Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Universität Ulm
– Direktor: Univ.- Prof. Dr. Thomas Wirth–

Molekulare Charakterisierung transgener Mauslinien mit deregulierter IKK2 Funktion in Neuronen

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Maximilian Valentin Malfertheiner
aus Ulm an der Donau
2007

AmtierenderDekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Wirth
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Tobias Böckers

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2008

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN V

1 EINLEITUNG 1

1.1 Der Transkriptionsfaktor NF-κB 1
1.1.1 Die NF-κB Protein Familie 1
1.1.2 Die IκB Proteine 3
1.1.3 NF-κB Signalwege 4
1.1.4 „Knock-out"- und transgene Modelle des NF-κB-Systems 7
1.1.5 NF-κB im Zentralnervensystem 10

1.2 Energiehaushalt und Stoffwechsel 14
1.2.1 Der Hypothalamus, Zentrale des Stoffwechsels 16
1.2.2 Neuropeptide 16
1.2.3 Insulin und seine Signalwege 19
1.2.4 Verbindungen von NF-κB zur Steuerung der Energiehomöostase 21

1.3 Transgene Mauslinien mit veränderter neuronaler IKK2 Funktion 22

1.4 Zielsetzung 24

2 MATERIAL UND METHODEN 26

2.1 Material 26
2.1.1 Reagenzien und Chemikalien 26
2.1.2 Molekularbiologische Materialien 27
2.1.3 Puffer und Lösungen 28
2.1.4 Verbrauchsmaterialien 29
2.1.5 Geräte 29
2.1.6 RT-PCR-Primer für Reverse Transkriptase Reaktion 30

2.2 Methoden 30
2.2.1 Tiersektionen 30
2.2.2 RNA Techniken 30
2.2.3 Protein Techniken 35

2.3 Statistik und Datenverarbeitung 42

3 ERGEBNISSE 43

3.1 Untersuchte Tiere und Organe 43

3.2 Basale Expression der IKK2 in Gehrinregionen von IKK2-CA Mäusen 44

3.3 Veränderungen des Insulinsignaling im Gehirn von IKK2-CA und IKK2-DN Tieren 45

3.4 Untersuchungen der Genexpression in IKK2-DN und IKK2-CA Mäusen 50
3.4.1 Auswertung der Affymetrix Chipanalyse 50
3.4.2 Analyse der Expression von Genen, die in die Energiehomöostase eingreifen.. 55
3.4.3 Veränderungen der Expression endogener Opioide und Cannabinoide 58
3.4.4 Veränderungen der Expression bekannter NF-κB Zielgene 60
3.4.5 Veränderungen der Expression von Gerüstproteinen 62
3.4.6 Veränderungen der Regulation des Wachstumshormons im Gehirn 64

3.5 Analyse von Gensequenzen auf mögliche NF-κB Bindungsstellen 65
3.5.1 Gelretardationsanalysen zum Nachweis einer κB Bindung 66

4 DISKUSSION 71

4.1 Basale Expression des IKK2 Transgens im ZNS 71

4.2 Einfluss des IKK2-DN Transgens auf den Stoffwechsel 71
4.2.1 Veränderungen der Genexpression im Stoffwechsel 72
4.2.2 Einfluss auf das Insulinsignaling im ZNS 74

4.3 Analyse der Genexpression mit DNA-Microarrays 76

4.4 Unterschiede im Genexpressionsprofil der IKK2-DN und IKK2-CA Mäuse 76
4.4.1 Veränderungen in der Expression bekannter NF-κB Zielgene 76
4.4.2 Veränderungen in der Expression von Gerüstproteinen 77
4.4.3 Veränderungen der Genexpression im Wachstumshormonsystem 78

4.5 Schlussfolgerung 79

5 ZUSAMMENFASSUNG 81

5.1 Deutsche Zusammenfassung 81

5.2 English Summary 83

6 LITERATURVERZEICHNIS 85

7 ANHANG 93

7.1 RT PCR Primer 93

Danksagung 98

Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
BAFF	B-cell activating factor
BDGF	brain-derived growth factor
BDNF	brain-derived neutrophic factor
BETA	brain-specific transcription factor
BSA	bovine serum albumin
CamK	Calmodulin dependent kinase
cAMP	zyklisches 5’-3’-Adenosinmonophosphat
CanR	Cannabinoid Receptor
Ce	Cerebellum
CKII	Casein-Kinase II
Co	Cortex
Cox	Cyclooxygenase
CREB	cAMP response element binding protein
DMEM	Dulbecco’s modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (acid)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DPEC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
Erk	extracellulr signal-related kinase
FCS	fetal calf serum
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GalR	Galanin-Rezeptor
GH	growth hormone
GHr	GH receptor
GHRH	GH releasing hormone

GHRHr	GHRH receptor
Hi	Hippocampus
Hp	Hypophyse
HVL	Hypophysenvorderlappen
Hy	Hypothalamus
ICAM	intercellular cell adhesion molecule
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IκB	inhibitor of NF-kB
IKK	IκB-Kinase
IL	Interleukin
JNK	Jun N-terminal kinase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
LPS	Lipopolysaccharid
LTD	long-term depression
LTP	long-term potentiation
Mi	Mittelhirn
min	Minute
NEMO	NF-kB essential modifier
NES	nuclear export sequence
neuNOS	neuronale NO-Synthase
NF-κB	Nuclear Factor κB
NGF	nerve growth factor
NIK	NF-kB-inducing kinase
NKBF	neuronal κB binding factor
NLS	nuclear localisation signal
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat (Glutamat-Antagonist)
NO	Stickstoffmonoxid
NPY	Neuropeptid-Y
Ob	olfaktorische Bulbi
OpioR	opioid receptor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSD	postsynaptic density protein
Rack	receptor of activated protein kinase c
RHD	Rel homology domain

RIP	receptor interacting protein
Ro	Rombencephalon
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RT-PCR	reverse transcriptase – polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecylsulfate
SOD	Superoxid-Dismutase
St	Striatum
TAD	Transaktivierungsdomäne
TEMED	N,N,N’,N’-Tetramethylethylendiamin
TGF	transforming growth factor
Th	Thalamus
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1	TNF-Rezeptor 1
TRADD	TNF receptor-associated death domain
TRAF	TNFR-associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
UV	Ultra Violett
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Der Transkriptionsfaktor NF-κB

Der Transkriptionsfaktor NF-κB spielt eine zentrale Rolle bei vielen wichtigen Signaltransduktionsprozessen, indem er extrazelluläre Signale in Veränderungen der Genexpression umsetzt. NF-kB abhängige Zielgene sind an der Regulation von Entzündungsprozessen, der Immunzellentwicklung, des Zellzyklus, der Apoptose sowie von Lern- und Entwicklungsvorgängen beteiligt.
Ursprünglich wurde NF-κB als nukleärer Faktor in B-Zellen im Zusammenhang mit der Expression der leichten κ (kappa) Ketten von Immunglobulinen entdeckt. Daher erklärt sich auch der Name „nuclear factor kappa lightchain B". Bereits in Intervertebraten finden sich NF-κB Homologe, was eine starke Konservierung im Laufe der Evolution belegt.
Bis heute wurde eine Vielzahl von NF-κB regulierter Gene (aufgelistet bei www.nf-kb.org) beschrieben. NF-κB wird eine große medizinische Relevanz zugesprochen, vor allem im Zusammenhang mit Erkrankungen des Immunsystems, Infektionen, Tumorerkrankungen und auch neurodegenerativen Erkrankungen.
Über die Funktion von NF-κB im zentralen Nervensystem (ZNS) ist allerdings relativ wenig bekannt.

1.1.1 Die NF-κB Protein Familie

NF-κB ist kein einzelnes Protein, es besteht aus einer ganzen Familie von Proteinen, den so genannten NF-κB/Rel-Proteinen, welche dimere Transkriptionsfaktoren bilden. Bisher wurden fünf strukturell verwandte Mitglieder der NF-κB/Rel Familie in Säugetieren beschrieben: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 (p50) und NF-κB2 (p52), wobei p50 und p52 durch proteolytische Prozessierung aus den inaktiven Vorstufen p105 und p100 entstehen. Die Umwandlung von p105 erfolgt konstitutiv, die von p100 zu p52 hingegen ist ein regulierter Prozess (Beinke et al., 2004). Neben diesen fünf NF-κB-Untereinheiten gibt es noch weitere Homologe, die in Viren oder Invertebraten vorkommen, z.B. das virale v-Rel, X-Rel1 aus *Xenopus* sowie die *Drosophila*-Gene Dorsal, Dif und Relish

(Manfruelli et al., 1999, Hedengren et al., 1999). Im Gehirn von Säugern kommen außerdem noch die κB-bindenden Proteine BETA, neuronal κB-binding factor (NKBF) und verschiedene „developing brain factors“ vor (Koerner et al., 1989; Cauley et al., 1994; Moermann et al., 1999). Die NF-κB/Rel Proteine können miteinander verschiedene Homo- und Heterodimere bilden. Strukturell gemeinsam haben sie eine Rel-Homologie-Domäne (RHD). Diese ist verantwortlich für DNA-Bindung, Dimerisierung und Wechselwirkung mit den inhibitorischen κB–Proteinen (IκB). Sie enthält außerdem eine Kernlokalisationssequenz, das so genannte „nuclear localisation signal“ (NLS), welche im inaktiven Zustand durch IκB-Proteine abgeschirmt ist und bei Aktivierung freigelegt wird (Beinke et al., 2004; Schmitz et al., 2004).

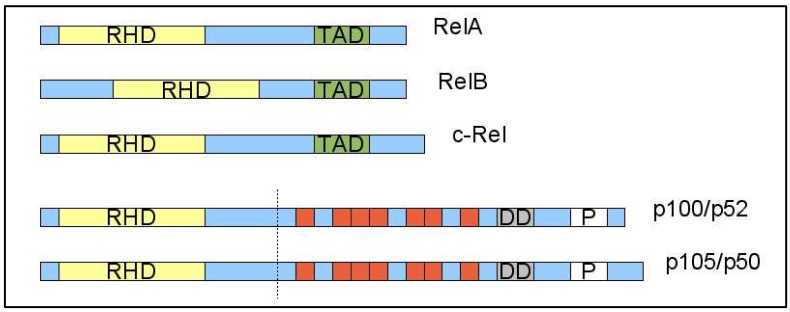


Abbildung 1: Rel/NF-κB-Proteine (RHD: Rel-homology domain, TAD: transactivation domain P: phophorylation domain, DD: death domain)

Nur Dimere aus zwei NF-κB Untereinheiten sind in der Lage, über ihre RHD an die DNA zu binden. RelA (p65), RelB und c-Rel enthalten außerdem eine Transaktivierungsdomäne (TAD), die über Wechselwirkungen mit Coaktivatoren die Transkription eines Gens induzieren kann. p50 und p52 hingegen fehlt diese TAD, dadurch können ihre Homo- oder p50/p52-Heterodimere als Repressoren der Transkription wirken. Die Heterodimere von p50 und p52 mit den anderen Rel-Proteinen, z.B. p50/RelA, sind wegen deren TAD Aktivatoren der Transkription (Schmitz et al., 2004). Die Steuerung der Transkription erfolgt über die Bindung an kB-Sequenzmotive, mit der Consensussequenz GGGRNNYYCC (R = Purin, Y = Pyrimidin, N = beliebige Base) (Hayden und Gosh, 2004).

Die Mitglieder der NF-κB-Familie können untereinander beliebige Homo- und Heterodimere ausbilden, die an die DNA binden und transkriptionell aktiv sind. Die einzige Ausnahme hierbei bildet RelB, das nur Heterodimere mit p50 oder p52 ausbilden

kann (Ryseck et al., 1995). Das Dimer, das nach Stimulation von Zellen, z.B. mit proinflammatorischen Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), aktiviert wird und somit zur schnellen Antwort einer Zelle auf äußere Reize beiträgt, ist das p50/RelA-Heterodimer, das ubiquitär exprimiert wird. Dagegen sind c-Rel- und RelB-enthaltende Komplexe hauptsächlich in lymphoiden Zellen vorhanden und dort für die konstitutive NF-κB-Aktivität verantwortlich (Lernbecher et al., 1993; Weih et al., 1994).
NF-κB Dimere liegen in unstimulierten Zellen als inaktive Komplexe im Zytoplasma vor, da sie an inhibitorische IκB Proteine gebunden sind. Durch verschiedene Stimuli wird NF-κB aktiviert und kann dadurch in den Zellkern gelangen, um auf die Transkription seiner Zielgene Einfluss zu nehmen.

1.1.2 Die IκB Proteine

Die inhibitorischen κB (IκB)-Proteine haben große Bedeutung für die Aktivität von NF-κB. Sie dienen der Maskierung der NLS, der Rel/NF-κB-Dimere, wodurch diese im Cytoplasma gehalten werden. Es sind sieben verschiedene IκB-Proteine bekannt, IκBα, IκBβ, IκBγ IκBε, Bcl-3 und die NF-κB-Vorläufer p100 und p105 (Schmitz et al., 2004).
Gemeinsam sind den IκB-Proteinen fünf bis sieben Wiederholungen einer Ankyrin-Sequenz sowie verschiedene Phosphorylierungsstellen (Ausnahme Bcl-3). Ankyrin-Sequenzen dienen zur Interaktion mit anderen Proteinen, in diesem Fall zur Interaktion mit der RHD, der NF-κB-Proteine (Huxford et al., 1998; Jacobs and Harrison, 1998), wodurch die Kern-Lokalisationssequenzen der NF-κB-Dimere maskiert werden. Dies verhindert, dass NF-κB in den Zellkern wandert und dort an die DNA bindet.
Die Phosphorylierungsstellen der IκB-Proteine befinden sich im N-Terminus und sind von entscheidender Bedeutung für den Abbau der IκB-Proteine und somit für die NF-κB-Aktivierung.
Neben den strukturellen Gemeinsamkeiten gibt es auch Unterschiede zwischen den IκB-Proteinen, z.B. was ihre Bindung an die verschiedenen NF-κB-Dimere und ihren Wirkungsmechanismus betrifft. Im N-Terminus von IκBα, IκBβ und IκBε befinden sich Sequenzen, die für den stimulus-abhängigen Abbau dieser IκB-Proteine benötigt werden und auch als signalresponsive Domänen bezeichnet werden.
IκBα interagiert mit allen RelA, RelB oder c-Rel enthaltenden NF-κB Dimeren, nicht

jedoch mit p50- oder p52-Homodimeren. Eine weitere Besonderheit ist, dass IκBα außer im Zytoplasma auch im Zellkern zu finden ist und es eine „nuclear export sequence“ (NES) besitzt, wodurch es aktives NF-κB inaktivieren und aus dem Kern zurück ins Zytoplasma transportieren kann (Huang et al., 2000; Johnson et al., 1999). Außerdem wird der Promotor von IκBα von NF-κB angesprochen, dies entspricht einem negativen Feedback Mechanismus (Chiao et al., 1994).

IκBβ ist nur in der Lage mit Dimeren zu interagieren welche RelA enthalten. Im Unterschied zu IκBα verläuft seine Degradation langsamer und es wird auch später resynthetisiert (Thompson et al., 1995).

IκBε scheint spezifisch für RelA und c-Rel enthaltende NF-κB Dimere zu sein (Li und Nabel, 1997; Simeonidis et al., 1997). IκBε ist wie IκBα NF-κB abhängig reguliert, allerdings findet seine Resynthese langsamer statt (Li und Nabel, 1997; Whiteside et al., 1997), was zu einer längeren Transkription der Gene durch NF-κB führt.

IkBα entsteht durch einen alternativen Promotor aus der C-terminale Domäne von p105 (Beinke et al., 2004).

Eine Sonderstellung nimmt das Protooncogen Bcl-3 ein, da es mit p50- und p52-Homodimeren nicht nur die Transkription hemmen, sondern auch transkriptionsaktivierende Komplexe bilden kann (Bours et al., 1993; Fujita et al., 1993).

1.1.3 NF-κB Signalwege

Verschiedenste Signale (z.B. TNFα, LPS, BAFF, UV-Licht) können die Aktivierung von NF-κB induzieren, doch erfolgt dies nicht immer über die gleiche Signalkette. So werden heute drei Wege der NF-κB Aktivieung unterschieden, der klassische, der alternative und der atypische Signalweg. Alle drei münden in einer NF-κB Aktivierung durch die Freisetzung der NF-κB Dimere von den IκB-Proteinen.

1.1.3.1 Der klassische Signalweg

Der klassische oder auch kanonische Signalweg der NF-κB Aktvierung, basiert auf der Aktivierung des IκB Kinase Komplexes (IKK). Dieser IKK Komplex besteht aus zwei

Kinasen, IKK1 und IKK2, sowie aus einer regulatorischen Komponente, IKKγ/NEMO (NF-κB essential modifier). Die Kinaseaktivität, die für die Degradation von IκB-Proteinen verantwortlich ist, geht in erster Linie von der IKK2-Untereinheit aus.

Eines der bestuntersuchten Signale, die zu einer Aktivierung über den klassischen NF-κB Signalweg führen, ist der Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α), weshalb der klassisch Signalweg auch an diesem Beispiel erklärt werden soll.

Bindet TNF-α an den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1), so bewirkt dies die Rekrutierung des Adaptor-Proteins TRADD (TNF receptor-associated death domain). Ist TRADD an den Rezeptor gebunden führt dies wiederum dazu, dass die beiden Adaptor-Proteine TRAF2 (TNF receptor-associated Factor 2) und RIP (receptor interacting protein) ebenfalls rekrutiert werden. Von den beiden Adaptor-Proteinen ist nur RIP essentiell für die NF-κB-Induktion durch TNF-α, dies wurde dadurch gezeigt, dass der komplette Verlust der NF-κB Aktivierung in RIP-defizienten, nicht jedoch in TRAF2-defizienten Mäusen auftritt (Kelliher et al., 1998; Yeh et al., 1997).

Ist der IκB-Kinase Komplex zum TNF-α-Rezeptor gebracht, wird er dort phosphoryliert und dadurch aktiviert. Die IKK2 im aktivierten Komplex phoshoryliert nun die beiden spezifischen Serin-Reste 32 und 36 des IκB-Proteins, das dadurch von einer SCF-Ubiquitin-Ligase ubiquitinyliert werden kann. Das ubiquitinylierte IκB-Protein wird damit dem Abbau durch das Proteasom zugeführt. Wegen der nun freiliegenden NLS wird das aktive NF-κB Dimer in den Kern transportiert, wo es an κB-Sequenzen bindet und mit verschiedenen Co-Aktivatoren eine Transktiption NF-κB-abhängiger Gene induziert (Schmitz et al., 2004).

1.1.3.2 Der alternative Signalweg

Der alternative oder auch nichtkanonische Signalweg unterscheidet sich durch die Art der freigesetzten NF-κB/Rel-Dimere und durch die Zusammensetzung des IKK-Komplexes (hier ein IKK1-Homodimer). Dieser Signalweg ist unabhängig von IKKγ/NEMO (Senftleben et al., 2001) und führt zur Freisetzung von p52/RelB.

Signale wie BAFF, Lymphotoxin α/β, CD40L und andere Aktivatoren des alternativen Aktivierungswegs führen zu einer Aktivierung der NF-κB-inducing kinase (NIK), welche eine Phosphorylierung von IKK1 Proteinen bewirkt. Sehr wahrscheinlich katalysieren

aktivierte IKK1 Homodimere die Phosphorylierung der IκB-Domäne von p100, was die Ubiquitinylierung und Prozessierung von p100 zu p52 durch das Proteasom ermöglicht. Der so aktivierte p52/RelB-Komplex wird entsprechend dem klassischen Signalweg in den Zellkern transportiert und kann dort seine Zielgene regulieren.
Der alternative Signalweg kommt vor allem in B-Lymphozyten vor und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung sekundärer lymphatischer Organe (Senftleben et al., 2001; Ghosh und Karin, 2002).

1.1.3.3 Atypische Signalwege

Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung von NF-κB ist unabhängig vom IKK-Komplex und erfolgt über MAP-Kinasen und die Casein-Kinase II (CKII), auch weitere Kinasen werden vermutet, die IκB-Proteine phosphorylieren können (Schmitz et al., 2004; Perkins et al., 2006).
Der atypische Signalweg von NF-kB erfolgt als Antwort auf DNA Schäden, so gehören kurzwelliges UV-Licht und einige als Chemotherapeutika verwendete Substanzen zu den Aktivatoren dieser Signalkaskade. Für Doxorubicin wurde gezeigt, dass es zu einer schnellen Degradation von IκBα durch das Proteasom führt, ohne dabei die Phosphorylierung von Serin 32 und 36 von IκBα zu benötigen (Tergaonkar et al., 2003). Die NF-κB Aktivierung durch UV-Licht erfolgt durch die Rekrutierung einer p38 MAP-Kinase, die über die Aktivierung der CKII zu einer massiven Phosphorylierung von IκBα an seinem C-Terminus führt (Kato et al., 2003).

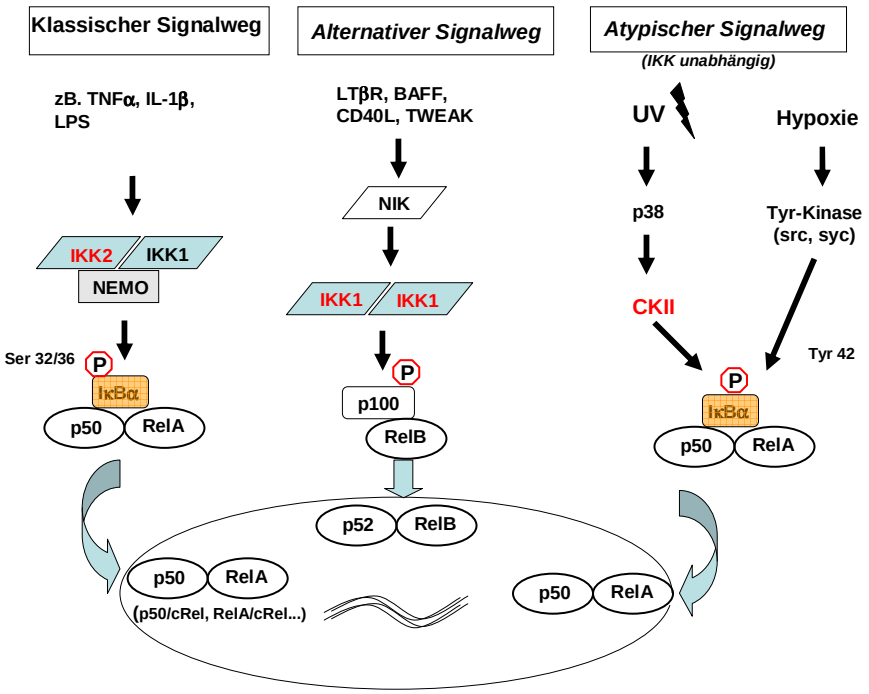


Abbildung 2: NF-κB Signalwege: Rechts ist der klassische, in der Mitte der alternative und rechts der atypische Signalweg dargestellt. Der klassische Signalweg kann über TNF-a, IL-1 und LPS induziert werden und führt zur Aktivierung von p50/RelA-Heterodimeren. Der alternative Signalweg kann über LTβR, CD40L, BAFF und TWEAK aktiviert werden und führt über NIK/IKK1 zur Prozessierung von p100; nachfolgend gelangen p52/RelB-Heterodimere in den Zellkern.Der atypische Signalweg wird durch UV-Licht oder Hypoxie induziert und führt zur Aktivierung von p50/RelA-Heterodimeren (nach Ghosh und Karin, 2002).(P: phosphoryliert, Ser: Serin, Tyr: Tyrosin)

1.1.4 „Knock-out“- und transgene Modelle des NF-κB-Systems

Um die Funktion der verschiedenen Komponenten des NF-κB-Systems in vivo näher zu untersuchen, wurden „Knock-out“-Mausmodelle generiert. So wurden bereits für sämtliche Rel/NFκB-Proteine, die IκB-Proteine und auch für die Komponenten des IKK-Komplexes, defiziente Mäuse untersucht.

RelA defiziente Mäuse wiesen eine starke Apoptose von Hepatozyten auf, die zu embryonaler Letalität 15 bis 16 Tage nach Befruchtung führte (Beg et al., 1995). Dies scheint an einer erhöhten Sensitivität für TNF-α zu liegen. Denn bei Mäusen, denen zusätzlich zu RelA auch das Gen für TNFR1 fehlt, blieb die erhöhte Apoptoserate aus, und sie konnten sich normal entwickeln (Doi et al., 1999). Diese Befunde sprechen für eine große Bedeutung von RelA in der Regulation der Apoptose. Bei gleichzeitigem Fehlen von

RelA als auch dem Gen für den TNF-α Rezeptor zeigte sich eine gestörte Entwicklung sekundärer lymphoider Organe (Alcamo et al., 2002)

Bei der Untersuchung von RelB defizienten Mäusen zeigten sich verschiedene immunologische Defekte wie eine T-Zellabhängige myeloide Hyperplasie, Splenomegalie durch extramedulläre Hämatopoese und Struktur Veränderungen des Thymus (Burkly et al., 1995; Weih et al., 1995). Im Gegensatz zu den T-Zellen wirkte sich das Fehlen von RelB nicht auf die B-Zellentwicklung aus, obwohl RelB in reifen B-Zellen stark exprimiert ist (Pettit et al., 1997). Die Folgen der RelB Defiziens lassen darauf schließen, dass RelB für viele Immunfunktionen von Bedeutung ist.

Für c-Rel, das überwiegend in Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert wird, zeigten sich auch Störungen in eben diesem System. So weisen c-Rel defiziente Mäuse einen Defekt in der Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen auf (Kontgen et al., 1995; Gerondakis et al., 1996). Bei B- als auch bei T-Zellen findet sich eine Störung in der Proliferation, nicht aber in ihrer Differenzierung.

Verschiedene immunologische Defekte zeigen sich auch bei NF-κB1 defizienten Mäusen. Dies betrifft vor allem B-Zellen, nicht aktivierte B-Zellen sterben schneller und ihre Proliferation ist gehemmt (Grumont et al., 1998). Auch sind die B-Zellen nicht mehr im Stande, auf Antigenstimulation zu reagieren oder das „switching“ der Isotypen durchzuführen (Snapper et al., 1996).

Die prozessierte Form von NF-κB2, das p52, bildet hauptsächlich mit RelB Dimere. Deswegen ähnelt der Phänotyp von NF-κB2 defizienten Mäusen wohl auch dem der RelB defizienten. Es konnten Defekte in der Bildung der Marginalzone und der Keimzentren nachgewiesen werden (Caamano et al., 1998; Franzoso et al., 1998).

Um Erkenntnisse zu gewinnen, inwieweit sich die einzelnen NF-κB-Proteine ergänzen oder im Falle des Fehlens eines Genes auch ersetzen können, wurden auch Untersuchungen an Mäusen vorgenommen, denen mehrere NF-κB-Proteine fehlen. Mäuse denen NF-κB1 und NF-κB2 fehlt, zeigen einen Defekt in der Knochenentwicklung durch Störung der Differenzierung von Osteoklasten (Franzoso et al., 1997). Fehlt neben dem Gen für NF-κB1 auch das für RelA, so führt dies zu massiven B-Zell Defekten (Horwitz et al., 1997).

Die gleichzeitige Abwesenheit von NF-κB1 und RelB führt zu einer Verstärkung der inflammatorischen Infiltrate und damit zu einem frühen Tod der Mäuse (Weih et al., 1997). NF-κB1 und c-Rel defiziente Mäuse zeigen verstärkte Defekte bei der B-Zell Proliferation und dem „switching“, nicht aber bei der Entwicklung der B-Zellen (Grossmann et al.,

1999).

Um Aufschluss zu erhalten, welche Auswirkungen eine fehlende oder konstitutive Hemmung von NF-κB hat, wurden auch Knock-out- und transgene Mauslinien für die IκB-Proteine generiert.

Dabei zeigen IκBα defiziente Mäusen schwere Entzündungen der Haut und eine starke Granulozytose, wodurch sie 7 bis 10 Tage nach ihrer Geburt sterben (Beg et al., 1995). Dies wird erklärt durch die erhöhte Expression proinflammatorischer Faktoren, bedingt durch die konstitutive NF-κB Aktivität. Bei genaueren Untersuchungen zeigte sich, dass die erhöhte NF-κB Aktivität Zelltyp spezifisch ist. Wurden die Lymphozyten aus neugeborenen IκBα- defizienten Mäusen untersucht, ergab sich, dass die Differenzierung der B- und T Zellen beschleunigt ist und diese stärker aktiviert sind (Chen et al., 2000).

Für IκBα wurden nicht nur Knock-out Mäuse generiert, sondern auch transgene Mäuse mit einem mutiertem IκBα, welches nicht degradierbar ist. Bei systemischer Expression des Transgens sind diese Mäuse nicht in der Lage, Haarfollikel, Schweiß- und Tränendrüsen zu bilden, was den Symptomen der humanen hypohydrotischen ektodermalen Dysplasie ähnelt.

Bei einer Deletion des Genes für IκBε zeigt sich eine Reduktion unreifer Thymozyten (Memet et al., 1999), also ein wesentlich milderer Phänotyp als bei IκBα Knockout´s.

Mäuse mit einer Defizienz für Bcl-3 weisen eine normale Entwicklung auf, zeigen aber Defekte der B- und T Zellen bei der Immunantwort auf Antigene (Franzoso et al., 1997).

Auch für die Mitglieder der IKK Familie, IKK1, IKK2 und IKKγ/Nemo, wurden Knockout Mäuse generiert und untersucht. Während die IKK1 defizienten Tiere wenige Stunden nach Geburt sterben, führt das fehlen von IKK2 oder IKKγ/Nemo bereits in embryonalen Stadien zum Tod (Rudolph et al., 2000; Makris et al., 2000). Bei den IKK1 defizienten Tiere scheinen Defekte in der Hautdifferenzierung eine wesentliche Rolle zu spielen, was in einer verdickten und stark adhärierenden Epidermis resultiert. Dadurch wachsen bei den Mäusen die Gliedmaßen nicht richtig aus, bei sonst normaler Entwicklung des Skeletts (Hu et al., 1999).

IKK2 und IKKγ/Nemo Knockout Mäuse zeigen ein ähnliches Bild wie die RelA defizienten Mäuse, sie sterben während ihrer Embryonalentwicklung aufgrund der Apoptose von Hepatozyten (Li et al., 1999). Wie bei RelA lässt sich auch hier durch das zusätzliche Fehlen von TNFR1 die Letalität aufheben (Rudolph et al., 2000).

Bei den IKKγ/Nemo defizienten Mäusen sind von diesem Phänotyp ausschließlich Männchen betroffen, da IKKγ X-chromosomal vererbt wird und somit in Männchen schon

ein mutantes Allel ausreicht, um die Symptome hervorzurufen. Heterozygote Weibchen zeigen einen Hautphänotyp, der durch inflammatorische Infiltration, erhöhte Proliferation und Apoptose von Keratinozyten gekennzeichnet ist (Makris et al., 2000; Schmidt-Supprian et al., 2000). Diese Symptome ähneln der humanen Incontinentia Pigmenti, und in der Tat konnte bewiesen werden, dass in betroffenen Individuen das Gen für IKKγ mutiert ist (Smahi et al., 2000)

1.1.5 NF-κB im Zentralnervensystem

Die zentralen Aufgaben des Nervensystems sind die Verarbeitung, Weiterleitung und Speicherung von Informationen. Um diese komplexen Anforderungen zu erfüllen, werden hoch spezialisierte Zellen benötigt. Neurone sind in der Lage Informationen zu empfangen, weiterzuleiten und auch zu speichern. Auf welche Weise diese Mechanismen beeinflusst oder reguliert werden ist noch nicht vollständig aufgeklärt worden. Es wird vermutet, dass auch NF-κB in die Vorgänge im Zentralnervensystem (ZNS) eingreift, und auch dort eine wichtige Rolle spielt.

