positivkontrolle) und der Agarose Beads, präzipitiert. Nach Waschen der Beads wurden die Vernetzungen gelöst und die DNA isoliert. Zusätzlich wurde eine

Chromatin-Probe mitgeführt, die nicht präzipitiert wurde, und so Auskunft über die eingesetzte Chromatinmenge gibt (Input). Durch eine quantitative PCR mit einem Primerpaar, das die LS4 Sequenz umschließt, wurde anschließend nachgewiesen, wie viel Stat3 an die DNA gebunden war. Die zusätzliche Amplifikation des Myoglobin Gens diente als Negativkontrolle. Für die Positivkontrolle wurde der humane H2B Promotor amplifiziert. Abbildung 25 fasst die Ergebnisse aus 3 ChIP Experimenten zusammen. Angegeben ist jeweils, wie viel Prozent der eingesetzten Chromatinmenge nach Präzipitation mit dem spezifischen Antikörper wieder gewonnen werden konnte.

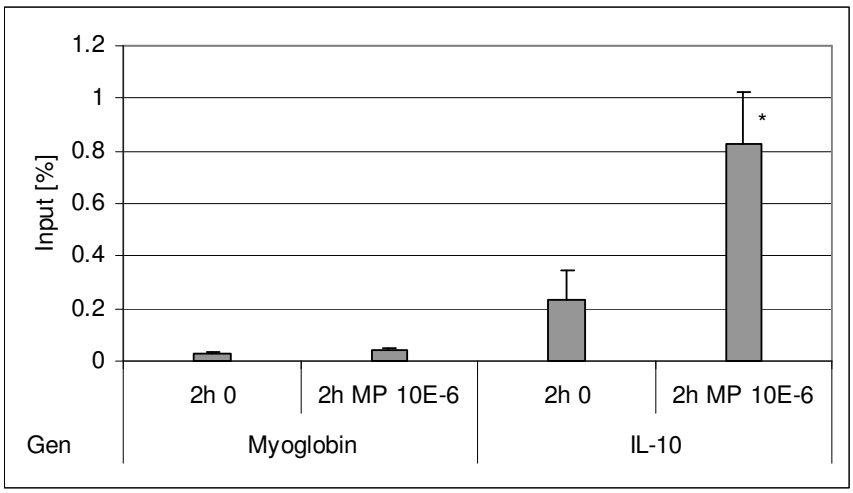

Abbildung 25: ChIP-Analyse: MP induziert die Bindung von Stat3 an die LS4 Sequenz im IL-10 Promotor

RPMI 8226.1 Zellen wurden für 2 h mit MP 10^{-6} M stimuliert. Die Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) wurde wie im Methodenteil beschrieben für stimulierte und unstimulierte Zellen mithilfe eines Anti-Stat3 Antikörpers durchgeführt. Mittels einer quantitativen PCR mit Primern, die die LS4 Sequenz umschließen wurde die Bindung von Stat3 im IL-10 Promotor nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurde das Myoglobin Gen amplifiziert. Gezeigt ist eines von insgesamt drei repräsentativen Experimenten. Der mit * markierte Wert ist im Vergleich zum unstimulierten Wert mit ($p < 0.05$) signifikant.

Nach Stimulation mit 6α-Methylprednisolon in einer Konzentration von 10^{-6} M für 2 h konnten 0,83 ± 0,2 % der eingesetzten Chromatinmenge wieder gewonnen werden. In der unstimulierten Probe hingegen nur 0,24 ± 0,11 %. Durch die Stimulation mit dem Glukokortikoid ist folglich *in vivo* um Faktor 3,4 mehr Stat3 an die DNA

gebunden als in der unstimulierten Probe. Am Myoglobin Gen (Negativkontrolle) war, wie erwartet, keine Bindung von Stat3 nachweisbar. In der unstimulierten Probe konnten 0,03 ± 0,01 % und in der stimulierten Probe 0,04 ± 0,01 % des eingesetzten Chromatins durch Immunpräzipitation wieder gewonnen werden.
Um die Induktion der Stat3 Bindung auf einem Agarosegel (2 %) zu veranschaulichen, wurde erneut eine PCR für die nach einem ChIP Experiment isolierte DNA durchgeführt, die bei Zyklus 30 gestoppt wurde.

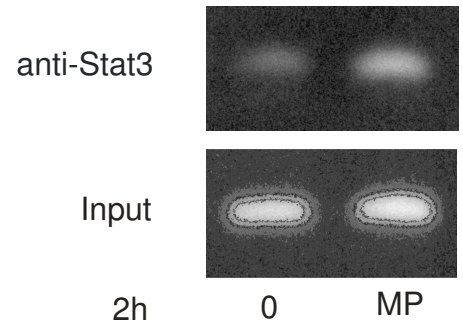

Abbildung 26: Induktion von Stat3 durch MP (ChIP)
RPMI 8226.1 Zellen wurden für 2 h mit MP 10^{-6} M stimuliert. Die Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) wurde wie im Methodenteil beschrieben mithilfe eines Anti-Stat3 Antikörpers für stimulierte und unstimulierte Zellen durchgeführt. Im Anschluss wurde eine PCR mit Primern, die die LS4 Sequenz umschließen durchgeführt und bei Zyklus 30 unterbrochen. Die Amplifikate wurden auf ein 2 %-iges Agarosegel aufgetragen. Als Kontrolle wurde eine 1:15 Verdünnung des in das Experiment eingesetzten Gesamtchromatins mitamplifiziert (Input). Im Vergleich zur unstimulierten Probe (0) war nach Stimulation mit MP mehr Stat3 an die DNA gebunden.

Auch auf dem Gel ist die Induktion von Stat3 durch 6α-Methylprednisolon gut zu sehen (obere Spalte). Für das Experiment wurde für die unstimulierte und die stimulierte Probe gleich viel Chromatin eingesetzt (siehe Input, untere Zeile). Die densitometrische Analyse zeigte für die stimulierte Probe eine 2,6-fache Induktion der LS4 DNA-Menge nach Präzipitation mit anti-Stat3.

3.6 Phosphorylierung von Stat3 Protein vor und nach Induktion durch MP

Um zu klären, ob und an welchen Aminosäureresten Stat3 nach der Induktion durch MP phosphoryliert vorliegt, wurden Kernextrakte aus Zellen, die für 2 h mit MP 10^{-6} M stimuliert wurden, gewonnen und im Western Blot analysiert. Aktin diente dabei als Kontrolle und war für alle Proben gleich. Die Menge an unphosphoryliertem Stat3 war in beiden Proben (stimuliert und unstimuliert) gleich. Das Gleiche konnte für das am Ser^{727} und Tyr^{705} phosphorylierte Stat3 Protein beobachtet werden. Es war jedoch mehr Stat3 Protein, das am Tyr^{705} phosphoryliert ist nachweisbar, als welches, das am Ser^{727} phosphoryliert ist. Für keinen der untersuchten Phosphorylierungszustände von Stat3 war eine Veränderung durch MP zu beobachten.

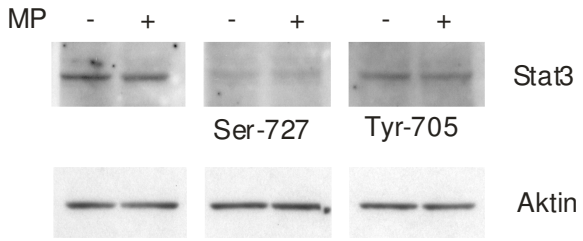

Abbildung 27: Western Blot Analyse: Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von Stat3 nach Stimulation mit MP

RPMI Zellen wurden für 2 Stunden mit MP 10^{-6} M stimuliert. Im Anschluss wurde wie im Methodenteil beschrieben eine Western Blot Analyse durchgeführt. Für die Immundetektion wurden Antikörper gegen Stat3, den Phospho-Ser^{727} und den phospho-Tyr^{705} Rest von Stat3 verwendet. Als Kontrolle wurde ein Antikörper gegen Aktin verwendet. Die Detektion erfolgte mittels Chemolumineszenz. Gezeigt ist eines von insgesamt drei repräsentativen Experimenten.

3.7 Beteiligung des Glukokortikoidrezeptors an der Induktion durch MP

Um zu prüfen, ob die Induktion von IL-10 durch Glukokortikoide durch den nukleären Glukokortikoidrezeptor oder durch einen Oberflächenrezeptor vermittelt wird, wurden RPMI 8226.1 Zellen mit MP in einer Konzentration von 10^{-6} M und mit, bzw. ohne Mifepristone (RU-486) in einer Konzentration von 3 µM für 4 h stimuliert. Mifepristone ist ein Steroidhormonrezeptor Agonist, der an den Rezeptor bindet und somit die Bindung von Glukokortikoiden verhindert. Mithilfe von TRI-

Reagent wurde anschließend die mRNA isoliert. Nach Umschreiben in cDNA wurde eine LightCycler PCR für IL-10 und α-Enolase durchgeführt. Die Daten wurden unter Annahme von einer Basis von 2 berechnet, an Enolase angeglichen und relativ zum unstimulierten 0 h Wert (= 1) berechnet. Nachfolgende Abbildung fasst die Mittelwerte aus 4 voneinander unabhängigen Experimenten zusammen.

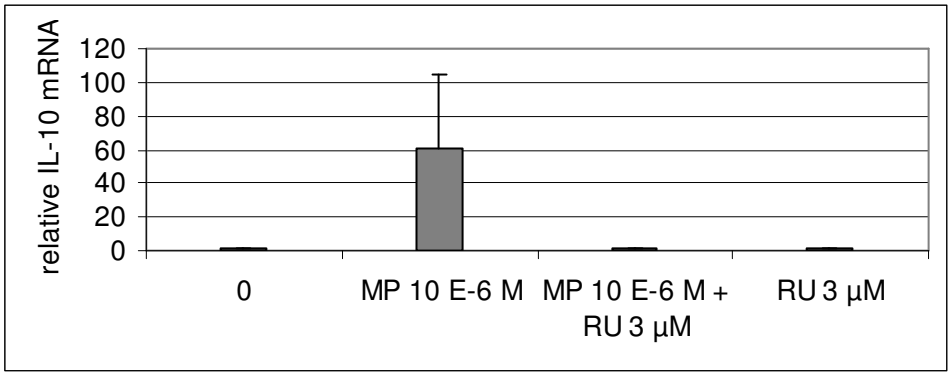

Abbildung 28: Blockade des Glukokortikoidrezeptors durch RU-486

RPMI 8226.1 Zellen wurden für 4 h mit MP 10^{-6} M und mit 3 µM des Steroidrezeptor Anatagonisten RU-486 stimuliert. Die mRNA wurde wie im Methodenteil beschrieben isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine quantitative PCR für IL-10 und Enolase durchgeführt. Die Ergebnisse wurden an Enolase angeglichen und relativ zum unstimulierten 0 Stunden Wert (= 1) mit der Basis von 2 berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Experimenten +/- SD.

Die Stimulation mit MP 10^{-6} M führte zu einer 61 ± 44-fachen Induktion der IL-10 mRNA-Menge im Vergleich zur unstimulierten Probe. Die Stimulation der Zellen mit MP 10^{-6} M und RU-486 3 µM führte, wie auch die Stimulation mit RU-486 3 µM allein, zu keiner Induktion der IL-10 mRNA. Das Ergebnis lässt darauf schließen, dass der Glukokortikoidrezeptor bei der Induktion der IL-10 mRNA maßgeblich beteiligt ist.

Um eine Beteiligung des Glukokortikoidrezeptors auch auf Promotorebene nachweisen zu können, wurde das pIL-10(-195).luci Konstrukt in RPMI 8226.1 Zellen transfiziert und für 6 h mit und ohne RU-486 3 µM und MP 10^{-6} M stimuliert. In Abbildung 29 ist der Mittelwert von drei voneinander unabhängigen Experimenten dargestellt.

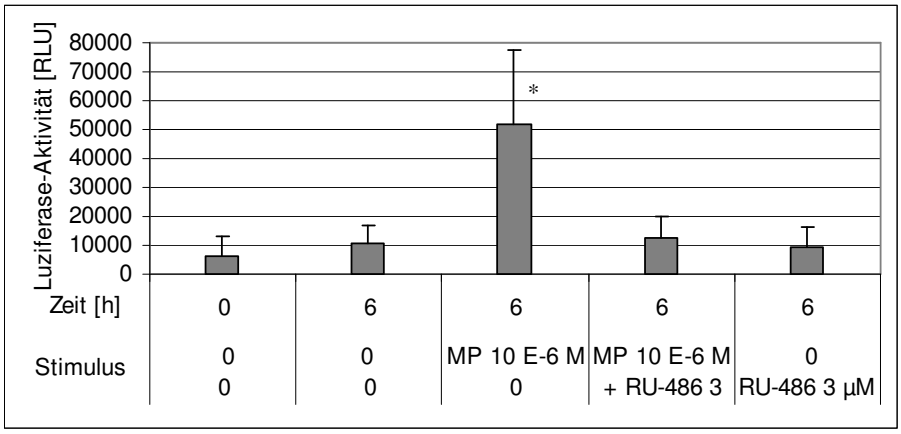

Abbildung 29: Blockade der Transaktivierung des pIL-10(-195) Luziferase Reportergenkonstrukts durch RU-486 nach Stimulation mit MP

RPMI 8226.1 Zellen wurden mit dem pIL-10(-195) Luziferase Reportergenkonstrukt und dem Renilla Luziferase Kontrollvektor kotransfiziert. Nach 70 Stunden wurden die Zellen mit MP 10^{-6} M und RU-486 3 µM für 6 h stimuliert und die Luziferaseaktivität in RLU gemessen und an Renilla Luziferase angeglichen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Experimenten +/- SD. Das mit * markierte Ergebnis ist mit ($p < 0.05$) signifikant.

