

Abstract

NF- κ B transcription factors are central regulators of the immune system and of tissue homeostasis. Their function is crucial for host defense, development and survival. However prolonged and pathologically increased NF- κ B activation is associated with several severe diseases from chronic inflammatory diseases to cancer. Negative regulation of NF- κ B is therefore crucial for normal homeostasis. One of the most important negative regulatory mechanisms of NF- κ B signaling is the negative feedback loop provided by NF- κ B induced expression of the inhibitory protein I κ B α . *Nfkb1a* (coding for I κ B α) is a direct NF- κ B target gene and newly synthesized I κ B α protein can bind and inactivate NF- κ B dimers. In this study, we performed a detailed analysis of the NF- κ B dependent regulation of *Nfkb1a* transcription via 12 identified NF- κ B binding sites and its physiological relevance. For this purpose different knockin mouse lines were generated using homologous recombination in ES cells lacking (i) 6 binding sites of the *Nfkb1a* promoter, (ii) 6 binding sites in the first intron of this gene or (iii) all 12 NF- κ B binding sites. Mice of these different mutant lines were subsequently studied to investigate the function of these different clusters of 6 NF- κ B binding sites each for NF- κ B dependent regulation of *Nfkb1a* transcription. Although ablation of all 12 NF- κ B binding sites in the *Nfkb1a* locus strongly impaired inducible *Nfkb1a* transcription, mice with these mutations were born normally and did not show early lethality in contrast to the phenotype of I κ B α whole body knockout mice, that die early after birth with systemic inflammation. However lack of NF- κ B mediated regulation of *Nfkb1a* transcription rendered adult mice lacking all 12 NF- κ B binding sites highly susceptible to LPS induced shock and resulted in alterations of immune-cell subsets as well as spontaneous immune-cell infiltrates in several organs. Mice lacking only one of the two NF- κ B binding site clusters also showed increased susceptibility to LPS induced shock. Thus, both the promoter cluster as well as the intronic cluster of NF- κ B binding sites in the *Nfkb1a* promoter are therefore important *in vivo* for negative feedback regulation of NF- κ B. Studying different primary cells of these mutant mouse lines *in vitro* we could demonstrate the importance of both clusters for NF- κ B mediated transcriptional activation of *Nfkb1a* in more detail. We could demonstrate a specific requirement of the intronic cluster for baseline *Nfkb1a* transcription, whereas the promoter cluster is crucial for inducible transcription. Importantly, impaired *Nfkb1a* expression in mutant macrophages strongly reduced TNF induced NF- κ B oscillatory dynamics. The effect of reduced *Nfkb1a* expression on the NF- κ B response and specifically on the expression of other NF- κ B target genes was however not strong, although cell-type specific differences were observed. In conclusion, NF- κ B mediated transcriptional regulation of *Nfkb1a* expression differentially depends on both NF- κ B binding site clusters and is vital for normal physiology.

Zusammenfassung

NF- κ B Transkriptionsfaktoren spielen eine zentrale Rolle bei der Regulierung des Immunsystems sowie der Gewebshomöostase. Ihre Funktion ist entscheidend für die Immunantwort, Entwicklungsprozesse und zelluläres Überleben. Chronische oder übermäßig starke NF- κ B-Aktivität ist jedoch mit einer Vielzahl von schweren Erkrankungen assoziiert, die von chronischen Entzündungsreaktionen bis hin zu Krebserkrankungen reichen. Die negative Regulation von NF- κ B ist daher kritisch für die Erhaltung der physiologischen Homöostase. Einer der wichtigsten Mechanismen für die Inhibierung von NF- κ B ist die Expression des negativ wirkenden Proteins I κ B α . Aktivierte NF- κ B Transkriptionsfaktoren induzieren die Expression des negativen Regulators *Nfkb1a* (des für I κ B α kodierenden Gens) und bewirken so die direkte Terminierung des Signaltransduktionsweges. In der vorliegenden Studie beschreiben wir im Detail die NF- κ B-abhängige Regulation des *Nfkb1a* Gens und deren physiologische Relevanz unter besonderer Berücksichtigung von zwölf identifizierten NF- κ B Bindungsstellen (BS). Zu diesem Zweck wurden, per homologer Rekombination in ES-Zellen, verschiedene Knockin-Mäuse generiert denen spezifische NF- κ B BS im *Nfkb1a*-Locus fehlen: (i) 6 BS des *Nfkb1a* Promoters, (ii) 6 BS des ersten Introns oder (iii) alle diese 12 BS. Anhand dieser Mäuse wurde die Funktion dieser beiden Cluster, bestehend aus jeweils sechs NF- κ B Bindestellen, für die transkriptionelle Regulation des *Nfkb1a* Gens untersucht. Mutation beider Cluster führte zu einer starken Hemmung der induzierbaren Transkription von *Nfkb1a*. Mäuse mit diesen Mutationen wurden jedoch ohne erkennbaren pathologischen Phänotyp geboren und zeigten keine Beeinträchtigung ihrer Überlebensfähigkeit, im Gegensatz zu I κ B α komplett Knockout-Mäusen, die früh nach der Geburt mit systemischer Entzündung versterben. Adulte Mäuse, denen beide NF- κ B BS Cluster fehlten, reagierten jedoch hoch empfindlich in einem LPS-induzierte Sepsis Modell und entwickelten Immunzell-Infiltrate in einigen Organen, sowie andere Immunzell-Veränderungen. Auch Mäuse in denen nur das intronische oder das Promoter Cluster mutiert wurde, waren anfällig für LPS induzierte Sepsis, ein Anzeichen für deregulierte NF- κ B-Aktivität. Beide Cluster sind daher *in vivo* für die Transkription von *Nfkb1a* und damit für die negative Rückkopplung nach NF- κ B Aktivierung notwendig. Anhand von Zellkulturexperimenten mit verschiedenen primären Zelltypen der Knockin-Mäuse konnten wir die Funktion dieser Cluster, für die NF- κ B-abhängige transkriptionelle Regulation von *Nfkb1a*, im Detail analysieren. Das Cluster im Intron des *Nfkb1a* Gens ist hiernach hauptsächlich für die basale Transkription verantwortlich, während das Cluster im Promoter eine wesentliche Rolle für die induzierbare Transkription spielt. Interessanter Weise führte eine gehemmte *Nfkb1a* Transkription zu einer starken Reduzierung von, normalerweise nach TNF Stimulierung auftretenden, Oszillationen der NF- κ B Transkriptionsfaktoren zwischen Zytoplasma und Nukleus. Der Effekt von gehemmter *Nfkb1a* Transkription auf die Expression anderer NF- κ B Zielgene war jedoch nicht stark ausgeprägt, zeigte aber Zelltyp spezifische Unterschiede. Zusammenfassend hängt die transkriptionelle Regulation von *Nfkb1a* von beiden NF- κ B BS Clustern ab und ist wichtig für die Regulation von anderen NF- κ B Zielgenen und die oszillierende Dynamik von NF- κ B *in vitro* sowie für die Regulierung von NF- κ B Aktivität *in vivo*.