Zahlreiche Befunde lassen bereits auf wichtige Funktionen von NF-κB im ZNS schließen. So wurden bereits κB-bindende Proteine beschrieben, die nur im Gehirn vorkommen wie der „brain specific transcription factor“ (BETA), der „neuronal κB-binding factor“ (NKBF) und verschiedene „developing brain factors“ (Koerner et al., 1989; Cauley et al., 1994; Moermann et al., 1999). Es wurde auch gezeigt, dass im Nervensystem induzierbares NF-κB meist in der Form von zwei Untereinheiten vorkommt, RelA/p50 oder p50/p50. In kortikalen Neuronen wurde eine konstitutive nukleäre NF-κB Aktivität entdeckt, die auf RelA/p50 Dimeren beruht und möglicherweise neuroprotektive Wirkung hat (Kaltschmidt et al., 1994). Für RelB wurde gezeigt, dass es mit Ausnahme von Zonen aktiver Neurogenese, im ZNS nicht expremiert wird (Denis-Donini et al., 2005), was darauf hinweist, dass der alternative Signalweg in Neuronen kaum zum tragen kommt.

Für die Aktivierung von NF-κB in Neuronen und Glia-Zellen wurden einige Faktoren identifiziert (Kaltschmidt et al., 2005), darunter Stimuli wie Neurotransmitter, Neurotrophine und die Membrandepolarisation (Mattson et al., 2000).

Für den Neurotransmitter Glutamat ist der Aktivierungsmechanismus von NF-κB untersucht worden. Dabei zeigte sich, dass besonderst die Aktivierung des Glutamat

Rezeptors vom NMDA-Typ (hemmbar durch N-Methyl-D-Aspartat) Einfluss auf die NF-κB Aktivität nimmt. Wird der Rezeptor durch Glutamat aktiviert, verursacht dies eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels. Dieser erhöhte intrazellulären Ca^{2+}-Spiegel bewirkt eine autophosphorylierung der Calmodulin-abhängigen Proteinkinase CamKII an Threonin 286 (Ouyang et al., 1997), wodurch die CamKII in einen Calmodulin unabhängigen, aktiven Status übergeht. Dass CamKII in Neuronen NF-κB aktivieren kann, wurde gezeigt (Lilienbaum und Israel, 2003; Guerrini, 1997), nur der genaue Mechanismus ist bisher noch ungeklärt. Angenommen wird hierfür eine Einbeziehung des Proteasoms, da eine gesteigerte Aktivität des postsynaptischen Proteasoms nach neuronaler Stimulation nachgewiesen werden konnte (Ehlers, 2003).

Ein weiterer Faktor, der zu einem Anstieg der NF-κB-Aktivität im ZNS beiträgt, ist oxidativer Stress (speziell O_2^-, H_2O_2 und NO), etwa bei neurodegenerativen Erkrankungen. Auch Amyloid-β und seine Vorläufer erhöhen die NF-κB-Aktivität, was im Zusammenhang mit Alzheimer untersucht wird. Ebenso wie Aktivatoren sind auch etliche Inhibitoren der NF-κB-Aktivität im ZNS bekannt, z.B. antiinflammatorische Cytokine wie TGFβ oder IL-10, aber auch pharmakologisch verwendete Stoffe wie Acetylsalicylsäure oder Glucocorticoide haben eine hemmende Wirkung auf die NF-κB Aktivität im ZNS. Auf welche Weise diese Stoffe NF-κB im ZNS hemmen ist noch nicht geklärt worden, als mögliche Erklärung wird die Induktion der Transkription von IκB-Proteinen diskutiert (Camandola et al., 2000).

Neben den spezifischen Einflüssen auf die Aktivität von NF-κB im ZNS, wurde auch der Einfluss von NF-κB auf die Transkription von Genen im ZNS untersucht. In einer Microarray-Untersuchung von menschlichen Glioblastom-Zellen wurde für über 880 von 7500 betrachtete Gene eine TNF-abhängige Expression nachgewiesen. TNF als bekannter Induktor von κB. Bei einem Vergleich der durch TNF induzierten Genexpression in den Glioblastom-Zellen mit Zellen, die nicht dem Nervensystem entstammen, zeigten sich wesentliche Zelltyp-spezifische Unterschiede. In einigen Fällen war die TNF induzierte Transkription durch PDTC, einem Inhibitor des NF-κB Systems, beeinflussbar, was einen Hinweis auf eine mögliche NF-κB abhängige Transkription liefert (Schwamborn et al., 2003). In weiteren Untersuchungen wurde für einige Gene eine ZNS-spezifische NF-κB Regulation nachgewiesen, zu diesen gehören NCAM, der brain-derived growth-factor (BDGF), Cyclooxygenase II, die Calmodulin abhängige Kinase CAMKII, das Amyloid-Vorläuferprotein, der μ-Opioid-Rezeptor und die induzierbare Stickoxid Synthase (iNOS) (Meffert und Baltimore, 2005).

Die Rolle von NF-κB in Neuronen und Gliazellen lässt sich nur schwer differenzieren. Aufschluß über diese Frage könnten am ehesten Untersuchungen an Knockout Mäusen mit spezifischen Zelltypen ergeben.
Auf die bisherigen Erkenntnisse der Wirkung von NF-κB im ZNS, vor allem in Bezug auf Apoptose und die synaptische Plastizität, soll im Weiteren noch näher eingegangen werden.

1.1.5.1 Die Rolle von NF-κB bei pro- und anti-apoptotische Mechanismen im ZNS

Die Frage ob NF-κB im ZNS eine schützende Wirkung hat oder sogar pro-apoptotisch wirkt wurde noch nicht abschließend geklärt, bisher liegen zu diesem Thema widersprüchliche Befunde vor.
Erste Befunde zeigten eine neuroprotektive Wirkung für TNF (Cheng et al., 1994). Kurze Zeit später wurde durch mehrere weiterführend Untersuchungen gezeigt, dass die TNF induzierte NF-κB Aktivierung Neurone vor excitotoxischem Stress und neurotoxischem Amyloid-β schützten kann (Barger et al., 1995; Kaltschmidt et al., 1999).
Amyloid-β Plaques sind charakteristisch für den Morbus Alzheimer, eine neurodegenerative Erkrankung. Bei der Untersuchung solcher Amyloid-β Plaques von Alzheimer Patienten, im Vergleich zu Kontrollobjekten, wurde eine verminderte NF-κB Aktivität um diese Plaques bei den Alzheimer Patienten festgestellt (Kaltschmidt et al., 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der NF-κB Aktivität die neuronale Apoptose durch Amyloid-β verstärkt (Kaltschmidt et al., 1999). Aufgrund dieser Befunde wird dem NF-κB Signalweg eine wichtige neuroprotektive Funktion in Zusammenhang mit dem Morbus Alzheimer zugesprochen (Mattson, 2004).
Auch für Glutamat aktivierbare Neurone wurde NF-κB eine protektive Rolle zugesprochen, es wurde gezeigt, dass eine basale NF-κB Aktivität, die normalerweise durch die Glutamat-abhängige Grundaktivität der Neuronen sichergestellt ist, für deren Überleben notwendig ist (Barger et al., 2005).
Weitere Argumente für eine neuroprotektive Wirkung von NF-κB liefern Befunde die zeigen, dass Zielgene von NF-κB Apoptose Inhibitoren (Wang et al., 1998) und Antioxidantien (Keller et al., 1998) sind.

Diesen Befunden gegenüber stehen aber Arbeiten die NF-κB eine pro-apoptotische Funktion im Nervensystem zusprechen. So wurde gezeigt, dass IKK nach Ischämie zu vermehrter Aktivierung neuronaler Apoptose führt (Herrmann et al., 2005). In primären Neuronen die genotoxischem Stress ausgesetzt wurden, konnte durch Blockade der NF-κB Aktivierung eine neuroprotektive Wirkung erzielt werden (Aleyasin et al., 2004). Für den Morbus Parkinson wurde eine erhöhte NF-κB Aktivität in dopaminergen Neuronen gezeigt (Hunot et al., 1997). Und zu den von NF-κB regulierten Genen zählen auch solche mit pro-apoptotischer Funktion, wie p53 und c-Myc.
Die widersprüchlichen Ergebnisse auf die Frage, ob NF-κB eine pro- oder anti-apoptotische Wirkung auf Neurone hat, machen deutlich, dass weitere Untersuchungen zur Funktion von NF-κB bei der Regulation der Apoptose im Nervensytem nötig sind. Die Annahme, dass die Funktion von NF-κB durch die Art des Stimulus bestimmt wird, erscheint als sehr wahrscheinlich (Kaltschmidt et al., 2000).

1.1.5.2 Einfluss von NF-κB auf die Signalverarbeitung im ZNS

Zur Übertragung von Informationen zwischen Neuronen dienen die Synapsen. Das Vorkommen und die Funktion von NF-κB an eben diesen Synapsen wurde insbesondere an Synapsen mit Glutamat-Rezeptoren des NMDA-Typs untersucht, denen auch eine Funktion bei Lernvorgängen zugeschrieben wird.
Dabei wurde gezeigt, dass sowohl prä- als auch postsynaptisch in den Dendriten wohl nur das p65/p50-Dimer vorkommt (Meffert et al., 2005). Bei Glutamatstimulation und traumatischen Hirnverletzungen konnte durch die Beobachtung des Dynein-vermittelten Transports von NF-κB in den Zellkern gezeigt werden, dass NF-κB als retrograder Messenger fungiert (Haddad, 2002). Als retrograder Messenger wird ein Signal bezeichnet, welches Informationen von der Synapse zurück an den Zellkern übermittelt und dort zur Genexpression führt. Im Fall von Hirnverletzungen ließ sich hierbei eine bis zu einem Jahr anhaltende Aktivierung von NF-κB im Zellkern nachweisen (Nonaka et al., 1999).
Den Fähigkeiten des Lernens und Erinnerns liegen molekulare Mechanismen zugrunde die noch nicht im Detail entschlüsselt sind. Aryeh Routtenberg stellte die Vermutung an, dass die synaptische Plastizität zur Speicherung von Informationen führt, als Resultat des Dialogs an Synapsen (Routtenberg et al., 2000). Dass sich eine Hemmung des NF-κB

Systems negativ auf die long-term depression (LTD) und long-term potentiation(LTP) auswirkt, kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass NF-κB zur Regulierung der synaptischen Plastizität beiträgt.

Zusammenhänge zwischen Lernen und Erinnerung und dem NF-κB System zeigten sich auch bei verschiedenen Untersuchungen an Tieren mit modulierter NF-κB Aktivität. So wurde bei Untersuchungen von p65-/- TNFR1-/- Mäusen eine verminderte Lernfähigkeit festgestellt (Meffert et al., 2003). Mäuse mit inaktiviertem p50 zeigten geringere Auswirkungen, aber dennoch eine verminderte Lernfähigkeit (Kassed et al., 2002). An Krabben konnte während der Speicherung von Informationen eine erhöhte NF-κB Aktivität nachgewiesen werden (Freudenthal et al., 2000). Auch wurde gezeigt, dass die Konditionierung einer Schreckreaktion bei Ratten von der NF-κB Aktivierung, hier in der Amygdala, abhängig ist (Yeh et al., 2002). Aus einer Hemmung von NF-κB durch IκB in Neuronen resultierte ein Verhaltensdefizit sowie eine verminderte Induktion der LTD und LTP. Dies könnte mit einer reduzierten Phosphorylierung von CREB korrelieren (Kaltschmidt et al., 2006)

1.2 Energiehaushalt und Stoffwechsel

Um das Gleichgewicht zwischen Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch, die Energiehomöostase, aufrechtzuerhalten, haben Säugetiere komplexe Mechanismen entwickelt. Diese Mechanismen werden durch das Zusammenspiel von peripheren und zentralen Botenstoffe reguliert, welche in Tabelle 1 aufgelistet sind.

Unter den Botenstoffen lassen sich prinzipiell zwei entgegengesetzt wirkende Regulationssysteme unterscheiden. Zum einen orexigene Faktoren, welche zu vermehrter Nahrungsaufnahme und Speicherung von Energieträgern im Fettgewebe führen. Und diesen entgegen wirken Faktoren mit anorexigener Wirkung, die zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme und einer Hemmung der Einlagerung von Energie ins Fettgewebe führen.

Der zentrale Punkt der Energiehomöostase ist die Nahrungsaufnahme, zumindest was die kurzfristige Regulation anbelangt. Anreiz zur Nahrungsaufnahme gibt das Gefühl von „Hunger“, welches einen inneren Trieb darstellt. Ist dieser befriedigt, treten Sättigung und Sattheit ein. Sättigung bezeichnet das Ende der Nahrungsaufnahme, Sattheit beschreibt die

Zeitdauer bis zum nächsten Hungergefühl. Das wichtigste Sättigungssignal wird vermittelt durch die Dehnung von Magen und Darm (Plata-Salaman, 1991).

Die langfristige Regulation der Energiehomöostase erfolgt über die Meldung der Energiereserven des Körpers an das Gehirn und die Messung des Energiebedarfs.

Auskunft über die Energiereserven gibt unteranderem das vom Fettgewebe produzierte Hormon Leptin, dessen Spiegel von Rezeptoren am Hypothalamus gemessen werden (Tartalgia et al., 1995; Hamann und Matthaei, 1996; Funahashi et al., 2003).

Tabelle 1: Orexigene und anorexigene Faktoren: Neuropeptide

Orexigen	Neuropeptid Y	**Anorexigen**	ACTH
	AGRP		CRH
	Beta-Endorphin		Urocortin
	Endocannabinoide		Neurotensin
	Orexin A und B		Glucagon like peptide1
	Galanin		CART
	MCH		Alpha MSH
	Hypocretin/orexin		
	Ghrelin		

Tabelle 2: Periphere Hormone mit zentraler Wirkung

Orexigen	Ghrelin	**Anorexigen**	Leptin
	Wachstumshormone		PYY
	Insulin-like growth factor- 1		Insulin
			T3,T4
			Sex hormones
			Cholecystokinin

1.2.1 Der Hypothalamus, Zentrale des Stoffwechsels

Die Nahrungsaufnahme und der Energieumsatz des Körpers werden vom Gehirn aus gesteuert, zentrales Kontrollorgan dabei ist der Hypothalamus.
Der Hypothalamus ist ein Teil des Zwischenhirns, er liegt unter dem Thalamus und bildet den Boden des dritten Ventrikels. Über das Infundibulum ist er mit der Hypophyse verbunden. Innerhalb des Hypothalamus lassen sich eine Reihe von lokalen Ansammlungen von Neuronen, so genannte Kerne abgrenzen, die wiederum in eine vordere, eine mittlere und eine hintere Kerngruppe eingeteilt werden. Weniger gut abgrenzbare Gebiete werden aufgrund ihrer Lage in die periventrikuläre, die mediale und die laterale Zone eingeteilt.
Der Hypothalamus gilt als oberstes Integrationsorgan vegetativer Funktionen, da ihn alle Signale, die über den Körperzustand informieren, also sowohl aus Drüsen als auch aus dem peripheren Nervensystem freigesetzte, erreichen. Dort werden sie mit äußeren Reizen wie Geruch, Geschmack etc. verrechnet. Dieser Prozess wird als Integration bezeichnet (Gellhorn, 1959; Lumb und Lovick, 1993).
Neben der bereits genannten Steuerung der Nahrungsaufnahme ist der Hypothalamus auch verantwortlich für die Aufrechterhaltung und Koordination wichtiger Parameter wie Atmung, Kreislauf, Körpertemperatur und Reproduktionsverhalten. Um seine Aufgaben zu erfüllen, steuert der Hypothalamus zum einen die Hormonabgabe der Hypophyse, und zum anderen besitzt er zahlreiche neuronale Verbindungen zu anderen Hirnzentren.
Für die Steuerung der Nahrungsaufnahme herrschte lange die Vorstellung vor, dass es im Hypothalamus ein ventromediales Sättigungszentrum und ein laterales Hungerzentrum gibt. Angesichts neuer Erkenntnisse ist diese Hypothese nicht mehr zu vertreten. Es wurde entdeckt, dass die beiden Zentren mit dem dorsomedialen hypothalamischen Nukleus, dem Nukleus Arcuatus und dem Nukleus Paraventrikularis verbunden sind. Die Nahrungsaufnahme wird also durch ein komplexes Netzwerk innerhalb des Hypothalamus gesteuert (Jobst et al., 2006).

1.2.2 Neuropeptide

Um Informationen von Zelle zu Zelle weiterzugeben, nutzt der Körper Hormone als

Botenstoffe, auch Nervenzellen nutzen solche Botenstoffe. Zwischen Nervenzellen werden Signale durch Neurotransmitter und Neuropeptide übertragen.
Neuropeptide sind Peptide, die im Zentralnervensystem als Botenstoffe fungieren. Hierbei nehmen sie oft eine Zwischenstellung zwischen Hormonen und reinen Neurotransmittern ein. Ihre Funktion wird teilweise auch als neuromodulatorisch bezeichnet, da sie die Wirkung von anderen Botenstoffen, vor allem Neurotransmittern graduell unterstützen oder hemmen können. Während Neurotransmitter dadurch wirken, dass sie andere Neuronen depolarisieren oder hyperpolarisieren, haben Neuropeptide vielfältige Wirkungsansätze. Sie können unter anderem Einfluss nehmen auf die Expression von Genen, die lokale Durchblutung oder die Morphologie von Glia Zellen (Schwyzer, 1980; Swaab, 1982).
Neuropeptide sind in den Enden von Nervenfasern bestimmter Neurone gespeichert und entfalten ihre Wirkung meist über die Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren.
Aktuell sind etwa 100 verschiedene Neuropeptide bekannt, welche von unterschiedlichen Neuronen Populationen gebildet und freigesetzt werden. Für eine ganze Reihe von Neuropeptiden ist bekannt, dass sie Einfluss auf die Energiehomöostase des Körpers nehmen. Diese an der Regulation der Energiehomöostase beteiligten Neuropeptide sind in Tabelle 1 aufgeführt. Allein die Anzahl der beteiligten Neuropeptide an der Regulation des Energiehaushaltes lässt ein komplexes und differenziell gesteuertes System vermuten.

1.2.2.1 Galanin

Galanin ist ein Neuropeptid ohne Zugehörigkeit zu einer der bekannten Neuropeptidfamilien. Seine Wirkung erfolgt über G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Ionenkanäle, meistens im Sinne einer Inhibition der Sekretion von Hormonen und Transmittern. So inhibiert es die Freisetzung von Dopamin im Hypothalamus, stimuliert aber die von Prolaktin und dem Wachstumshormon (Perumal et al., 2003).
Es kommt häufig in Neuronen zusammen mit GABA, Serotonin und NPY vor, seine Expression ist in der Schwangerschaft erhöht, und es wird auch in der Plazenta gebildet (Vrontakis et al., 1992 und Kleine et al., 2001).
Steroide, NGF und Nervenschäden haben Einfluss auf die Genexpression von Galanin, wobei die höchsten Galanin Konzentrationen in der Amygdala, dem Hypothalamus und

dem Stammhirn auftreten.
Die orexigene Wirkung von Galanin wirkt sich insbesondere in einer Steigerung der Fettaufnahme aus. Darüber hinaus besitzt Galanin eine hyperglykämische Wirkung, bedingt durch die Hemmung der Glukose gesteuerten Insulinfreisetzung (Nielson et al., 1989). Und außerdem scheint Galanin als physiologischer Antagonist der Substanz P zu wirken, da gezeigt wurde, dass es die Schmerzempfindung vermindert (Kuraishi et al., 1991).
Es sind drei verschiedene Galanin Rezeptoren bekannt, sie werden als GALR1, GALR2 und GALR3 bezeichnet. Für GALR1 und GALR2 ist eine Expression in bestimmten Regionen im ZNS bekannt, ebenso wie in peripheren Geweben. Für GALR3 konnte eine Expression in Herz, Milz und Testes nachgewiesen werden (Vrontakis, 2002).

1.2.2.2 Wachstumshormon

Das Wachstumshormon, auch Somatotropin genannt, ist ein Polypeptidhormon, welches im Hypophysenvorderlappen (HVL) gebildet wird und Wachstum und Zellreproduktion stimuliert.
Die Regulation der Sekretion des Wachstumshormons erfolgt direkt mittels Neuropeptide aus dem Hypothalamus, stimulierend durch das GHRH (growth hormone releasing hormone) und hemmend durch das Somatostatin. Dabei unterliegen die hypothalamischen Hormone selbst auch verschiedenen Regelmechanismen. Unter anderem wird Somatostatin α1- und ß2-adrenerg stimuliert. GHRH wird α2-adrenerg und auch durch Dopamin stimuliert, sein Rezeptor (GHRHR) wird auf den somatotrophen, Wachstumshormon bildenden, Zellen des Hypophysenvorderlappens exprimiert. Das Wachstumshormon selbst (wie auch IGF-1) wirkt direkt stimulierend auf Somatostatin und begrenzt somit seine eigene Ausschüttung. IGF-1 hemmt die Wachstumshormon-Ausschüttung direkt auf hypophysärer Ebene.
Zahlreiche Substanzen im Stoffwechsel bewirken eine Modulation der Wachstumshormon-Freisetzung und -Wirkung, wie Aminosäuren (z.B. Arginin), Insulin, Ghrelin, Kohlenhydrate, Schilddrüsenhormone und Sexualhormone. Die Insulin-vermittelte Hypoglykämie ist beispielsweise ein starker Stimulationsreiz der Wachstumshormon-Sekretion. Der Transkriptionsfaktor Pit1 ist verantwortlich für die Differenzierung der

somatotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens (Simmons et al., 1990), fehlt die Pit1 Expression während der Hypophysenentwicklung, resultiert daraus ein Mangel an Wachstumshormon.

Die Wachstumshormon-Ausschüttung erfolgt pulsatil über den Tag verteilt, jedoch mit nächtlichen Maximalwerten im Schlaf. Als endokrines Hormon wird das Wachstumshormon zu den Zielzellen durch Transportproteine, die Wachstumshormonbindungsproteine (GHBP), befördert. An den Zielzellen wirkt es über die Bindung an einen spezifischen Rezeptor (GHR).

Das Wachstumshormon vermittelt anabole, lipolytische, kohlenhydrateinsparende und wachstumsfördernde Effekte. Diese werden zumeist über weitere Faktoren, insbesondere IGF-1, vermittelt. Jedoch wurden auch unmittelbare Wirkungen des Wachstumshormons auf Knorpel und Fettgewebe nachgewiesen. In Gewebekulturen regt es die Mitose an. So werden beispielsweise proliferationsfähige Knorpelzellklone selektiert, die dann unter IGF-1-Einwirkung expandieren und proliferieren (Isaakson et al., 1990; Laron, 2001). Das Wachstumshormon bewirkt zudem einen, das Wachstum erst ermöglichenden Zustand im Energiehaushalt der Zellen und Gewebe. Diese anabolen Effekte werden durch Aufnahme von Aminosäuren in die Zelle erreicht, hier besteht ein partieller Insulinsynergismus. Durch die Lipolyse kommt es zur Freisetzung von Dihydroxyacetonphosphat, welches für die Glukoneogenese genutzt wird. In physiologischer Konzentration wirkt es insulinantagonistisch durch Hemmung der Glukoseaufnahme in die Zelle. Allerdings wird durch das Wachstumshormon auch Insulin aus dem Pankreas freigesetzt. In pharmakologischer Dosis (z.B. bei therapeutischer Wachstumshormon-Substitution) hat das Wachstumshormon sogar einen insulinähnlichen Effekt (Glukose- und Aminosäurenaufnahme in die Zelle, Hemmung der Lipolyse).

1.2.3 Insulin und seine Signalwege

Insulin ist das wichtigste anabole Hormon des Organismus, seine Funktion besteht in der Regulation von Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel, es nimmt aber auch Einfluss auf die Regulation von Zellwachstum und Proliferation. Insulin entfaltet seine vielfältigen Wirkungen in allen Geweben. Gebildet wird Insulin in den β-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas. Es ist ein Peptidhormon aus 51 Aminosäuren bestehend aus einer A-

und einer B-Kette, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.
Zur Sekretion von Insulin kommt es, wenn die Blutglukosekonzentration über 4 mmol/l ansteigt. Daraufhin greift Insulin an etlichen Stellen in den Stoffwechsel ein, seine Wirkungen entfaltet sich, je nach Signalweg, sehr schnell oder zeitlich verzögert.
Zu den schnellen Wirkungen zählen die Steigerung der Glucose Aufnahme in Muskel und Adipocyten sowie die Aktivierung der Glycogensynthase. Auch die Hemmung der Lipolyse und der Glycogenolyse erfolgt sehr schnell, beide werden durch eine Verminderung der cAMP-Konzentration erreicht. Langsamer erfolgende Insulinwirkungen hingegen sind solche, die die Induktion von Enzymen benötigen, wie z.B. die Induktion der Lipoproteinlipase, welche für die Triacylglycerinbiosynthese zuständig ist oder die Hemmung der Gluconeogenese und die Stimulierung der Glycolyse.
Der Insulinrezeptor ist ein tetrameres Transmembranprotein aus zwei α- und zwei β-Untereinheiten. Er gehört zur Familie der Tyrosinkinase- Rezeptoren. Insulin bindet an seine α- Untereinheiten und führt damit zur Phosphorylierung von Tyrosylresten an den β-Untereinheiten. Wird der Insulinrezeptor durch Insulin aktiviert, so werden in der Zelle mehrere Substrate an ihren Tyrosylresten phosphoryliert, darunter die Insulin-Rezeptor-Substrate 1-4 (IRS1-4) sowie die Shc Adapter Protein Isoformen, Gab-1, APS und Cbl. Die Aktivierung dieser Proteine führt zu unterschiedlichen Signalwegen, auf den IRS- und den Cbl Signalweg soll im Weiteren kurz eingegangen werden.
Die Phosphorylierung von IRS aktiviert den Phosphoinositol-3 Kinase (PI3K) Signalweg. Dies erfolgt über eine Interaktion von IRS mit der regulatorischen Untereinheit p85 von PI3K. Dadurch entfaltet PI3K seine enzymatische Aktivität an der Plasmamembran, wo es Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) bildet. Eine Inhibierung von PI3K durch Wortmannin blockiert die Insulin bedingte Glukose Aufnahme in die Zelle komplett (Okada et al, 1994), was die Rolle von PI3K unterstreicht. In der Folge führt eine erhöhte Konzentration von PIP3 zur Aktivierung weiterer Kinasen, darunter Akt und Protein Kinase C. Akt wird an seinem Serinrest 473 phosphoryliert (Sarbassov et al., 2005), was im Weitern eine Steigerung des Glucose Transports, als auch der Glycogen Synthese bewirkt (Jiang et al., 2003). Die zentrale Funktion von Akt im Insulin Signaling wurde anhand von Studien mit reduziertem Akt in Mäusen gezeigt (Cho et al., 2001; Jiang et al., 2003).
Es wurde gezeigt, dass Insulin in sensitiven Zellen die Phosphorylierung des Protooncogens Cbl bewirkt (Ribon et al., 1997), dies geschieht über das Adapterprotein APS. Der Insulinrezeptor bindet APS an eine β-Untereinheit, wo es phosphoryliert wird

(Hu et al., 2003). APS rekrutiert daraufhin Cbl über eine SH2 Domäne, was zu einer Phosphorylierung von Cbl an drei Tyrosinresten führt (Liu et al., 2002). In Fett- und Muskelgewebe führt der Cbl/CAP Signalweg zum Einbau des Glucosetransporters GLUT4 in die Zellmembran, und damit zu einer gesteigerten Glucoseaufnahme, was Anlass dazu gibt, ihn als parallelen Signalweg zu dem PI3K- Signalweg zu betrachten.
Für Insulin sind nicht nur Wirkungen in peripheren Geweben bekannt, sondern es wurde auch gezeigt, dass Insulin die Neuropeptidexpression im Hypothalamus und die Nahrungsaufnahme beeinflusst (Schwartz et al., 1992 und Baskin et al., 1999).

1.2.4 Verbindungen von NF-κB zur Steuerung der Energiehomöostase

Bislang gibt es keine Befunde die belegen, dass das NF-κB System Einfluss auf die zentralnervöse Steuerung der Energiehomöostase nimmt. Es gibt aber Hinweise, die auf mögliche Verbindungen schließen lassen.
Für das NPY-Y und das Galanin-1-Rezeptor Gen konnte gezeigt werden, dass sie funktionelle Bindungsstellen für NF-κB in ihren regulatorischen Sequenzen aufweisen (Lorimer et al., 1997 und Musso et al., 1997). Da sowohl NPY als auch Galanin orexigene Faktoren sind, könnte eine verringerte Expression von NPY oder auch dem Galanin-1-Rezeptoren zu einer Abschwächung des orexigenen Effektes führen.
Auch bei dem Signalweg von α-MSH, einem anorexigen Neuropeptid, wurde eine Verbindung zum NF-κB System gezeigt. Von α-MSH induzierte Signalwege vermitteln ihre anorexigene Wirkung über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Hierdurch kommt es zu einer Blockierung der NF-κB Aktivierung (Ichiyama et al., 1999). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Inhibition von NF-κB an der anorexigenen Wirkung von α-MSH beteiligt ist.
Insulin hemmt im Hypothalamus die Expression von NPY, woraus eine verminderte Nahrungsaufnahme resultiert (Schwartz et al., 1992). Es wurde eine direkte Verbindung zwischen dem Insulinsignalweg und der IKK2 beschrieben (Kim et al., 2001). Hierbei wurde gezeigt, dass eine Überexpression von IKK2 zu Insulinresistenz führen kann, so wie umgekehrt eine Inhibition von IKK2 eine bestehende Insulinresistenz aufheben kann.
In neueren Untersuchungen wurden weitere Zusammenhänge des NF-κB Systems mit Insulinresistenz gefunden (Dongsheng et al., 2005 und Arkan et al., 2005), diese machen

eine erhöhte NF-κB Aktivität verantwortlich für gesteigerte Insulinresistenz.

1.3 Transgene Mauslinien mit veränderter neuronaler IKK2 Funktion

Die vorliegende Arbeit basiert auf der Untersuchung zweier transgener Mauslinien, welche in der Abteilung generiert wurden. Es wurde sowohl eine dominant-negative Version von IKK2 (IKK2-DN) als auch eine konstitutiv-aktive Form von IKK2 (IKK2-CA) eingesetzt.
Es wurde ein Tetrazyklin reguliertes Genexpressionssytem (Tet-Off-System) verwendet, welches eine konditionale Regulation der IKK2 Aktivität ermöglicht. Dabei steht die Expression des mutanten IKK2-Proteins wie auch der Luziferase unter der Kontrolle des tet-Operators. Um eine Neuronen-spezifische Expression zu bewirken, steht das Tetrazyklin-regulierte Aktivatorprotein (tTA) unter der Kontrolle des Cam-KinaseII Promotors, dies wurde erreicht durch Kreuzung mit der Linie α-CaMKII-tTA.
Doppelt transgene Mäuse (α-CaMKII-tTA x luciferase-(tetO)7-IKK2-DN) werden IKK2-DN +/+ genannt, bzw. IKK2-CA +/+ im Fall von (α-CaMKII-tTA x luciferase-(tetO)7-CA-IKK2). Analysen der Transgenexpression in doppelt transgenen IKK2-DN Mäusen zeigten ein Expressionsmuster mit massiver Überexpression im Cortex, Striatum und Hippokampus und deutlicher Expression in den olfaktorischen Bulbi, Hypothalamus, Thalamus und Mittelhirn.