Nach Stimulation mit MP 10^{-6} M konnte eine Lichtintensität von 51839,2 ± 25675,9 RLU/5 x 10^5 Zellen gemessen werden. Damit konnte im Gegensatz zur unstimulierten Probe, in der 6213,6 ± 7051,1 RLU/5 x 10^5 Zellen messbar waren, eine um Faktor 10 gesteigerte Transaktivierung des Konstruktes gezeigt werden. In der mit MP 10^{-6} M und RU-486 3 µM stimulierten Probe war mit 12788 ± 7354 RLU/5 x 10^5 Zellen hingegen nur eine um Faktor 1,5 gesteigerte Transaktivierung zu beobachten. Es konnte keine Stimulation der Zellen durch RU-486 3 µM alleine festgestellt werden.

Ohne die Beteiligung des Glukokortikoidrezeptors kommt es also zu keiner Transaktivierung des pIL10-(-195) Konstruktes durch Glukokortikoide. Der Glukokortikoidrezeptor ist an der durch Glukokortikoide vermittelten Induktion von IL-10 maßgeblich beteiligt.

3.8 Blockade der PI3K durch Ly 294,000 und Wortmannin

Da bekannt ist, dass Glukokortikoide die Phosphatidylinositol-3-hydroxykinase (PI3K) über den Glukokortikoidrezeptor aktivieren können (Hafezi-Moghadam *et al.* 2002), wurden die Zellen im nachfolgenden Versuch vor der Stimulation mit MP 10^{-6} M für 4 h mit den PI3-Kinase Inhibitoren Ly 294,002 und Wortmannin für 20 min vorinkubiert. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob die PI3-Kinase an der Induktion von IL-10 durch MP beteiligt ist.

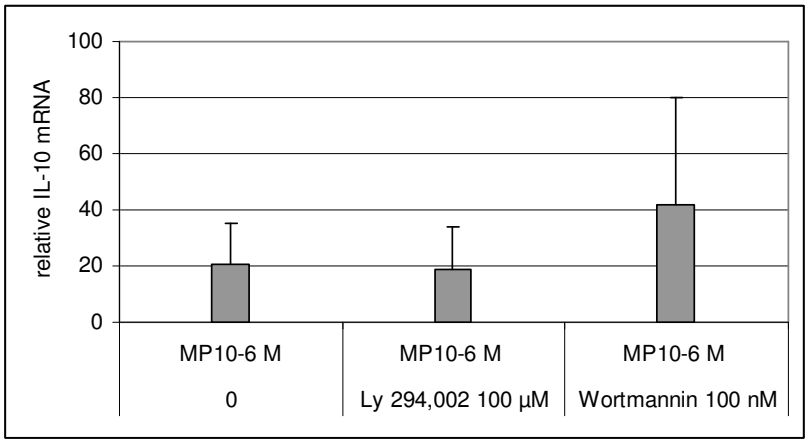

Abbildung 30: Die Induktion der IL-10 mRNA durch MP kann durch die PI3-Kinase Inhibitoren Ly 294,002 und Wortmannin nicht beeinflusst werden

RPMI 8226.1 Zellen wurden für 4 Stunden mit MP 10^{-6} M und den PI3-Kinase Inhibitoren Ly 294,002 100 µm und Wortmannin 100 nM stimuliert. Die mRNA wurde wie im Methodenteil beschrieben isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine quantitative PCR für IL-10 und Enolase durchgeführt. Die Ergebnisse wurden an Enolase angeglichen und relativ zum unstimulierten 0 Stunden Wert (= 1) mit der Basis von 2 berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert aus fünf Experimenten +/- SD.

Nach Stimulation mit MP 10^{-6} M wurde um Faktor 20,6 ± 14,8 mehr IL-10 produziert als in der unstimulierten Probe (nicht gezeigt). Trotz Vorinkubation der Zellen mit Ly 294,002 100 µM konnte nach Stimulation mit MP 10^{-6} M für 4 h keine deutliche Abnahme der IL-10 mRNA Menge beobachtet werden. Der Faktor der Induktion betrug 18,9 ± 15. Nach Vorinkubation der Zellen mit Wortmannin 100 nM konnte gegenüber der unstimulierten Probe eine Induktion um Faktor 41,6 ± 38,7

beobachten werden. Diese liegt damit noch über der, die durch MP alleine erzielt werden konnte. Da beide Inhibitoren in DMSO gelöst wurden, wurden Kontrollen mitgeführt, die den eingesetzten DMSO Konzentrationen entsprachen. Ebenso wurde ausgeschlossen, dass die Inhibitoren ohne MP zu einer Induktion führen (Daten nicht gezeigt).

3.9 Induktion von IL-10 mRNA in primären humanen B-Zellen

Aus 50 ml humanem Blut von gesunden Spendern wurden zunächst PBMC, danach mittels MACS-Separation B-Zellen isoliert. Die isolierten B-Zellen wurden im FACS auf ihre Reinheit überprüft (> 95 % CD 19^+ Zellen), in MonoMac6-Medium + 10 % FCS aufgenommen und für 24 h ohne und mit LPS 1 µg/ml und MP 10^{-6} M stimuliert. Aus den Lysaten wurde die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die relative IL-10 mRNA im LightCycler quantitativ bestimmt. Als interne Kontrolle wurde erneut das Haushaltsgen α-Enolase amplifiziert. Abbildung 31 fasst das Ergebnis von 6 Spendern zusammen.

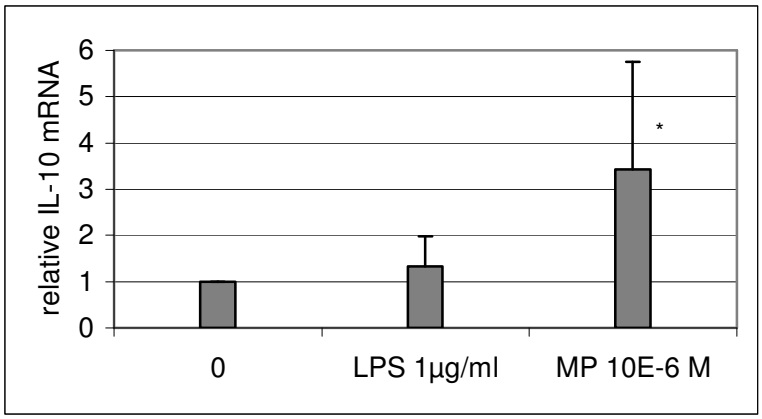

Abbildung 31: Induktion der IL-10 mRNA durch MP in humanen B-Zellen

Primäre humane B-Zellen, die mithilfe der MACS Methode separiert wurden, wurden für 24 h mit LPS 1 µg/ml bzw. MP 10^{-6} M stimuliert. Die mRNA wurde wie im Methodenteil beschrieben isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine quantitative PCR für IL-10 und Enolase durchgeführt. Die Ergebnisse wurden an Enolase angeglichen und relativ zum unstimulierten 0 Stunden Wert (= 1) mit der Basis von 2 berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Experimenten +/- SD. Der mit * gekennzeichnete Wert ist im Vergleich zum unstimulierten Wert mit ($p < 0.05$) signifikant.

Nach 24 h wurde in der mit LPS 1 µg/ml stimulierten Probe 1,3 ± 0,7-fach mehr IL-10 mRNA synthetisiert als in der unstimulierten Probe. In der mit MP 10^{-6} M stimulierten Probe wurde um Faktor 3,4 ± 2,3 mehr IL-10 mRNA produziert als in der unstimulierten Probe. Die IL-10 mRNA lässt sich in primären humanen B-Zellen durch MP induzieren.

3.10 Methylprednisolon transaktiviert nicht jeden Promotor

Um zu zeigen, dass Glukokortikoide nicht jedes transfizierte Konstrukt transaktivieren, wurde das 3xκB.luci Konstrukt als Negativkontrolle transfiziert. Das transfizierte Konstrukt enthält drei hintereinander klonierte Bindestellen für den Transkriptionsfaktor NF-κB. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 32 zusammengefasst.

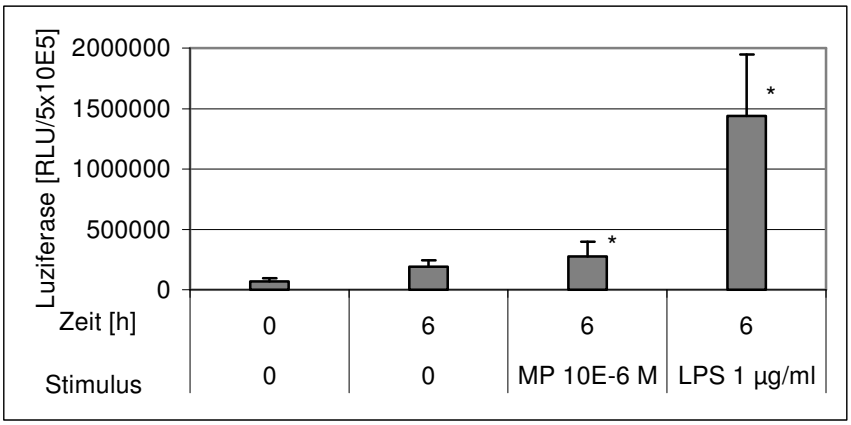

Abbildung 32: Das 3xκB Luziferase Reportergenkonstrukt kann durch Stimulation mit LPS, nicht aber durch MP transaktiviert werden

Das 3xκB Luziferase Reportergenkonstrukt wurde zusammen mit Renilla Luziferase Kontrollvektor in RPMI 8226.1 Zellen transfiziert. Nach 70 Stunden wurden die Zellen mit MP 10^{-6} M und LPS 1 µg/ml für 6 Stunden stimuliert. Die Luziferaseaktivität wurde in RLU gemessen und an Renilla Luziferase angeglichen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Experimenten +/- SD. Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind mit ($p < 0.05$) signifikant.

Durch Glukokortikoide erfolgte nach 6 h nur eine 1,7-fache Transaktivierung des 3xκB.luci Konstrukts. Dabei konnten in der unstimulierten Probe 6678,1 ± 30034,8 RLU/5 x 10^5 Zellen und in der stimulierten Probe 274643,7 ± 120716,4 RLU/5 x 10^5

gemessen werden. Im Gegensatz dazu konnte durch die Stimulation mit LPS 1 µg/ml mit messbaren 1438566,7 ± 508250,8 RLU/5 x 10^5 eine 11-fache Transaktivierung des 3xκB.luci Konstrukts beobachtet werden. Diese Daten zeigen, dass die Transfektion erfolgreich war und dass das Konstrukt durch LPS transaktiviert werden konnte, während die Glukokortikoide keine relevante Aktivität hatten.

3.11 Vergleich der Induktion durch MP und LPS

Sowohl für LPS, als auch wie hier gezeigt, für GC ist Stat3 der entscheidende Transkriptionsfaktor für die Induktion des IL-10 Gens. Daher tauchte die Frage auf, ob beide Stimuli im direkten Vergleich dieselbe Antwort auslösen. Für den Vergleich der von der Zelllinie RPMI 8226.1 produzierten IL-10 Proteinmenge nach Stimulation mit LPS und Methylprednisolon wurden die Zellen für 24 h mit, und ohne MP 10^{-6} M und LPS 1 µg/ml inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellüberstände geerntet und die IL-10 Proteinmenge im ELISA gemessen. Abbildung 33 fasst die Ergebnisse aus fünf Versuchen zusammen.

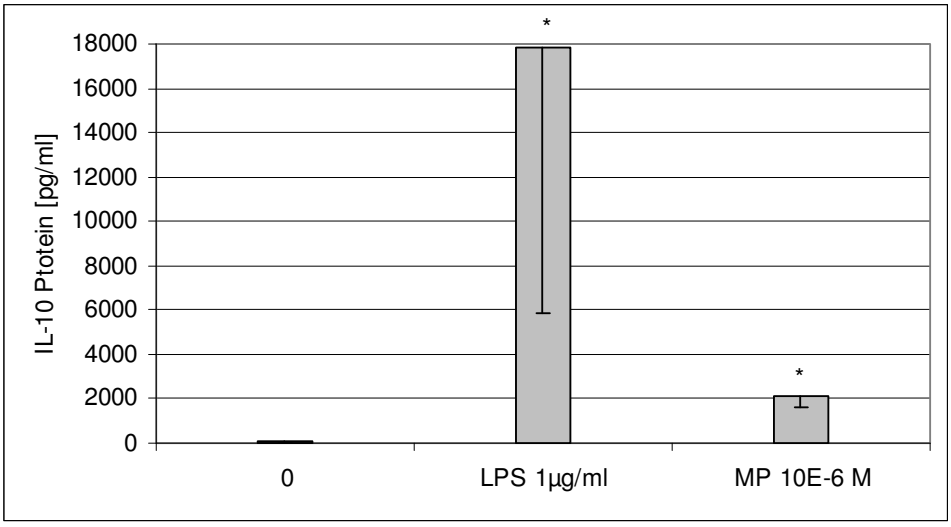

Abbildung 33: Induktion von IL-10 Protein nach Stimulation mit LPS und MP
RPMI 8226.1 Zellen wurden für 24 h mit MP 10^{-6} M und LPS 1 µg/ml stimuliert. Die IL-10 Proteinmenge wurde wie im Methodenteil beschrieben mithilfe eines ELISAs gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert +/- SD aus fünf unabhängigen Versuchen. Zur weiteren Analyse wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt. Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind mit ($p < 0.05$) signifikant.

Nach Stimulation der Zellen mit LPS 1 µg/ml konnten 17791 ± 11939,7 pg/ml IL-10 Protein gemessen werden. Da in der unstimulierten Probe nur 92,8 ± 57,6 pg/ml gemessen werden konnten, entspricht dies einer Steigerung der IL-10 Proteinmenge durch LPS um Faktor 191. Wie schon in Abbildung 7 gezeigt, produzieren mit MP stimulierte Zellen 23-mal mehr IL-10 Protein als unstimulierte. Folglich wird nach Stimulation mit LPS 8-mal so viel IL-10 Protein synthetisiert wie nach Stimulation mit MP.

Um zu überprüfen, ob entsprechend der IL-10 Proteinmenge auch die IL-10 mRNA Transkription in mit LPS stimulierten RPMI 8226.1 Zellen höher ist als in mit MP stimulierten Zellen, wurden diese für 4 h mit und ohne LPS 1 µg/ml und MP 10^{-6} M stimuliert. Abbildung 34 zeigt den Mittelwert aus 4 unabhängigen Experimenten.

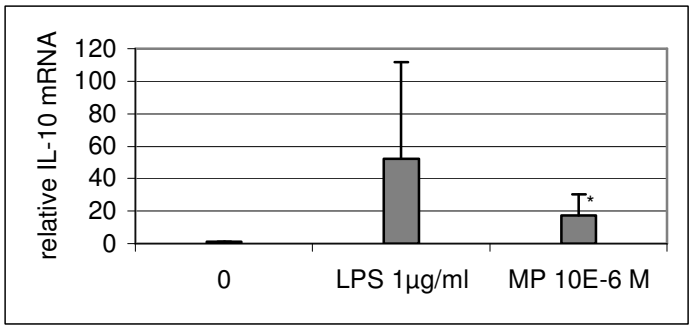

Abbildung 34: Vergleich der Induktion von IL-10 mRNA nach Stimulation mit LPS und MP

RPMI 8226.1 Zellen wurden für 4 Stunden mit LPS 1 µg/ml und MP 10^{-6} M stimuliert. Die mRNA wurde wie im Methodenteil beschrieben isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine quantitative PCR für IL-10 und Enolase durchgeführt. Die Ergebnisse wurden an Enolase angeglichen und relativ zum unstimulierten 0 Stunden Wert (= 1) mit der Basis von 2 berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Experimenten +/- SD. Der mit * markierte Wert ist im Vergleich zum unstimulierten Wert mit ($p < 0.05$) signifikant.

Die Induktion der mRNA durch LPS 1 µg/ml war 52 ± 60-fach, mit MP 10^{-6} M 17 ± 13-fach höher als in der unstimulierten Probe und damit der konstitutiv exprimierten IL-10 mRNA. In der mit LPS 1 µg/ml stimulierten Probe wurde so um Faktor 3 mehr IL-10 mRNA transkribiert als in der mit MP 10^{-6} M stimulierten Probe. Somit ist LPS bezüglich der Induktion von IL-10 mRNA und Protein, dem MP überlegen.

Zuletzt wurde in Transferexperimenten untersucht, ob die Induktion des pIL-10(-1044).luci Promotorkonstrukts durch LPS ebenfalls höher ist als die durch MP, oder ob der beobachtete Effekt durch z. B. eine längere Stabilität der IL-10 mRNA zustande kommen könnte.

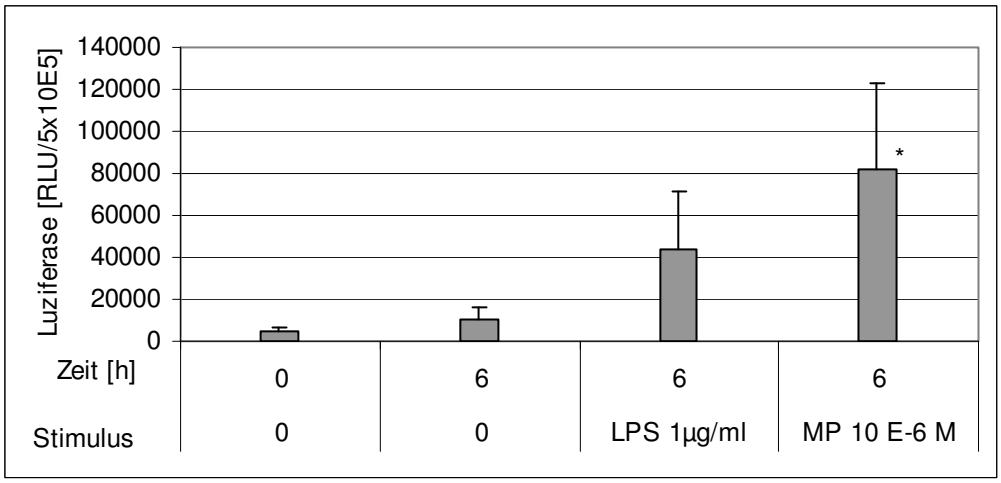

Abbildung 35: Vergleich der Transaktivierung des pIL-10(-1044) Luziferase Reportergenkonstrukts durch LPS und MP.

RPMI 8226.1 Zellen wurden mit dem pIL-10(-195) Luziferase Reportergenkonstrukt und dem Renilla Luziferase Kontrollvektor kotransfiziert. Nach 70 Sunden wurden die Zellen mit $MP10^{-6}$ M und LPS 1 µg/ml für 6 h stimuliert. Die Luziferaseaktivität wurde in RLU gemessen und an Renilla Luziferase angeglichen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Experimenten +/- SD. Das mit * gekennzeichnete Ergebnis ist mit ($p < 0.05$) signifikant.

Nach Stimulation mit LPS 1 µg/ml konnten 43588,7 ± 27535,9 RLU/5 x 10^5 Zellen gemessen werden. In der Unstimulierten Probe waren 4364,8 ± 1899,1 RLU/5 x 10^5 Zellen messbar. Damit konnte eine 6-fache Transaktivierung des Konstrukts durch LPS beobachtet werden. Durch MP konnte eine 12-fache Transaktivierung des pIL-10(-1044).luci Konstrukts nach einer Stimulation für 6 h gezeigt werden (81881,1 ± 40711,3 RLU/5 x 10^5 Zellen). Durch das Glukokortikoid MP konnte das Konstrukt 2-mal stärker transaktiviert werden als durch LPS.

4 Diskussion

4.1 Induktion von IL-10 in der B-Zelllinie RPMI 8226.1

Dass Glukokortikoide IL-10 induzieren können und diese Induktion zu deren anti-inflammatorischen Wirkung beiträgt, ist schon länger bekannt. Bereits 1998 zeigten Gayo et al., dass die Verabreichung von Glukokortikoiden in Multiple Sklerose (MS) Patienten zu einer erhöhten IL-10 mRNA Expression in den PBMC und zu einer erhöhten IL-10 Proteinmenge im Serum der Patienten führt. Diese Ergebnisse konnten sie in *in vitro* Experimenten mit PBMC von Gesunden, in denen sie nach Stimulation mit GCs sowohl eine Induktion der IL-10 mRNA als auch der IL-10 Proteinmenge zeigen konnten, bestätigen (Gayo *et al.* 1998). Dandona et al. beschrieben ebenfalls eine erhöhte IL-10 Proteinmenge im Serum von mit GC behandelten Patienten (Dandona *et al.* 1999). Eine Induktion von IL-10 durch GC konnten John et al. in ihrer Arbeit an Alveolarmakrophagen von Asthma Patienten zeigen, die mit LPS stimuliert wurden (John *et al.* 1998). Daneben konnte in *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass GC zu einer Induktion von IL-10 in Monozyten (Mozo *et al.* 2004) und Makrophagen (Frankenberger *et al.* 2005) führen. Auch in primären T-Zellen (Karagiannidis *et al.* 2004) und T-Zell Kulturen führen GCs zu einer Induktion von IL-10 (Barrat *et al.* 2002; Richards *et al.* 2000). Es gibt jedoch bisher keine Daten, die eine Induktion von IL-10 durch GC in B-Zellen belegen. Ebenso waren die molekularen Mechanismen, die dieser Induktion zugrunde liegen weitestgehend unbekannt.

Für die Untersuchung der Fragestellung, ob Glukokortikoide in B-Zellen das Zytokin IL-10 induzieren können und welche molekularen Mechanismen dieser Induktion zugrunde liegen, wurde in dieser Arbeit die B-Zelllinie RPMI 8226.1 als Modellsystem verwendet. Für die Verwendung dieser B-Zelllinie als Modellsystem spricht, dass diese bereits in früheren Arbeiten zur Untersuchung des IL-10 Promotors verwendet wurde. So konnte eine Induktion von IL-10 durch LPS (Benkhart *et al.* 2000; Ziegler-Heitbrock *et al.* 1994) und IFN-α (Ziegler-Heitbrock *et al.* 2003) in dieser Zelllinie gezeigt werden. Daneben zählen eine hohe Wachstumsrate, eine leichte Handhabung und eine schnelle Verfügbarkeit zu den Vorteilen dieser

Zelllinie. Gegen die Verwendung einer Zelllinie als Modellsystem spricht im Allgemeinen, dass ihr Genom von dem von primären Zellen abweichen kann. Deshalb ist es wichtig, die erhaltenen Ergebnisse in primären Zellen zu bestätigen.
IL-10, das von B-Zellen produziert wird, übt aber auch starke Effekte auf diese aus. Es induziert die Proliferation und Differenzierung von aktivierten humanen B-Zellen, aber auch die Apoptose von leukämischen B-Zellen. Daher scheint die Untersuchung seiner Regulation in dieser Zellart besonders interessant. Grundsätzlich wären die Untersuchungen jedoch auch in einer anderen Zellpopulation möglich gewesen. Von großem Interesse wäre es zu untersuchen, ob die in der Arbeit gemachten Beobachtungen zum Regulationsmechanismus auch auf andere Zellarten übertragbar sind.
Als Glukokortikoid wurde das synthetisch hergestellte 6α-Methylprednisolon verwendet, das problemlos über mehrere Monate gelagert werden kann.
In der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass IL-10 in der B-Zelllinie RPMI 8226.1 durch 6α-Methylprednisolon (MP) induzierbar ist. Nach Stimulation der Zellen mit MP 10^{-6} M für 24 h konnte mithilfe einer ELISA Analyse eine 23-fache Steigerung der IL-10 Proteinmenge im Überstand der Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen gemessen werden. Eine Induktion der IL-10 Proteinmenge durch GC konnten auch Gayo et al. in ihren Experimenten bestätigen. Sie beobachteten in PBMC nach Stimulation mit MP 10^{-6} M einen 1,2-fachen Anstieg und nach Stimulation mit MP 10^{-5} M einen 1,7-fachen Anstieg der IL-10 Proteinmenge (Gayo *et al.* 1998). Auch Mozo et al. beschrieben in Monozyten eine 8-fache Induktion der IL-10 Proteinmenge nach Inkubation dieser mit Dexamethason (Dex) 10^{-6} M für 12 h. Die Glukokortikoide Deflazacort und Cortison (Hydrocortison) führten in ihrer Studie ebenfalls zu einer Induktion der IL-10 Proteinmenge (Mozo *et al.* 2004). Die Untersuchungen beider Arbeitsgruppen stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. Das abweichende Induktionsniveau ist vermutlich auf die angewendeten Zellen und Bedingungen zurückzuführen. Abweichend von unseren Ergebnissen, konnten Mozo et al. jedoch keine Veränderung der IL-10 Proteinmenge in B- und T-Zellen feststellen (Mozo *et al.* 2004).
Um den molekularen Mechanismen der beobachteten Induktion der IL-10 Proteinmenge näher zu kommen, wurde im Anschluss untersucht, ob neben der Induktion

der Proteinmenge auch eine Induktion der IL-10 mRNA Menge zu beobachten ist. Ist dies nicht der Fall, wäre dies ein Hinweis darauf, dass die Regulation ausschließlich post-transkriptionell erfolgt. Es konnte aber ein Anstieg der IL-10 mRNA nach Stimulation mit MP beobachtet werden. Dieses Ergebnis spricht für einen Regulationsmechanismus auf Ebene der Transkription. In der durchgeführten Zeitkinetik war die Induktion durch MP 10^{-6} M nach 2 und 4 h am höchsten. Aufgrund der hohen Standardabweichung war diese im Mittel 15,5-fache Steigerung jedoch nicht signifikant. Es wären weitere Experimente notwendig um die Signifikanz der Induktion zu sichern. Darauf wurde jedoch verzichtet, da für die weiteren Experimente zur Analyse der molekularen Mechanismen der IL-10 Induktion durch GC nur bedeutend ist, dass die IL-10 mRNA nach Stimulation mit MP deutlich ansteigt und dass dies in einem Zeitrahmen von 2 bis 4 h gut nachweisbar ist. Eine Induktion der IL-10 mRNA ist auch nach Stimulation der Zellen mit geringeren MP Konzentrationen (MP 10^{-7} M und 10^{-8} M) zu sehen. Die Induktion mit MP 10^{-6} M führte jedoch mit Faktor 17,4 zur höchsten Induktion unter den eingesetzten Konzentrationen. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Effekt für MP spezifisch ist, da mit abnehmender MP Konzentration auch eine Abnahme der IL-10 mRNA beobachtet werden konnte. Der Anstieg der IL-10 mRNA nach Stimulation mit Glukokortikoiden wird durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt. Gayo et al. beschrieben in PBMC einen Anstieg der IL-10 mRNA Menge um Faktor 2,5 nach Stimulation mit MP 10^{-6} M und um Faktor 3,2 nach Stimulation mit MP 10^{-5} M für 48 h (Gayo *et al.* 1998). Eine Vorinkubation von Monozyten mit Dex 10^{-6} M führte auch in den Untersuchungen von Mozo et al. zu einer um Faktor 4,2 erhöhten IL-10 mRNA Menge (Mozo *et al.* 2004).