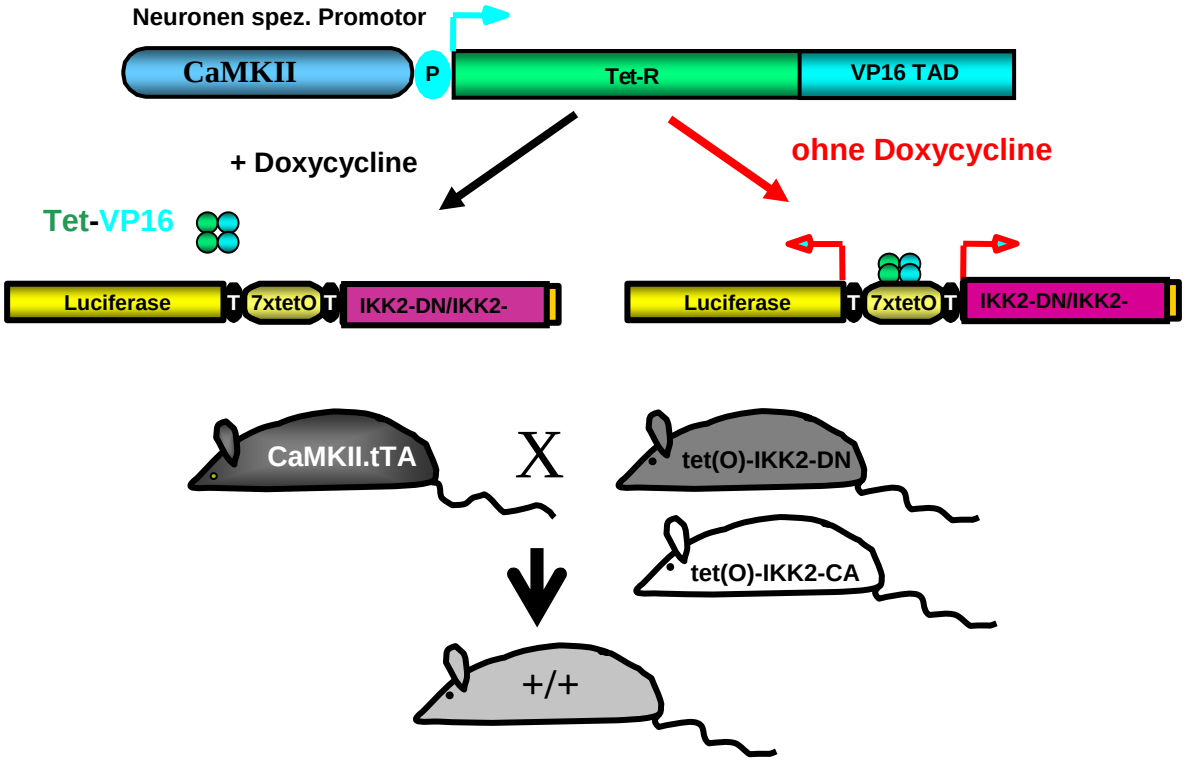


Abbildung 3: Schematische Darstellung der transgenen Mausmodelle. (DN: dominant negativ, CA: konstitutiv aktiv, tet(O): Tetrazyklin reguliertes Genexpressionssytem (Tet-Off-System), tTA: Tetrazyklin-regulierte Aktivatorprotein, CaMKII: Cam-KinaseII Promotor)

Die IKK2-DN Mäuse, also die Tiere mit einer blockierten NF-κB Aktivierung in Neuronen, weisen eine Reduktion des Körpergewichts und der Körpergröße auf. Bei männlichen adulten Tieren entwickelte sich eine durchschnittliche Gewichtsreduktion von ca. 20%, die durch Doxyzyklingabe bei adulten Tieren nicht rückgängig zu machen war. Bei Doxyzyklingabe während der Schwangerschaft entwickelten sich allerdings keine Gewichtsunterschiede zu Wildtyp Mäusen. Durch Doxyzyklinapplikation zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten wurde als entscheidender Zeitpunkt für die Ausprägung des Phänotyps die späte perinatale Phase Tag E 16,5-18,5 ermittelt. Eine Transgenexpression konnte bereits ab Tag E 13,5 nachgewiesen werden. Durch Maussektionen konnte die Art der Gewichtsreduktion von IKK2-DN +/+ Tieren näher bestimmt werden. So zeigte sich bei den Tieren ein geringerer Fettanteil und ein reduziertes Gehirngewicht, so wie insgesamt ein signifikant reduziertes Nettokörpergewicht. Längenmessungen (Kopf-Rumpf, Tibiaknochen) belegten auch eine verminderte Körpergröße, bedingt durch die neuronenspezifische NF-κB Repression. Untersuchungen zur täglichen aufgenommenen Nahrungsmenge ergaben keine Unterschiede. Kalorimetrische Messungen machten allerdings eine erhöhte metabolische Rate deutlich, was einen Gewichtsverlust bei gleicher

Kalorienaufnahme verständlich macht.
Bei den IKK2-CA +/+ Mäusen führt die konstitutiv aktive Form der IKK2, bzw. deren Folge eine erhöhte Aktivität von NF-κB, zu einem „hyperaktivem“ Phänotyp. Bei den Tieren konnte eine lokomotorische Hyperaktivität beobachtet werden, mit einer um ca. 40% erhöhten Aktivität gegenüber Wildtypen. Sie scheinen auch eine Veränderung der zirkadianen Rhythmik zu besitzen.

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die molekulare Charakterisierung transgener Mäuse mit deregulierter IKK2 Funktion in Neuronen. Der Schwerpunkt liegt dabei bei Experimenten, die am Hypothalamus durchgeführt werden. Dies liegt darin begründet, dass der Hypothalamus das Regulationszentrum für den Energiestoffwechsels darstellt und der Phänotyp der IKK2-DN Tiere durch ein reduziertes Körpergewicht und eine reduzierte Körpergröße geprägt wird.
Die Ausprägung des Phänotyps ist wohl auf einer verminderten NF-κB Aktivität in umschriebenen Regionen des Gehirns zurückzuführen. Alternativ könnte man sich auch einen NF-κB unabhängigen Mechanismus von IKK2 vorstellen, wie dies für den Insulinsignalweg gezeigt wurde. Denkbar wäre, dass daraus eine gesteigerte Insulinsensitivität resultiert, die möglicherweise eine vergleichbare Entwicklungsstörung der Tiere auslösen könnte.
Ziel ist es, das Expressionsprofil von Genen zu ermitteln, welche im Zusammenhang mit Stoffwechsel und Entwicklung stehen. Zunächst werden Gene analysiert, welche im Hypothalamus für die Regulation des Sättigungsgefühls zuständig sind. Im Weiteren werden Gene, die im Zusammenhang mit Stoffwechsel, Wachstum, Apoptose und Strukturbildung stehen, untersucht. Um mögliche Unterschiede im Expressionsmuster des Hypothalamus in Zusammenhang mit der veränderten IKK2 Aktivität zu setzen, sollen in den Experimenten jeweils Tiere mit verminderter IKK2 Aktivität (KD), Wildtyp und solche mit konstitutiv aktiver IKK2 (CA) verglichen werden.
Gene mit veränderter Expression werden auf Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF-κB in der genomischen Sequenz geprüft. Um die gefundenen Sequenzen als NF-κB Bindungsstellen zu verifizieren, sollen EMSA Studien durchgeführt werden.

Untersucht werden sollen auch mögliche Veränderungen von Insulin induzierten Signalwegen im ZNS der Tiere.
Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen einen Einblick in die Funktion von IKK2 und der NF-κB- Familie in Neuronen geben, speziell auf ihre Wirkung am Hypothalamus.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Die folgenden Chemikalien und Reagenzien wurden verwendet:

Acrylamid
Agarose
Ammoniumpersulfat (APS)
Ampuwa
Borsäure
Bromphenolblau
BSA (Bovines Serumalbumin)
Butanol
Chloroform
Coomassie Brillantblau
DEPC (Diethylpyrocarbonat)
Desoxynukleotide (dATP,dCTP,dGTP, dTTP;32P dATP,32P dCTP)
DTT (Dithiothreitol)
ECL Reagenz
EDTA (ethylendiamintetraacetat)
EGTA (ethylenglykoltetraacetat)
Ethanol
Ethidiumbromid
FCS (Fötales Kälberserum)
Formamid
Formaldehyd
Glycerol
Glycerin
Gelatine
HEPES (N 2 Hydroxyethylpiperazin N'2 Ethansulfonsäure)
Isopropanol
Kaliumacetat
Kaliumchlorid
Magermilchpulver
Magnesiumchlorid
bMercaptoethanol
Methanol
Mops (N-Morpholino-Propansulfonsäure)
Natriumacetat
Natriumcarbonat
Natriumchlorid
Natriumdodecylsulfat (SDS)
Natriumfluorid
Dinatriumhydrogenphosphat
Natriumhydroxid
Phenol
Phosphorsäure
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)

Poly (dI/dC)(Poly desoxyinosin /Poly desoxycytosin)	Tetramethylethylendiamin)
2 Propanol	Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)
Proteaseinhibitor Tabletten (DTA frei)	Triton
Salzsäure	Trizol
Stickstoff,flüssig	Trockeneis
TEMED (N,N,N',N'	Tween 20
	Wasser (HPLC Grad)

Die aufgelisteten Produkte wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Biosciences
AppliChem GmbH,Darmstadt
Calbiochem,La Jolla,USA
Carl Roth GmbH,Karlsruhe
Difco, Detroit, USA
Gibco BRL /Life Technologies, Paisley, Schottland
Mallinckrodt Baker B.V.,Deventer,Niederlande
Merck KGaA, Darmstadt
PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Roche Diagnostics
Roche Molecular Biochemicals (vorm.Boehringer Mannheim)
Serva, Heidelberg
Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Seelze)

2.1.2 Molekularbiologische Materialien

Enzyme	**Firma**
Alkalische Phosphatase (CIP)	Fa.Roche Molecular Biochemicals
Klenow Polymerase	Fa.Stratagene
Taq DNA Polymerase	Fa.Amersham Pharmacia Biotech
Reverse Transcriptase M-MLV	Fa. Promega
Ribonuklease A	Fa.Sigma

RNAguard Ribonuclease Inhibitor	Fa.Amersham Pharmacia Biotech

Antikörper	**Firma**
Akt 9272	Cell Signaling
Anti IKK α/β	Santa Cruz
Anti- JunB	Abcam
Anti NF-κB c-rel	Santa Cruz
Anti NF-κB p50	Santa Cruz
Anti NF-κB p50	Upstate
Anti NF-κB p65	Santa Cruz
Anti-JunB (C11)	Santa Cruz
Anti-JunB (N17)	Santa Cruz
Anti-phospho-IRS-1 (Ser 307)	Cell Signaling
Cleaved Caspase-3 (Asp175)	Cell Signaling
Donkey anti rabbit	Dianova
Goat anti mouse	Dianova
Phospho- Akt (Ser 473)	Cell Signaling
Phospho- Akt (Thr 308)	Cell Signaling
Phospho- IκB-α	Santa Cruz

2.1.3 Puffer und Lösungen

1x TBS	10 mM	Tris/HCl ph 8,0
	150 mM	Natriumchlorid
	ad. 1l	H_2O
10x TBE	1 M	Tris Base
	1 M	Borsäure
	0,5 M	EDTA
10x PBS ph 7,2	87,65 g	Natriumchlorid

	2 g	Kaliumchlorid
	11,7 g	Di- Natriumhydrogenphosphat
	2,4 g	Natrium-di-hydrogenphosphat
	ad. 1 l	H_2O
Dignam C	20 mM	HEPES ph 7,9
	25 %	Glycerol
	0,42 M	Natriumchlorid
	1,5 mM	Magnesiumchlorid
	0,2 mM	EDTA

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Eppendorfröhrchen (1,5 ml, 2,2 ml ; Fa. Eppendorf)
Falcons (15 ml, 50 ml; Fa. Becton Dickson)
Küvetten (Plastik; Fa. Sarstedt)
Membran “Immobilon P” (Fa. Millipore)
Pippettenspitzen (200 µl, 1000 µl; Fa. Gilson)
Röntgenfilme (Fa. Kodak)
Spritzen und Kanülen (Fa. Braun Melsungen)

2.1.5 Geräte

Blockthermostat TCR 100 (Fa. Roth)
ELISA Reader „SpectraMax 190“ (Fa. Molecular Devices)
Mini Trans-Blot Electrophoretic transfer Cell (Fa. Bio-Rad)
Minizentrifuge DW41 (Fa. Qualitron)
Photometer „ Ultraspec 3000“ (Fa. Pharmacia Biotech)
Push Column Beta Shield Device (Fa. Stratagen)
Tischzentrifuge „ Biofuge pico“ (Fa. Haereus)

Thermocycler „ Primus 96 plus“ (Fa. MWG Biotech)
Vortexer “Vortex- Genie 2” (Fa. Scientific Industries)
UV Lampe “Bio Viewer” (Fa. Biostep)

2.1.6 RT-PCR-Primer für Reverse Transkriptase Reaktion

Alle Primer für RT-PCR wurden von der Firma Biomers.net bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Tiersektionen

Die Mäuse wurden mit Ether betäubt und dann dekapitiert. Als nächstes wurden die einzelnen Gehirnregionen präpariert. Diese wurden dann sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.2 RNA Techniken

2.2.2.1 RNA Isolierung aus Gewebe

Die Isolierung von Gesamt- RNA aus Gehirngewebe erfolgte durch die Trizol Methode. Hierfür wurde das Gewebe, welches in flüssigem Stickstoff gelagert wurde, auf Trockeneis zu feinem Pulver gemörsert, dieses dann mit 1 ml Trizol versetzt. Das Trizol mit dem Pulver wurde dann mehrfach mit einer Spritze und einer 21GA Nadel aufgezogen, um eine schnellere und bessere Lösung des Pulvers in dem Trizol zu erreichen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde je 1ml Trizol 0,2 ml Chloroform zugesetzt, gut geschüttelt und für weitere 5 min inkubiert.Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 12000 x g wurde die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Für die RNA Präzipitation wurde dem gewonnenen Überstand je eingesetztem Milliliter Trizol 0,5 ml Isopropanol zugesetzt, vermischt und erneut zentrifugiert, 10 min bei 12000 x g und 4°C. Anschließend wurde der Isopropanolüberstand verworfen und das Pellet zweimal mit 75%-igem Ethanol gewaschen, das Pellet dann an der Luft getrocknet und in DEPC- Wasser gelöst.

Ausbeute und Reinheit der isolierten Gesamt-RNA wurden photometrisch durch Messung der Absorption im Spektrophotometer bestimmt. Dazu wurden 3 µl der RNA-Probe mit DPEC-Wasser 1:100 verdünnt und die Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette gemessen als Leerwert diente reines DPEC-Wasser. Außerdem wurde das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Dieses Verhältnis sollte bei allen Proben bei etwa 1,8 (260 nm / 280 nm) liegen, die (unverdünnte) Konzentration an RNA betrug dann:
$c(RNA) = Abs(260\ nm) \cdot 4\ \mu g/\mu l$

Außerdem wurde die RNA noch durch Elektrophorese auf einem Ethidiumbromid-Agarosegel überprüft.

Die in Wasser gelöste RNA wurde bei -80 °C, oder wenn mit 100%-igem Ethanol und Natrium- Acetat (3 M) gefällt, bei -20°C gelagert

2.2.2.2 cDNA Synthese

Vorbereitung der Proben

Aus den RNA Proben wurden je 2 µg in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und diese 10 min bei 12000x g zentrifugiert. Die erhaltenen Überstände wurden verworfen und die zurückgebliebenen Pellets mit jeweils 200 µl 80%- igem Ethanol gewaschen.

Nach der Lufttrocknung der Pellets wurde jedes in 14 µl DEPC- Wasser gelöst. Es folgte die Zugabe von je 1 µl Oligo-dt-Primer und eine 5-minütige Inkubation bei 70°C mit weiteren 5 min auf Eis.

cDNA Synthese Reaktion

Zu den vorbereiteten Proben wurden jeweils 1,25 µl dNTP´s (10 mM), 1 µl des 25 U RNase Inhibitors (40 U/µl), 1 µl der M-MLV Reverse Transkriptase, 5 µl des 5x First Strand- Puffers und 1,75 µl DEPC- Wasser gegeben. Für einen optimalen Reaktionsablauf wurden die Proben für eine Stunde bei 42 °C inkubiert, um das Enzym zu deaktivieren

wurden Sie anschließend für 15 Minuten bei 70 °C gehalten.
Die erhaltenen cDNA- Proben wurden bei –20 °C gelagert, für die PCR waren noch 1:5 Verdünnungen dieser anzusetzen.
Eine Qualitätskontrolle der hergestellten cDNA erfolgte durch eine PCR mit β-Actin Primern.

2.2.2.3 PCR- Reaktionen

Die PCR wurde mit entsprechenden Primerpaaren durchgeführt die die Amplifikation der zu untersuchenden DNA- Fragmente erlaubten. Eingesetzt wurden stets 2- 4 µl der 1:5 Verdünnung der cDNA. Zu der jeweiligen cDNA Probe wurde gegeben:

3 µl dNTP´s
3 µl 10x Puffer (Pharmacia)
1 µl 5´ Primer 100 pmol/ µl
1 µl 3´ Primer 100 pmol/ µl
19,8 µl Ampuwa- Wasser
0,2 µl Taq- Polymerase

Für jedes Primerpaar wurde ein PCR- Programm bestimmt, so dass die Menge des Endprodukts im linearen Bereich lag und eine semiquantitative Analyse zuließ. Als Grundprogramm wurde folgendes verwendet:

1 x	94°C	3 min
30 x	62°C	45 sec
	72°C	70 sec
	94°C	45 sec
1 x	62°C	1 min
	72°C	10 min

2.2.2.4 Northern Blot

Herstellen der DNA Sonden

Die Sonden wurden mittels RT-PCR hergestellt, verwendet wurden Fragmente der kodierenden Regionen der entsprechenden Gene, Lisch 7 und Bac 33 (für Primer Sequenzen s.o.). Die Sonden-DNA wurde in einem 1%-igen Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA enthielt das Gel den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid. Mit Hilfe von UV-Licht wurden die DNA-Banden detektiert und mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten.

Für die Isolierung der DNA aus den Gelbanden wurde der *Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen (Hilden) verwendet und die Extraktion nach den Herstellerangaben vorgenommen.

Mit den gewonnenen DNA Proben wurde das Verfahren erneut durchgeführt um eine größere Reinheit der Sonden zu erzielen.

Vor der Verwendung der Sonden wurden 3 µl jeder Sonde erneut auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen, um einerseits die Reinheit zu überprüfen und andererseits um ihre Konzentration abschätzen zu können.

RNA-Gelelektrophorese

Es wurden je 25 µg RNA eingesetzt. Diese wurden zunächst bei 4°C zentrifugiert (10 min 12000 rpm) mit je 200 µl Ethanol gewaschen, und erneut zentrifugiert (5 min 12000 rpm). Anschließend wurden die Proben in der Vakuum Zentrifuge getrocknet, dann in 18 µl Denaturierungspuffer gelöst.

20x MOPS Puffer	MOPS	400 mM
	NaAc	100 mM
	EDTA	10 mM
	mit NaOH auf pH 7,0	

Denaturierungspuffer	Formaldehyd	35 µl
	Formamid	100 µl
	20x MOPS	10 µl
	Wasser	55 µl

Waschlösung 1	Phosphatpuffer ph 7,2	40 mM

	EDTA	1 mM
	SDS	5 %
Waschlösung 2	Phosphatpuffer ph 7,2	40 mM
	EDTA	1 mM
	SDS	1 %

Zum Denaturieren wurden die Proben für 15 min im Wasserbad bei 56 °C inkubiert.
Vor dem Auftragen auf das 1,4 % Agarosegel wurde jede Probe mit 4 µl Ladepuffer und 0,5 µl Ethidiumbromid versetzt.

RNA-Fixierung auf Nylon-Membranen

Um die RNA aus dem Agarosegel über Diffusion auf eine positiv geladenen Nylonmembran (Hybond N+; Amersham, Freiburg) zu transferieren wurde die Technik des Kapillar Blots angewendet.
Anschliessend wurde die Membran unter UV Licht gelegt um die RNA auf der Membran zu fixieren („cross link“). Die Membran wurde dann noch mit Hybridisierungspuffer bei 65 °C vorhybridisiert.

Sonden Vorbereitung

Die Sonden wurden mit 1x TE auf ein Endvolumen von 45 µl gebracht, für 5 min im Heizblock (100 °C) denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt.
Zur Markierung der Sonden wurde der „Random Primed DNA Labeling Kit“ der Firma Roche verwendet. Diese von Feinberg und Vogelstein (Feinberg & Vogelstein, 1983) entwickelte Methode basiert auf der Hybridisierung eines Gemisches aller möglichen Hexanukleotid-Kombinationen mit dem zu markierenden DNA-Fragment.
Zu der durch die Denaturierung einzelsträngigen DNA der Sonde, wird der komplementäre Strang durch das Klenow- Fragment der DNA-Polymerase synthetisiert. Durch Zugabe von 32P dNTP´s und einer Mischung der übrigen Nukleotide wird der komplementäre DNA-Strang als radioaktiv markierte Sonde gebildet.
Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurden die nicht gebundenen Nukleotide dadurch entfernt, dass die Sonden duch eine Säule (push column Fa. Stratagen) gedrückt wurden.

Hybridisierung

Die Membranen wurden über 12 Stunden bei 65 °C mit den Sonden in Hybridisierungslösung hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Membranen zunächst jeweils zweimal 20 min mit Waschlösung 1 und dann mit Waschlösung 2 bei 65°C gewaschen.

Danach folgte eine einstündige Exposition einer Bildplatte des Fuji *Bio-Imaging Analysers* BAS 1500 (Fujifilm, Japan). Über Nacht wurde ein Röntgenfilm exponiert und -80°C gelagert.

2.2.3 Protein Techniken

2.2.3.1 Proteinextraktion aus Gewebe

Zur Gewinnung von Proteinextrakten aus Gehirngewebe von Mäusen wurden die Proben zunächst ihrem Volumen entsprechend mit Dignam C versetzt, z.B. Cortex mit 700 µl, Mittelhirn mit 300 µl, Striatum mit 150 µl, Hypophyse mit 80 µl, etc. und bei 4°C homogenisiert. Anschließend wurden sie für 20 min bei 13000x g zentrifugiert.

Der gewonnene Überstand wurde in ein neues Eppendorf- Gefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C aufbewahrt.

Dignam C	HEPES pH 7,9	10 mM
	$MgCl^2$	1,5 mM
	NaCl	0,42 M
	Glycerol	25 %
	EDTA	0,2 mM
	DTT	1 mM
	PMSF	1 mM
	Proteaseinhibitoren	1 Tbl. Auf 10 ml

2.2.3.2 Proteinquantifizierung

Methode nach Bradford

Hierzu wurde jeweils 1 µl der zu messenden proteinextrakte mit 150 mM NaCl auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt, bevor 1 ml des Bradford- Reagenzes hinzugefügt wurden. Nach Durchmischung und kurzer Inkubation wurde mittels Photometrie bei 595 nm die optische Dichte bestimmt. Die Konzentration der Proteinextrakte wurde über eine Eichkurve ermittelt, zu deren Erstellung BSA-Standards mit Proteinkonzentrationen zwischen 0,5 und 20,0 µg / µl verwendet wurden.

Bradford- Reagenz	Coomassie Brillantblau	100 mg
	Ethanol	50 ml
	Phosphorsäure 85 %	100 ml
	Wasser	ad 1 l

Bestimmung der Luciferase- Aktivität

Die Bestimmung der Luziferase-Aktivität erlaubt einen Rückschluss auf die Expression des Transgens, da Transgen und Luziferasreportergen gekoppelt sind.
Das Enzym Luziferase setzt unter ATP-Verbrauch das Substrat Luziferin um, wobei Energie in Form von Photonen frei wird. Die freigesetzte Lichtmenge, die im Bioluminaten gemessen wird, ist ein Maß für die vorhandene Luciferase-Aktivität (de Wet et al., 1987).
5 µl Proteinextrakt werden in ein Messröhrchen gegeben, in das der Bioluminat automatisch 50 µl Luziferase-Meßlösung injiziert und die Luziferaseaktivität durch Messung der freigesetzten Lichteinheiten (Messdauer: 15sec) bestimmt. Zusätzlich wird die Hintergrundaktivität ermittelt, die die freigesetzten Lichteinheiten der Messlösung ohne Zugabe des Zellextrakts darstellt. Dieser Nullwert muss bei der Auswertung von den Messdaten abgezogen werden.

2.2.3.3 Immunoblot

Die Proteinextrakte wurden mit Diganm C auf gleiches Volumen gebracht (30 µl), eingesetzt wurden je 50–100 µg Protein. Mit Laemmli- Ladepuffer wurden die Proben bis

zu einer Endkonzentration von 25 % versetzt und bei 100°C, für 10 Minuten denaturiert.
Die so vorbereiteten Proben wurden auf ein Polyacrylamid-Gel, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel, aufgetragen und durch anlegen einer Spannung (40–80V je nach Größe des Gels) aufgetrennt. Das Gel wurde in Transferpuffer inkubiert und elektrophoretisch auf eine zuvor in Methanol aktivierte und in Transferpuffer äquilibrierte PVDF- Membran geblottet.
Nach dem Blot wurde diese Membran dreimal in PBS/0,2 Tween 20 gewaschen, und dann, um unspezifische Bindungen abzudecken, in Blockmilch geschwenkt (1h bei Raumtemperatur). Für eine weitere Stunde wurde die Membran in mit dem spezifischen Antikörper versetzter Blockmilch inkubiert, um anschließend erneut dreimal in PBS/0,2 Tween 20 gewaschen und in Blockmilch geschwenkt zu werden.
Danach wurde die Membran mit in Blockmilch gelöstem, Peroxidasegekoppeltem sekundärem Antikörper versetzt. Schließlich wurde die Membran wiederum dreimal in PBS/0,2 Tween 20 gewaschen und mit ECL- Reagenz nach Herstellerangaben behandelt. Zur Detektion der Proteinbanden wurde die Membran einem Röntgenfilm exponiert.
Sollten die Antikörper wieder von der Membran abgelöst werden, wurde die Membran über 25 Minuten bei 50 °C in Stripping-Puffer gelegt und danach in PBS/0,2 Tween 20 gewaschen. Dies ermöglichte eine erneute Antikörperinkubation.

Trenngel (10%)	Acrylamid (40%)	11,25 ml
	Tris 1,5 M pH 8,8	11,25 ml
	Wasser	21, 7 ml
	SDS 20 %	450 µl
	APS 10 %	400 µl
	TEMED	30 µl
Sammelgel (5%)	Acrylamid (40%)	2,5 ml
	Tris 0,5 M pH 6,8	5,1 ml
	Wasser	12,3 ml
	SDS 20 %	100 µl
	APS 10 %	400 µl
	TEMED	27 µl

Ladepuffer Laemmli (4x)	Tris 2M pH 6,8	12,5 ml
	SDS	10 g
	Glycerin	13 ml
	Bromphenolblau	1 Spatelspitze
	Wasser	ad 50 ml
	unmittelbar vor Gebrauch:	
	β- Mercaptoethanol	5 %
Laufpuffer Laemmli	Tris	12,1 g
	Glycin	57,6 g
	SDS 20 %	20 ml
	Wasser	ad 4 l
Transferpuffer	Tris	5,8 g
	Glycin	2,9 g
	SDS 20 %	1,85 ml (0,037%)
	Methanol	200 ml
	Wasser	ad 1l
Stripping Puffer	SDS	2 %
	Tris- HCL pH 6,8	62,5 mM
	β- Mercaptoethanol	100 mM

2.2.3.4 Gelretardationsanalyse

Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Zunächst wurden die einzelsträngigen, komplementären Oligonukleotide durch Erhitzen für eine Stunde im Wasserbad (100 °C), unter verwendung eines Annealingpiffers und anschließendes langsames Abkühlen auf Raumtemperatur hybridisiert.

Die doppelsträngigen Oligonukleotide wurden mittels der Klenow-Reaktion radioaktiv markiert. Dabei werden überhängende DNS- Enden mit radioaktiven α- ^{32}P- dCTP Nukleotiden aufgefüllt. Die Oligonukleotide fungieren in den Gelretardationsanalysen als Sonden.

Klenow- Reaktion:	Sonde	1 µl
(45 min bei RT)	dNTP (0,5 mM, ohne dCTP)	2,5 µl
	α- ^{32}P- dCTP (10µCi/ µl)	5 µl
	Klenow- Enzym (5U/ µl)	3 µl
	Reaktionspuffer (10x)	5 µl
	Wasser	ad 50 µl

Eingesetzte Sonden

Bac33	5'AGAAATAA-GGGGTCAGCC-ATGTT3'
	5'AGAAACAT-GGCTGACCCC-TTATT3'
GalaninR1 A/B	5'AGACATGG-AGGCATTTCC-TCAAC3'
	5'AGAGTTGA-GGAAATGCCT-CCATG3'
GalaninR1 C/D	5'AGAGGGAGC-GGGAAAAACC-ATGTT3'
	5'AGACCTTT-GGGAAAAACC-GCTCCC3'
Growth Hormone	5'AGAGTTGT-GGGCTTTCCC-ATCTG3'
	5'AGACAGAT-GGGAAAGCCC-ACAAC3'
SP1	5'AGCATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC3'
	5'AGCGCTCGCCCCGCCCCGATCGAAT3'

Zur Entfernung von nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden wurden Reinigungssäulen (Stratagene NucTrap) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Zunächst wurde der radioaktive Reaktionsansatz mit 30 µl STE- Puffer auf 80 µl aufgefüllt. Die Säulen wurden dann mit 80 µl STE- Puffer äquilibriert, bevor die 80 µl Reaktionsansatz durch die Säule in ein Eppendorf- Gefäß gepresst wurde. Abschließend wurde die Säule mit 80 µl STE- Puffer nachgespült, was im gleichen Eppendorf- Gefäß aufgefangen wurde.

Der so aufgereinigten Sonde wurde 1 µl zur Aktivitätsbestimmung über einen Geiger-Müller Zähler entnommen.

STE- Puffer	NaCl	100 mM
	Tris- HCl (pH 7,5)	20 mM
	EDTA	10 mM

Bindungsreaktion

Für die Gelretardationsanalysen wurden Gesamtzellextrakte verwendet. Die Bindungsreaktion, bei der sich Komplexe zwischen Proteinen und der radioaktiv markierten Sonde bilden, wurde über 20-30 min bei Raumtemperatur durchgeführt.

Bindungsreaktion	Proteinextrakt	6- 18 µg
	Radioaktive Sonde	1- 1,5 µl
	Poly dI/ dC (2µg/µl)	1 µl
	BSA (2mg/ml)	1 µl
	5x Bindungspuffer	3,4 µl
	Wasser	ad 20 µl

5x Bindungspuffer	HEPES	100 mM
	KCl	250 mM
	EDTA	5 mM
	Ficoll	20 %
	unmittelbar vor Gebrauch:	
	DTT	5 mM

Natives Proteingel

Das native Polyacrylamid- Gel wurde einen Tag vorher hergestellt und über Nacht bei 4°C gelagert. Bevor die Proben aufgetragen wurden erfolgte zunächst ein Vorlauf mit 0,5x TBE als Laufpuffer um das Gel zu äquilibrieren (25 mA über 30 min).

Dann wurden die Proben aufgetragen und die erhaltenen Komplexe dadurch separiert (25

mA über ca. 3 h). Nach dem Lauf wurde das Gel bei 75°C in einem Vakuumtrockner für zwei Stunden getrocknet und einem Röntgenfilm exponiert.
Für die Charakterisierungen der Zusammensetzung der NF-κB Komplexe wurden Antikörper eingesetzt. Den Gesamtzellextrakten wurde eine Stunde vor der Bindungsreaktion 1 µl spezifischer Antikörper zugesetzt, dies wurde auf Eis durchgeführt. Für Kompetitions- und Verdünnungsreihen wurde der Bindungsreaktion je nach Konzentration noch nicht radioaktive Sonde zugegeben, um entsprechende Verdünnungen zu erreichen (1:1, 1:10, 1:100).