Da das verwendete MP in EtOH gelöst ist, wurde durch die Stimulation der Zellen mit EtOH 0,01 %, welche der EtOH Konzentration im Stimulationsansatz mit MP 10^{-6} M entspricht, ausgeschlossen, dass die Induktion von IL-10 Protein und mRNA auf EtOH und nicht auf MP zurückzuführen ist. Das Ergebnis spricht eindeutig für eine Induktion durch MP.

In der Literatur existieren zahlreiche Beispiele, in denen die Induktion von Genen nicht auf den jeweils eingesetzten Stimulus, sondern auf eine Kontamination mit LPS zurückzuführen war. Gao et al. beschrieben z. B., dass die Induktion von TNF in

Makrophagen und Monozyten nicht wie ursprünglich beobachtet durch das humane Heat Shock Protein 70 (rhHsp70) verursacht wurde, sondern durch LPS, mit dem dieses kontaminiert war (Gao and Tsan 2003). Um für das in dieser Arbeit verwendete System auszuschließen, dass das verwendete MP mit LPS, das nachweislich zu einer Induktion von IL-10 mRNA und Protein führt (Benkhart *et al.* 2000; Gayo *et al.* 1998), verunreinigt ist, wurde der LPS Neutralisator Polymyxin B (PMB) in der Stimulation eingesetzt. Unsere Daten zeigen deutlich, dass PMB ein wirksamer Neutralisator von LPS ist, allein jedoch zu keiner Induktion von IL-10 führt. Die Stimulation der Zellen mit PMB und MP 10^{-6} M zeigt eine ähnlich hohe Induktion wie die durch MP 10^{-6} M allein. Diese Ergebnisse sprechen eindeutig dafür, dass die Induktion allein auf MP zurückzuführen ist.

4.2 Induktion des IL-10 Promotors

Der von uns beobachtete Anstieg der mRNA Menge kann mehrere Ursachen haben. Zum einen könnte er Ergebnis einer erhöhten Transkription, zum anderen auf post-transkriptionelle Mechanismen, wie z. B. die Regulation der mRNA Stabilität, zurückzuführen sein. Die Regulation der Stabilität einer mRNA erfolgt meist über deren 3`UTR (untranslated region). Powell et al. beschrieben in ihrer Studie drei potenzielle, die mRNA destabilisierende Motive im 3`UTR des Maus IL-10 Promotors. Diese werden durch Induktion mit PMA stabilisiert. Dies führt zu einer gesteigerten mRNA und Proteinmenge (Powell *et al.* 2000). Zu einer erhöhten Transkription eines Gens kommt es durch eine erhöhte Initiation, also der Interaktion der Polymerase mit dem Promotor. Dabei spielen Transkriptionsfaktoren wie z. B. NF-κB, C/EBP und Stat eine große Rolle, die selbst an die DNA binden und die Bindung der Polymerase an den Promotor vermitteln oder erleichtern. Pro-inflammatorische Signale, wie z. B. TNF und IL-1, führen zu einer Aktivierung von NF-κB, das an seine Zielsequenz im Promotor bindet und die Transkription der pro-inflammatorischen Gene IL-8 und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) induziert (De Bosscher *et al.* 2003). Eine Beteiligung von NF-κB an der Transkriptionsregulation von IL-10 ist jedoch unwahrscheinlich. Dagegen sprechen die Untersuchungen von Bondeson et al., in denen eine Überexpression von adenoviralem I-κBα keinen Einfluss auf die IL-10 Genexpression hat (Bondeson *et al.* 1999).

1999). Auch wurden potenzielle NF-κB Bindestellen nach einer MatInspector Professional™-Analyse als Bindemotive zurückgewiesen. In unveröffentlichten Co-Transfektionsexperimenten führten p50 und p65 zu keiner Transaktivierung des IL-10 Gens (Benkhart *et al.* 2000). Bekannt ist jedoch, dass viele Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormonrezeptoren über Stat Proteine die Transkription pro-inflammatorischer Gene induzieren (Hanada and Yoshimura 2002).

Durch die Transfektion von IL-10 Reportergenkonstrukten wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Induktion von IL-10 durch Glukokortikoide auf Transkriptionsebene über den IL-10 Promotor erfolgt. Zahlreiche Arbeiten, die die Beteiligung der Transkriptionsfaktoren SP1 und SP3 (Ma *et al.* 2001; Tone *et al.* 2000), C/EBP (Brenner *et al.* 2003), Stat3 (Benkhart *et al.* 2000; Herbeuval *et al.* 2004; Ziegler-Heitbrock *et al.* 2003), c-Maf (Cao *et al.* 2005), IRF-1 (Ziegler-Heitbrock *et al.* 2003) und IRAK1 (Huang *et al.* 2004) an der Induktion von IL-10 beschreiben, legen einen solchen Regulationsmechanismus nahe. Das für diesen Zweck in die Zellen transfizierte 1044 bp lange Reportergenkonstrukt enthält Bindemotive für die Transkriptionsfaktoren SP1 bei -601, GRE bei -316, IRF bei -181 und Stat bei -120 bp vom Transkriptionsstart (Benkhart *et al.* 2000; Kube *et al.* 1995; Ma *et al.* 2001). Nach Stimulation mit MP 10^{-6} M für 6 h konnte eine 18,5-fache Transaktivierung des Konstruktes beobachtet werden. Diese Daten sprechen für eine deutliche und schnelle Induktion des IL-10 Promotors durch MP. Dass diese für das GC spezifisch ist, belegt die Abnahme der Transaktivierung mit sinkender MP Konzentration. Das Ergebnis spricht dafür, dass die Regulation der Induktion von IL-10 durch Glukokortikoide weitestgehend transkriptionell erfolgt.

4.3 Analyse des IL-10 Promotors

Um den Mechanismus, über den Glukokortikoide IL-10 induzieren genauer untersuchen zu können, wurden die Zellen mit unterschiedlich langen IL-10 Reportergenkonstrukten transfiziert. Dabei sollten die an der Induktion von IL-10 beteiligten Transkriptionsfaktoren identifiziert werden.

Die Zellen wurden mit einem 195 bp langen Konstrukt, das nur noch die Bindestellen für IRF und Stat, nicht aber die für SP1 und GRE enthält, transfiziert. Das Ergebnis einer 8,8-fachen Transaktivierung des IL-10 Promotors durch GC im

Vergleich zu unstimulierten Zellen legt nahe, dass die Bindemotive SP1 und GRE für die Induktion nicht essenziell sind. Auch Benkhart et al. zeigten nach Verwendung der gleichen Deletionsserie in derselben B-Zelllinie, dass SP1 nicht an der Induktion von IL-10 durch LPS beteiligt ist (Benkhart *et al.* 2000). Dennoch wurden die Transkriptionsfaktoren SP1 und SP3 im murinen IL-10 Promotor als wichtige Transkriptionsfaktoren der IL-10 Genexpression identifiziert (Brightbill *et al.* 2000; Tone *et al.* 2000). Ma et al. beschrieben bei -636 bp vom Transkriptionsstart ein SP1 Bindemotiv, das für die Induktion von IL-10 in der Zelllinie THP-1 durch LPS wichtig ist (Ma *et al.* 2001). Dass das GRE nicht essenziell an der Induktion beteiligt ist, spricht gegen eine ausschließlich klassische Regulation der Transkription durch Glukokortikoide, die über die Bindung des Glukokortikoid-Glukokortikoidrezeptor Komplexes an das palindromische GRE Sequenzmotiv erfolgt. In der Literatur werden aber auch indirekte Wirkungsweisen von Glukokortikoiden, wie z. B. durch die Bindung des GC-GR Komplexes an weitere Transkriptionsfaktoren, wie NF-κB, (Nissen and Yamamoto 2000) und dadurch an andere Sequenzmotive in der DNA oder durch die Beeinflussung anderer Signaltransduktionswege (Kassel *et al.* 2001; Takeda *et al.* 1998) beschrieben. Da die Transaktivierung des 1044 bp langen Konstruktes stärker ist als die des verkürzten 195 bp langen Konstruktes, kann es durchaus sein, dass SP1 und GRE an einer Verstärkung der Transkription beteiligt sind. Nach unseren Daten ist dies aber nur ein Faktor 2 Effekt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass weitere Faktoren an der Regulation des IL-10 Promotors durch GC beteiligt sein müssen.

Ziegler-Heitbrock et al. zeigten im Jahr 2003 die Beteiligung der Transkriptionsfaktoren IRF und Stat3 an der Induktion von IL-10 durch IFN-α, wobei das Stat3 Bindemotiv für die Transaktivierung des Promotors ihren Daten zur Folge essenziell ist (Ziegler-Heitbrock *et al.* 2003). Um zu überprüfen, ob die Motive für die Induktion von IL-10 durch Glukokortikoide wichtig sind, wurden RPMI 8226.1 Zellen mit 195 bp langen Konstrukten transfiziert, die Mutationen im IRF Motiv, bzw. im Stat3 Motiv, oder in beiden enthalten. Nach Transfektion des Konstrukts mit der IRF Mutante konnte eine 14-fache Transaktivierung durch MP 10^{-6} M erzielt werden. Diese liegt über der mit dem Wildtyp Konstrukt erzielten 8,8-fachen Transaktivierung. Dieser Unterschied in der Transaktivierung kann auf experimentelle

Schwankungen (die Induzierbarkeit des Konstrukts oder der Zellpassage) zurückgeführt werden. Obwohl alle Konstrukte parallel am gleichen Tag transfiziert wurden und als Kontrolle immer ein Plasmid mit einer Luziferase aus einer anderen Spezies (Renilla Luziferase) mittransfiziert wurde, kann es sein, dass die Zellen unterschiedlich stark auf das GC reagieren. Das Ergebnis lässt darauf schließen, dass das IRF Bindemotiv nicht an der Transaktivierung des IL-10 Promotors durch Glukokortikoide beteiligt ist. Auch für die durch LPS induzierte IL-10 Genexpression ist das IRF Bindemotiv, obwohl die Bindung von IRF an das Motiv erfolgt, nicht essenziell (Ziegler-Heitbrock *et al.* 2003). Doch ähnlich wie bei der durch IFN-α induzierten IL-10 Genexpression scheint auch bei der durch GC induzierten Transaktivierung das Stat3 Bindemotiv eine wichtige Rolle zu spielen. Nach Transfektion der Stat Mutante konnte nur noch eine 2,5-fache Transaktivierung des IL-10 Promotors durch GC gemessen werden. Auch in der Doppelmutante war das Expressionsniveau mit einer 5-fachen Steigerung der Genexpression nach Stimulation durch GC niedriger als im Wildtyp Konstrukt.

Dass Stat3 eine wichtige Rolle in der Genexpression von IL-10 spielt, bestätigen bereits Daten anderer Arbeitsgruppen, die in anderen Zelltypen oder Stat3 Knockout-Mäusen generiert wurden. Herbeuval et al. zeigten in ihrer Arbeit eine durch Stat3 vermittelte Induktion von IL-10 in Darmkrebszellen (Herbeuval *et al.* 2004). Auch Cheng et al., die in PEM (peritoneal gewonnenen Makrophagen), aus LysMcre/Stat3$^{flox/-}$ Mäusen, die kein Stat3 exprimieren - anders als in Wildtyp Mäusen - nach Stimulation mit LPS kein IL-10 nachweisen konnten, postulierten eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors Stat3 an der IL-10 Genexpression (Cheng *et al.* 2003). Ebenfalls bestätigten Maritano et al. eine Beteiligung der Stat3β Isoform an der Induktion von IL-10 durch LPS (Maritano *et al.* 2004). Kasprzycka et al. zeigten in T-Zelllinien eine Blockade der IL-10 Expression nach Depletion von Stat3 durch die entsprechende siRNA (Kasprzycka *et al.* 2006). T-Zellen aus der Maus, die kein SOCS 3 exprimieren, besitzen nach Stimulation mit LPS eine erhöhte Stat3 Aktivität und produzieren mehr IL-10 (Kinjyo *et al.* 2006).

Aufgrund dieser Ergebnisse, die alle auf eine Beteiligung von Stat3 an der IL-10 Genexpression hinweisen, wurde ein 150 bp langes Promotorkonstrukt in die B-Zelllinie transfiziert, das nur noch das Stat3 Bindemotiv enthält. Die Annahme, dass

dieses noch induzierbar sein müsste, bestätigte sich durch eine 2,7-fache Induktion des Promotors bei einer hohen Expression mit 3591,5 ± 2068,8 RLU/5 x 10^5 Zellen. Die Daten zeigen einerseits, dass dieses Konstrukt, wie erwartet, immer noch durch Glukokortikoide induzierbar ist, andererseits geht die Transaktivierung von 8,8-fach im Vergleich zum 195 bp langen Konstrukt auf 2,7-fach zurück. Diese Beobachtung legt nahe, dass in dem Promotorstück zwischen -195 bp und -150 bp vom Transkriptionsstart ein weiteres an der Transkriptionsregulation durch Glukokortikoide beteiligtes Sequenzmotiv liegen könnte. Dieser Sequenzbereich wurde in dieser Arbeit aber nicht genauer untersucht, da das 150 bp lange Promotorkonstrukt im Rahmen der Linkerscanningserie erneut transfiziert wurde und eine 7,7-fache Induktion beobachtet werden konnte. Diese entspricht dem Expressionsniveau des 195 bp langen Konstrukts und schwächt somit die Vermutung weiterer wichtiger Sequenzmotive in dem Bereich ab. Als Ursache können daher erneut experimentelle Schwankungen, wie z. B. eine von der Zellpassage abhängige Induzierbarkeit der Zellen, angenommen werden. An dieser Stelle hätte ein Vergleich der Induktion durch LPS als Kontrolle Aufschluss über die Vergleichbarkeit der Induktion der Zellen in beiden Experimenten gegeben. Um aber mögliche Bindemotive in diesem Bereich zu identifizieren bzw. auszuschließen, wäre eine funktionelle Analyse dieses Bereiches durch eine Linkerscanningserie nötig.

Da das 150 bp Konstrukt durch GC immer noch induzierbar ist, wurden Promotorkonstrukte transfiziert, die eine 10 bp lange Linkersequenz an unterschiedlichen Stellen im 150 bp langen IL-10 Promotorkonstrukt enthalten. Wichtig ist dabei, dass die Sequenz des Linkers neutral ist, also keine Proteinbindestelle enthält oder durch seine Implementierung in die Sequenz generiert. Durch die Verschiebung des Linkers innerhalb des Konstrukts werden eventuell vorhandene Bindemotive für Transkriptionsfaktoren zerstört. Ist dies der Fall, bleibt die Transaktivierung des Konstrukts durch Glukokortikoide aus. Auf diese Weise sollten weitere Motive entdeckt werden, die möglicherweise neben Stat3 an der Transkription beteiligt sind. Die Linkerscanningserie wurde bereits von Benkhart et al. für die Analyse des IL-10 Promotors in der B-Zelllinie RPMI 8226.1 verwendet. In der damaligen Studie konnte Stat3 als essenzieller Transkriptionsfaktor für die Regulation von IL-10 durch LPS identifiziert werden, da die IL-10 Promotoraktivität nach Transfektion des LS4

Konstrukts, das die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor enthält, im Vergleich zu den anderen Konstrukten deutlich zurückging (Benkhart *et al.* 2000). Nach Stimulation mit GC konnte ebenfalls ein deutlicher Rückgang der Promotoraktivität von Faktor 7,7 im wt Konstrukt auf Faktor 2,2 im LS4 Konstrukt beobachtet werden. Weitere cis-Elemente, die an der Aktivierung von IL-10 durch GC beteiligt sein könnten, wurden nicht gefunden. Mit diesem Experiment konnte nochmals eindeutig gezeigt werden, dass ein Stat Element an der Induktion von IL-10 durch Glukokortikoide, wie auch an der Induktion durch LPS und IFN-α beteiligt ist (Benkhart *et al.* 2000; Ziegler-Heitbrock *et al.* 2003). Die Transfektion eines Plasmids, welches drei hintereinander klonierte Stat3 Bindemotive enthält, bestätigt durch seine um Faktor 28,8-fache Transaktivierung nach Stimulation mit MP 10^{-6} M nochmals die Bedeutung des Stat Bindemotivs.

Eine Transfektion der Linkerscanningserie in andere Zelllinien wäre an dieser Stelle interessant, da je nach Gewebeart und Differenzierungsgrad der Zellen unterschiedliche Transkriptionsfaktoren für die Genregulation notwendig sein können.

Um zu zeigen, dass Glukokortikoide nicht jedes beliebige transfizierte Konstrukt transaktivieren, wurde in dieser Arbeit das 3xκB.luci Konstrukt transfiziert. Da der GRα die Aktivierung der Transkription durch den Transkriptionsfaktor NF-κB inhibiert (Smoak and Cidlowski 2004), wurde keine Transaktivierung des Konstruktes erwartet. Das Konstrukt war wie erwartet nur durch LPS induzierbar, nicht aber durch MP. Aufgrund dieses Ergebnisses kann davon ausgegangen werden, dass die in der Arbeit gezeigten Induktionen spezifisch für die jeweils getesteten Konstrukte sind.

4.4 Analyse der Bindung von Stat3 an die DNA in der LS4 Sequenz

4.4.1 Gelshift- und Supershiftanalysen

Um die Bindung von Stat3 an die LS4 nachzuweisen, wurden Gelshift Analysen durchgeführt. Neben der Bindung des Proteins an die Sequenz konnte auch eine Induktion der Bindung nach Stimulation mit MP 10^{-6} M und LPS 1 µg/ml gezeigt werden. Die Bindung des Stat3 Proteins an die LS4 Sequenz war nach Stimulation durch MP 10^{-6} M nach 2 h, und nach Stimulation mit LPS 1 µg/ml nach 4 h am

höchsten. Diese zeitliche Diskrepanz deutet auf einen unterschiedlichen Regulationsmechanismus, der zur Bindung von Stat3 an die DNA führt, hin. Ein Vergleich der Bandenintensität lässt vermuten, dass MP ein besserer Induktor von Stat3 ist als LPS.

In der anschließend durchgeführten Supershiftanalyse konnte mithilfe eines Antikörpers gegen Stat3 nochmals bestätigt werden, dass es sich um Stat3 handelt, das an die LS4 Sequenz im IL-10 Promotor bindet. Durch die Bindung des Antikörpers an den Transkriptionsfaktor verschiebt sich die Bande im Gel nach oben. Auch Benkhart et al. konnten die Bindung von Stat3 an die LS4 Sequenz nach Stimulation mit LPS nachweisen (Benkhart *et al.* 2000). Die Tatsache, dass die Bindung des Proteins an die DNA erst nach 2 h nachweisbar ist, lässt vermuten, dass zwischen der Stimulation und dem Binden von Stat3 an die DNA viele Zwischenschritte notwendig sind.

Der in dieser Arbeit verwendete anti-Stat3 Antikörper ist laut des Herstellers Santa Cruz Biotechnology, Inc. für Stat3 spezifisch und reagiert nicht mit Stat1α p91, Stat1β p84, Stat2 p113, Stat3β, Stat4, Stat5 oder Stat6. Im Rahmen eines in dieser Arbeit nicht gezeigten Experiments wurde nachgewiesen, dass die Bande nur mit diesem Antikörper, nicht aber mit Antikörpern gegen Stat1-2 und 4-6 verschoben werden kann. Zudem wird dieser Antikörper von mehreren Arbeitsgruppen für unterschiedliche Anwendungen wie z. B. für ChIP verwendet (Barre *et al.* 2005; Giraud *et al.* 2004; Yu *et al.* 2002).

Die Tatsache, dass die Verwendung der Antikörper gegen Stat1-2 und 4-6 zu keiner Verschiebung der Bande im Gel führen, zeigt, dass es sich wahrscheinlich um ein Stat3 Homodimer und nicht wie Decker et al. für den c-fos-Promotor nach Stimulation mit PDGF- und EGF beschrieben um ein Heterodimer aus Stat1 und Stat3 (Decker *et al.* 1997), handelt.

4.4.2 Chromatin-Immunpräzipitationsanalysen

Vorteil der ChIP Methode ist, dass Bindungen von Proteinen an die genomische Kern-DNA *in vivo*, ohne die Zugabe von künstlichen Oligos wie bei EMSA Experimenten, nachgewiesen werden können. Auch mithilfe dieser Methode konnte die Bindung von Stat3 an die LS4 Sequenz im IL-10 Promotor gezeigt werden. Daneben

konnte durch Stimulation mit MP eine 3-fache Induktion der Bindung von Stat3 an die DNA in der LS4 Sequenz beobachtet werden. Das Ergebnis konnte ebenfalls auf einem Agarosegel visualisiert werden. Mithilfe eines densitometrischen Auswertungsprogrammes war auch auf dem Gel eine Induktion um Faktor 3 zu beobachten. Für den Nachweis der Bindung des Proteins in der LS4 Sequenz wurden Primer verwendet, die eine 80 bp lange, das LS4 Motiv umschließende Sequenz amplifizieren. Um die Reinheit der präzipitierten DNA-Fragmente zu überprüfen, wurde zusätzlich das Myoglobin Gen amplifiziert. Die % Recovery dieses Gens lag um Faktor 10 unter der von IL-10 und zeigte damit eindeutig, dass die Präzipitation für die LS4 Sequenz spezifisch ist. Als Positivkontrolle wurde in der Immunpräzipitation ein anti-TATA Box binding Protein (TBP) Antikörper eingesetzt. Die Bindung des TBP an die DNA wurde anschließend im H2B Promotor nachgewiesen. Kasprzycka et al. gelang es ebenfalls mithilfe der ChIP Methode eine vermehrte Bindung von Stat3 im IL-10 Promotor von IL-10 produzierenden T-Zellen im Gegensatz zu T-Zellen, die kein IL-10 exprimieren nachzuweisen (Kasprzycka *et al.* 2006).

Zusammenfassend weisen sowohl die Ergebnisse der Gelshift Analyse, als auch die der Supershift und ChIP Analyse auf die Beteiligung des Transkriptionsfaktors Stat3 an der Induktion von IL-10 durch Glukokortikoide hin.

Trotz all dieser eindeutigen Ergebnisse sollte bedacht werden, dass es noch weitere wichtige Elemente geben kann, die ebenfalls beteiligt sind, jedoch mit den in dieser Arbeit angewendeten Methoden nicht entdeckt werden konnten.

4.5 Nachweis der Beteiligung des Glukokortikoidrezeptors an der Induktion von IL-10 durch GC

Wenn Stat3 nach Induktion durch GC direkt an die DNA bindet, stellt sich die Frage, wie diese Bindung durch GCs vermittelt wird. Mittlerweile sind mehrere Wirkungsmechanismen von GC bekannt. Der klassische Wirkungsmechanismus umfasst die Bindung des GC an den Glukokortikoidrezeptor, der im Zytoplasma oder im Zellkern der Zelle vorliegt und durch Bindung an die DNA oder über Protein-Protein Wechselwirkungen die Transkription eines Gens induziert (Smoak and Cidlowski 2004). Des weiteren werden in der Literatur sogenannte nicht-genomische

Wirkungsweisen von Glukokortikoiden beschrieben, bei denen die GC über membrangebundene Oberflächenrezeptoren wirken (Cato *et al.* 2002). Gametchu et al. identifizierten einen membranassoziierten GR in S-49 Lymphom Zellen (Gametchu *et al.* 1991). Li et al. zeigten in PC12 Zellen, dass Corticosteron über die Bindung an einen putativen Oberflächenrezeptor unter Beteiligung der Protein Kinase C (PKC) p38 und cJun NH_2-terminale Proteinkinase (JNK) aktivieren können. Daneben zeigten sie, dass Corticosteron auch zu einer Aktivierung der Erk1/2 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) führt. Ebenfalls scheinen ein putativer Oberflächenrezeptor und die PKC an dieser Aktivierung beteiligt zu sein. Dass die beobachtete Aktivierung vom GR unabhängig verläuft, zeigten sie durch die Zugabe des GR Antagonisten RU-486 (Li *et al.* 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen jedoch für eine Beteiligung des GR an der Regulation von IL-10 durch Glukokortikoide und damit für einen klassischen Regulationsweg. Der Inhibitor RU-486 inhibierte in den durchgeführten Experimenten eindeutig die Induktion von IL-10 in der Zelllinie RPMI 8226.1. Auch war das 195 bp lange Promotorkonstrukt nach Zugabe des Inhibitors nicht mehr durch MP induzierbar. Mozo et al. bestätigten in ihren Experimenten in Monozyten ebenfalls eine Beteiligung des GR an der Induktion von IL-10 nach Stimulation mit GC (Mozo *et al.* 2004).

Nun stellt sich die Frage, wie der GR seine Wirkung unter Beteiligung von Stat3 entfaltet.