Natives Proteingel	10x TBE	5 ml
	Polyacrylamid	12 ml
	Ampuwa- Wasser	83 ml
	APS 10%	700 µl
	TEMED	70 µl

2.2.3.5 **ELISA** (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Verwendet wurden folgende Kits:

- Quantikine Mouse Leptin Immunoassay (Fa. R&D Systems)
- Immunoassay Kit Akt [pT308] (Fa. BioSource)
- Immunoassay Kit Akt [pS473] (Fa. BioSource)
- Immunoassay Kit Akt (total) (Fa. BioSource)

Für den Leptin ELISA wurde Serum von Mäusen der IKK/DN Linie verwendet, welche aus einem Experiment aus der Arbeitsgruppe Dr. Baumann stammt.
Die Akt ELISAS wurden mit Proteinextrakten von Gehirnregionen, ebenfalls aus einem Experiment der Arbeitsgruppe Dr. Baumann, durchgeführt (siehe Ergebnisse).

Gehirnregionen für Akt ELISAS:

- Hypothalamus/Thalamus
- Cortex
- Mittelhirn/ Striatum/ Hippocampus

Bei allen vier Experimenten wurden die Proben 20fach verdünnt eingesetzt (10ul Probe + 190ul verdünnungs Puffer). Alle verwendeten Chemikalien waren in dem entsprechenden Kit enthalten und die Durchführung erfolgte entsprechend dem mitgelieferten Protokoll.

2.3 Statistik und Datenverarbeitung

Für die Auswertung der verschiedenen Meßdaten und Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurde ein Power Macintosh G4 Rechner mit dem Betriebssystem OS X verwendet (Fa.Apple). Folgende Programme wurden dabei angewandt:

Acrobat Reader 5.0
Adobe Photoshop 5.0
Excel für OS X
Internet Explorer 5.2
OligoNet Order 1.0
Word für OS X

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchte Tiere und Organe

Zur Charakterisierung des IKK2-DN und des IKK2-CA Mausmodells wurden doppelt transgene (+/+) Genotypen mit einfach transgenen (+/- oder -/+) verglichen. Die einfach transgenen Mäuse wurden hierbei als phänotypischer Wildtyp herangezogen. Es Wurden Mäuse der Linien IKK2-DN 12, IKK2-CA 5, IKK2-CA 7, sowie Embryonen der Linie IKK2-DN 12 der Embryonaltage 17,5 und 18,5 untersucht.
Die in den durchgeführten Experimenten untersuchten Organe sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 3: Untersuchte Organe

Hirnregionen	***innere Organe***
Olfaktorische Bulbi (OB)	Milz
Hypothalamus (Hy)	Leber
Thalamus (Th)	Niere
Mittelhirn (Mi)	Lunge
Cerebellum (Ce)	Herz
Rhombencephalon (Rh)	Auge
Striatum (St)	Ovar
Hippocampus (Hi)	Testis
Cortex (Co)	
Hypophyse (Hp)	

Für die RT-PCR Untersuchungen wurde zunächst immer eine Kontrolle mit β-Actin durchgeführt, um zu zeigen, daß die cDNA Konzentrationen in den Verdünnungen vergleichbar sind. Außerdem wurde stets eine RT-PCR mit Primern für β-Glob durchgeführt, um die Expression des Transgens nachzuweisen und die Genotypen zu verifizieren.

Vor der Sektion und Präparation der Mäuse wurden diese, soweit nicht anders erwähnt, für 24h gehungert. Das Gewicht jeder Maus wurde dabei vor und nach der 24 stündigen Nahrungskarenz gemessen.

In der Abbildung 4 ist auf der linken Seite das Körpergewicht adulter Tiere in Gramm dargestellt, jeweils vor und nach der 24 stündigen Nahrungskarenz, unterteilt nach einfach- und doppelt transgenen Tieren. Dabei ist zu erkennen, dass die einfach transgenen Mäuse, die wie schon erwähnt als phänotypischer Wildtyp gelten, ein deutlich größeres Ausgangsgewicht haben, als die doppelt transgenen Mäuse. Auf der rechten Seite ist der prozentuale Verlust vom Körpergewicht, innerhalb der 24h dargestellt. Zu erkennen ist, dass die doppelt transgenen Mäuse nach 24h, 12,6% ihres Körpergewichts verloren haben, die Wildtyp Mäuse hingegen nur 5,45%. Dieser Abbildung liegen die Körpergewichte jeweils dreier doppelt transgener und dreier einfach transgener Mäuse der Linie IKK-DN-12 zugrunde.

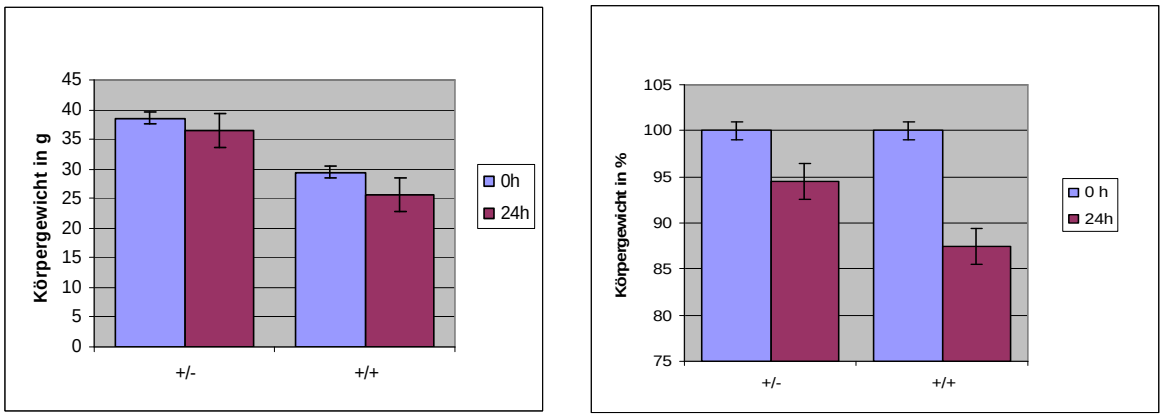


Abbildung 4: Gewichte von Inhibiting-kB-Kinase2-dominant negativ (IKK2-DN) Mäusen vor und nach einer 24 Stunden Nahrungskarenz. links: absolutes Gewicht in Gramm, rechts: Darstellung des Gewichtsverlust in Prozent. Für +/- und +/+ jeweils n=3

3.2 Basale Expression der IKK2 in Gehrinregionen von IKK2-CA Mäusen

Zur Charakterisierung der IKK2-CA Mäuse wurde das Expressionsniveau der IKK2 auf Proteinebene mittels Westernblot untersucht. Es sollte überprüft werden, ob auch Unterschiede der Expression in den einzelnen Gehirnregionen vorliegen.

Die verwendeten Proteinextrakte wurden aus Mäusen der Linie IKK-CA-5 gewonnen. Für den Westernblot wurde der anti-IKK α/β Antikörper der Firma Santa Cruz eingesetzt. Wie in Abbildung 5 zu erkennen, ist die Expression der rekombinanten IKK2 nur in der +/+ Maus vorhanden, während bei der -/+ Maus die Expression nicht nachweisbar ist. Die deutlichsten Banden zeigen Striatum, Hippocampus und Cortex der +/+ Maus. Aber auch Hypothalamus, Thalamus, die Olfaktorischen Bulbi und das Mittelhirn zeigen deutliche Banden. Eine nur sehr schwache Expression des Transgens zeigt sich bei Rhombencephalon, Hypophyse und Cerebellum.

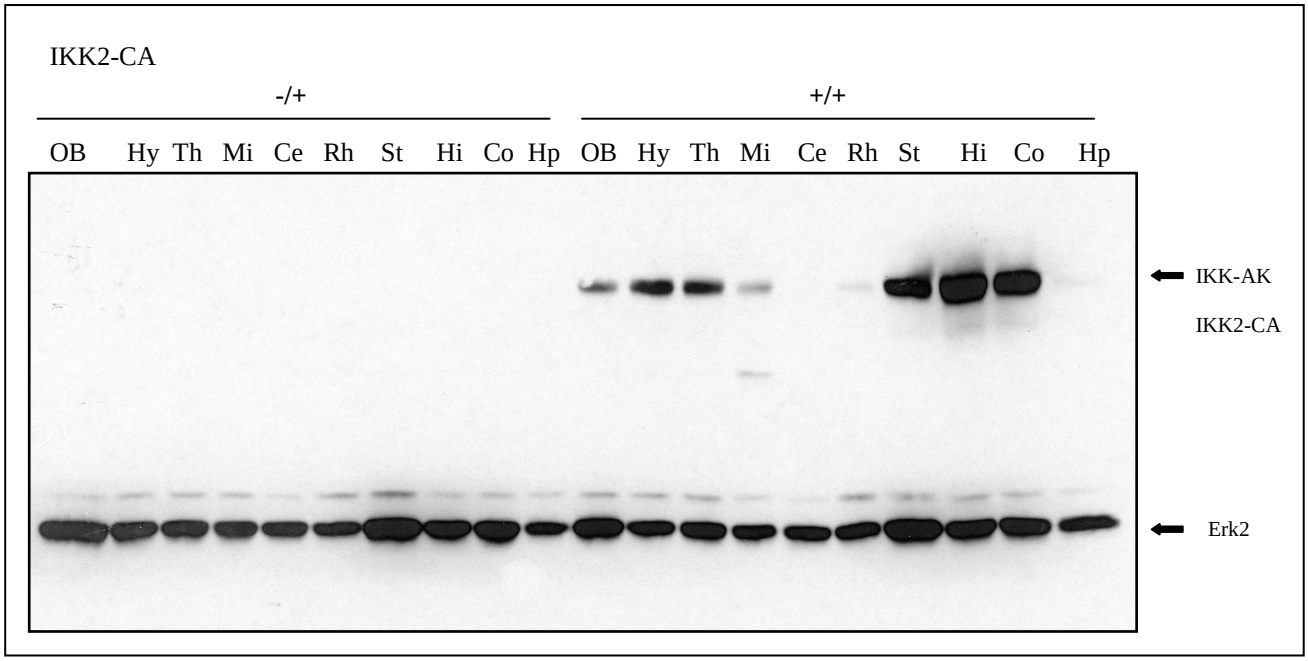


Abbildung 5: Das Expressionsprofil des Inhibiting-kB-Kinase2-constitutiv aktiv (IKK2-CA) Transgens wurde mittels Westernblot untersucht.Als Ladekontrolle wurde Erk2 detektiert Es wurden 100µg Proteinextrakt je untersuchter Gehirnregion und Genotyp eingesetzt.Untersucht wurden Olfaktorische Bulbi (OB), Hypothalamus (Hy), Thalamus (Th), Mittelhirn (Mi), Cerebellum (Ce), Rhombencephalon (Rh), Striatum (St), Hippocampus (Hi), Cortex (Co) und Hypophyse (Hp).

3.3 Veränderungen des Insulinsignaling im Gehirn von IKK2-CA und IKK2-DN Tieren

Um die Auswirkungen der veränderten IKK2 Aktivität auf das Insulinsignaling im Gehirn zu untersuchen, wurden Westernblots mit Antikörpern für Akt und Insulinrezeptor Substrat-1 (IRS-1) durchgeführt. Um Unterschiede in der Aktivität von Akt und IRS-1

darzustellen wurden auch Antikörper für phosphoryliertes Akt und IRS-1 eingesetzt. Durchgeführt wurden diese Experimente, da eine hohe IKK Aktivität durch phosphorylierung des IRS-1 zu einer Insulinresistenz führen könnte, bzw. bei den IKK-DN eine erhöhte Insulinsensitivität resultieren könnte.

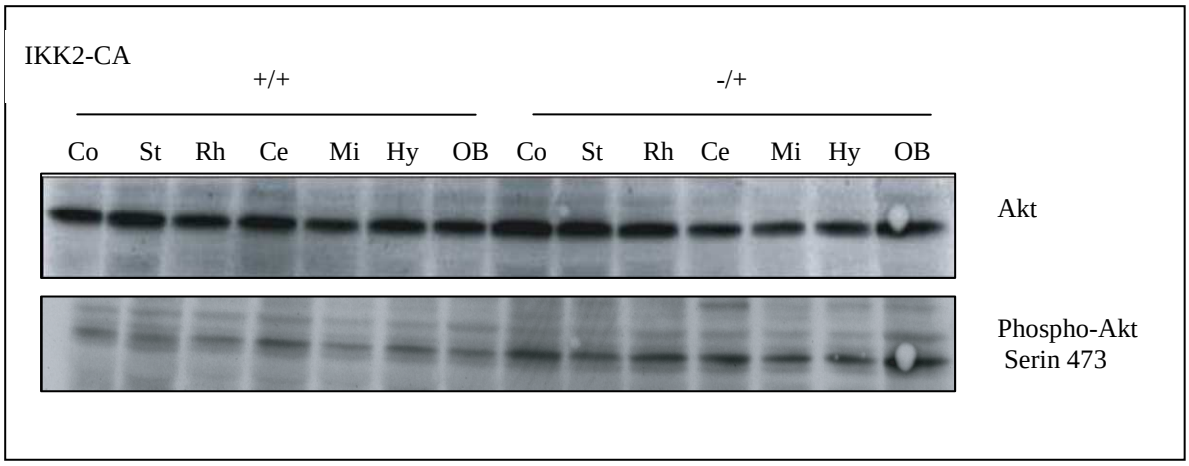


Abbildung 6: Western-Blot mit Hirnregionen von Inhibiting-kB-Kinase2-constitutiv aktiv Mäusen, mit Antikörpern für Akt, sowie für eine an Serin 473 phosphorylierte Form von Akt. Es wurden je 100µg Proteinextrakt jeder untersuchten Gehirnregion und Genotyps eingesetzt.Untersucht wurden Cortex (Co), Striatum (St), Rhombencephalon (Rh), Cerebellum (Ce), Mittelhirn (Mi), Hypothalamus (Hy) und Olfaktorische Bulbi (OB).

In Abbildung 6 sind Westernblots von IKK2-CA-5 Mäusen dargestellt. Untersucht wurde Protein von verschiedenen Gehirnregionen und Akt Antikörper. Zum einen ein Antikörper gegen das gesamte Akt Protein, und ein Antikörper gegen an Serin 473 phosphoryliertes Akt.

Bei der Analyse zeigte sich, dass in den zu vergleichenden Gehirnregionen weitestgehend gleiche Konzentrationen von Akt Protein vorliegen. Die stärksten Banden weisen Cortex und Striatum beider Genotypen auf. Das Cerebellum der +/+ Maus zeigt eine stärkere Expression im Vergleich zu dem -/+ Tier.

Phospho-Akt scheint bei den +/+ Mäusen in einer geringere Konzentration vorzuliegen. Vergleicht man die einzelnen Gehirnregionen der +/+ und -/+ Mäuse miteinander, so erkennt man bei denen der +/+ Mäuse stets schwächere Signale. Eine Ausnahme macht das Cerebellum, das keine Transgenexpression aufweist. Hier werden bei +/+ und -/+ Tiere vergleichbare Intensitäten beobachtet. In Gehirnregionen mit Transgenexpression zeigen sich vor allem Unterschiede beim Cortex und den olfaktorischen Bulbi aber auch im Hypthalamus scheint das phospho-Akt verringert.

Um Unterschiede im Insulinsignalweg bei IKK2-DN Mäusen im ZNS zu untersuchen wurde ein Experiment durchgeführt, bei welchem Mäusen Insulin appliziert wurde. Bei diesem Experiment wurden 11 Mäuse der Linie IKK2-DN-1 eingesetzt, davon hatten vier den Genotyp +/+ und sieben Mäuse waren Wildtypen. Zunächst wurden die Mäuse für 12h gehungert, dann wurde ihnen Insulin Actrapid HM 40I.E./ml in einer Verdünnung von 1:200 in NaCl-Lösung intraperitoneal gespritzt. Dabei wurden die eingesetzten Mengen für das Körpergewicht der Mäuse berechnet, 50µl Lösung wurden pro 5g Körpergewicht verwendet. Drei Mäusen, davon eine +/+, wurde kein Insulin gespritzt, diese sollten als Vergleichswerte dienen. Nach 30 min wurden fünf der mit Insulin behandelten Mäuse seziert, darunter zwei +/+ und nach einer Stunde drei (eine +/+). Bei der Präparation wurden Hy/Th, Mi/St/Hi, Ce, Co, Milz, Muskel und Leber entnommen und aus diesen Organen Proteinextrakte gewonnen.

Die aus diesem Experiment gewonnenen Proteinextrakte von Hy/Th, Mi/St/Hi und Co wurden dann für Akt-ELISA´s eingesetzt. Durchgeführt wurden ELISA´s für Akt [total], an Serin 473 phosphoryliertes Akt (Akt [pS473]) und an Threonin 308 phosphoryliertes Akt (Akt [pT308]). Dieses Experiment wurde durchgeführt, um mögliche Unterschiede in der Aktivierung des Insulinsignalwegs darzustellen.

In Abbildung 7 sind die Werte von Akt [pT308] bezogen auf die Konzentration von Akt [total] (Akt [pT308]/ Akt [total]) dargestellt. In dem Diagramm oben links sind die Ergebnisse für die Region Hy/Th wiedergegeben. Dabei zeigen Wildtyp und doppelt-transgene (+/+) Mäuse ohne Behandlung und 30 min nach Insulingabe vergleichbare Werte. Nach 60 min weisen die Wildtypen jedoch einen um etwa ¼ höheren Wert auf. Ein ähnliches Bild bietet das Diagramm oben rechts, in dem die Werte für den Cortex gezeigt sind. Zwar sind hier die Werte ohne Insulin und nach 30min bei den +/+ Mäusen höher, nach 60min sind sie aber wieder etwa um ¼ reduziert gegenüber den Wildtypen. Für die Region Mi/St/Hi (unteres Diagramm) ergibt sich ein anderes Bild, hier zeigt sich nach 60 min eine stärkere Erhöhung von gemessenem Akt [pT308] bei den Wildtypen.

der Aktivierung des Insulinsignalwegs darzustellen.

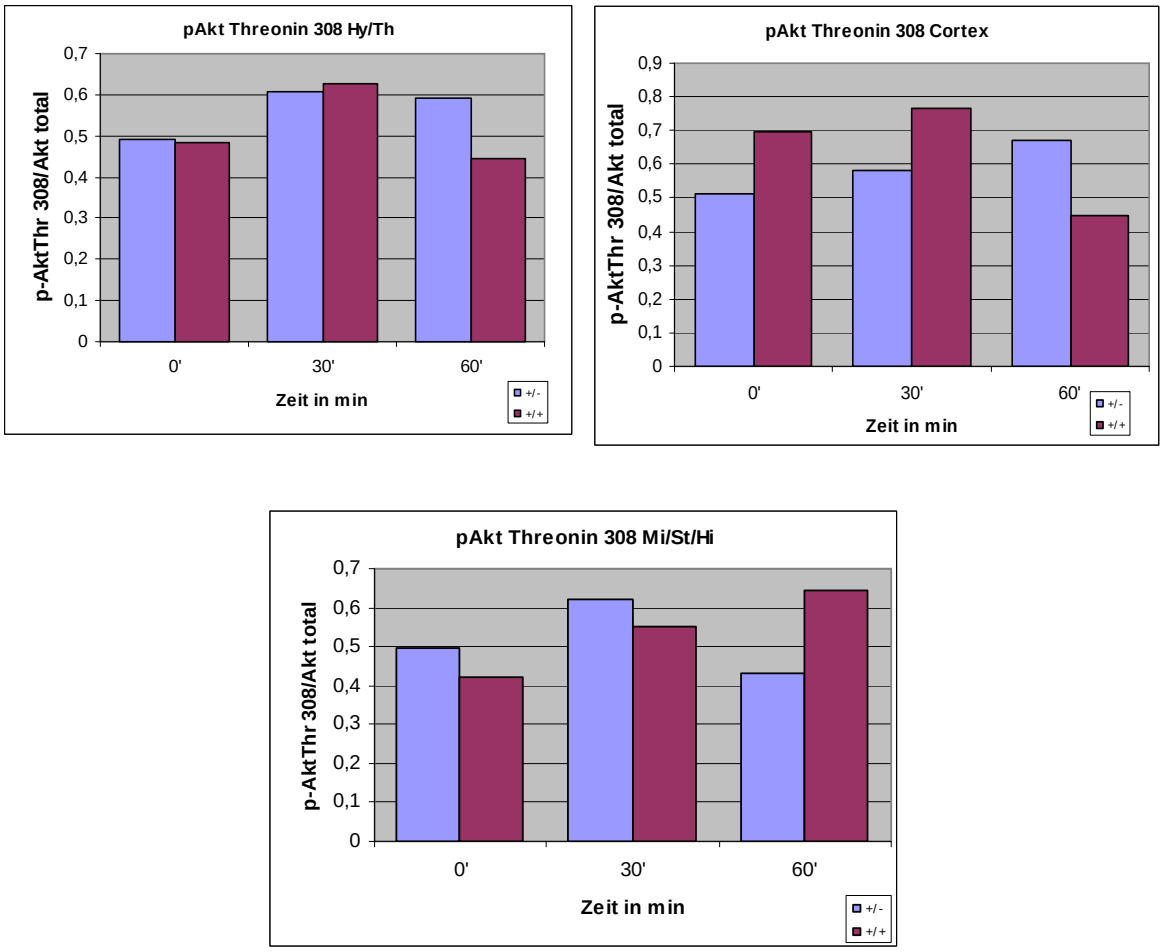


Abbildung 7: Enzyme linked immunosorbent assay mit Proteinextrakten aus Gehirnregionen von Inhibiting-kB-Kinase2-dominant negativ (IKK2-DN-12) Mäusen mit einem Antikörper gegen Akt [pT308] dargestellt sind die Werte bezogen auf die Konzentration von Akt [total]. Es wurden je 10ul Probe 1:20 verdünnt eingesetzt. Untersucht wurden Hypothalamus/Thalamus (Hy/Th), Cortex und Mittelhirn/Striatum/Hippocampus (Mi/St/Hi) zu den Zeitpunkten 0, 30 und 60 min.

Die Diagramme in Abbildung 8 zeigen die Ergebnisse für den Akt [pS473] ELISA, bezogen auf die Konzentration von Akt [total]. Oben links wird wieder Hy/Th, oben rechts Cortex und unten Mi/St/Hi gezeigt. Die Ausgangswerte ohne Insulin zeigen bei allen drei Diagrammen kaum Unterschiede zwischen Wildtyp und +/+. Die 30min Werte hingegen zeigen sich sowohl bei Hy/Th als auch beim Cortex der +/+ Mäuse im Vergleich deutlich erhöht. Bei Mi/St/Hi sind hier vergleichbare Werte zu erkennen. Wie schon bei dem Akt [pT308] ELISA zeigt sich auch hier, dass die 60min Werte der +/+ Mäuse von Hy/Th und Co verringert sind im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen. Bei Mi/St/Hi sind die Werte bei +/+ Tieren erneut erhöht.

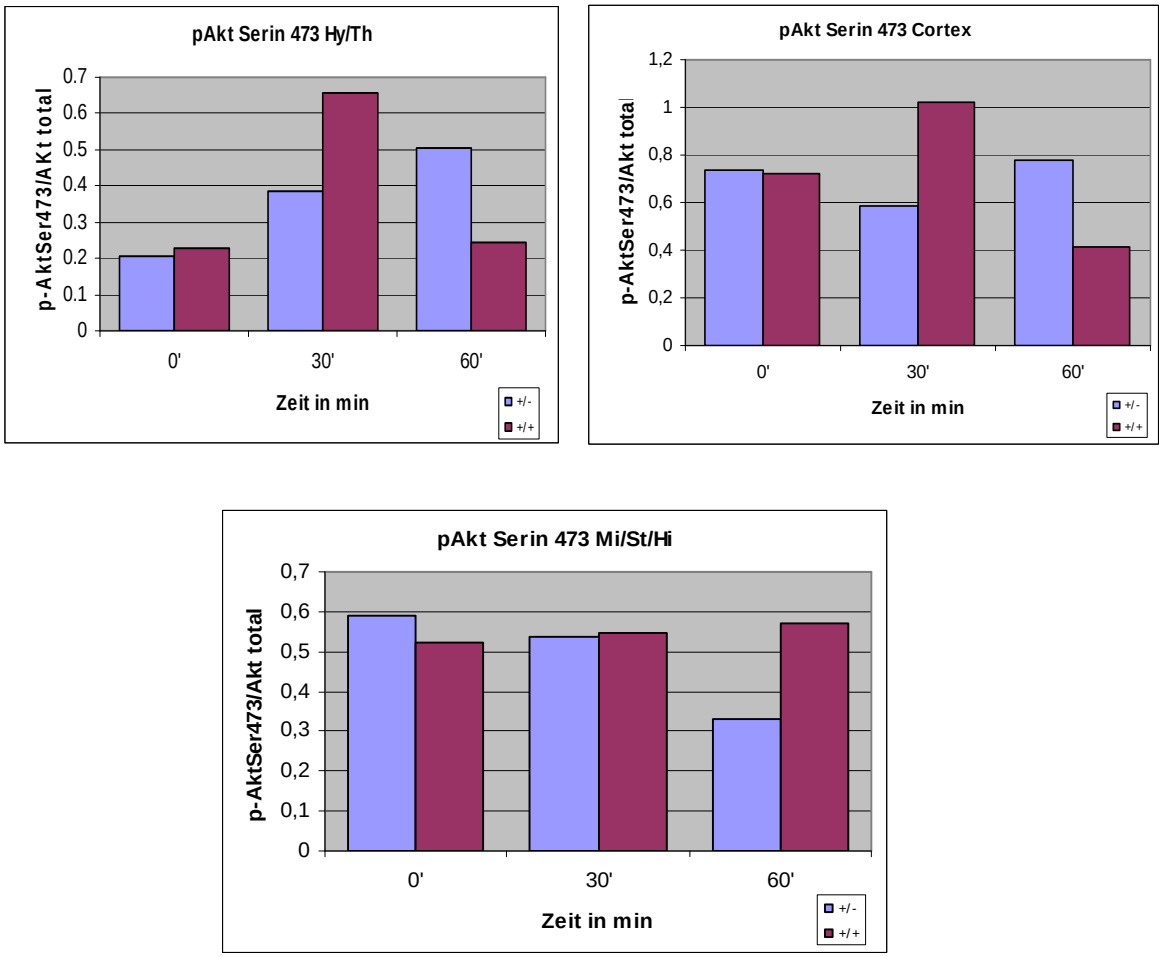


Abbildung 8: Enzyme linked immunosorbent assay mit Proteinextrakten aus Gehirnregionen von Inhibiting-kB-Kinase2-dominant negativ (IKK2-DN-12) Mäusen mit einem Antikörper gegen Akt [pS473]Dargestellt sind die Werte bezogen auf die Konzentration von Akt [total]. Es wurden je 10ul Probe 1:20 verdünnt eingesetzt. Untersucht wurden Hypothalamus/Thalamus (Hy/Th), Cortex und Mittelhirn/Striatum/Hippocampus (Mi/St/Hi) zu den Zeitpunkten 0, 30 und 60 min nach Insulin Injektion.

Leptin als Sättigungssignal für den Hypothalamus kann starken Einfluss auf die Energiehomöostase haben, weshalb wir den Leptinspiegel der Tiere messen wollten.

Für den Leptin ELISA wurde Serum von 35 IKK2-DN Mäusen eingesetzt, darunter 16 doppelt transgene Mäuse. Vor der Sektion wurden die Tiere für 12h gehungert. Für den ELISA wurde je 10 µl Serum in 20facher Verdünnung eingesetzt.

In dem gezeigten Diagramm (Abb. 9), sind die Mittelwerte der gemessenen Leptinspiegel für +/+ und -/+ Mäuse dargestellt. Die +/+ Mäuse zeigen im Mittel einen verringerten Leptinspiegel gegenüber den +/- Mäusen, die Fehlerindikatoren weisen jedoch auf starke Schwankungen hin, wobei eine Tendenz erkennbar ist.

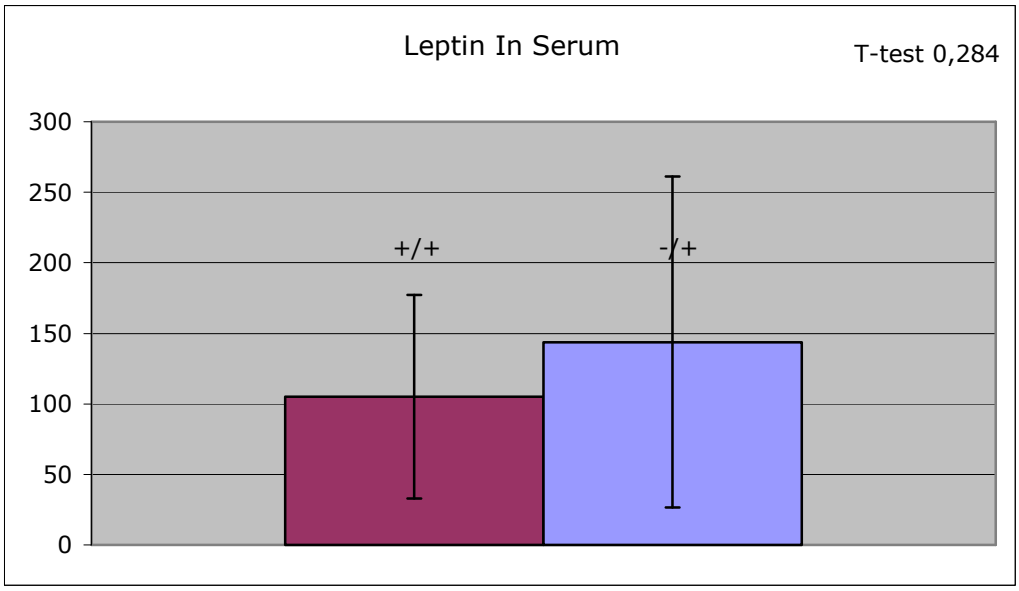


Abbildung 9: Enzyme linked immunosorbent assay für die Messung von Leptin im Serum von Inhibiting-kB-Kinase2-dominant negativ (IKK2-DN) Mäusen, verwendetes Kit „Quantikine Mouse Leptin Immunoassay" R&D Systems. Serum von für 12h gehungerten IKK2-DN Mäusen n =16 für +/+ und n = 22für -/+ Mäuse. Als Proben wurde je 10µl Serum in einer 1:20 Verdünnung eingesetzt.

3.4 Untersuchungen der Genexpression in IKK2-DN und IKK2-CA Mäusen

3.4.1 Auswertung der Affymetrix Chipanalyse

Zur Untersuchung möglicher Veränderungen in der Genexpression der IKK-DN Mäuse wurde eine Genchipanalyse in der Abteilung durchgeführt. Hierfür wurden embryonale Gesamtgehirne Tag 17,5 der Linien IKK-DN-12, -17 und -8 verwendet, jeweils -/+ und +/+ Genotypen wurden untersucht. Die Tiere der Linie IKK-DN-8 zeigen kein reduziertes Körpergewicht im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen, weshalb sie für die Auswertung der Genanalyse als Wildtypen angesehen wurden. Bei der Auswertung der Genanalyse zeigten sich fünf differenziell regulierte Gene, welche alle keine bisher beschriebenen NF-κB Zielgene sind. Zudem handelt es sich bei allen fünf Genen um bisher nur wenig

beschriebene Gene die als Bac33 (ENSMUST00000069263), Lisch7 (AK045265), C13 Rik (ENSMUST00000043494), D2E (ENSMUST00000036647) und MOE1 (ENSMUST00000066061) bezeichnet wurden. Die bisher bekannten Informationen zu diesen Genen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Gene aus Affymetrix Chipanalyse, Informationen von Ensembl.org

Gen	**Ensembl ID**	**Chr.**	**Exons**	**Transkript Größe bp**	**Peptid Größe AS**	**Protein Domänen**
Bac33	ENSMUST00000069263	5	1	366	121	- Signal Peptid Motiv
Lisch7	AK045265	14	15	3649	741	- Zink Finger Domäne - Prolin reiche Region
C13Rik	ENSMUST00000043494	14	1	699	233	- Wilms Tumor Protein - Orphan nuclear receptor - NLI interacting factor
D2E	ENSMUST00000036647	2	13	4545	465	- Dullard-like Phosphatase Domäne
MOE1	ENSMUST00000066061	1	1	816	271	

Um die Expression dieser fünf Gene in den verschiedenen Gehirnregionen von IKK2-DN Mäusen zu untersuchen wurden entsprechende Primer für RT-PCR ausgewählt. Für die eingesetzte cDNA wurden die entsprechenden Gehirnregionen von jeweils drei Wildtyp und drei +/+ Mäusen zusammengefasst.

Bei Bac33, C13Rik, Lisch7 und D2E ließ sich für alle Gehirnregionen eine Expression darstellen (Abb.10). Für MOE1 konnte trotz wiederholter Versuche und Modifikationen des PCR Programms und der Primer keine Expression nachgewiesen werden.

C13Rik, Lisch7 und D2E zeigen ähnliche Expressionsprofile ohne große Unterschiede zwischen den einzelnen Gehirnregionen oder den Genotypen. Die stärkste Expression ist bei allen drei bei den +/+ olfaktorischen Bulbi zu erkennen, dies korreliert allerdings auch mit β-Actin. Bei den fehlenden Signalen handelt es sich wohl um Fehler im PCR-Ansatz.

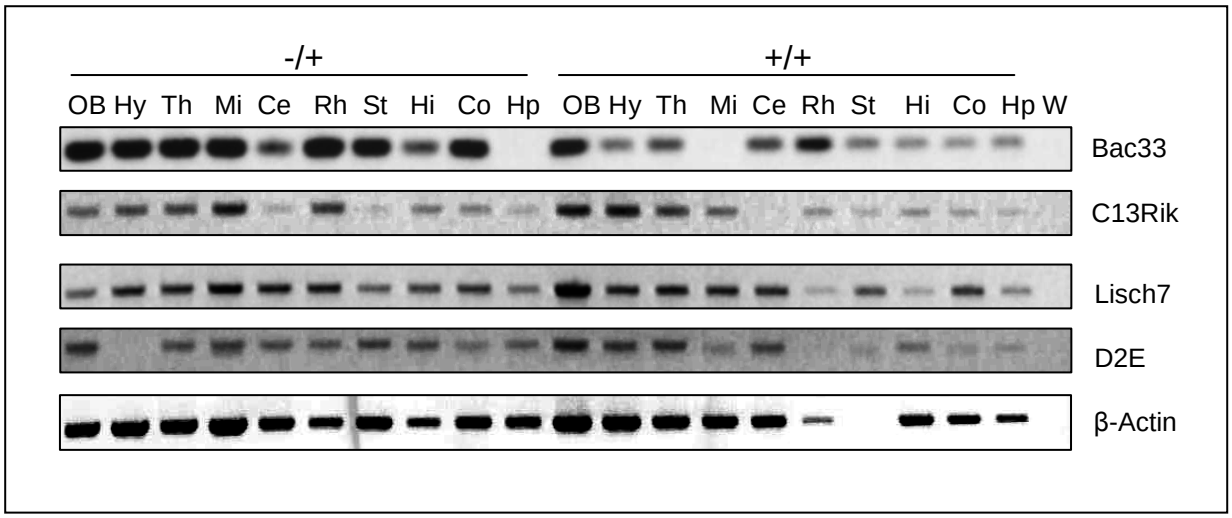


Abbildung 10: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion mit Gehirnregionen von Inhibiting-kB-Kinase2-dominant negativ Mäusen. Eingesetzte Primer für die Gene aus Affymetrix Chipanalyse. Untersucht wurden Olfaktorische Bulbi (OB), Hypothalamus (Hy), Thalamus (Th), Mittelhirn (Mi), Cerebellum (Ce), Rhombencephalon (Rh), Striatum (St), Hippocampus (Hi), Cortex (Co) und Hypophyse (Hp). Wasser (W)

Bac33 lässt eine reduzierte Expression in den Organen der +/+ Proben (Abb.10) erkennen, um dieses Ergebniss zu überprüfen wurde die RT-PCR wiederholt mit IKK12-DN (Abb.11), was erneut eine reduzierte Expression bei den +/+ Ergebnisses zeigte. Die größten Unterschiede lassen sich bei Striatum und Cortex ausmachen, die bei den Wildtyp Mäusen die stärksten Signale zeigen und bei den +/+ Mäusen kaum zu erkennen sind. Bei den +/+ Mäusen zeigen die olfaktorischen Bulbi die größte Expression.

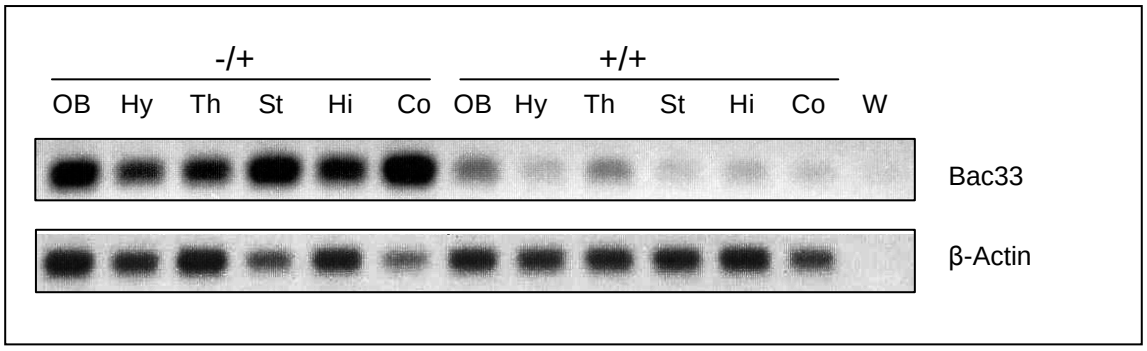


Abbildung 11: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion mit Gehirnregionen von Inhibiting-kB-Kinase2-dominant negativ-12 Mäusen. Verwendeter Primer für Bac33. Untersucht wurden Olfaktorische Bulbi (OB), Hypothalamus (Hy), Thalamus (Th), Striatum (St), Hippocampus (Hi)und Cortex (Co). Wasserkontrolle (W)

Um zu überprüfen, ob eine NF-κB-abhängige Regulation vorliegt, sollte auch eine

vergleichende Untersuchung mit IKK2-CA Mäusen vorgenommen werden. Hierfür wurde aus den Gehrinregionen einer -/+ und einer +/+ IKK2-CA Maus RNA gewonnen, und aus dieser cDNA für RT-PCR synthetisiert.

Bac33 zeigte eine stärkere Expression in einigen Gehirnregionen der +/+ Maus, insbesondere in den olfaktorischen Bulbi, Hypothalamus, Mittelhirn, Rhombencephalon, und Striatum. Ein umgekehrter Befund zeigte sich nur im Rückenmark.

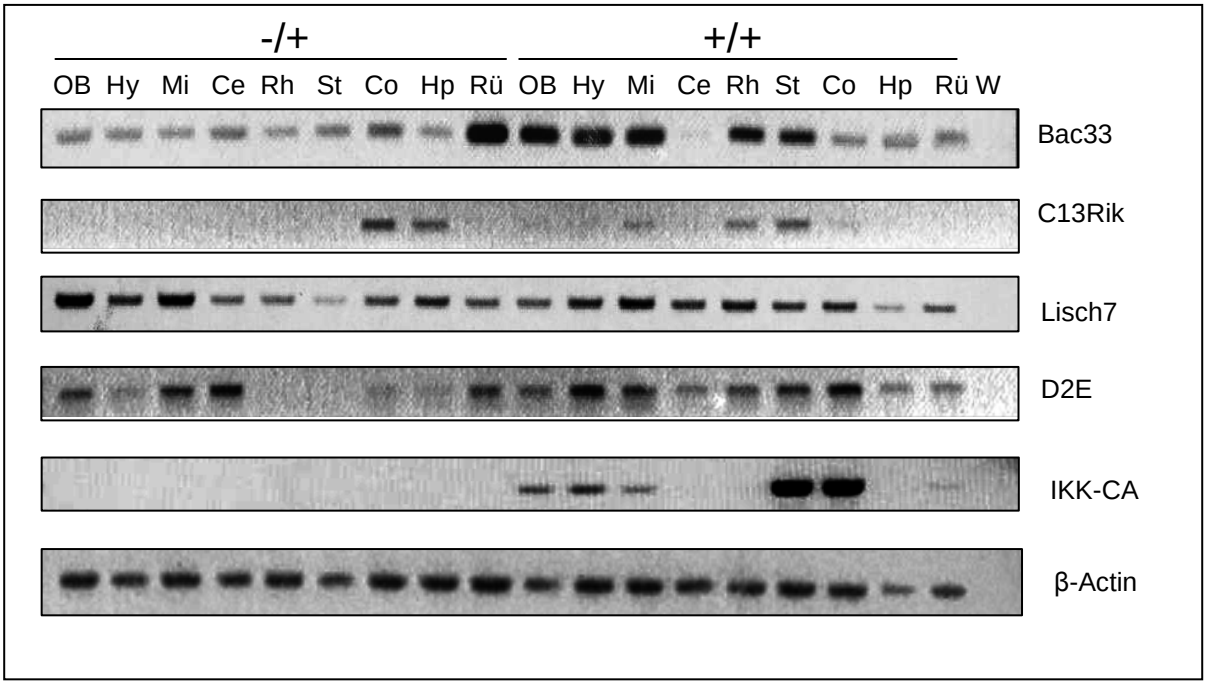


Abbildung 12: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion mit Gehirnregionen von Inhibiting-kB-Kinase2-constitutiv aktiv (IKK2-CA) Mäusen. Eingesetzte Primer für die Gene aus Affymetrix Chipanalyse. Untersucht wurden Olfaktorische Bulbi (OB), Hypothalamus (Hy), Mittelhirn (Mi), Cerebellum (Ce), Rhombencephalon (Rh), Striatum (St), Cortex (Co) und Rückenmark (Rü). Wasserkontrolle (W)

Auch in den IKK2-CA Mäusen zeigten sich bei Lisch7 und D2E keine wesentlichen Differenzen im Expressionsprofil. Für C13Rik ließen sich nur wenige Banden darstellen.

Für die Chipanalyse wurden embryonale Gesamtgehirne Tag 17,5 verwendet, die bisherigen Untersuchungen wurden aber an Gehirnen adulter Tiere vorgenommen. Um die Ergebnisse der Chipanalyse auch über RT-PCR zu belegen, und um die in den adulten Mäusen bereits gezeigten Unterschiede in der Expression von Bac33 auch in der embryonal Phase zu zeigen wurden weitere Untersuchungen angestellt. Hierfür wurden aus IKK2-DN Embryonen, Tag 17,5 und 18,5, einzelne Gehirnregionen präpariert und aus diesen RNA gewonnen. In der RT-PCR (Abb. 13) sind bei Tag 17,5 die Banden für Cortex, Hypothalamus und Mittelhirn des +/+ Embryos abgeschwächt im Vergleich zu

denen des -/+ Embryos. Für das Striatum lässt sich kaum ein Unterschied zwischen den Genotypen ausmachen. Überraschenderweise zeigten sich bei den Embryonen von Tag 18,5 keine Unterschiede zwischen den Genotypen.

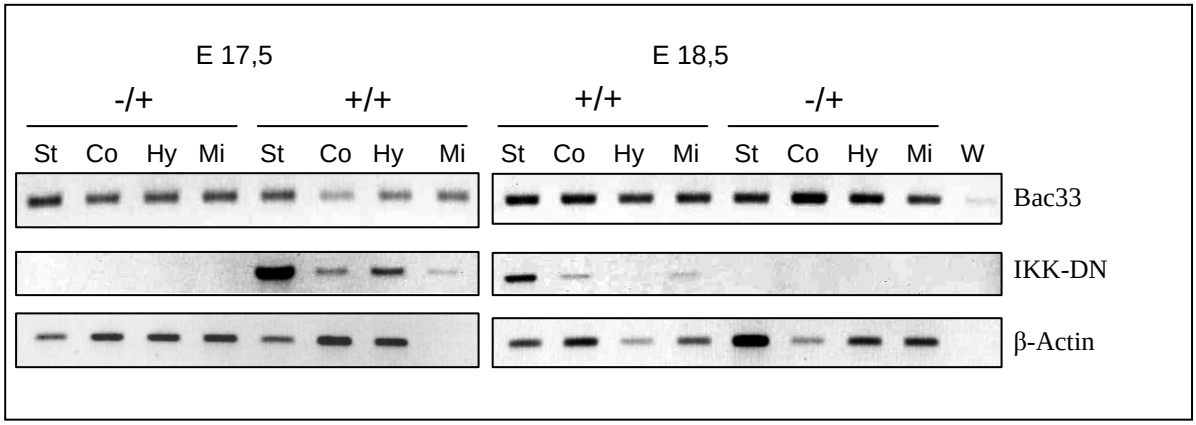


Abbildung 13: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion mit Gehirnregionen von Inhibiting-kB-Kinase2-dominant negativ-17 Embryonen Tag 17,5 und 18,5. Eingesetzt wurde ein Primer für Bac33, sowie β-Actin als Ladekontrolle und β-Glob als Kontrolle der Transgen-Expression.Untersucht wurden die Gehirnregionen Striatum (St), Cortex (Co), Hypothalamus (Hy) und Mittelhirn (Mi). Wasserkontrolle (W)

Da über die Gene aus der Chipanalyse nur wenig bekannt war, und auch ihr Expressionsprofil in verschiedenen Geweben unbekannt war, sollte dieses auf RNA Ebene untersucht werden. Hierfür wurden RT-PCR durchgeführt. Die Abbildung 14 zeigt die RT-PCR-Analyse, verwendet wurde Gewebe aus Wildtyp Mäusen. Lisch7 zeigte deutliche Banden für Hypothalamus/Thalamus und die Milz, so wie schwächere in den übrigen Gehirnregionen und den Testes. Für Niere, Lunge, Herz und Leber konnte keine Expression von Lisch7 gezeigt werden. D2E zeigte die stärkste Expression in den Testes und wesentlich schwächere in Milz und Cortex. C13Rik wird in Milz, Niere, Testes, Leber und Hypothalamus/Thalamus exprimiert. Für Bac33 zeigten sich Banden vergleichbarer Intensität in allen untersuchten Geweben, was für eine ubiquitäre Expression dieses Gens spricht.

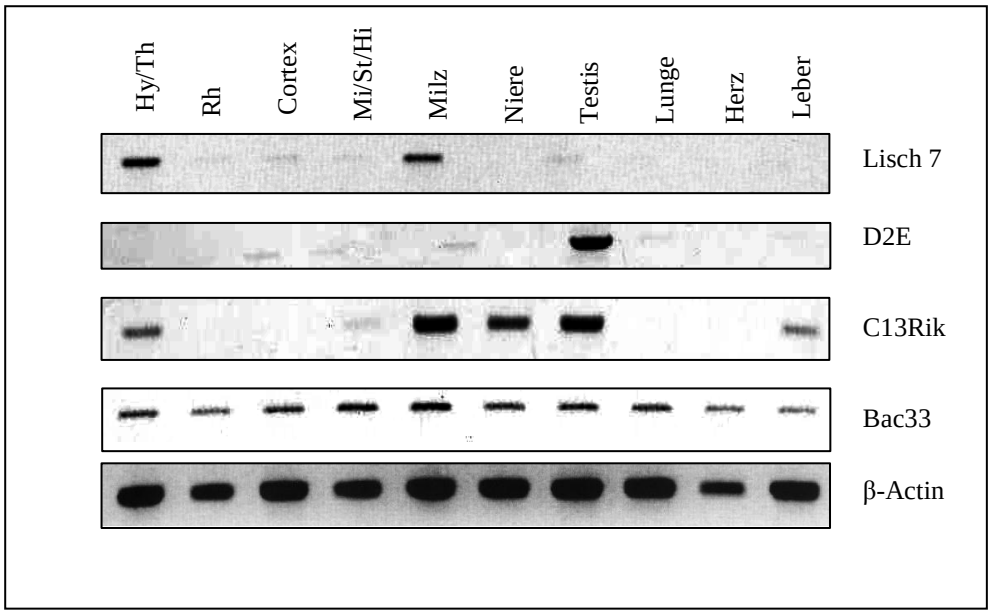


Abbildung 14: Expressionprofil von Lisch7, D2E, C13Rik, Bac33 mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion in den angezeigten Geweben von wildtyp Mäusen.

3.4.2 Analyse der Expression von Genen, die in die Energiehomöostase eingreifen.

Um mögliche Hinweise auf die Ursache des reduzierten Körpergewichts und die reduzierte Größe der IKK2-DN +/+ Mäuse zu finden, sollten ausgewählte Gene untersucht werden, welche Einfluss auf Wachstum, Körpergewicht oder Stoffwechsel haben.

So wurden durch RT-PCR zunächst Neuropeptide untersucht für die eine orexigene oder anorexigene Wirkung beschrieben ist. Denn eine veränderte Nahrungsaufnahme oder ein verstärkter Stoffwechsel könnten eine mögliche Erklärung für den Phänotyp der Tiere liefern.

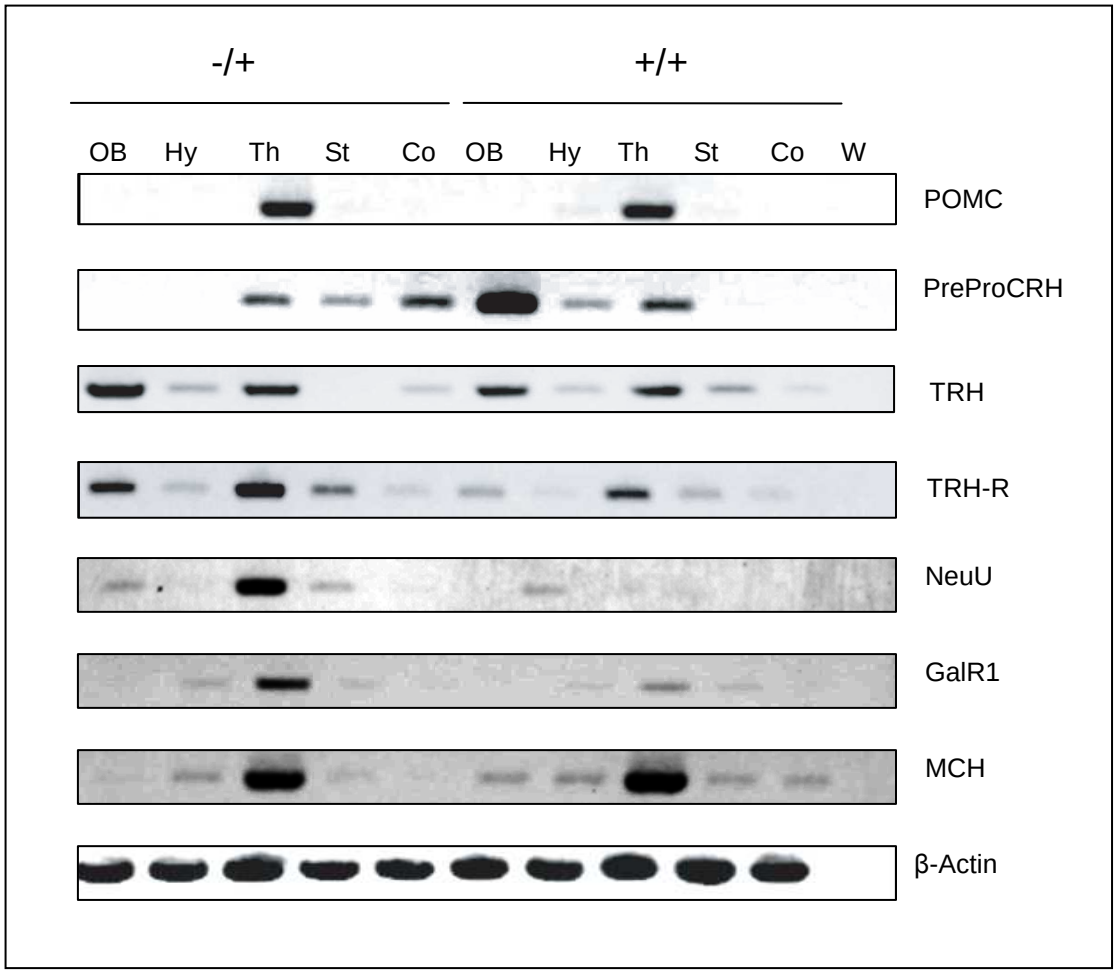


Abbildung 15: Expressionsanalyse von Genen, die in die Energiehomöostase eingreifen, mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion. Verwendet wurden Gehirnregionen von Inhibiting-kB-Kinase2-dominant negativ Mäusen, sowie spezifische Primer für: Proopiomelanocortin (POMC), PrePro Corticotropin freisetzendes Hormon (PreProCRH), Thyreotropin freisetzendes Hormon (TRH), TRH-Rezeptor (TRH-R), Neuromedin U (NeuU), Galanin- Rezeptor1 (GalR1), Melanin konzentrierendes Hormon (MCH), β-Actin als Kontrolle. Untersuchte Organe: Olfaktorische Bulbi (OB), Hypothalamus (Hy), Thalamus (Th), Striatum (St), Cortex (Co). Wasserkontrolle (W)

Pro-Opiomelanocortin (POMC), das Vorläufer-Peptid des Corticotropin freisetzenden Hormons (PreProCRH), das Thyreotropin freisetzende Hormon (TRH), der TRH Rezeptor (TRH-R) und Neuromedin U (NeuU) sind Gene mit anorexigener Wirkung, die untersucht wurden. Für POMC ließ sich durch die PCR kein Unterschied zwischen Wildtyp und +/+ ausmachen, eine Expression zeigte sich nur im Thalamus (Abb.15). PreProCRH zeigte eine starke Expression in den olfaktorischen Bulbi der +/+ Maus, während bei den olfaktorischen Bulbi der Wildtyp Maus keine Expression zu erkennen war. Umgekehrtes gilt für Striatum und Cortex, bei denen sich nur bei der Wildtyp Maus eine Expression darstellen ließ. Nicht auszuschließen ist, dass diese Unterschiede auf Fehlern im PCR

Ansatz beruhen.

Für TRH und TRH-R zeigten sich ähnlich Bilder, beide wiesen die stärkste Expression in den olfaktorischen Bulbi und dem Thalamus auf. Sowohl TRH als auch TRH-R zeigten eine etwas schwächere Expression in der +/+ Maus, besonders deutlich ist dies bei TRH-R an den olfaktorischen Bulbi zu erkennen. Für Neuromedin U ergab sich ein wesentlicher Expressionsunterschied im Thalamus, mit einer deutlich stärkeren Expression in der Wildtyp Maus. Die untersuchten anorexigenen Faktoren zeigten keine verstärkte Expression in den +/+ Tieren und lieferten damit keinen Hinweis auf die Entstehung des Phänotyps.

Mit dem Galanin Rezeptor1 (GalR1) und dem Melanin konzentrierendem Hormon (MCH) sind zwei orexigene Faktoren untersucht worden (Abb.15). GalR1 weist eine verstärkte Expression im Thalamus der Wildtyp Maus auf, dieser Befund würde zu dem Phänotyp der IKK2-DN +/+ Mäuse passen. MCH zeigt eine vergleichbare Expression in beiden Genotypen. Für die Gene des Stoffwechsel ließe sich eigentlich die stärkste Expression im Hypothalamus erwarten, dass dies nicht der Fall ist, sondern stets der Thalamus eine prominente Expression aufwies, könnte an der Präparation des Gehirns liegen. Vermutlich wurden bei der Präparation größere Teile des Hypothalamus am Thalamus belassen.

Von einer neuen Präparation von acht Mäusen der IKK2-DN 12 Linie, vier Wildtyp und vier IKK2-DN +/+, wurden nur Hypothalamus und die Hypophyse untersucht. Die Mäuse wurden wie gewohnt vor der Sektion für 24h gehungert. Für die RNA Extraktion aus dem Gewebe wurden je drei +/+ und drei Wildtypen zusammengefasst verarbeitet und je eine einzeln. In der Abbildung 16 sind die beiden ersten Hypothalami und die Hypophysen, die aus drei Mäusen zusammengefassten, und die beiden in der Mitte abgebildeten Hypothalami stammen jeweils aus nur einer Maus. Die Untersuchung des Neuropeptid Y (NPY) ergab gleiche Expressionsniveaus in den Hypothalami der beiden Genotypen, als auch in den Hypophsen, wobei die Expression in den Hypophysen erwartungsgemäß schwächer ausfiel. Bei dem GalR1 zeigte sich eine schwächere Expression bei dem einzelnen Hypothalamus der +/+ Maus, die etwas reduzierte Intensität dieser Bande korreliert allerdings mit einer schwächeren β-Actin Bande, also einer geringeren cDNA-Konzentration in der Verdünnung. Bei den zusammengefassten Hypothalami wurde kein Unterschied zwischen den Genotypen deutlich. In den Hypophysen konnte keine Expression gezeigt werden. Ein weiterer orexigener Faktor ist das Agouti related peptide (AGRP), hier zeigten sich Banden von sehr schwacher Intensität in den Hypophysen. Für den Hypothalamus konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen gezeigt werden.

Auch die bereits zuvor (Abb. 15) untersuchten anorexigenen Faktoren TRH und TRH-R ließen hier keine Unterschiede im Expressionsniveau der Hypothalami erkennen. Für TRH-R zeigten sich ähnliche Intensitäten der Banden in den Hypophysen und den Hypothalami. TRH hingegen zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Organen, mit deutlich stärkerer Expression in den Hypothalami. Die Wildtyp Hypophyse zeigte sich hier auch mit stärker Intensität als die +/+.

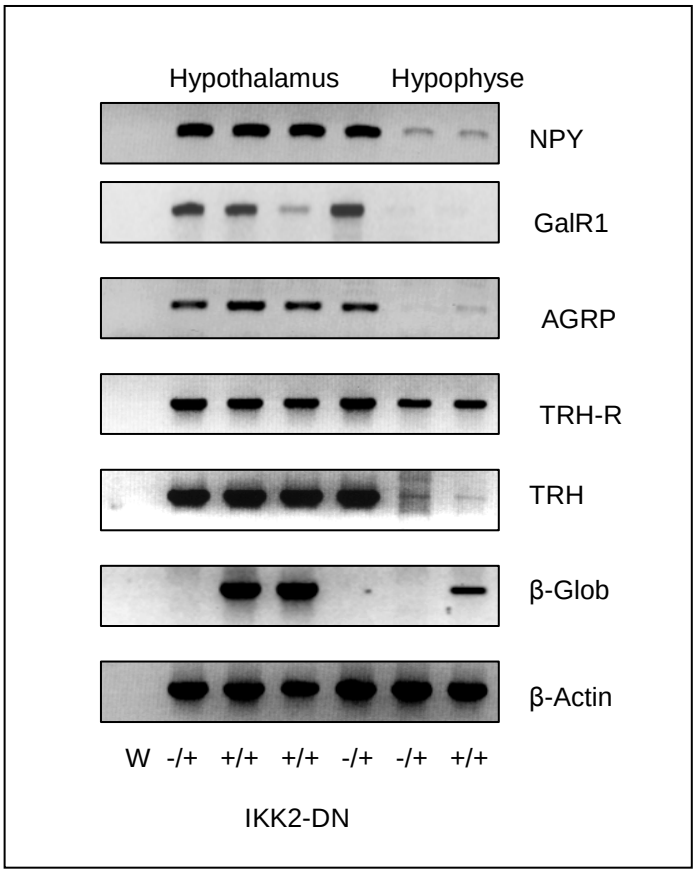


Abbildung 16: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion mit Hypothalamus und Hypophyse von Inhibiting-kB-Kinase2-dominant negativ Mäusen. Primer für Neuropeptid-Y (NPY), Galanin- Rezeptor1 (GalR1), Agouti related peptide (AGRP),Thyreotropin freisetzendes Hormon (TRH), TRH-Rezeptor (TRH-R), Neuromedin U (NeuU), , Melanin konzentrierendes Hormon (MCH), β-Actin als Kontrolle und β-Glob zur Kontrolle der Transgenexpression. Wasserkontrolle (W)

3.4.3 Veränderungen der Expression endogener Opioide und Cannabinoide

Dem System der endogenen Opioide und Cannabinoide wird eine Rolle in der Regulation

des Stoffwechsels zugesprochen, weshalb Gene aus diesem System an dieser Stelle untersucht werden sollten. Untersucht wurden die Opioid Rezeptoren μ (μ OpioR), κ (κ OpioR) und δ, der Nociceptin Rezeptor (NociR), sowie die Cannabinoid Rezeptoren (CB1/2) (Abb.17). Für den δ Opioid Rezeptor und den Cannabinoid Rezeptor2 ist es mit den verwendeten Primern mittels RT-PCR nicht gelungen eine Expression darzustellen.
Der μ OpioR zeigte eine Expression in allen untersuchten Gehirnregionen, wobei sich beim Hypothalamus nicht die erwartete Bande bei 636bp darstellte, sondern eine Bande bei ca. 100bp. Dies lässt sich womöglich durch ein alternatives Splicen erklären. Für den κ OpioR lassen sich kaum Unterschiede erkennen, bei der Hypothalamus Wildtyp Probe war ein Fehler aufgetreten, weshalb keine Bande zu sehen ist. Der NociR zeigte vergleichbare Expressionsstärken in den jeweiligen Gehirnregionen der beiden Genotypen. Lediglich der Hypothalamus der +/+ Maus wies eine verstärkte Expression, gegenüber dem der Wildtyp Maus, auf. Auch für den CB1 zeigen sich in den entsprechenden Banden gleichwertige Intensitäten, außer im Thalamus, wo die Wildtyp Maus eine höhere Intensität aufweist.