Ein für dieses System in Frage kommender Regulationsweg wäre, dass der GR direkt mit Stat3 interagiert und dessen Bindung an die DNA positiv beeinflusst. Eine Interaktion zwischen dem GR und Stat3 wurde für die Regulation der Gene Fibrinogen und α2 Macroglobulin beschrieben (Duan and Simpson-Haidaris 2006; Lerner *et al.* 2003; Takeda *et al.* 1998). In allen Arbeiten zeigen GCs alleine jedoch eine geringe Wirkung auf die Genexpression. Ihre Wirkung entfalten sie erst durch einen synergistischen Effekt mit IL-6. Dieser Effekt beruht auf den Wechselwirkungen zwischen dem GR und dem durch IL-6 induzierten Stat3 (Lerner *et al.* 2003). Dieser Mechanismus passt aber nicht in das System dieser Arbeit, da gezeigt werden konnte, dass GCs die Bindung von Stat3 an die DNA ohne Kostimulus induzieren. Möglich wäre jedoch, dass die Bindung des GRs an Stat3 dessen Bindung an die

Bindung an die DNA und Verbleib im Nukleus stabilisiert. Dies würde bedeuten, dass Stat3 durch die Bindung des GRs nicht mehr zwischen Zytoplasma und Kern hin und her transportiert wird, sondern im Kern verbleibt. Leider konnten die in dieser Arbeit durchgeführten ChIP Experimente keine Bindung zwischen Stat3 und dem GR nachweisen. Dies könnte aber auf die verwendeten ChIP Bedingungen und den Antikörper zurückzuführen sein. Außerdem wurde im ChIP Experiment nur ein kleiner Teil, nämlich der die LS4 Sequenz umfassende Abschnitt von 80 bp des IL-10 Promotors, untersucht. Möglich wäre auch, dass der GR an einer anderen Stelle bindet und mit Stat3 über die Bildung eines Enhancosoms interagiert. An dieser Stelle wären weitere Experimente notwendig, um eine Bindung von Stat3 und des GR auf Chromatinebene zu bestätigen oder endgültig abzuweisen.

Eine weitere mögliche Erklärung der Beeinflussung der Bindung von Stat3 an die DNA durch den GR wäre, dass dieser zu einer vermehrten Phosphorylierung des Tyrosinrests am Stat3 führt. Die Phosphorylierung des Tyrosinrests am Stat3 Molekül ist für dessen Dimerisierung und Translokation in den Nukleus von großer Bedeutung. Dadurch könnten Stat3 Homodimere vermehrt in den Nukleus wandern. Die durchgeführte Western Blot Analyse zeigte sowohl in der unstimulierten als auch in der stimulierten Probe eine schwache Phosphorylierung des Serinrests und eine stärkere Phosphorylierung des Tyrosinrests. Dabei zeigt das Ergebnis eindeutig, dass die Stimulation mit GC zu keiner Änderung des Phosphorylierungsmusters von Stat3 führt. Im Gegensatz zu diesen Daten konnten Benkhart et al. eine vermehrte Phosphorylierung des Tyrosin- und des Serinrests am Stat3 Protein nach Stimulation mit LPS beobachten (Benkhart *et al.* 2000). Welche Funktion die Phosphorylierung des Serinrests

hat, ist noch umstritten und könnte von Promotor zu Promotor variieren (Decker and Kovarik 2000). Neuere Daten weisen darauf hin, dass Stat3 auch im unphosphorylierten Zustand aktiv sein kann. Yang et al. zeigten, dass die Expression von Y705F Stat3 eine Reihe von Genen wie den epidermalen Wachstumsfaktor-rezeptor, die Rantes Chemokine und IL-6 induzieren kann (Yang *et al.* 2005). Eine Transaktivierung durch unphosphoryliertes Stat3 erfolgt wahrscheinlich über eine Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren wie z. B. p65, einer Untereinheit von NF-κB (Yoshida *et al.* 2004). Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für das durch

GC aktivierte Stat3 denkbar. Trotz geringer Phosphorylierung des Tyrosinrests erfolgt die Translokation in den Kern. Denkbar wäre zusätzlich, eine Blockade des Shuttle Mechanismus zwischen Kern und Zytoplasma.
Eine nicht genomische Wirkung von GCs über den GR wurde für den PI3 Kinase Weg gezeigt. Dabei aktiviert der GR das Nitric Oxide Synthase Gen (eNOS) über die Aktivierung der PI3-Kinase und der nachfolgenden Proteinkinase Akt (Hafezi-Moghadam *et al.* 2002). Um zu untersuchen, ob die Induktion von IL-10 ähnlich wie bei eNOS über den PI3 Kinase Weg vermittelt wird, wurden die PI3 Kinase Inhibitoren Ly 294,002 und Wortmannin eingesetzt. Die Inhibitoren zeigten in den eingesetzten Konzentrationen jedoch keine Inhibierung der durch MP vermittelten mRNA Induktion. Es wurden aber keine weiteren Konzentrationen der Inhibitoren getestet. Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch DMSO, in dem beide Inhibitoren gelöst sind, wurde ebenfalls ausgeschlossen.

4.6 Induktion von IL-10 mRNA in primären humanen B-Zellen

Wie bereits zu Anfang erwähnt konnte, eine Induktion von IL-10 durch GC bereits in Monozyten (Mozo *et al.* 2004), in Makrophagen (Frankenberger *et al.* 2005) und in T-Zellen (Barrat *et al.* 2002; Richards *et al.* 2000) gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte nun zum ersten Mal eine Induktion von IL-10 durch GC in einer B-Zelllinie nachgewiesen werden. Da das Genom von Zelllinien von dem von primären Zellen abweichen kann, war es für diese Arbeit unerlässlich, die beobachtete Induktion von IL-10 durch GC auch in humanen primären B-Zellen zu zeigen. In den aus PBMC isolierten B-Zellen konnte nach Stimulation mit MP 10^{-6} M eine um Faktor 3,4 erhöhte IL-10 mRNA Produktion gezeigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch kein ELISA-Experiment zur Untersuchung der IL-10 Proteinmenge nach Stimulation mit GC in primären B-Zellen durchgeführt. Mozo et al. konnten nach Inkubation von primären B-Zellen mit Dexamethason keine Induktion von IL-10 Protein nachweisen (Mozo *et al.* 2004). Für zukünftige Experimente wäre es wichtig, die Induktion von IL-10 durch GC in primären Zellen auch auf Proteinebene nachzuweisen. Die Durchführung von Promotoranalysen in primären Zellen ist aufgrund einer geringen Transfektionsrate problematisch. Eine Alternative bietet die Transfektion mittels adenoviraler Reporterkonstrukte.

4.7 Vergleich von durch MP und LPS induziertem IL-10

Nach Stimulation der B-Zelllinie mit LPS 1 µg/ml konnte im Überstand der Zellen 8-mal mehr IL-10 Protein nachgewiesen werden als nach Stimulation mit MP 10^{-6} M. Ebenso produzierten mit LPS 1 µg/ml induzierte B-Zellen um Faktor 3 mehr IL-10 mRNA, als die mit MP 10^{-6} M stimulierten. Überraschenderweise war die Transaktivierung des 1044 bp langen Konstruktes nach Stimulation mit MP 10^{-6} M doppelt so stark wie die nach Stimulation mit LPS 1 µg/ml. Die höhere Induktion des Promotors bei niedrigerer mRNA Produktion im Vergleich zu LPS legt nahe, dass weitere Mechanismen die Expression beeinflussen. Möglich wäre eine Stabilisierung der IL-10 mRNA durch LPS. Ein solcher post-transkriptioneller Mechanismus wurde für IL-10 von Powell et al beschrieben (Powell *et al.* 2000). Demnach wäre vorstellbar, dass LPS die mRNA stabilisiert und so, trotz geringerer Promotoraktivität, eine größere Menge an IL-10 mRNA und Protein gebildet wird. Andererseits könnten Glukokortikoide über den 3`UTR die mRNA stärker destabilisieren. Daneben könnten epigenetische Mechanismen wirken, wie z. B. eine vermehrte Histon Acetylierung (Shoemaker *et al.* 2006).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Glukokortikoide sowohl in der B-Zelllinie RPMI 8226.1 als auch in primären humanen B-Zellen zu einer Induktion von IL-10 führen. Die Regulation der Genexpression erfolgt hauptsächlich auf Promotorebene. Da der Glukokortikoidrezeptor an der Induktion beteiligt ist, wirkt das Glukokortikoid wahrscheinlich über den klassischen Mechanismus, wobei das GRE nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Als der für die Induktion essenzielle Transkriptionsfaktor konnte Stat3 identifiziert werden. Da eine Bindung des GR an die DNA nicht nachgewiesen werden konnte, bleibt die Frage offen, auf welche Weise der GR mit Stat3 interagiert und dessen Bindung an die DNA in Folge einer Stimulierung mit GC induziert.

5 Zusammenfassung

IL-10 ist ein anti-inflammatorisch wirkendes Zytokin, das von T-Zellen, Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen produziert wird. Es wirkt immunsuppressiv, indem es die Expression von MHC Klasse II Molekülen herunterreguliert und die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine inhibiert. Seine Bedeutung wird an IL-10 Knock-out-Mäuse deutlich, die Autoimmunerkrankungen entwickeln und entzündungsresistent sind. Glukokortikoide (GC) wirken wie Zytokine immunsuppressiv. Sie verhindern die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine und die Einwanderung von Leukozyten ins Gewebe. In klinischen Studien konnte durch GC eine Erhöhung von IL-10 im Blut besonders in Leukozyten gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der molekulare Mechanismus der IL-10 Induktion durch Glukokortikoide untersucht. Die Glukokortikoidbehandlung führte sowohl in primären B-Zellen als auch in der B-Zelllinie RPMI 8226.1 zu einer deutlichen Induktion der IL-10 Expression. Daneben konnte eine zeit- und dosisabhängige Induktion der IL-10 mRNA durch das Glukokortikoid Methylprednisolon gezeigt werden. Die Induktion konnte auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Zur Identifizierung des zugrunde liegenden molekularen Mechanismus konnte mithilfe eines 1044 bp langen IL-10 Promotor Reportergenkonstrukts die Beteiligung des IL-10 Promotors und somit eine Regulation auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden. Da nach Transfektion eines 195 bp langen Promotorkonstrukts noch immer eine deutliche Induktion von IL-10 durch GC zu beobachten war, scheinen sowohl das SP1 Bindemotiv als auch das Glukokortikoid Responsive Element (GRE), die in diesem Konstrukt nicht enthalten waren, keine bedeutende Rolle bei der Induktion zu spielen. Das Ergebnis einer anschließenden Transfektion von 195 bp langen Konstrukten mit und ohne Mutation des Stat Bindemotivs wies auf eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors Stat3 hin. Dessen Beteiligung konnte im Anschluss durch die Transfektion einer Linkerscanningserie und die Transfektion eines Konstrukts, das drei hintereinander klonierte Stat3 Bindemotive enthält nochmals bestätigt werden. Eine Induktion der Bindung von Stat3 Protein an die DNA nach Stimulation mit GC

mit GC konnte mithilfe von Gelshift, Supershift und ChIP Analysen gezeigt werden. Das Protein zeigte jedoch nach Zugabe von GC keine verstärkte Phosphorylierung am Ser^{727}- oder Tyr^{705}- Rest. Im anschließenden Experiment konnte eine Beteiligung des Glukokortikoidrezeptors (GR) nachgewiesen werden.

Nachdem bisher die transkriptionelle Kontrolle der IL-10 Expression durch GC vollkommen unklar war, zeigt die vorliegende Arbeit erstmals eine zentrale Rolle des Transkriptionsfaktors Stat3.

6 Literaturverzeichnis

Akdis, C. A., Blesken, T., Akdis, M., Wuthrich, B., and Blaser, K. (1998). Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* **102**, 98-106.

Almawi, W. Y., and Melemedjian, O. K. (2002). Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J Leukoc Biol* **71**, 9-15.

Aman, M. J., Tretter, T., Eisenbeis, I., Bug, G., Decker, T., Aulitzky, W. E., Tilg, H., Huber, C., and Peschel, C. (1996). Interferon-alpha stimulates production of interleukin-10 in activated CD4+ T cells and monocytes. *Blood* **87**, 4731-6.

Barrat, F. J., Cua, D. J., Boonstra, A., Richards, D. F., Crain, C., Savelkoul, H. F., de Waal-Malefyt, R., Coffman, R. L., Hawrylowicz, C. M., and O'Garra, A. (2002). In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* **195**, 603-16.

Barre, B., Vigneron, A., and Coqueret, O. (2005). The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and riboblastoma proteins on the Cdc25A Promotor. *J Biol Chem* **280**, 15673-81.

Benkhart, E. M., Siedlar, M., Wedel, A., Werner, T., and Ziegler-Heitbrock, H. W. (2000). Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol* **165**, 1612-7.

Bettelli, E., Das, M. P., Howard, E. D., Weiner, H. L., Sobel, R. A., and Kuchroo, V. K. (1998). IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol* **161**, 3299-306.

Black, R., Kronheim, S., Sleath, P., Greenstreet, T., Virca, G. D., March, C., and Kupper, T. (1991). The proteolytic activation of interleukin-1 beta. *Agents Actions Suppl* **35**, 85-9.