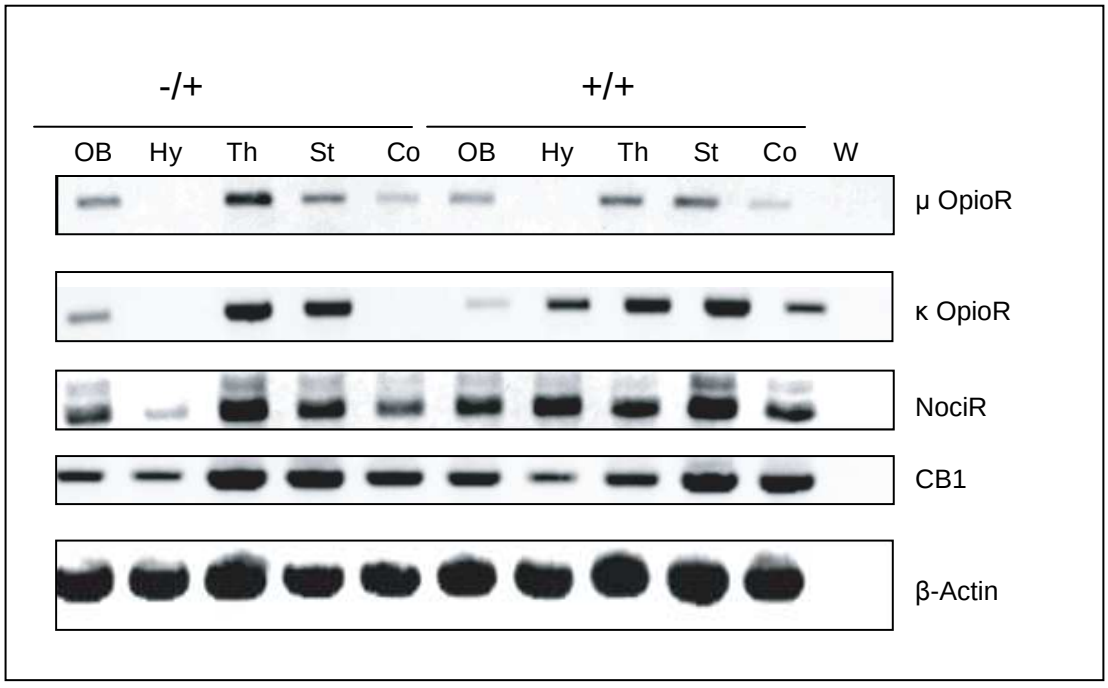


Abbildung 17: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion mit Gehirnregionen von Inhibiting-kB-Kinase2-dominant negativ Mäusen. Primer wurden verwendet für die Opioid Rezeptoren μ (μ OpioR),und κ (κ OpioR), den Nociceptin Rezeptor (NociR), sowie den Cannabinoid Rezeptore 1 (CB1). Untersuchte Organe: Olfaktorische Bulbi (OB), Hypothalamus (Hy), Thalamus (Th), Striatum (St), Cortex (Co). Wasserkontrolle (W)

3.4.4 Veränderungen der Expression bekannter NF-κB Zielgene

Es ist eine Vielzahl von Genen bekannt, deren Expression von NF-κB beeinflusst wird, und die damit als NF-κB Zielgene gelten. Einige dieser Gene sollten untersucht werden, um daran die veränderte Aktivität von NF-κB durch das IKK2-DN, bzw. das IKK2-CA Transgen zu zeigen. Für einige dieser Gene, wie z.B. Interleukin 6 (IL6) oder auch die Cyclooxygenase 2 (Cox2), sind auch Zusammenhänge mit dem Stoffwechsel bekannt.
Für p100 (NF-kB2) zeigt sich für die IKK2-DN ein schwer zu interpretierendes Ergebnis, da einige Banden fehlen (Abb.18). Der Thalamus zeigt zumindest eine mögliche stärkere Expression in den Wildtypen. Bei den IKK2-CA zeigt sich wesentlich deutlicher eine verstärkte Expression in den +/+ Mäusen, außer im Cortex, wobei dieser schon im β-Actin sehr schwach erscheint und somit nicht zu werten ist.
Interleukin 6 und der Interleukin 6 Rezeptor-b (IL6Rb), zeigten in den IKK2-DN Mäusen stärkere Expressionen, in den Regionen Thalamus, Striatum und Cortex. IL6 zeigte in den +/+ IKK2-CA im Thalamus eine erhöhte Intensität der Bande, IL6Rb im Hypothalamus (Abb.18).
Die Oxytocin Rezeptoren 1 und 2 (OX1R, OX2R) deuteten erhöhte Expression in den +/+ IKK2-CA Mäusen an, besonders deutlich war dies am Striatum zu erkennen (Abb.18). Während sich die Ergebnisse von OX1R und OX2R in den IKK2-CA Mäusen sehr ähnlich darstellten, differierten sie in den IKK2-DN wesentlich voneinander. OX1R bot Banden vergleichbarer Intensität für die einzelnen Organe jedes Genotyps, lediglich für den Cortex zeigte sich eine erhöhte Intensität auf Seiten der Wildtyp Maus. Für OX2R hingegen waren höhere Intensitäten der Banden in Striatum und Cortex und eine schwächere Intensität in den olfaktorischen Bulbi des +/+ Genotyps auszumachen.

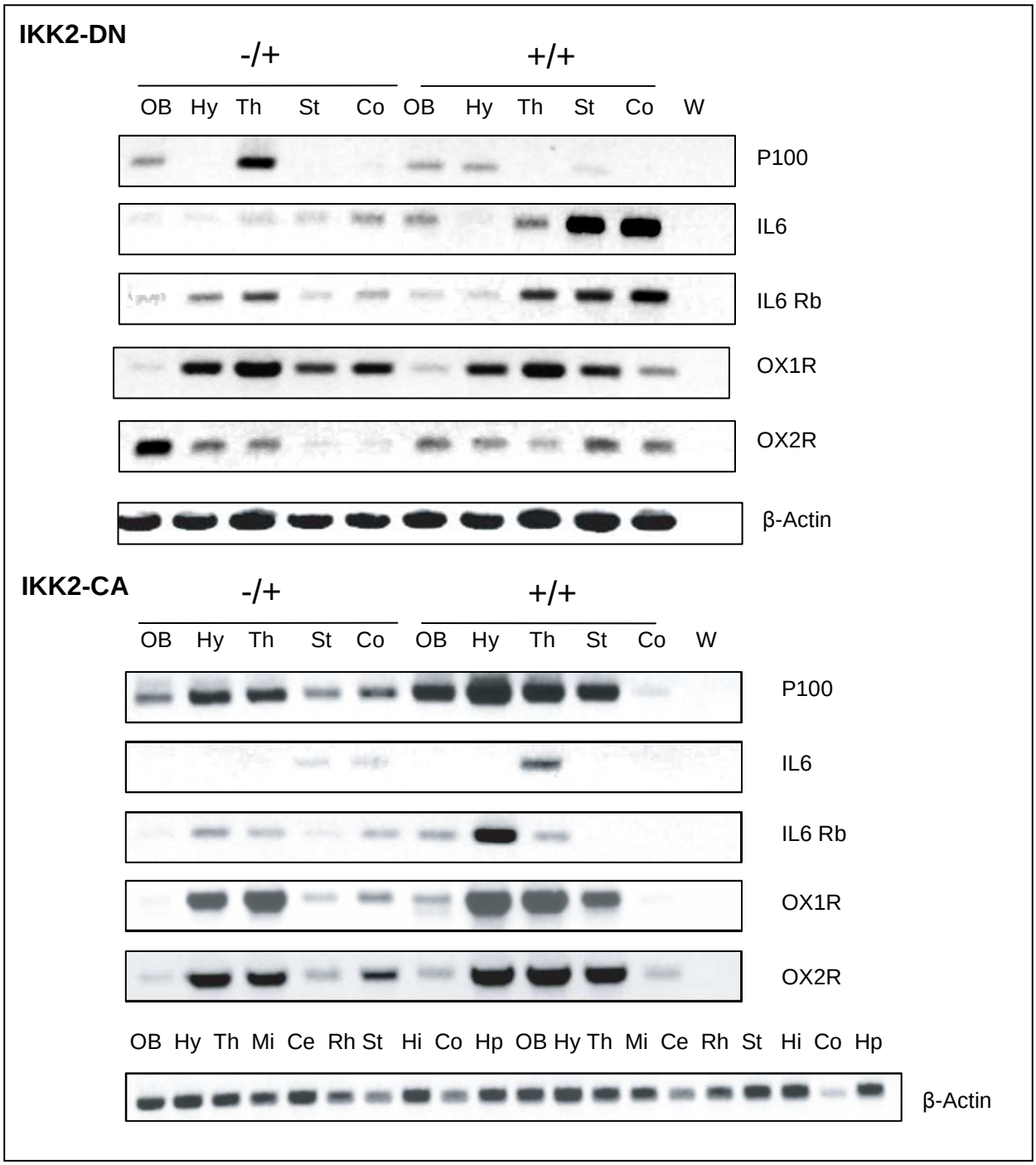


Abbildung 18: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion mit Gehirnregionen von Inhibiting-kB-Kinase2-dominant negativ und Inhibiting-kB-Kinase2-constitutiv aktiv Mäusen für bekannte NF-κB Zielgene. Olfaktorische Bulbi (OB), Hypothalamus (Hy), Thalamus (Th), Mittelhirn (Mi), Cerebellum (Ce), Rhombencephalon (Rh), Striatum (St), Hippocampus (Hi), Cortex (Co) und Hypophyse (Hp). Wasserkontrolle (W)

In Abbildung 19 sind die Ergebnisse für die Untersuchung von Cox2 und JunB, in IKK2-DN und IKK2-CA Mäusen abgebildet. In den IKK2-DN Mäusen zeigte sich für Cox2 eine Expression in den olfaktorischen Bulbi, Striatum, Hippocampus und Cortex, dies

entspricht dem Ergebnis für die IKK2-CA Mäuse, wobei bei diesen der Hippocampus nicht mit untersucht wurde. Tendenziell konnte man bei IKK2-DN stärkere Banden beim Wildtyp ausmachen. Bei IKK2-Ca ließ sich im Striatum der +/+ Maus eine stärkere Expression von Cox2 erkennen. Für JunB zeigte sich eine stärkere Expression in Striatum, Cortex, Hypophyse und Rückenmark. In den IKK2-DN spricht das Ergebnis für eine abgeschwächte Expression von JunB in dem +/+ Genotyp.

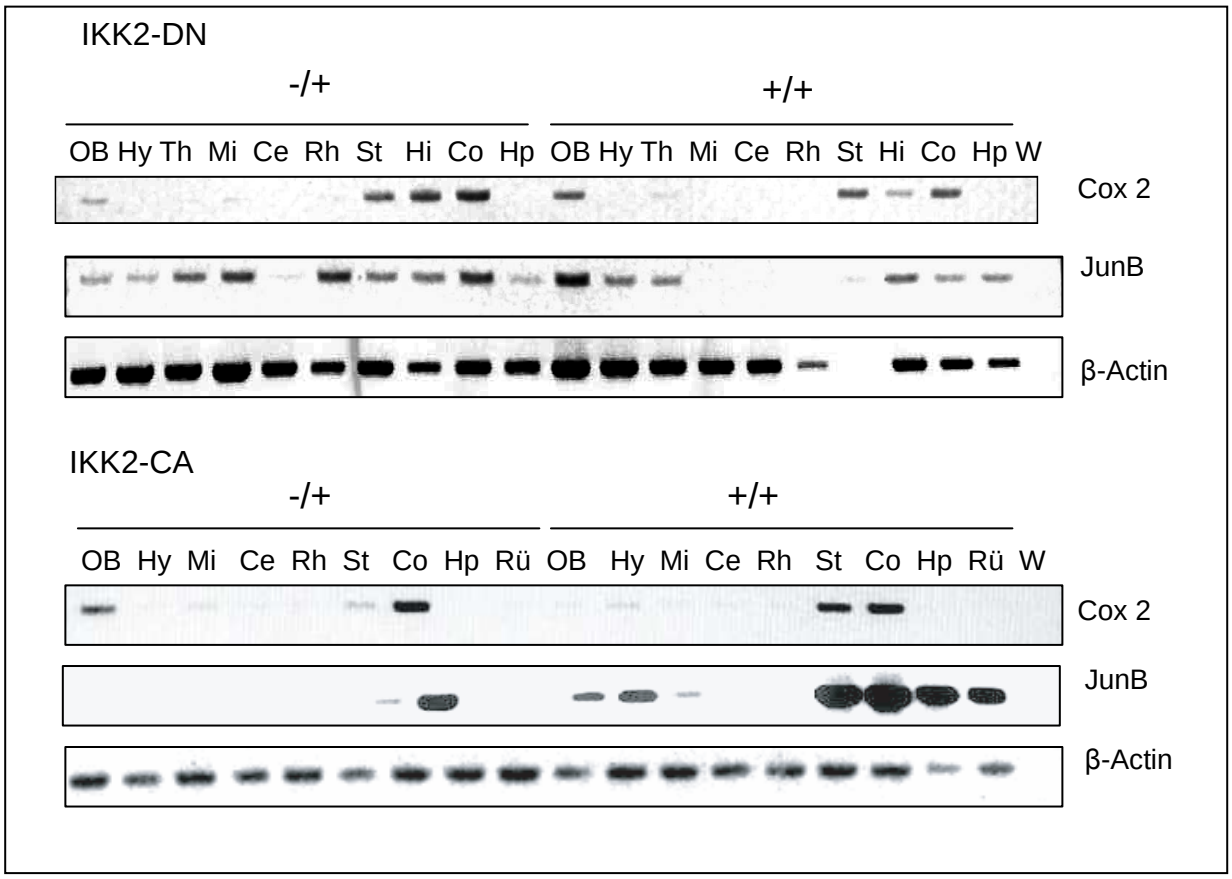


Abbildung 19: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion mit Gehirnregionen von Inhibiting-kB-Kinase2-dominant negativ und Inhibiting-kB-Kinase2-constitutiv aktiv Mäusen für bekannte NF-κB Zielgene. Olfaktorische Bulbi (OB), Hypothalamus (Hy), Thalamus (Th), Mittelhirn (Mi), Cerebellum (Ce), Rhombencephalon (Rh), Striatum (St), Hippocampus (Hi), Cortex (Co) und Hypophyse (Hp). Wasserkontrolle (W)

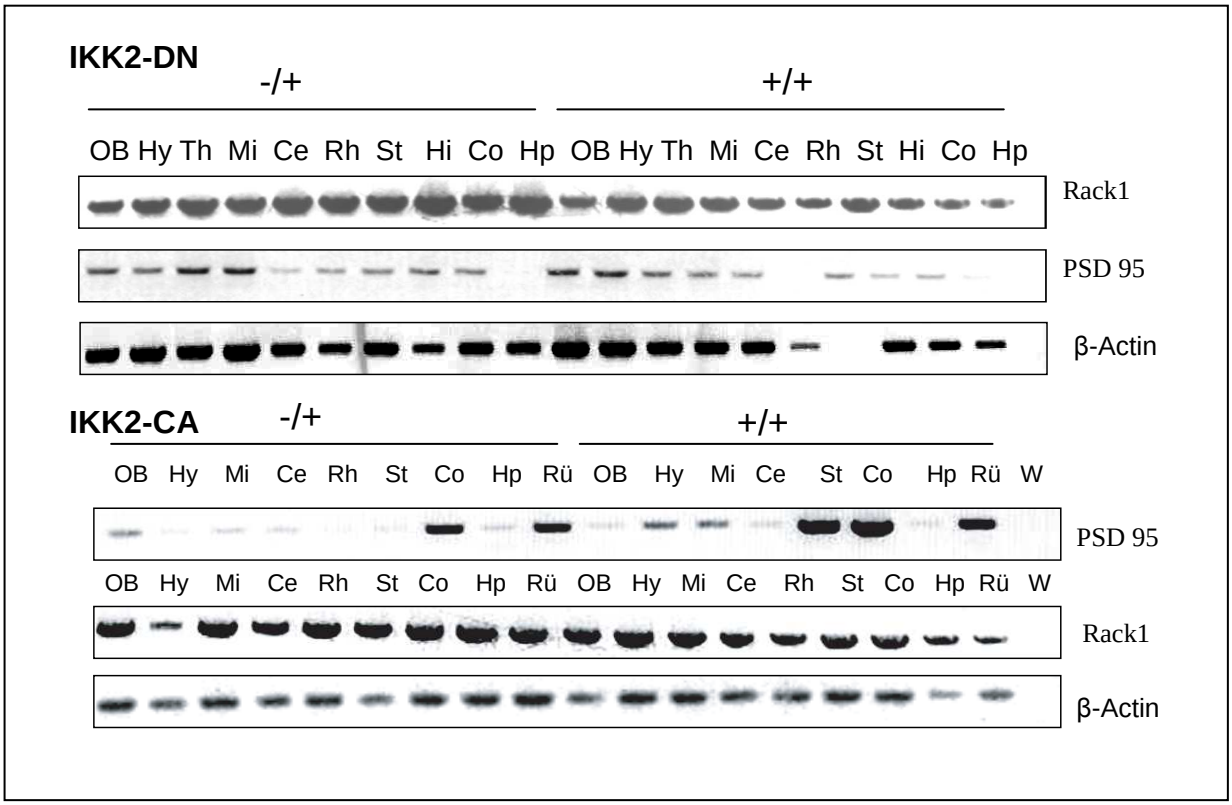
3.4.5 Veränderungen der Expression von Gerüstproteinen

Gerüstproteine sind Proteine mit vielen Bindungsdomänen, deren Aufgabe es ist andere Proteine zusammenzubringen und so deren Interaktion zu ermöglichen. Hier sollten zwei

wichtige Gene dieser Proteinfamilie untersucht werden, der „receptor for activated C kinase“ (RACK1) und das „postsynaptic density protein 95“ (PSD95). Während Rack1 bereits als NF-κB Zielgen beschrieben ist gilt PSD95 als wichtig für die Entwicklung von Nervenzellen.

Die RT-PCR von Rack 1 zeigte bei den IKK2-DN +/+ Mäusen eine abgeschwächte Expression gegenüber den Wildtypen, am deutlichsten zeigte sich diese in Hippocampus, Cortex und Hypophyse. Die RT-PCR mit IKK2-CA zeigte ein sehr ähnliches Bild, mit einer stärkeren Expression von Rack1 in den Organen der Wildtyp Maus.

Für PSD95 zeigte sich bei den IKK2-CA Mäusen die stärkste Expression in Striatum Cortex und Rückenmark. Insbesondere das Striatum der +/+ Maus ließ eine Hochregulation erkennen, aber auch Hypothalamus, Mittelhirn und Cortex zeigten Banden mit höherer Intensität. Bei IKK2-DN zeigten sich die Unterschiede weniger deutlich, doch war eine verminderte Expression bei den +/+ Mäusen zu erkennen. Die IKK2-DN -/+ Mäuse zeigten die stärkste Expression in Thalamus und Mittelhirn.



<u>Abbildung 20</u>: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion mit Gehirnregionen Inhibiting-kB-Kinase2-dominant negativ und Inhibiting-kB-Kinase2-constitutiv aktiv Mäusen. PSD95 und Rack1 Olfaktorische Bulbi (OB), Hypothalamus (Hy), Mittelhirn (Mi), Cerebellum (Ce), Rhombencephalon (Rh), Striatum (St), Cortex (Co), Hypophyse (Hp) und Rückenmark.. Wasserkontrolle (W)

Nach den Befunden von PSD95 wurden auch weitere Mitglieder der PSD-Familie untersucht (Abb.21). Hierfür wurden Cerebellum und Cortex von IKK2-CA Mäusen untersucht. Die RT-PCR zu Shank1 zeigte eine leicht verstärkte Expression auf Seiten des +/+ Genotyps. Die sechs anderen Gene der PSD-Familie (Kalirin, SAP97, SAP102, Shank1, Shank2, SPAR, Spank1) wiesen in den RT-PCR keine Unterschiede auf.

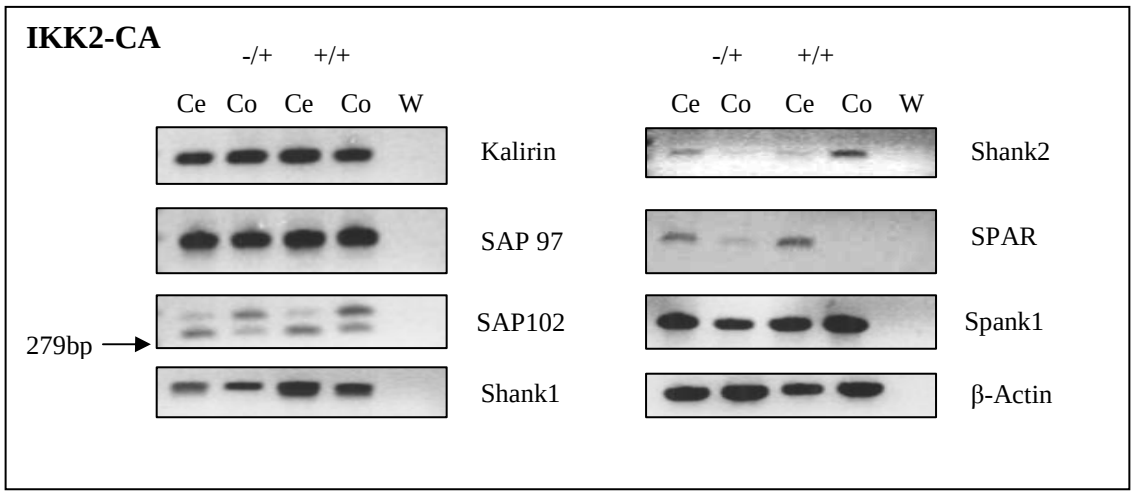


Abbildung 21 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion mit Cerebellum (Ce) und Cortex (Co) von Inhibiting-kB-Kinase2-constitutiv aktiv Mäusen mit Primern für Gene der Familie von Gerüstproteinen. β-Actin als Kontrolle

3.4.6 Veränderungen der Regulation des Wachstumshormons im Gehirn

Die IKK2-DN +/+ Tiere weisen eine geringere Größe und ein geringeres Gewicht auf als die Wildtypen, was neben anderen Ursachen auch durch eine Störung des Wachstumshormonhaushalts bedingt sein könnte.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Expression von Wachstumshormon (growth hormone, GH), seinem Releasing-Hormon (GHRH) und den zugehörigen Rezeptoren (GHR und GHRHR) in Hypothalamus und Hypophyse mittels RT-PCR untersucht (Abb. 22).

Für GHRH zeigte sich nur im Hypothalamus eine Expression und nicht in der Hypophyse. Dabei zeigten sich leichte Unterschiede in der Expression zwischen den untersuchten Hypothalami der beiden Genotypen, mit etwas schwächeren Banden bei den +/+ Hypothalami der IKK2-DN Mäuse. Bei IKK2-CA zeigte sich kein Unterschied. Die

Expression des Rezeptors (GHRHR) in der Hypophyse war bei beiden Proben vergleichbar, in den Hypothalami zeigte sich keine Expression.
Die Expression des Wachstumshormons selbst war in den +/+ IKK2-DN Tieren reduziert, die IKK2-CA Tiere zeigten nur einen geringeren Unterschied.
Der Hypophysen spezifische Transkriptionsfaktor (pituitary-specific transcription factor, Pit1) zeigte erwartungsgemäss nur in der Hypophyse eine Expression ohne Unterschiede zwischen den Genotypen.

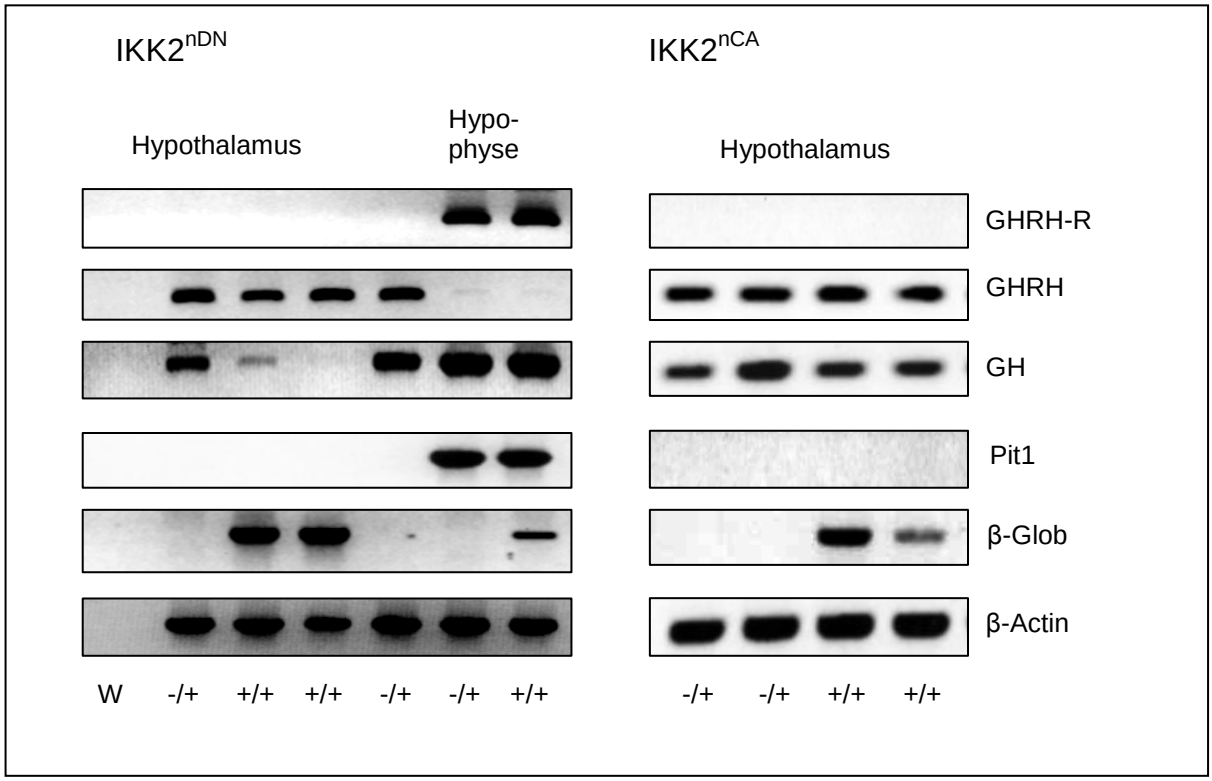


Abbildung 22: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion mit Hypothalami und Hypophysen von Inhibiting-kB-Kinase2-dominant negativ und Inhibiting-kB-Kinase2-constitutiv aktiv Mäusen. Untersucht wurden Wachstumshormon (GH), Wachstumshormon freisetzendes-Hormon (GHRH), der GHRH Rezeptoren (GHRH-R) und der Hypophysen spezifischer Transkriptionsfaktor 1 (Pit1) β-Actin als Ladekontrolle und β-Glob zur Kontrolle der Transgenexpression.

3.5 Analyse von Gensequenzen auf mögliche NF-κB Bindungsstellen

Um für die durch RT-PCR gefundenen Unterschiede in der Expression von Galanin

Rezeptor1, Bac33, und Growth Hormone einen weiteren Zusammenhang mit NF-κB herzustellen, wurden ihre genomischen Sequenzen auf mögliche Bindungstellen für NF-kB untersucht.

Hierfür wurden die Sequenzen der Ensembl.org Datenbank für Mus musculus herangezogen. Untersucht wurde jeweils der Bereich -2000 Basenpaare bis zum Transkriptionsstart (Start of Transcription). Diese Bereiche wurden zunächst manuell auf Sequenzen hin geprüft, die als NF-κB Bindungstellen beschrieben sind (siehe Tabelle 5). Diese Bindungstellen sind in den untersuchten Bereichen nicht vertreten. Für eine umfassende Analyse von möglichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wurde dann das Programm TFsearch (www.cbrc.jp) verwendet. Dabei wurden mögliche Bindungsstellen für NF-κB gefunden:

BAC33	5’ GGGGTCAGCC 3’
GalaninR1 A	5’ AGGCATTTCC 3’
C	5’ GGGAAAAACC 3’
Growth Hormone	5’ GGGCTTTCCC 3’

Tabelle 5: NF-κB Consensussequenzen (p50-p65)

1	GGG GAT TTC C	5	GGG GAT TCC C
2	GGG AAA TTC C	6	GGG AAT TTC C
3	GGG ATT TCC C	7	GGG GAA TTC C
4	GGG TTT CCC C	8	GGG ACT TTC C

3.5.1 Gelretardationsanalysen zum Nachweis einer κB Bindung

Um die gefundenen Sequenzen auf NF-kB Bindung zu untersuchen, wurden entsprechende DNA-Sonden (siehe Material und Methoden) in der Gelretardationsanalyse verwendet.

Als Kontrollen wurde zum einen ein DNA- Fragment mit einer bekannten κB-Sequenz (TW-κB) verwendet und zum anderen die Bindungssequenz des Transkriptionsfaktors SP-1SP-1) als Ladekontrolle eingesetzt.

Alle Sonden wurden mit Proteinextrakten aus PC 12 Zellen untersucht, die , unbehandelt (C) und zur NF-KB Aktivierung mit TNF (T) bzw. mit TNF und PMA zusammen

behandelt (T/P) waren.

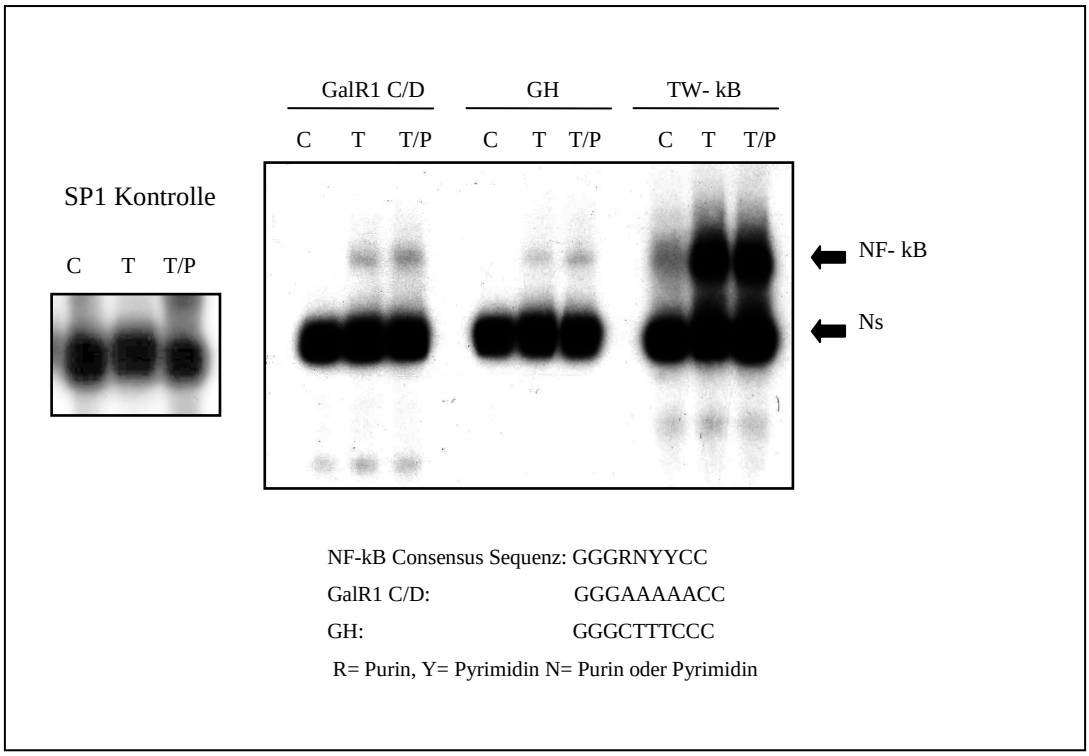


Abbildung 23: Electrophoretic Mobility Shift Assay mit Gesamtproteinextrakten, es wurden je Probe 6µg eingesetzt, nicht induzierte Extrakte (C), mit TNF induzierte (T) und mit TNF und PMA induzierte (T/P).Verwendete Sonden: SP1 als Ladekontrolle, TW-κB als Vergleich (wird spezifisch von aktivem NF-κB gebunden) , Galanin Rezeptor 1(GalR1 C/D) und Wachstumshormon (GH) Unspezifische Bande (Ns)..

Anhand der SP1 Kontrolle ist zu erkennen, dass gleiche Mengen an Protein eingesetzt wurden. Bei den anderen Sonden ist zunächst immer eine starke unspezifische Bande (NS) zu erkennen und darüber die für NF-kB spezifische Bande.

Bei der GalR1 C/D, als auch bei der Growth Hormone (GH) Sonde bietet sich ein ähnliches Bild. Bei den nicht induzierten Extrakten ist keine Bande zu erkennen, während bei denen mit TNF induzierten eine NF-kB Bindung zu erkennen ist, die sich nach TNF/PMA noch stärker darstellt. Im Vergleich zeigt sich, dass beiTW-kB nach TNF und TNF/PMA Stimulation eine wesentlich stärkere Bindung auftritt., Selbst bei den nicht induzierten Extrakten ist eine deutliche Bande sichtbar, die intensiver ist als die TNF/PMA Banden der beiden anderen Sonden.

Nicht dargestellt sind die Ergebnisse für Bac 33 und GalR1 A/B, da keine NF-kB spezifischen Banden zu erkennen waren.

Um die Bindungsstärke der Fragmente GalR1 C/D und GH mit der von TW-kB vergleichen zu können wurden Kompetitionsexperimente durchgeführt. Für diese wurden

nur noch nicht induzierte und mit TNF induzierte Zellextrakte verwendet.

Es wurde zunächst ein EMSA mit radioaktiv markierten TW-kB Sonden (heiße Probe) durchgeführt, dem nicht radioaktiv markierte Sonden (kalte Proben) in verschiedenen Konzentrationen zugegeben wurden (Abb. 24).

Auf der linken Seite ist, TW-kB ohne Zugabe, mit 30fach, 300fach und 1000fach höherer Konzentration an kalter GalR1 C/D, sowie mit 30facher Konzentration kalter TW-kB, eingesetzt worden. Zu erkennen ist, dass die 30fache Konzentration von kalter GalR1 C/D Sonde die DNA-Bindung abschwächt. Bei der 300fachen Konzentration ist bei dem nicht induzierten Extrakt fast keine Bande mehr zu erkennen und bei der 1000fachen ist die DANN-Bindung vollständig kompetiert. Allerdings ist die 30fache Konzentration an unmarkierter TW-kB Sonde ausreichend, um den gleichen Effekt zu bewirken. Auf der rechten Seite (Abb. 24) wurde das gleiche Experiment durchgeführt, mit dem Unterschied, dass hier statt der GalR1 C/D-, die GH Sonde eingesetzt wurde. Zu erkennen ist hier eine schwächere Wirkung der GH Sonde, da selbst bei der 1000fach höheren Konzentration gegenüber TW-kB, die DNA-Bindung nicht verschwindt, TW-kB also nicht ganz aus der Bindung verdrängt wird. Beide Befunde machen deutlich, dass die die gefundenen Sequenzen im Wachstumshormon und Galanin Rezeptor 1 nur eine geringe Bindungaffinität für aktiviertes NF-kB aufweisen.

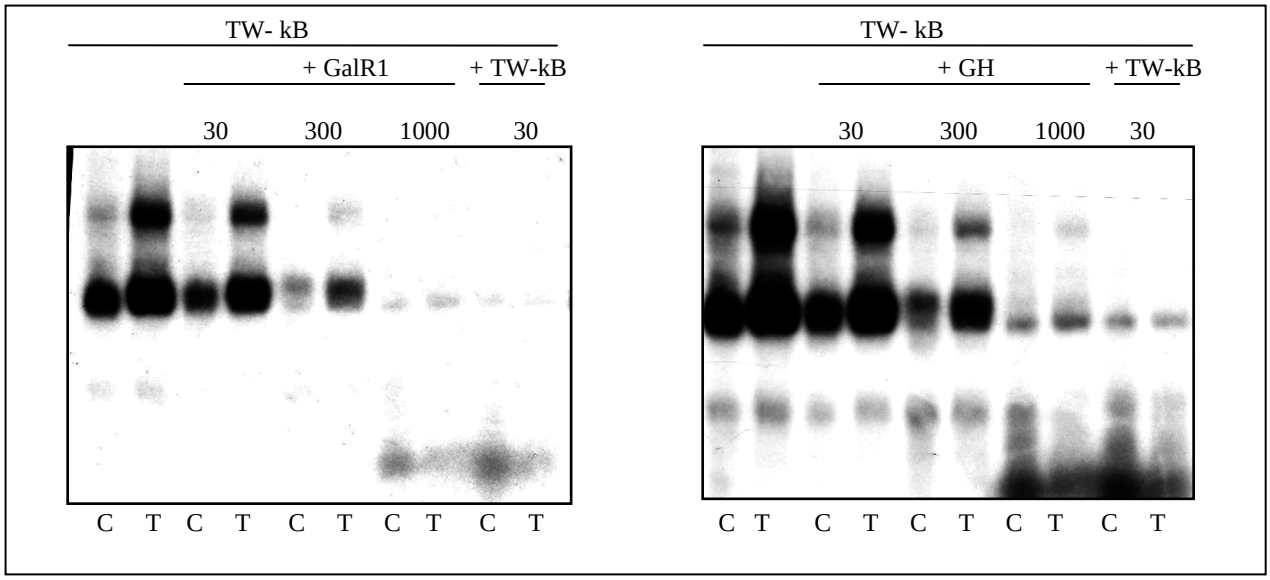


Abbildung 24: Kompetitions Electrophoretic Mobility Shift Assay mit Gesamtproteinextrakten, es wurden 6µg je Probe eingesetzt, nicht induzierte Extrakte (C), mit TNF induzierte Extrakte(T). Verwendete Sonden: TW-κB radioaktiv markiert (wird spezifisch von aktivem NF-κB gebunden), und als Kompetition in verschiedenen Konzentrationen links Galanin Rezeptor 1(GalR1 C/D) und rechts Wachstumshormon (GH) als nicht markierte Sonden.

Auch die umgekehrte Kompetition wurde durchgeführt, dass heißt, es wurde radioaktive GalR1 C/D bzw. GH Sonde eingesetzt und kalte TW-kB Sonde (Abb.25). Die TW-kB Sonde wurde hierbeiin der gleichen Konzentration wie die kalte Probe sowie in 1:10 und 1:100 verdünnter Konzentration verwendet.

Bei GalR1 C/D sieht man, dass die gleiche Konzentration an kalter TW-kB Probe die NF-kB Bindung nach TNF Stimulation komplett auslöscht, während bei geringerer Konzentration fast keine Kompetition auftritt. Ähnlich verhält es sich bei unbehandelten Extrakten. Die einfache Konzentration an kalter TW-kB Probe ist ausreichend, um die Bindung an GalR1 C/D zu verhindern. Allerdings sind hier auch die Verdünnungen in der Lage zu kompetitieren.

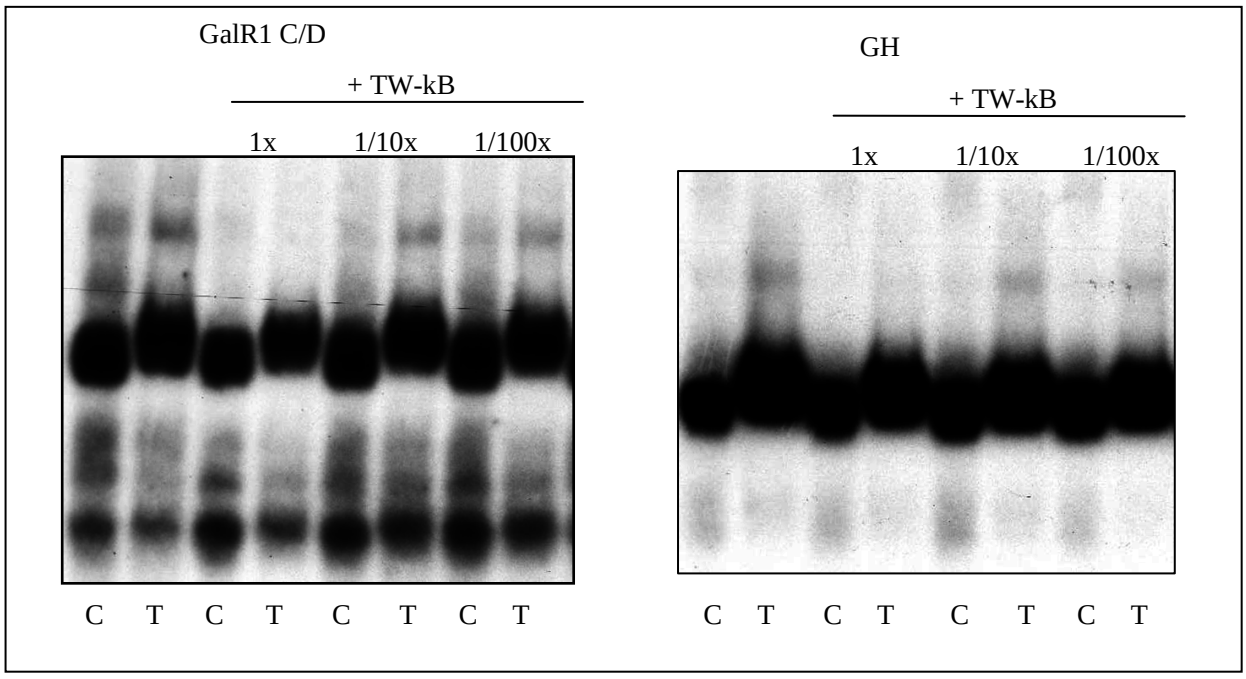


Abbildung 25: Kompetitions Electrophoretic Mobility Shift Assay mit Gesamtproteinextrakten, es wurden 6µg je Probe eingesetzt, nicht induzierte Extrakte (C), mit TNF induzierte Extrakte(T). Verwendete Sonden: TW-κB nicht radioaktiv markiert in verschiedenen Konzentrationen, und als links Galanin Rezeptor 1(GalR1 C/D) und rechts Wachstumshormon (GH) als radioaktiv markierte Sonden.

Im Falle der GH Sonde führt die Zugabe von kalter TW-kB Probe in einfacher, 1/10 und 1/100 Konzentration bei unstimulierten Extrakten zum Verschwinden der basalen NF-kB Bindung. Nach TNF Stimulation ist nur die einfache Konzentration an kalter Probe ausreichend, um eine komplette Kompetition auszulösen.

Zusammengefasst zeigen die erzielten Ergebnisse, dass die GalR1 C/D- Sonde im Vergleich mit der GH Sonde eine stärkere Bindungsfähigkeit für NF-kB aufweist.

Allerdings ist die Bindungsaffinität beider Sequenzen sehr viel geringer im Vergleich zum Konsensusmotiv der TW-kB Sonde.Um darzustellen, welche NF-κB Untereinheiten an die GalR1 C/D und GH Sonde binden wurden weitere Gelretardationsanalysen durchgeführt. Hierfür wurden spezifische Antikörper gegen die NF-κB Proteine p50, p65 und cRel eingesetzt. Für p50 standen zwei Antikörper von verschiedenen Firmen zur Verfügung, welche beide verwendet wurden (Abb.26). Bei beiden Sonden zeigte sich in Anwesenheit des Kontrollantikörpers (PI) der NF-κB spezifische Komplex (a). Nach Zugabe des p65-spezifischen Antkörpers wurde die Ausbildung dieses Komplexes in unbehandelten und TNF-induzierten Proben nahezu vollständig gehemmt. In Anwesenheit des p50 oder c-Rel spezifischen Antkörpers konnte bei beiden Sonden keine auffällige Veränderung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Allerdings kommt es Zu einer partiellen Retardierung des Komplexes und zur Ausbildung eines ‚Supershifts' (b) nach Zugabe des p50u Antikörpers. Es kann daher festgehalten werden, dass an die Sequenzmotive GalR1 C/D und GH NF-kB-Dimere binden, die sich aus den Untereinheiten p50 und p65 zusammensetzen. Da die Zugabe des p50u Antikörpers keine vollständige Retardierung von Komplex a bewirkt, legt nahe, dass neben p50/p65 Heterodimeren auch p65 Homodimeren vorliegen.

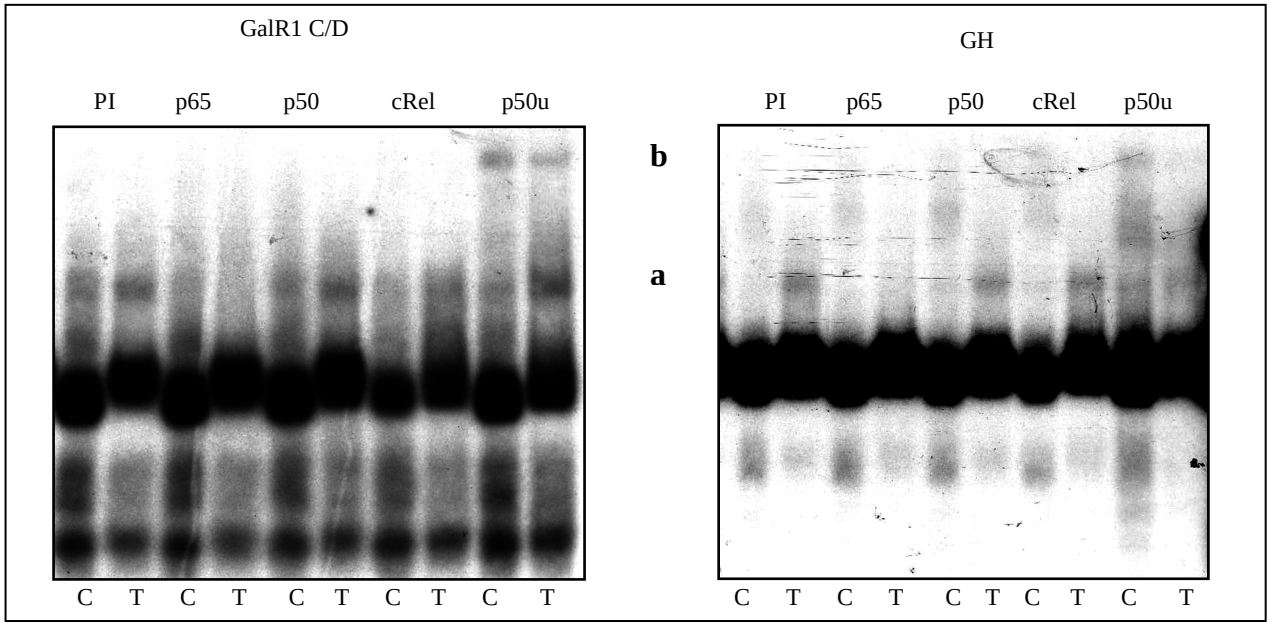


Abbildung 26: Antikörperspezifischer Electrophoretic Mobility Shift Assay zum Nachweis der NF-kB Proteine, die an die Galanin Rezeptor 1(GalR1 C/D) und Wachstumshormon (GH) Sequenzen binden.. Die Proteinextrakte wurden mit den angezeigten Antikörpern vorinkubiert. Als Kontrolle wurde ein unspezifischer polyklonaler IgG Antikörper (PI) eingesetzt. a ist die NF-κB spezifische Bande, b ist die durch den p50u Antikörper retardierte Bande.

4 Diskussion

4.1 Basale Expression des IKK2 Transgens im ZNS

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des IKK2-CA Transgens im ZNS wurde auf Proteineben mittels Westernblot (Abb.5) und auf RNA-Ebene mittels RT-PCR (β-Glob, Abb.12) untersucht. Die Expression des IKK2-DN Transgens wurde mittels RT-PCR untersucht (β-Glob, Abb.10).
Beide Transgene zeigen ähnliche Expressionsmuster in den verschiedenen Gehirnregionen mit jeweils sehr starker Expression in Striatum und Cortex, sowie starker Expression in den olfaktorischen Bulbi, Hypothalamus/Thalamus und dem Mittelhirn (Herrmann et al., 2005). Dies ermöglicht den direkten Vergleich der beiden Mauslinien, da vermutet werden kann, dass eine vergleichbare Expression der IKK2-Mutanten, auch entsprechende Änderungen in der IKK bzw. NF-κB Aktivität in den einzelnen Gehirnregionen bewirkt. So würde man erwarten, dass die Expression von NF-κB regulierten Genen in den IKK2-DN +/+ Tieren reprimiert und in den IKK2-CA +/+ Tieren erhöht ist.

4.2 Einfluss des IKK2-DN Transgens auf den Stoffwechsel

Der Phänotyp der IKK2-DN +/+ Mäuse zeichnet sich durch ein reduziertes Körpergewicht, so wie durch eine verminderte Körpergröße aus. Ursache einer solchen Ausprägung könnten Veränderungen im Stoffwechsel der Tiere sein. Bei der Regulation des Stoffwechsels spielen eine Vielzahl von Faktoren eine Rolle, und auch Organe und Gewebe, wie Leber, Pankreas, Muskel- oder Fettgewebe, können mehr oder weniger großen Einfluss auf den Stoffwechsel haben. Durch diese Gegebenheiten bestehen vielfältige Möglichkeiten einer Veränderung des Stoffwechsels, welche einen solchen Phänotyp zur Folge haben könnten. Die neuronen-spezifische Expression des Transgens lässt auf eine zentrale Beeinflussung des Stoffwechsels schließen. Hierbei rückt vor allem der Hypothalamus, das zentrale Regulationszentrum des Stoffwechsels, in das Zentrum des Interesses. Vorherige Studien zeigten keine Expression des Transgens in periphären

Organen.
Um Unterschiede im Energieverbrauch der Tiere darzustellen, wurden Hungerversuche mit ihnen durchgeführt. Die durchgeführte Untersuchung zeigte, dass die IKK2-DN +/+ Mäuse in 24h ohne Nahrung ca. 12,6 % ihres Körpergewichts verlieren, die Wildtyp Mäuse hingegen nur ca. 5,45 %. Dieser Befund spricht für einen erhöhten Energieverbrauch der doppelt transgenen Tiere. Ursächlich für einen erhöhten Energieverbrauch der Mäuse können eine erhöhte Thermogenese oder auch eine erhöhte Aktivität der Tiere sein.
Als Erklärung könnte z.B. eine Störung des thyreotropen Regelkreises dienen, da ein erhöhter Spiegel von Schilddrüsen-Hormonen einen erhöhten Grundumsatz bewirkt. Die Analyse der Schilddrüsen-Hormone zeigte jedoch keine signifikanten Veränderungen. Auch konnte keine Steigerung in der lokomotorischen Aktivität der Tiere festgestellt werden (persönliche Mitteilung von Dr. B. Baumann).

4.2.1 Veränderungen der Genexpression im Stoffwechsel

Werden einzelne Gene, welche eine Funktion in der Regulation des Stoffwechsels haben, in ihrer Expression beeinflusst, kann dies Folgen für den gesamten Organismus haben. Für eine ganze Reihe von Genen ist eine Funktion in der Regulation von Nahrungsaufnahme, Energiespeicherung und Energiemetabolismus bekannt. Nicht jede Störung eines dieser Gene wirkt sich auch deutlich auf den Stoffwechsel aus. Einige haben jedoch großen Einfluss, wie z.B. Untersuchungen von Leptinrezeptor Knockout Mäusen gezeigt haben (Zhang et al., 1994), die eine Fettsucht entwickelten.
Das für Proopiomelanocortin (POMC) kodierende Gen spielt eine große Rolle in der Regulation des Stoffwechsels, was unter anderem dadurch belegt ist, dass POMC defiziente Mäuse eine Fettsucht entwickeln (Yaswen et al., 1999). Es wurde auch gezeigt, dass eine Haploinsuffiziens des MC4R Gens mit 5% die häufigste monogene Ursache für massive Fettsucht beim Menschen ist (Farooqi et al., 2000). Bei den IKK-DN +/+ Tieren könnte eine erhöhte Expression von POMC eine mögliche Ursache für den Phänotyp sein. Das RT-PCR Ergebnis lässt allerdings auf eine POMC unabhängige Veränderung bei den Mäusen schließen.
Für PreProCRH war das Ergebnis nicht ganz eindeutig, doch könnte man eine vermehrte Expression in Hypothalamus, Thalamus und den olfaktorischen Bulbi auf Seite der doppelt

transgenen Maus interpretieren. Ein solcher Befund würde für einen erhöhten CRH Spiegel sprechen, welcher eine verstärkte anorexigene Wirkung bedeuten würde, und somit in das Schema des Phänotyps passen würde. CRH wurde als potenter Inhibitor der Nahrungsaufnahme beschrieben, mit Einfluss auf den Metabolismus und den Energieverbrauch (Britton et al., 1982; Richard et al., 2000)

Anders verhält es sich mit TRH und TRH-R, das dargestellte Ergebnis (Abb.15, S.57) widerspricht dem vermuteten, da für TRH eine anorexigene Wirkung beschrieben wurde und bei einer TRH Erhöhung auch mit einem erhöhten Energieverbrauch zu rechnen währe (Karydis et al., 1998). In den Untersuchugen an den Hypothalami (Abb.16) konnte der Befund allerdings auch nicht bestätigt werden, was den Aussagewert der Ergebnisse mindert.

Für das Ergebnis von Neuromedin U gilt ähnliches wie für TRH, eine verringerte Expression führt eher zu vermehrter Nahrungsaufnahme, was bei den Mäusen aber nicht der Fall ist. Für Neuromedin U defiziente Mäusen wurde gezeigt, dass diese eine Fettsucht mit vermehrter Nahrungsaufnahme entwickeln (Ivanov et al., 2002). Durch Behandlung mit exogenem Leptin konnte die Nahrungsaufnahme der Tiere jedoch gehemmt werden, was auf einen Leptin unabhängigen Mechanismus hinweist (Hanada et al., 2004). Bei dieser Konstellation mit verringerter Genexpression von anorexigenen Faktoren wie Neuromedin U könnte man annehmen, dass sich in Folge des ausschlaggebenden Defekts sekundäre Mechanismen entwickeln, die dem Phänotyp entgegenzuwirke und eine stärkere Ausprägung der Körgewichtsreduktion verhindern. Ein orexigener Faktor der beachtet werden sollte, ist Galanin. Untersucht wurde der Galanin Rezeptor 1 (GalR1), da dessen Gen beim Menschen schon als NF-κB Zielgen beschrieben wurde (Lorimer et al., 1997). Der GalR1 wird stark im Hypothalamus exprimiert (Burgevin et al., 1995). Die Tatsache, dass die RT-PCR (Abb.15) vor allem eine Expression im Thalamus zeigt lässt darauf schließen, dass Anteile des Hypothalamus bei der Präparation dem Thalamus zugeordnet wurden. Die Analyse weiterer Hypothalami (Abb.16) bestätigte diesen Verdacht. Das Ergebnis mit der deutlich stärkeren Expression bei den Wildtypen passt zu der beschriebenen NF-κB abhängigen Regulation im Menschen. Daher könnte weniger GalR1 eine abgeschwächte Galanin Wirkung zur Folge haben, was wiederum einen negativen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme haben könnte. Eine Hypophagie konnte bei den IKK2-DN Tieren jedoch nicht festgestellt werden.

Wie für das humane Galanin Rezeptor 1 Gen beschrieben, konnten wir im murinen Gen zwei potentielle NF-kB Bindungsstellen idendtifizieren. In Gelretartionsanalysen konnte

allerdings nur eine Bindung von NF-KB an die GalR1 C/D Sequenz (Position einfügen) nachgewiesen werden. Die gebundenen Komplexe bestehen sehr wahrscheinlich aus p50/65 und p65/p65 Dimeren. Die Kompetitionensexperimente machten aber deutlich, dass eine weitaus geringere Bindugsaffinität im Vergleich zum Konsensusmotiv vorliegt.
Ob diese Bindungsfähigkeit ausreicht, um eine NF-kB abhängige Expression des Rezeptors in vivo zu gewährleisten, ist offen und könnte in weiteren Studien mit entsprechenden Promotorkonstrukten charakterisiert werden.
Weitere wichtige orexigene Faktoren, NPY, MCH und AGRP, scheinen von dem Transgen nicht beeinflusst zu sein, sie zeigen alle drei eine vergleichbare Expression in den beiden Genotypen.

Endocannabinoide und Opioide

Schon seit hunderten von Jahren wird berichtet, dass der Konsum von Cannabis den Appetit steigern soll. Vor 40 Jahren wurde der genaue psychoaktive Wirkstoff identifiziert und in der Folge auch seine Rezeptoren Cannabinoid Rezeptor 1 (CB1) und -2 (CB2). Im ZNS wird nur CB1 exprimiert (Marsicano et al., 1999), um dort die Effekte der Endocannabinoide zu übermitteln, dies zeigte sich auch in den durchgeführten RT-PCR mit Primern für CB1 und CB2, da für CB2 keine Expression in den Gehirnregionen gezeigt werden konnte. Die reduzierte Expression von CB1 im Thalamus der doppelt transgenen Tiere könnte in Zusammenhang mit dem Phänotyp der Tiere stehen. In Experimenten mit CB1 -/- Mäusen wurde ein reduziertes Körpergewicht, ein reduzierter Fettanteil, sowie ein verminderter Appetit gezeigt (Cota et al., 2003). Für Cannabinoide wurde auch eine Inhibition von NF-κB über den CB1 beschrieben (Panikashvili et al., 2005).
Der μ-Opioid Rezeptor wurde als ein von NF-κB reguliertes Gen beschrieben (Kraus et al., 2003). Der Befund im Thalamus weist ebenfalls darauf hin, nicht jedoch der in den anderen Gehirnregionen, in denen das Transgen keinen Einfluss auf die Expression des μ-Opioid Rezeptor Gens zu haben scheint.

4.2.2 Einfluss auf das Insulinsignaling im ZNS

Insulin hat eine sehr starke anabole Wirkung in peripheren Geweben. Im ZNS wurde für Insulin vor allem ein starker Einfluss auf den Hypothalamus beschrieben. Hier wird Insulin ein starker anorexigener Effekt zugesprochen, indem es die Expression von NPY und

AGRP hemmt, und die von POMC steigert (Schwartz et al., 1992a).

Erste Zusammenhänge von Insulinresistenz und IKK2 wurden bereits durch die Wirkung von Salicylaten auf die Insulinresistenz gezeigt (Yuan et al., 2001; Kim et al., 2001). Arkan et al., und Cai et al. veröffentlichten dann 2005 Studien, welche eine Insulinresistenz hervorgerufen durch gesteigerte Aktivität von IKK2 in der Leber demonstrierten. Dieser Effekt wurde zurueckgefuehrt auf die phosphorylierung von IRS an Serinresten was wiederum eine verminderte Bildung von phopho-Akt verursacht.

Um eine schlüssige Erklärung für den Phänotyp der IKK2-DN Mäuse zu finden, müsste sich im ZNS infolge der reduzierten IKK2 Aktivität eine Insulinsensitivität und bei konstitutiv-aktiver IKK2 (IKK2-CA Tiere) eine Insulinresistenz ausbilden. Daraus könnte man folgern, dass bei Insulinsensitivität stärkere anorexigene Effekte auftreten, die ein vermindertes Körpergewicht der Tiere zur Folge haben. Die erhobenen Befunde (Abb.6) mit IKK2-CA Tieren unterstützen diese Überlegung. Höhere IKK2-Aktivität hemmt die Aktivierung von Akt. Die Auswertung der phosho-Akt ELISA Experimente bietet ein interessantes Bild. Die größte Bedeutung für den Stoffwechsel würde man den Befunden von Hypothalamus/Thalamus beimessen. Es ist auch anzunehmen, dass eine intraperitonale Insulinapplikation in erster Linie den Hypothalamus erreicht. In Übereinstimmung mit der aufgestellten Hypothese einer Insulinsensitivität wird bei IKK2-DN Tieren nach Insulinapplikation eine verstärkte Phosphorylierung an Serin 473 festgestellt. Es lässt sich jedoch nicht leicht erklären, wieso sich diese Unterschiede zwischen den 30 und 60 Minuten Werten umkehren. Zu diskutieren wäre, ob durch das IKK2-DN Transgen das Insulinsignaling dahingehend beeinflusst wird, dass aktivierte Akt auch wieder schneller dephosphoryliert wird. Das sich für die Mittelhirn, Striatum und Hippocampus wieder ein anderes Bild zeigt, weist entweder darauf hin, dass in verschiedenen Regionen andere Regulationsnechanismen greifen oder experimentelle Variationen vorliegen

Neben Insulin ist Leptin das wohl wichtigste periphere Signal des Stoffwechsels. Leptin wirkt auf die POMC Neuronen in gleicher Weise wie Insulin, hat allerdings eine entgegengesetzte Wirkung in den AGRP Neuronen. Leptin gibt dem Hypothalamus Rückmeldung über den Ernährungszustand und wirkt dort anorexigen (Hamann et al., 1996). Das dargestellte Ergebnis (Abb.9) zeigt tendenziell einen niedrigeren Leptinspiegel bei IKK2-DN +/+ Tieren. Dies lässt sich wohl damit erklären, dass Leptin proportional zur Fettmasse gebildet wird und diese bei den Tieren reduziert ist. Hiermit ist allerdings nur eine Folge des Phänotyps gezeigt und nicht eine ursächliche Wirkung. Die individuellen Schwankungen im Leptinspiegel der Tiere schmälern jedoch die Aussagekraft.

4.3 Analyse der Genexpression mit DNA-Microarrays

Bei der Genexpressionsanalyse mit DNA-Microarrays konnte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe fünf Kanditatengene identfiziert werden, die in embryonalen Gehirnen von IKK2-DN Tieren differenziell reguliert waren,. Es sollte in dieser Arbeit ein Expressionsprofil dieser Gene in embryonalen und adulten Tieren erstellt werden, um deren IKK2-DN abhängige Regulation zu veriferzieren und eine potentielle Verbindung zum Phänotyp darzustellen. Durch RT-PCR ließ sich für vier der fünf Gene eine Expression in Gehirnregionen nachweisen, lediglich für MOE1 ist dies nicht gelungen.
Im adulten Organismus zeigte sich für Bac33 gegenüber Wildtyp Mäusen eine abgeschwächte Expression in IKK2-DN +/+ und eine verstärkte Expression in IKK2-CA +/+ Mäusen. Bei den IKK2-DN Embryonen von Tag 17,5 bestätigte sich das Ergebnis, nicht jedoch in denen von Tag 18,5. Dies korrelierte allerdings mit einer reduzierten Trangenexpression. Diese befunde legen nahe, dass die IKK Aktivität einen Einfluss auf die Expression von Bac33 hat und Bac33 möglicherweise ein NF-kB Zielgen ist. Inwieweit eine veränderte Expression von Bac33 im ZNS mit dem phänotyp in Zusammenhang steht, ist unklar, da bisher keine detailierten Informationen zur Funktion des Genprodukts bekannt sind. Die gewonnen Daten zeigen, dass die Bac33 Expression nicht auf das ZNS beschränkt ist, sondern auch in peripheren Geweben exprimiert wird. Für C13Rik, Lisch7 und D2E konnten keine auffälligen Expressionsunterschiede zwischen adulten Wildtyp und IKK2-DN Tieren detektiert werden, möglicherweise war die RT-PCR Methode nicht sensitiv genug, um geringe Unterschiede in der Expression aufzuzeigen. Weiterhin könnten die Unterschiede in der Expression dieser Gene auch auf einen bestimmten Zeitpunkt in der embryonalen Entwicklung beschränkt sein

4.4 Unterschiede im Genexpressionsprofil der IKK2-DN und IKK2-CA Mäuse

4.4.1 Veränderungen in der Expression bekannter NF-κB Zielgene

Von großem Interesse bei der Untersuchung der transgenen Tiere mit veränderter IKK2

Aktivität sind natürlich die Veränderungen in der Exprssion von NF-kB abhängigen Zielgenen. Bei der Analyse von solchen Genen würde man erwarten, dass es zu einer Herabregulation bei den IKK2-DN und einer Hochregulation bei den IKK2-CA Mäusen kommt.

Zu diesen Überlegungen passen die Expressionsdaten von P100, Cox 2 und Jun B. Alle drei sind als NF-κB regulierte Gene beschrieben worden (Lombardi et al., 1995, Yamamoto et al., 1995 and Brown et al., 1995) und zeigen auch in den RT-PCR Analysen die entsprechenden Unterschiede in der Expression. Andere Zielgene wie IL-6 und OX1R weisen keine eindeutige Korrelation mit der IKK Aktivität auf, da nur in den IKK2-CA Tieren eine verstärkte Expression beobachtet werden konnte. Es ist nicht auszuschließen, dass die Regulation der basalen Expression auf einem NF-kB unabhängigen Mechanismus beruht und nur die induzierte Expression über das IKK/NF-KB System gesteuert wird. So konnte die Induktion von NF-kB Zielgenen bei der zerebralen Ischämie durch die Inhibition der IKK Aktivität reprimiert werden (Herrmann et al., 2005).

4.4.2 Veränderungen in der Expression von Gerüstproteinen

Es gibt eine Familie von Proteinen, die dafür sorgen, dass bestimmte Prozesse in der Zelle geordneter und damit schneller Ablaufen. Dies bewerkstelligen sie durch die Bindung der einzelnen Reaktionspartner an sich, womit sie diese in für die Reaktion günstige Positionen bringen. Die Proteine dieser Familie werden Gerüstproteine genannt, da sie als Gerüst für andere dienen. Eine wichtige Rolle spielen einige dieser Gerüstproteine auch für die Ausbidung von synaptischer Plastizität und die Entwicklung von Nervenzellen, weshalb sie im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

Das für die postsynaptische Dichte (PSD) wichtige Gerüstprotein PSD95 zeigte eine abgeschwächte Expression bei den IKK2-DN +/+ Tieren. Während andere Komponenten der PSD keine Expressionsänderungen aufweisen. PSD95 ist bislang nicht als NF-kB Zielgen beschrieben. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde eine Beeinflussung des Transkriptionslevels von PSD95 durch das Wachstumshormon im Hippocampus beschrieben (LeGreves et al., 2006). Es könnte daher eine Zusammenhang zwischen der reduzierten Expression von Wachstumhormon bei IKK2-DN Tieren und der PSD95 Transkription bestehen.