Bondeson, J., Browne, K. A., Brennan, F. M., Foxwell, B. M., and Feldmann, M. (1999). Selective regulation of cytokine induction by adenoviral gene transfer of IkappaBalpha into human macrophages: lipopolysaccharide-induced, but not zymosan-induced, proinflammatory cytokines are inhibited, but IL-10 is nuclear factor-kappaB independent. *J Immunol* **162**, 2939-45.

Brenner, S., Prosch, S., Schenke-Layland, K., Riese, U., Gausmann, U., and Platzer, C. (2003). cAMP-induced Interleukin-10 Promotor activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation. *J Biol Chem* **278**, 5597-604.

Brightbill, H. D., Plevy, S. E., Modlin, R. L., and Smale, S. T. (2000). A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 Promotor in macrophages. *J Immunol* **164**, 1940-51.

Cao, S., Liu, J., Chesi, M., Bergsagel, P. L., Ho, I. C., Donnelly, R. P., and Ma, X. (2002). Differential regulation of IL-12 and IL-10 gene expression in macrophages by the basic leucine zipper transcription factor c-Maf fibrosarcoma. *J Immunol* **169**, 5715-25.

Cao, S., Liu, J., Song, L., and Ma, X. (2005). The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. *J Immunol* **174**, 3484-92.

Cato, A. C., Nestl, A., and Mink, S. (2002). Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE* **2002**, RE9.

Cheng, F., Wang, H. W., Cuenca, A., Huang, M., Ghansah, T., Brayer, J., Kerr, W. G., Takeda, K., Akira, S., Schoenberger, S. P., Yu, H., Jove, R., and Sotomayor, E. M. (2003). A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity* **19**, 425-36.

Chomarat, P., Rissoan, M. C., Banchereau, J., and Miossec, P. (1993). Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *J Exp Med* **177**, 523-7.

Crawley, J. B., Williams, L. M., Mander, T., Brennan, F. M., and Foxwell, B. M. (1996). Interleukin-10 stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and p70 S6 kinase is required for the proliferative but not the antiinflammatory effects of the cytokine. *J Biol Chem* **271**, 16357-62.

Dai, W. J., Kohler, G., and Brombacher, F. (1997). Both innate and acquired immunity to Listeria monocytogenes infection are increased in IL-10-deficient mice. *J Immunol* **158**, 2259-67.

Dandona, P., Aljada, A., Garg, R., and Mohanty, P. (1999). Increase in plasma interleukin-10 following hydrocortisone injection. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 1141-4.

Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-21.

De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev* **24**, 488-522.

de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., and de Vries, J. E. (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* **174**, 1209-20.

Decker, T., and Kovarik, P. (2000). Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* **19**, 2628-37.

Decker, T., Kovarik, P., and Meinke, A. (1997). GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res* **17**, 121-34.

Del Prete, G. F., De Carli, M., Mastromauro, C., Biagiotti, R., Macchia, D., Falagiani, P., Ricci, M., and Romagnani, S. (1991). Purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen(s) of Toxocara canis expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* **88**, 346-50.

Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., and Roeder, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* **11**, 1475-89.

Duan, H. O., and Simpson-Haidaris, P. J. (2006). Cell type-specific differential induction of the human gamma-fibrinogen Promotor by interleukin-6. *J Biol Chem* **281**, 12451-7.

Dummer, W., Bastian, B. C., Ernst, N., Schanzle, C., Schwaaf, A., and Brocker, E. B. (1996). Interleukin-10 production in malignant melanoma: preferential detection of IL-10-secreting tumor cells in metastatic lesions. *Int J Cancer* **66**, 607-10.

Enk, A. H., and Katz, S. I. (1992). Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol* **149**, 92-5.

Eskdale, J., Kube, D., Tesch, H., and Gallagher, G. (1997). Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics* **46**, 120-8.

Fiorentino, D. F., Bond, M. W., and Mosmann, T. R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* **170**, 2081-95.

Frankenberger, M., Haussinger, K., and Ziegler-Heitbrock, L. (2005). Liposomal methylprednisolone differentially regulates the expression of TNF and IL-10 in human alveolar macrophages. *Int Immunopharmacol* **5**, 289-99.

Gametchu, B., Watson, C. S., Shih, C. C., and Dashew, B. (1991). Studies on the arrangement of glucocorticoid receptors in the plasma membrane of S-49 lymphoma cells. *Steroids* **56**, 411-9.

Gao, B., and Tsan, M. F. (2003). Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J Biol Chem* **278**, 174-9.

Gastl, G. A., Abrams, J. S., Nanus, D. M., Oosterkamp, R., Silver, J., Liu, F., Chen, M., Albino, A. P., and Bander, N. H. (1993). Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression. *Int J Cancer* **55**, 96-101.

Gayo, A., Mozo, L., Suarez, A., Tunon, A., Lahoz, C., and Gutierrez, C. (1998). Glucocorticoids increase IL-10 expression in multiple sclerosis patients with acute relapse. *J Neuroimmunol* **85**, 122-30.

Giraud, S., Hurlstone, A., Avril, S., and Coqueret, O. (2004). Implication of BRG1 and cdk9 in the STAT3-mediated activation of the p21waf1 gene. *Oncogene* **23**, 7391-8.

Hafezi-Moghadam, A., Simoncini, T., Yang, Z., Limbourg, F. P., Plumier, J. C., Rebsamen, M. C., Hsieh, C. M., Chui, D. S., Thomas, K. L., Prorock, A. J., Laubach, V. E., Moskowitz, M. A., French, B. A., Ley, K., and Liao, J. K. (2002). Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* **8**, 473-9.

Hanada, T., and Yoshimura, A. (2002). Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**, 413-21.

Herbeuval, J. P., Lelievre, E., Lambert, C., Dy, M., and Genin, C. (2004). Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6. *J Immunol* **172**, 4630-6.

Ho, A. S., Liu, Y., Khan, T. A., Hsu, D. H., Bazan, J. F., and Moore, K. W. (1993). A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11267-71.

Hodge, S., Hodge, G., Flower, R., and Han, P. (1999). Methyl-prednisolone upregulates monocyte interleukin-10 production in stimulated whole blood. *Scand J Immunol* **49**, 548-53.

Hsu, D. H., de Waal Malefyt, R., Fiorentino, D. F., Dang, M. N., Vieira, P., de Vries, J., Spits, H., Mosmann, T. R., and Moore, K. W. (1990). Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* **250**, 830-2.

Huang, Y., Li, T., Sane, D. C., and Li, L. (2004). IRAK1 serves as a novel regulator essential for lipopolysaccharide-induced interleukin-10 gene expression. *J Biol Chem* **279**, 51697-703.

Imada, K., and Leonard, W. J. (2000). The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* **37**, 1-11.

Jantzen, H. M., Strahle, U., Gloss, B., Stewart, F., Schmid, W., Boshart, M., Miksicek, R., and Schutz, G. (1987). Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene. *Cell* **49**, 29-38.

John, M., Lim, S., Seybold, J., Jose, P., Robichaud, A., O'Connor, B., Barnes, P. J., and Chung, K. F. (1998). Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1alpha, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* **157**, 256-62.

Karagiannidis, C., Akdis, M., Holopainen, P., Woolley, N. J., Hense, G., Ruckert, B., Mantel, P. Y., Menz, G., Akdis, C. A., Blaser, K., and Schmidt-Weber, C. B. (2004). Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* **114**, 1425-33.

Kasprzycka, M., Marzec, M., Liu, X., Zhang, Q., and Wasik, M. A. (2006). Nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase (NPM/ALK) oncoprotein induces the T regulatory cell phenotype by activating STAT3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9964-9.

Kassel, O., Sancono, A., Kratzschmar, J., Kreft, B., Stassen, M., and Cato, A. C. (2001). Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *Embo J* **20**, 7108-16.

Kim, J. M., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Khan, T. A., and Moore, K. W. (1992). Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol* **148**, 3618-23.

Kinjyo, I., Inoue, H., Hamano, S., Fukuyama, S., Yoshimura, T., Koga, K., Takaki, H., Himeno, K., Takaesu, G., Kobayashi, T., and Yoshimura, A. (2006). Loss of SOCS3 in T helper cells resulted in reduced immune responses and hyperproduction of interleukin 10 and transforming growth factor-beta 1. *J Exp Med* **203**, 1021-31.

Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., and Schindler, C. W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* **285**, 1-24.

Kube, D., Platzer, C., von Knethen, A., Straub, H., Bohlen, H., Hafner, M., and Tesch, H. (1995). Isolation of the human interleukin 10 Promotor. Characteri-

zation of the Promotor activity in Burkitt's lymphoma cell lines. *Cytokine* **7**, 1-7.

Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Muller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263-74.

Kumar, R., and Thompson, E. B. (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* **64**, 310-9.

Lasa, M., Abraham, S. M., Boucheron, C., Saklatvala, J., and Clark, A. R. (2002). Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38. *Mol Cell Biol* **22**, 7802-11.

Lerner, L., Henriksen, M. A., Zhang, X., and Darnell, J. E., Jr. (2003). STAT3-dependent enhanceosome assembly and disassembly: synergy with GR for full transcriptional increase of the alpha 2-macroglobulin gene. *Genes Dev* **17**, 2564-77.

Li, X., Qiu, J., Wang, J., Zhong, Y., Zhu, J., and Chen, Y. (2001). Corticosterone-induced rapid phosphorylation of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in PC12 cells. *FEBS Lett* **492**, 210-4.

Liu, Y., Wei, S. H., Ho, A. S., de Waal Malefyt, R., and Moore, K. W. (1994). Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol* **152**, 1821-9.

Ma, W., Lim, W., Gee, K., Aucoin, S., Nandan, D., Kozlowski, M., Diaz-Mitoma, F., and Kumar, A. (2001). The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 Promotor via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *J Biol Chem* **276**, 13664-74.

Maritano, D., Sugrue, M. L., Tininini, S., Dewilde, S., Strobl, B., Fu, X., Murray-Tait, V., Chiarle, R., and Poli, V. (2004). The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions. *Nat Immunol* **5**, 401-9.

Matsuoka, Y., Moore, G. E., Yagi, Y., and Pressman, D. (1967). Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma. *Proc Soc Exp Biol Med* **125**, 1246-50.

Meyer, T., Carlstedt-Duke, J., and Starr, D. B. (1997). A weak TATA box is a prerequisite for glucocorticoid-dependent repression of the osteocalcin gene. *J Biol Chem* **272**, 30709-14.

Mocellin, S., Marincola, F., Rossi, C. R., Nitti, D., and Lise, M. (2004). The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**, 61-76.

Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**, 683-765.

Moore, K. W., Vieira, P., Fiorentino, D. F., Trounstine, M. L., Khan, T. A., and Mosmann, T. R. (1990). Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRFI. *Science* **248**, 1230-4.

Morrison, N., and Eisman, J. (1993). Role of the negative glucocorticoid regulatory element in glucocorticoid repression of the human osteocalcin Promotor. *J Bone Miner Res* **8**, 969-75.

Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348-57.

Mozo, L., Suarez, A., and Gutierrez, C. (2004). Glucocorticoids up-regulate constitutive interleukin-10 production by human monocytes. *Clin Exp Allergy* **34**, 406-12.

Nissen, R. M., and Yamamoto, K. R. (2000). The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* **14**, 2314-29.

Platzer, C., Fritsch, E., Elsner, T., Lehmann, M. H., Volk, H. D., and Prosch, S. (1999). Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. *Eur J Immunol* **29**, 3098-104.

Platzer, C., Meisel, C., Vogt, K., Platzer, M., and Volk, H. D. (1995). Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs. *Int Immunol* **7**, 517-23.

Powell, M. J., Thompson, S. A., Tone, Y., Waldmann, H., and Tone, M. (2000). Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. *J Immunol* **165**, 292-6.

Pratt, W. B., and Toft, D. O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* **18**, 306-60.

Punnonen, J., de Waal Malefyt, R., van Vlasselaer, P., Gauchat, J. F., and de Vries, J. E. (1993). IL-10 and viral IL-10 prevent IL-4-induced IgE synthesis by inhibiting the accessory cell function of monocytes. *J Immunol* **151**, 1280-9.

Rawlings, J. S., Rosler, K. M., and Harrison, D. A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* **117**, 1281-3.

Richards, D. F., Fernandez, M., Caulfield, J., and Hawrylowicz, C. M. (2000). Glucocorticoids drive human CD8(+) T cell differentiation towards a phenotype with high IL-10 and reduced IL-4, IL-5 and IL-13 production. *Eur J Immunol* **30**, 2344-54.

Ruppert, S. M., McCulloch, V., Meyer, M., Bautista, C., Falkowski, M., Stunnenberg, H. G., and Hernandez, N. (1996). Monoclonal antibodies directed against the amino-terminal domain of human TBP cross-react with TBP from other species. *Hybridoma* **15**, 55-68.

Shakhov, A. N., Collart, M. A., Vassalli, P., Nedospasov, S. A., and Jongeneel, C. V. (1990). Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med* **171**, 35-47.

Shoemaker, J., Saraiva, M., and O'Garra, A. (2006). GATA-3 directly remodels the IL-10 locus independently of IL-4 in CD4+ T cells. *J Immunol* **176**, 3470-9.

Shuto, T., Imasato, A., Jono, H., Sakai, A., Xu, H., Watanabe, T., Rixter, D. D., Kai, H., Andalibi, A., Linthicum, F., Guan, Y. L., Han, J., Cato, A. C., Lim, D. J., Akira, S., and Li, J. D. (2002). Glucocorticoids synergistically enhance nontypeable Haemophilus influenzae-induced Toll-like receptor 2 expression via a negative cross-talk with p38 MAP kinase. *J Biol Chem* **277**, 17263-70.

Smoak, K. A., and Cidlowski, J. A. (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev* **125**, 697-706.

Stephanou, A. (2004). Role of STAT-1 and STAT-3 in ischaemia/reperfusion injury. *J Cell Mol Med* **8**, 519-25.

Takeda, T., Kurachi, H., Yamamoto, T., Nishio, Y., Nakatsuji, Y., Morishige, K., Miyake, A., and Murata, Y. (1998). Crosstalk between the interleukin-6 (IL-6)-JAK-STAT and the glucocorticoid-nuclear receptor pathway: synergistic activation of IL-6 response element by IL-6 and glucocorticoid. *J Endocrinol* **159**, 323-30.

Tone, M., Powell, M. J., Tone, Y., Thompson, S. A., and Waldmann, H. (2000). IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J Immunol* **165**, 286-91.

Vieira, P., de Waal-Malefyt, R., Dang, M. N., Johnson, K. E., Kastelein, R., Fiorentino, D. F., deVries, J. E., Roncarolo, M. G., Mosmann, T. R., and Moore, K. W. (1991). Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1172-6.

Visser, J., van Boxel-Dezaire, A., Methorst, D., Brunt, T., de Kloet, E. R., and Nagelkerken, L. (1998). Differential regulation of interleukin-10 (IL-10) and IL-12 by glucocorticoids in vitro. *Blood* **91**, 4255-64.

Wehinger, J., Gouilleux, F., Groner, B., Finke, J., Mertelsmann, R., and Weber-Nordt, R. M. (1996). IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the Promotors of selected genes. *FEBS Lett* **394**, 365-70.

Wieland, S., Schatt, M. D., and Rusconi, S. (1990). Role of TATA-element in transcription from glucocorticoid receptor-responsive model Promotors. *Nucleic Acids Res* **18**, 5113-8.

Yang, C. H., Shi, W., Basu, L., Murti, A., Constantinescu, S. N., Blatt, L., Croze, E., Mullersman, J. E., and Pfeffer, L. M. (1996). Direct association of STAT3 with the IFNAR-1 chain of the human type I interferon receptor. *J Biol Chem* **271**, 8057-61.

Yang, J., Chatterjee-Kishore, M., Staugaitis, S. M., Nguyen, H., Schlessinger, K., Levy, D. E., and Stark, G. R. (2005). Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res* **65**, 939-47.

Yoshida, Y., Kumar, A., Koyama, Y., Peng, H., Arman, A., Boch, J. A., and Auron, P. E. (2004). Interleukin 1 activates STAT3/nuclear factor-kappaB cross-talk via a unique TRAF6- and p65-dependent mechanism. *J Biol Chem* **279**, 1768-76.

Yu, Z., Zhang, W., and Kone, B. C. (2002). Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) inhibits transcription of the inducible nitric oxide synthase gene by interacting with nuclear factor kappaB. *Biochem J* **367**, 97-105.

Zdanov, A., Schalk-Hihi, C., and Wlodawer, A. (1996). Crystal structure of human interleukin-10 at 1.6 A resolution and a model of a complex with its soluble receptor. *Protein Sci* **5**, 1955-62.

Zhou, X., Schmidtke, P., Zepp, F., and Meyer, C. U. (2005). Boosting interleukin-10 production: therapeutic effects and mechanisms. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **5**, 465-75.

Ziegler-Heitbrock, H. W., Pechumer, H., Petersmann, I., Durieux, J. J., Vita, N., Labeta, M. O., and Strobel, M. (1994). CD14 is expressed and functional in human B cells. *Eur J Immunol* **24**, 1937-40.

Ziegler-Heitbrock, L., Lotzerich, M., Schaefer, A., Werner, T., Frankenberger, M., and Benkhart, E. (2003). IFN-alpha induces the human IL-10 gene by recruiting both IFN regulatory factor 1 and Stat3. *J Immunol* **171**, 285-90.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des IL-10 Homodimers 5

Abbildung 2: Der Jak/Stat Signalweg nach Aktivierung durch ein Zytokin. 11

Abbildung 3: Stat Protein Struktur 12

Abbildung 4: Strukturformel des verwendeten 6α-Methylprednisolons. 13

Abbildung 5: Struktur des GRα Proteins. 14

Abbildung 6: Aktivierung und Repression der Transkription durch GRα 15

Abbildung 7: Induktion von IL-10 Protein durch MP 50

Abbildung 8: Kinetik der IL-10 mRNA Induktion durch MP 52

Abbildung 9: Titration: Induktion von IL-10 mRNA nach Stimulation mit unterschiedlichen MP Konzentrationen 53

Abbildung 10: Qualitätskontrolle: Die Induktion der IL-10 mRNA erfolgt nicht durch EtOH, in dem MP gelöst ist. 54

Abbildung 11: Polymyxin B (PMB) ist ein wirksamer Neutralisator von Lipopolysaccharid (LPS) 55

Abbildung 12: Qualitätskontrolle: MP ist nicht mit LPS kontaminiert. 55

Abbildung 13: Schematische Darstellung des pIL-10(-1044) Luziferase Reportergenkonstrukts mit potentiellen Bindemotiven. 57

Abbildung 14: Titration: Transaktivierung des pIL-10(-1044) Luziferase Reportergen-konstrukts durch verschiedene MP Konzentrationen. 58

Abbildung 15: Schematische Darstellung des pIL-10(-195) Luziferase Reportergenkonstrukts 58

Abbildung 16: Deletionsserie: Transaktivierung der pIL-10(-195) LuziferaseReportergenkonstrukte mit und ohne Mutation durch MP. 59

Abbildung 17: Schematische Darstellung des pIL-10(-150) Luziferase Reportergenkonstrukts 61

Abbildung 18: Transaktivierung des pIL-10(-150) Luziferase Reportergen-konstrukts durch MP und LPS 61

Abbildung 19: Schematische Darstellung der Linkerscanningserie 62

Abbildung 20:	Transaktivierung der Linkerscanninserie durch MP	63
Abbildung 21:	Schematische Darstellung des LS4(3x Stat3) Luziferase Reportergen-konstrukts	64
Abbildung 22:	Transaktivierung des LS4 Trimers durch MP	64
Abbildung 23:	Gelshiftanalyse: Stat3 bindet nach Stimulation mit LPS und MP vermehrt an die LS4 Sequenz im IL-10 Promotor	65
Abbildung 24:	Supershiftanalyse: Stat3 bindet an die LS4 Sequenz im IL-10 Promotor	66
Abbildung 25:	ChIP-Analyse: MP induziert die Bindung von Stat3 an die LS4 Sequenz im IL-10 Promotor	68
Abbildung 26:	Induktion von Stat3 durch MP (ChIP)	69
Abbildung 27:	Western Blot Analyse: Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von Stat3 nach Stimulation mit MP	70
Abbildung 28:	Blockade des Glukokortikoidrezeptors durch RU-486	71
Abbildung 29:	Blockade der Transaktivierung des pIL-10(-195) Luziferase Reportergenkonstrukts durch RU-486 nach Stimulation mit MP	72
Abbildung 30:	Die Induktion der IL-10 mRNA durch MP kann durch die PI3-Kinase Inhibitoren Ly 294,002 und Wortmannin nicht beeinflusst werden	73
Abbildung 31:	Induktion der IL-10 mRNA durch MP in humanen B-Zellen	74
Abbildung 32:	Das 3xκB Luziferase Reportergenkonstrukt kann durch Stimulation mit LPS, nicht aber durch MP transaktiviert werden	75
Abbildung 33:	Induktion von IL-10 Protein nach Stimulation mit LPS und MP	76
Abbildung 34:	Vergleich der Induktion von IL-10 mRNA nach Stimulation mit LPS und MP	77
Abbildung 35:	Vergleich der Transaktivierung des pIL-10(-1044) Luziferase Reportergenkonstrukts durch LPS und MP.	78

8 Danksagung

Das Zustandekommen einer Doktorarbeit ist nie nur das Resultat einer Einzelperson. Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während meiner Arbeit betreut und unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. HWL Ziegler-Heitbrock danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas. Desweiteren möchte ich ihm für die Betreuung meiner Dissertation trotz der großen Entfernung, die regelmässigen Diskussionen und Anregungen bedanken. Er hat mich auf dem langen Weg der ChIP Experimente stets unterstützt und motiviert. Ebenfalls bedanken möchte ich mich für die Ermöglichung zweier Auslandsaufenthalte im Rahmen der ChIP Experimente sowie für die Durchsicht der Arbeit.

Frau Dr. Marion Frankenberger möchte ich für die fachliche Betreuung der Arbeit, die Einführung in die Methoden, ihre ständige Diskussionsbereitschaft, Unterstützung und Aufmunterung in den schwierigen Phasen dieser Arbeit danken. Danke für das Interesse an der Arbeit und die Durchsicht des Manuskripts.

Frau PD Dr. Bettina Kempkes danke ich für ihre Bereitschaft diese Dissertation vor der Fakultät für Biologie der LMU München zu vertreten. Ebenfalls möchte ich mich bei ihr für ihr Interesse an der Arbeit, ihre Anregungen und unterstützenden Ratschläge bedanken.

Vielen Dank an Herrn Dr. Thomas Hofer für seine Hilfestellungen im Labor und seine Unterstützung bei der Bildbearbeitung.

Ein stetig kompetenter Ansprechpartner in Computerfragen war Herr Dr. Winfried Möller für mich. Vielen Dank dafür!

Dr. Valerie Albrecht, Dr. Ellen Bitterle, Gudrun Kassner, Kathrin Felten, Gisela Jaskiola und Christiane Eder danke ich für die tolle Zusammenarbeit, die damit verbundene angenehme Arbeitsathmosphäre, die aufmunternden Worte, ihre Unterstützung sowie ihre Freundschaft.

Den Kollegen vom IHB in Neuherberg danke ich für ihre Kollegialität und die netten Gespräche. Herrn Dr. Konrad Maier danke ich fürs Zuhören und Aufmuntern.

Frau Dr. Annette Schaefer danke ich für die Einarbeitung in die ChIP Methode.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Henk Stunnenberg danke ich für die nette Aufnahme in ihrem Labor. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Marion Lohrum und Max Koeppel für ihre unermüdliche Betreuung in Sachen ChIP. Durch ihren Einsatz habe ich mich in Nijmegen sehr wohl gefühlt und denke gerne an die zwei Wochen zurück.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Firmen Inamed Research GmbH & Co. KG und Activaero GmbH für die nette private Zusammenarbeit (Gespräche, Grillabende, Partys…)

Matthias Immerz und Martina Wehner danke ich für ihre Hilfe bei der Formatierung der Arbeit.

Meinen Eltern möchte ich für die jahrelange Unterstützung bei der Verwirklichung meiner Pläne und ihre Liebe bedanken. Ohne sie wäre ich nicht so weit gekommen. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei meinem Mann Florian, der immer für mich da ist und in der Zeit der Entstehung dieser Arbeit einiges mitgemacht hat. Ausserdem danke ich allen Familienmitgliedern und Freunden für ihre Unterstützung und Motivation in den letzten drei Jahren.

Vielen Dank Euch Allen!!!!!!!!!!

9 Lebenslauf

Persönliche Daten		Claudia Unterberger, geb. Wehner geboren am 02.07.1977 in Gräfelfing
Schulbildung	1984-1988 1988-1997	Grundschule in Forstenried, München Erlangung der allgemeinen Hochschulreife am Theresia-Gerhardinger-Gymnasium am Anger der A. Schulschwestern v.U.L.Fr., München
Studium	1997-2003 1999 2002/03	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München Vordiplom Diplomarbeit mit dem Thema: „Genomische Analyse einzelner disseminierter Tumorzellen und Primärtumoren von Bronchialkarzinompatienten: Mutation und Selektion bei der frühen systemischen Krebserkrankung“. Betreut von Dr. med. Christoph Klein. Institut für Immunologie der LMU München
Promotion	seit 2003	Promotion in der KKG entzündliche Lungenerkrankungen der GSF in Gauting. Betreut von Frau Dr. Frankenberger, GSF Gauting und vertreten von Frau PD Dr. Kempkes, Institut für Klinische Molekularbiologie, GSF München
Nebentätigkeit	2000	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Zoologie der LMU München Thema: „Molekulare Entwicklungsbiologie: Evolution embryonaler Musterbildung; genetische Arbeiten mit Tribolium“

Ehrenwörtliche Versicherung:

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die Dissertation von mir selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den …….

……..

(Claudia Unterberger)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich nicht anderweitig versucht habe, ohne Erfolg eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen. Ausserdem erkläre ich, dass die Dissertation keiner anderen Prüfungskommission ganz oder in wesentlichen Teilen vorgelegt wurde.

München, den …….

……..

(Claudia Unterberger)