4.4.3 Veränderungen der Genexpression im Wachstumshormonsystem

Wegen der reduzierten Körpergröße der IKK2-DN +/+ Tiere wurde die Expression von Komponenten des Wachstumshormonsystems untersucht. Dabei zeigte sich überraschenderweise eine reduzierte mRNA-Expression von Wachstumshormon (GH) in den Hypothalami. In der Hypophyse, dem eigentlichen Wachstumshormon-bildenden Organ, war die Expression bei beiden Genotypen vergleichbar stark, was konsistent mit den Befunden zur GHRH Expression im Hypothalamus ist, die nur geringfügige Unterschiede aufwies. Welche Regulationsmechanismen zur Expression von GH im Hypothalamus selbst beitragen ist unklar. Für einen GHRH-unabhängigen Mechanismus spricht die Expression des GHRH-R. Dieser wird wie für das bekannte Regulationssystem erwartet nur in der Hypophyse expremiert, hat also keinen Einfluss auf die GH-Bildung im Hypothalamus. Konsequenterweise findet sich keine Expression von Pit1 im Hypothalamus, sondern kann nur in der Hypophyse nachgewiesen werden. Eine IKK2-abhängige Deregulation von Pit1 ist daher ausgeschlossen. Sehr viel wahrscheinlicher ist die direkte NF-kB abhängige Expression von GH. In dieser Arbeit wurde in den regulatorischen Sequenzen des GH-Gens eine potentielle Bindungsstelle für NF-kB gefunden. Dieses Motiv befindet sich stromaufwärts vor dem eigentlichen Promotorbereich. In Gelretardationsanalysen wurde eine NF-kB Bindung bestätigt. Ähnlich der GalR1 C/D Sequenz ist jedoch nur eine geringe Bindungsaffinität für p50/p65 und p65/p65 Dimere an dieses Sequenzmotiv vorhanden. Die Frage nach der Funktionalität dieser Bindungstelle bei der Steuerung der GH-Expression im Hypothalamus kann nicht schlüssig beantwortet werden. Die im Vergleich durchgeführten Expressionstudien an IKK2-CA Mäusen zeigten keine verstärkte Expression von GH und sprechen gegen eine kritische Funktion.

Ob die reduzierte hypothalamische GH-Expression als Erklärung für den Phänotyp gelten kann, ist fraglich. Bislang sind keine Befunde beschrieben, die über die Funktion von GH im Hypothalmus Aufschluss geben. Erste immunhistologische Befunde weisen auf eine GH Expression in paraventrikulären Neuronen hin, die deutlich schwächer ist im Vergleich zu hypophysäre Neuronen (persöhnliche Mitteilung Bernd Baumann). In Vorarbeiten wurde die späte perinatale Phase als kritischer Zeitpunkt für Ausprägung des Gewichtsphänotyps bestimmt. Möglicherweise kommt es zu einer Fehlentwicklung von Neuronen, die sich im adulten Tier in einer Wachtumshormondefizienz manifestiert. Zur weiteren Klärung dieser Frage sind Untersuchungen in Anwesenheit von Doxyzyklin

notwendig. Wird die Transgenexpression während der Embryonalentwicklung ausgeschaltet und die GH-Expression im adulten Tier bestimmt, könnte überprüft werden, ob eine Korrelation zwischen GH-Expression und Phänotyp vorliegt.

4.5 Schlussfolgerung

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen Unterschiede in der Expression einiger Gene, welche ursächlich für den Phänotyp der IKK2-DN Mäuse sein könnten. So haben wir eine verminderte Expression von TRH-R und GalR-1 gefunden, welche jeweils eine Abschwächung orexigener Siganle zur Folge haben. In PreProCRH haben wir auch ein Gen identifiziert, welches stärker in den IKK2-DN Tieren expriemiert wird und eine anorexigene Wirkung haben könnte.

Dies sind alles Signale, die Einfluss auf Nahrungsaufnahme bzw. Energiehomöostase haben. Da wir auch gegensätzliche Ergebnisse haben und keines dieser Gene eine massive Veränderung seiner Expression zeigt, ist anzunehmen, dass komplexe Regulations- und Gegenregulationsmechanismen in ihrer Summe für den Phänotyp der Tiere verantwortlich sind. Die Tatsache, dass sich der Phänotyp in der späten perinatalen Phase ausprägt, spricht eher dagegen, dass Signale welche an der kurzzeitigen Regulation der Energiehomöostase beteiligt sind, ausschlaggebend sind. Es ist jedoch nicht auszuschliessen, da eine Dissregulation des hypothalamischen Regelkreises auch in der Entwicklung des Hypothalamus und der Struktur seiner Neuronen begründet liegen kann.

Der Gedanke einer Störung der Neuronenentwicklung hat uns auch dazu geführt, die Gerüstproteine zu untersuchen. Der Befund der verminderten Expression von PSD 95 scheint daher sehr interessant. Da eben PSD 95 eine Rolle bei der Entwicklung von Neuronen zugesprochen wurde. Ebenso wurde eine Verbindung zwischen dem Wachstumshormon und PSD95 beschrieben (LeGreves et al., 2006).

Unsere Ergebnisse zeigen eine verminderte Expression von Wachstumshormon im Hypothalamus der IKK2-DN +/+ Tiere. Zwar ist die Funktion von Wachstumshormon im Hypothalamus bisher nicht geklärt, doch würden die bisher bekannten Wirkungen des Wachstumshormons durchaus zum Phänotyp der Tiere passen. Verminderte Körpergrösse, Körpergewicht und auch die verminderte Tibialänge sind Merkmale die gut zu einem Mangel an Wachstumshormon passen würden. In welcher Weise NF-κB, PSD95 und

Wachstumshormon sich gegenseitig beeinflussen bleibt zu klären. Eine mögliche Hypothese ist, dass NF-κB Einfluss auf PSD95 in der perinatalen Phase nimmt, was wiederum durch eine veränderte Neuronenfunktion im Hypothalamus zu einem Mangel an Wachstumshormon in den Tieren führen würde.

Von Interesse könnte auch die Erforschung der Funktion von Bac33 sein, da es differenziell reguliert zu sein scheint und möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung des Phänotyps hat.

Die hier vorliegenden Ergebnisse können nicht die Ursache für den Phänotyp der IKK2-DN +/+ Tiere erklären, doch liefern sie neue Ansätze für weiterführende Untersuchungen, welche diese Frage klären könnten. Darüberhinaus liefern sie einen Einblick in die Mechanismen der Genexpression von NF-κB in Neuronen und lassen Vermutungen auf mögliche Funktionen dieses komplexen Systems zu.

5 Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Der dimere Transkriptionsfaktor NF-κB ist von zentraler Bedeutung bei der Regulation der Immunantwort, bei Entzündungsvorgängen und bei der Entwicklung des Immunsystems. Im unstimulierten Zustand wird NF-κB durch inhibitorische κB-Proteine (IκB-Proteine) im Zytoplasma zurückgehalten. Auf ein Signal hin können die IκB-Proteine durch die IκB-Kinase (IKK), bestehend aus den Untereinheiten IKK1, IKK2 und IKKγ, phosphoryliert und durch Ubiquitinylierung zum Abbau durch das Proteasom markiert werden. So werden NF-κB-Dimere freigesetzt und translozieren in den Zellkern, wo sie durch Bindung an spezifische regulatorische Stellen der DNS die Gentranskription beeinflussen können.
Nur wenig ist bisher bekannt über die Funktion von NF-κB im Zentralennervensystem (ZNS). Um die Rolle von NF-κB in Neuronen zu untersuchen, wurden deshalb mutante IKK2-Proteine in transgenen Mäusen mit Hilfe des Tet-off-Systems exprimiert. Es wurde sowohl eine dominant-negative Version von IKK2 (IKK2-DN), als auch eine konstitutiv-aktive Form von IKK2 (IKK2-CA) eingesetzt. Dieser Arbeit vorausgegangen sind bereits Untersuchungen zu Größe und Gewicht der Tiere, Versuche mit Doxyzyklin-Gabe zur Ermittlung des entscheidenden Zeitpunktes für die Ausprägung des Phänotyps, sowie eine Genchipanalyse. Die Untersuchungen von Größe und Gewicht zeigten, dass die IKK2-DN +/+ Tiere einen Phänotyp mit verringertem Gewicht und reduzierter Körpergröße entwickeln. Durch die Doxyzyklinapplikation wurde als entscheidender Zeitpunkt die späte perinatale Phase Tag E 16,5 bis E 18,5 ermittelt. Die Genchip-Analyse zeigte fünf differentiell regulierte Kandidatengene mit unbekannter Funktion auf.
In der vorliegenden Arbeit sollte dieses Mausmodell molekularbiologisch charakterisiert werden, der Schwerpunkt lag dabei auf der Untersuchung der Ursache des Phänotyps der IKK2-DN +/+ Tiere. Dazu wurde die mRNA Expression einer Reihe von Genen, mit Bezug zu Stoffwechsel, neuronaler Entwicklung oder beschriebenem Zusammenhang mit NF-κB in verschiedenen Hirnregionen untersucht. Schwerpunkt lag dabei auf Genen des Wachstumshormonsystems und der Energiehomöostaseregulation im Gehirn. Auch die Gene, welche durch die Genchipanalyse ermittelt worden waren, wurden untersucht. Mittels Westernblot und ELISA wurden Untersuchungen zum Insulinsignaling und Leptin durchgeführt. Daneben wurde die spezifische DNA-Bindungsaktivität von NF-κB mit

zuvor ermittelten Sequenzen von Galanin Rezeptor 1 und Wachstumshormon mittels EMSA (electrophoretic mobility shift assay) charakterisiert.

Die Untersuchungen auf Proteinebene zu Insulinsignaling und Leptin erbrachten keine signifikanten Unterschiede. Die wesentlichen Befunde unserer Untersuchungen zeigen eine beeinträchtigte Expression des Wachstumshormons, sowie einiger anderer Gene, welche im Zusammenhang mit dem Phänotyp der IKK2-DN Tiere stehen könnten. Darunter befinden sich die verminderte Transkription des TRH-Rezeptors und des Galanin Rezeptors 1, beides Befunde welche eine Abschwächung orexigener Signale zur Folge haben. Die gesteigerte Transkription von PreProCRH steht fuer eine verstärkte anorexigene Wirkung und passt somit ebenfalls zu dem Phänotyp der IKK2-DN Tiere. Die verminderte Expression von Wachstumshormon im Hypothalamus der IKK2-DN +/+ Tiere koennte eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Phänotyps spielen. Obwohl die Funktion des Wachstumshormons im Hypothalamus bisher nicht geklärt ist, spiegeln die bisher bekannten Wirkungen des Wachstumshormons durchaus den Phänotyp der Tiere wieder. Verminderte Körpergrösse, Körpergewicht und auch die verminderte Tibialänge sind Merkmale die gut zu einem Mangel an Wachstumshormon passen würden. Eine mögliche Hypothese ist, dass NF-κB Einfluss auf das Strukturgen PSD95 in der perinatalen Phase nimmt, was wiederum durch eine veränderte Neuronenfunktion im Hypothalamus eine Beeinträchtigung der hypothalmus-gesteuerten Energiehomeostase induzieren könnte.

Von Interesse sollte auch die Erforschung der Funktion von Bac33 (ENSMUST 00000069263) sein, da es differenziell reguliert zu sein scheint, und möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung des Phänotyps hat.

Für weitere Untersuchungen würden sich insbesondere das Wachstumshormon, als auch der Galanin-Rezeptor-1 anbieten, da wir für beide eine Bindung von NF-κB zeigen konnten.

Zusammenfassend bietet diese Arbeit einen Einblick in die molekularbiologischen Veränderungen, die durch die neuronale Modulation der IKK Aktivität in transgenen Mäusen induziert wurden, und liefert einen Beitrag zum Verständnis der Funktion von NF-κB in Neuronen.

5.2 English Summary

The dimeric transcription factor NF-kB plays a central role in the regulation of immune response, inflammatory reactions and the development of the immune system. In unstimulated cells, the NF-κB dimers are sequestered in the cytoplasm by a family of inhibitors, called IκBs (Inhibitor of kappa B). Activation of the NF-κB complex occurs primarily via activation of a kinase called the IκB kinase (IKK), consisting of the subunits IKK1, IKK2 and IKKy. When activated by signals the IκB kinase phosphorylates two serine residues located in an IκB regulatory domain. When phosphorylated the IκB inhibitor molecules are modified by a process called ubiquitination which then leads them to be degraded by the proteasome. With the degradation of the IκB inhibitor, the NF-κB complex is then free to enter the nucleus where it can 'turn on' the expression of specific genes that have DNA-binding sites for NF-κB nearby.

Only little is known about the function of NF-kB in the central nervous system (CNS). To study the role of NF-kB in neurons mutants of the IKK2 have been expressed in transgenic mice using a tet-off-system. A dominant-negative (IKK2-DN) and a constitutive-active (IKK2-CA) version of the IKK protein have been used. Before this study have been performed an analysis of the weight and size of the mice, experiments with Doxycyclin administration to determine the exact time point for the development of the phenotype and a genechip analysis. The analysis of the weight and size showed a phenotype of reduced weight and size of the IKK2-DN +/+ mice. Through the Doxycyclin administration day E 16.5 to E 18.5 could be estimated to be crucial for the development of the phenotype. The genechip analysis brought up five differentially regulated candidate genes all with unknown function.

The aim of this study was to characterize this mousemodel biomolecularly. The focus was to study the reason for the phenotype of the IKK2-DN +/+ mice. Therefore we analyzed the mRNA expression of genes, related to metabolism, neuron development or known correlation with NF-kB, in different regions of the brain. The main focus was on genes of the growth hormone system and the regulation of energy homeostasis in the brain. We also analyzed the genes that came up through the genechip analysis. Using westernblot and ELISA we evaluated insulin signaling and leptin levels. Further we characterized the specific DNA binding activity of NF-kB, using electrophoretic mobility shift assay, with sequences from galanin receptor 1 and growth hormone which we evaluated before.

The research on protein level regarding insulin signaling and leptin did not show any

significant differences. The essential findings of our research showed a hindered expression of growth hormone, as well as of some other genes, which could be connected to the phenotyp of the IKK2-DN mice. Among these is the diminished transcription of the TRH receptor and the galanin receptor, both results in a reduced orexigenic signaling. The elevated transcription of PreProCRH stands for an increased anorexigenic effect that would also fit as an explanation for the phenotyp of the IKK2-DN mice. The reduced expression of the growth hormone in the hypothalamus of the IKK2-DN +/+ animals could play a pivotal role in the development of the phenotype. Although the function of the growth hormone in the hypothalamus is not yet resolved, the so far known effects of it reflect the phenotyp of the animals very well. Reduced body size and weight, and also the reduced length of the tibia are features which would fit well into the picture of a lack of growth hormone. A possible hypothesis is that NF-κB influences the scaffolding gene PSD95 within the perinatal phase, which in turn caused by a changed function of neurons in the hypothalamus could induce an impared hypothalamic-controlled energy homeostasis.

It should also be of interest to investigate the function of Bac33 (ENSMUST 00000069263), as it seems to be differentially regulated, like shown by our results, and could possibly play a role in the development of the phenotyp. For further investigations growth hormone and galanin receptor 1 should be of interest as we demonstrated a binding of NF-κB for both genes.

In summary, this work gives a new insight into the biomolecular changes caused by neuronal modulation of the IKK activity in transgenic mice and provides a contribution to the understanding of the function of NF-κB in neurons.

6 Literaturverzeichnis

1. Alcamo E, Hacohen N, Schulte LC, Rennert PD, Hynes RO, Baltimore D., Requirement for the NF-kappaB family member RelA in the development of secondary lymphoid organs. J Exp Med. 195: 233-244. 2002
2. Aleyasin H, Cregan SP, Iyirhiaro G, O'Hare MJ, Callaghan SM, Slack RS, Park DS., Nuclear factor-(kappa)B modulates the p53 response in neurons exposed to DNA damage. J Neurosci. 24: 2963-2973. 2004
3. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M., IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. Nat Med. 11: 191-198. 2005
4. Barger SW, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Krieglstein J, Mattson MP., Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca2+ accumulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 92: 9328-9332. 1995
5. Barger SW, Moerman AM, Xianrong M. Molecular Mechanisms of Cytokine-Induced Neuroprotection: NF-κB and Neuroplasticity. Current Pharmaceutical Design 11, 985-998 2005
6. Baumann B.: (persoenliche Mitteilung) 2006
7. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D., Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. Nature. 376: 167-170. 1995
8. Beinke S, Ley SC., Functions of NF-κB1 and NF-κB2 in immune cell biology. Biochem. J. 382: 393-409. 2004
9. Bours V, Franzoso G, Azarenko V, Park S, Kanno T, Brown K, Siebenlist U., The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. Cell. 72: 729-739. 1993
10. Britton DR, Koob GF, Rivier J, Vale W., Intraventricular corticotropinreleasing factor enhances behavioral effects of novelty. Life Sci 4: 363–367. 1982
11. Brown RT, Ades IZ, Nordan RP., An acute phase response factor/NF-kappa B site downstream of the junB gene that mediates responsiveness to interleukin-6 in a murine plasmacytoma. J Biol Chem. 270: 31129-31135. 1995
12. Burkly L, Hession C, Ogata L, Reilly C, Marconi LA, Olson D, Tizard R, Cate R, Lo D., Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. Nature. 373: 531-6. 1995
13. Caamano JH, Rizzo CA, Durham SK, Barton DS, Raventos-Suarez C, Snapper CM, Bravo R., Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. J Exp Med. 187: 185-96. 1998
14. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE., Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. Nat Med. 11: 183-190. 2005

15. Camandola S, Poli G, Mattson MP., The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal inhibits constitutive and inducible activity of nuclear factor kappa B in neurons. Brain Res Mol Brain Res. 85: 53-60. 2000
16. Cauley K, Verma IM., Kappa B enhancer-binding complexesthat do not contain NF-kappaB are developmentaly regulated in mammalian brain, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 390-394. 1994
17. Chen CL, Singh N, Yull FE, Strayhorn D, Van Kaer L, Kerr LD., Lymphocytes lacking I kappa B-alpha develop normally, but have selective defects in proliferation and function. J Immunol. 165: 5418-5427. 2000
18. Cheng B, Christakos S, Mattson MP., Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxin insults and promote maintenance of calcium homeostasis, Neuron 1: 139-153 1994
19. Chiao PJ, Miyamoto S, Verma IM., Autoregulation of I kappa B alpha activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 91: 28-32. 1994
20. Denis-Donini S, Caprini A, Frassoni C, and Grilli M., Members of the NF-kappaB family expressed in zones of active neurogenesis in the postnatal and adult mouse brain. Brain Res Dev Brain Res, 154: 81-89. 2005
21. Doi TS, Marino MW, Takahashi T, Yoshida T, Sakakura T, Old LJ, Obata Y., Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality. Proc Natl Acad Sci U S A. 96: 2994-2999. 1999
22. Ehlers MD., Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. Nat Neurosci. 6: 231-242. 2003
23. Franzoso G, Carlson L, Poljak L, Shores EW, Epstein S, Leonardi A, Grinberg A, Tran T, Scharton-Kersten T, Anver M, Love P, Brown K, Siebenlist U., Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. J Exp Med. 187: 147-159. 1998
24. Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores EW, Brown KD, Leonardi A, Tran T, Boyce BF, Siebenlist U., Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. Genes Dev. 11: 3482-3496. 1997
25. Freudenthal R, Romano A., Participation of Rel/NF-kB transcription factors in long term memory in the crab Chasmagnathus. Brain Res. 855: 274-281. 2000
26. Fujita T, Nolan GP, Liou HC, Scott ML, Baltimore D., The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. Genes Dev. 7: 1354-1363. 1993
27. Funahashi H, Yada T, Suzuki R, Shioda S., Distribution, function, and properties of leptin receptors in the brain. Int Rev Cytol. 224: 1-27. 2003
28. Gellhorn E., Hypothalamus, bladder and gut: a contribution to the understanding of autonomic integration. Acta Neuroveg (Wien). 19: 235-249. 1959
29. Gerondakis S, Strasser A, Metcalf D, Grigoriadis G, Scheerlinck JY, Grumont RJ., Rel-deficient T cells exhibit defects in production of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Proc Natl Acad Sci U S A. 93: 3405-3409. 1996
30. Ghosh S, Karin M., Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. Cell. 109: 81-96. 2002

31. Grossmann M, Metcalf D, Merryfull J, Beg A, Baltimore D, Gerondakis S., The combined absence of the transcription factors Rel and RelA leads to multiple hemopoietic cell defects. Proc Natl Acad Sci U S A. 96: 11848-11853. 1999
32. Grumont RJ, Rourke IJ, O'Reilly LA, Strasser A, Miyake K, Sha W, Gerondakis S., B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor kappaB1 (NF-kappaB1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. J Exp Med. 187: 663-674. 1998
33. Guerrini L, Molteni A, Wirth T, Kistler B, Blasi F., Glutamate-dependent activation of NF-kappaB during mouse cerebellum development. J Neurosci. 17: 6057-6063. 1997
34. Guerrini L, Blasi F, Denis DS., Synaptic activation of NF-kB by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 9077-9081. 1995
35. Gutierrez H, Hale VA, Dolcet X, Davies A. NF-κB signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. Development. 132: 1713-1726. 2005
36. Haddad JJ, Redox regulation of pro-inflammatory cytokines and IkappaB-alpha/NF-kappaB nuclear translocation and activation. Biochem Biophys Res Commun. 296: 847-856. 2002 Erratum in: Biochem Biophys Res Commun. 301: 625. 2003
37. Hamann A, Matthaei S., Regulation of energy balance by leptin. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 104:293-300. 1996
38. Hanada R, Teranishi H, Pearson JT, Kurokawa M, Hosoda H, Fukushima N, Fukue Y, Serino R, Fujihara H, Ueta Y, Ikawa M, Okabe M, Murakami N, Shirai M, Yoshimatsu H, Kangawa K, Kojima M. Neuromedin U has a novel anorexigenic effect independent of the leptin signaling pathway. Nat Med. 2004 10: 1067-1073. 2004
39. Hayden MS, Ghosh S. Signalling to NF-κB. Genes & Development 18: 2195-2224. 2004
40. Hedengren M, Asling B, Dushay MS, Ando I, Ekengren S, Wihlborg M, Hultmark D., Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in Drosophila. Mol Cell. 4: 827-837. 1999
41. Herrmann O, Baumann B, de Lorenzi R, Muhammad S, Zhang W, Kleesiek J, Malfertheiner M, Kohrmann M, Potrovita I, Maegele I, Beyer C, Burke JR, Hasan MT, Bujard H, Wirth T, Pasparakis M, Schwaninger M. IKK mediates ischemia-induced neuronal death. Nat Med. 11: 1322-1329. 2005
42. Horwitz BH, Scott ML, Cherry SR, Bronson RT, Baltimore D., Failure of lymphopoiesis after adoptive transfer of NF-kappaB-deficient fetal liver cells. Immunity. 6 : 765-772. 1997
43. Hu Y, Baud V, Delhase M, Zhang P, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M., Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. Science. 284: 316-320. 1999
44. Huang TT, Kudo N, Yoshida M, Miyamoto S., A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF -kappaB/IkappaBalpha complexes. Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 1014-1019. 2000
45. Hunot S, Brugg B, Ricard D, Michel PP, Muriel MP, Ruberg M, Faucheux BA, Agid Y, Hirsch EC., Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 94: 7531-7536. 1997

46. Huxford T, Huang DB, Malek S, Ghosh G., The crystal structure of the IkappaBalpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation. Cell. 95: 759-770. 1998
47. Ichiyama T, Campbell IL, Furukawa S, Catania A, Lipton JM., Autocrine alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits NF-kappaB activation in human glioma.J Neurosci Res. 58: 684-689. 1999
48. Isaksson OG, Nilsson A, Isgaard J, Lindahl A., Cartilage as a target tissue for growth hormone and insulin-like growth factor I. Acta Paediatr Scand Suppl. 367: 137-141 1990
49. Ivanov TR, Lawrence CB, Stanley PJ, Luckman SM., Evaluation of neuromedin U actions in energy homeostasis and pituitary function. Endocrinology. 143: 3813-3821. 2002
50. Jacobs MD, Harrison SC., Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. Cell. 95: 749-758. 1998
51. Jobst EE, Enriori PJ, Sinnayah P, Cowley MA., Hypothalamic regulatory pathways and potential obesity treatment targets. Endocrine. 29: 33-48. 2006
52. Johnson C, Van Antwerp D, Hope TJ., An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpha. EMBO J. 18: 6682-6693. 1999
53. Kaltschmidt B, Ndiaye D, Korte M, Pothion S, Arbibe L, Prullage M, Pfeiffer J, Lindecke A, Staiger V, Israel A, Kaltschmidt C, Memet S., NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. Mol Cell Biol. 26: 2936-2946. 2006
54. Kaltschmidt B, Uherek M, Wellmann H, Volk B, Kaltschmidt C., Inhibition of NF-kappaB potentiates amyloid beta-mediated neuronal apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA. 96: 9409-9414. 1999
55. Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C., Signalling via NF-κB in the nervous system. Biochimica et Biophysica Acta 2005
56. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofman TG, Hehner SP, Droge W, Schmitz ML., The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus, Eur. J. Biochem. 267: 3828-3835.2000
57. Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Baeuerle PA., Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF-kB in primary neurons. Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A. 92: 9618-9622. 1995
58. Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Neumann H, Wekerle H, and Baeuerle PA., Constitutive NF-kappaB activity in neurons. Mol Cell Biol, 14: 3981-3992. 1994
59. Karydis I, Tolis G., Orexis, anorexia, and thyrotropin-releasing hormone. Thyroid. 8:947-50. 1998
60. Kassed CA, Willing AE, Grabuzova-Davis S, Sanber PR, Pennypacker KR., Lack of NF-kB p50 exacerbates degredation of hippocampal neurons after chemical exposure and impairs learning. Exp. Neurol. 176: 277-288. 2002
61. Kato T Jr, Delhase M, Hoffmann A, Karin M., CK2 Is a C-Terminal IkappaB Kinase Responsible for NF-kappaB Activation during the UV Response. Mol Cell. 12: 829-839. 2003
62. Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, St Clair DK, Yen HC, Germeyer A, Steiner SM, Bruce-Keller AJ, Hutchins JB, Mattson MP., Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural

apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. J Neurosci. 18: 687-697. 1998

63. Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P., The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. Immunity. 8: 297-303. 1998
64. Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, Yuan M, Li ZW, Karin M, Perret P, Shoelson SE, Shulman GI., Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. J Clin Invest. 108: 437-446. 2001
65. Kleine B, Wolfahrt S, Lotsch M, Gantner T, Rossmanith WG, Expression of galanin in human placenta. Mol Hum Reprod. 7: 379-385. 2001
66. Koerner M, Rattner A, Mauxion F, Sen R, Citri Y., A brain-specific transcription activator, Neuron. 3: 563-572. 1993
67. Kontgen F, Grumont RJ, Strasser A, Metcalf D, Li R, Tarlinton D, Gerondakis S., Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. Genes Dev. 9: 1965-1977. 1995
68. Kucharczak J, Simmons MJ, Yongjun F, Gélinas C. To be, or not to be: NF-κB is the answer – role of Rel/NF-κB in the regulation of apoptosis. Oncogene. 22: 8961-8982. 2003
69. Kuraishi Y, Kawabata S, Matsumoto T, Nakamura A, Fujita H, Satoh M. Involvement of substance P in hyperalgesia induced by intrathecal galanin. Neurosci Res. 11: 276-285. 1991
70. Laron Z., Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. Mol Pathol. 54: 311-316. 2001
71. Le Greves M, Zhou Q, Berg M, Le Greves P, Fholenhag K, Meyerson B, Nyberg F., Growth hormone replacement in hypophysectomized rats affects spatial performance and hippocampal levels of NMDA receptor subunit and PSD-95 gene transcript levels. Exp Brain Res. 173: 267-73. 2006
72. Lernbecher T, Muller U, Wirth T., Distinct NF-kappa B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation. Nature. 365: 767-770. 1993
73. Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF, Verma IM., Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. Science. 284: 321-325. 1999
74. Li Z, Nabel GJ., A new member of the I kappaB protein family, I kappaB epsilon, inhibits RelA (p65)-mediated NF-kappaB transcription. Mol Cell Biol. 17: 6184-6190. 1997
75. Lilienbaum A, Israel A., From calcium to NF-kappa B signaling pathways in neurons. Mol Cell Biol. 23: 2680-2698. 2003
76. Lombardi L, Ciana P, Cappellini C, Trecca D, Guerrini L, Migliazza A, Maiolo AT, Neri A., Structural and functional characterization of the promoter regions of the NFKB2 gene. Nucleic Acids Res. 23: 2328-2336. 1995
77. Lorimer DD, Matkowskj K, Benya RV., Cloning, chromosomal location, and transcriptional regulation of the human galanin-1 receptor gene (GALN1R). Biochem Biophys Res Commun. 241: 558-564. 1997
78. Lumb BM, Lovick TA., The rostral hypothalamus: an area for the integration of autonomic and sensory responsiveness. J Neurophysiol. 70:1570-1577. 1993

79. Makris C, Godfrey VL, Krahn-Senftleben G, Takahashi T, Roberts JL, Schwarz T, Feng L, Johnson RS, Karin M., Female mice heterozygous for IKK gamma/NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder incontinentia pigmenti. Mol Cell. 5: 969-979. 2000
80. Manfruelli P, Reichhart JM, Steward R, Hoffmann JA, Lemaitre B., A mosaic analysis in Drosophila fat body cells of the control of antimicrobial peptide genes by the Rel proteins Dorsal and DIF. EMBO J. 18: 3380-3391. 1999
81. Mattson M.P., Pathways towards and away from Alzheimer´s disease. Nature. 430: 631-639. 2004
82. Mattson MP, Culmsee C, Yu Z, Camandola S., Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity. J Neurochem. 74: 443-456. 2000
83. Meffert MK, Baltimore D. Physiological functions for brain NF-κB. Trends in Neurosciences. Vol.28 No.1. 2005
84. Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D., NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. Nat Neurosci. 6: 1072-1078. 2003
85. Memet S, Laouini D, Epinat JC, Whiteside ST, Goudeau B, Philpott D, Kayal S, Sansonetti PJ, Berche P, Kanellopoulos J, Israel A., IkappaBepsilon-deficient mice: reduction of one T cell precursor subspecies and enhanced Ig isotype switching and cytokine synthesis. J Immunol. 163: 5994-6005. 1999
86. Moermann A.M., Mao, X., Lucas, M.M., Barger, S.W., Characterisation of a neuronal kappaB-binding factor distinct from NF-kappaB. Brain Res Mol Brain Res. 67: 303-315. 1999
87. Musso R, Grilli M, Oberto A, Gamalero SR, Eva C., Regulation of mouse neuropeptide Y Y1 receptor gene transcription: a potential role for nuclear factor-kappa B/Rel proteins. Mol Pharmacol. 51: 27-35. 1997
88. Nilsson T, Arkhammar P, Rorsman P, Berggren PO, Suppression of insulin release by galanin and somatostatin is mediated by a G-protein. An effect involving repolarization and reduction in cytoplasmic free Ca2+ concentration. J Biol Chem. 264: 973-980. 1989
89. Nonaka M, Chen XH, Pierce JE, Leoni MJ, McIntosh TK, Wolf JA, Smith DH., Prolonged activation of NF-kappaB following traumatic brain injury in rats. J Neurotrauma. 16: 1023-1034. 1999
90. Ouyang Y, Kantor D, Harris KM, Schuman EM, Kennedy MB., Visualization of the distribution of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II after tetanic stimulation in the CA1 area of the hippocampus. J Neurosci. 17: 5416-5427. 1997
91. Panikashvili D, Mechoulam R, Beni SM, Alexandrovich A, Shohami E., CB1 cannabinoid receptors are involved in neuroprotection via NF-kappa B inhibition. J Cereb Blood Flow Metab. 25: 477-484. 2005
92. Perkins ND, Gilmore TD. NF-□B functions during tumorgenesis and cancer therapy. Cell Death and Differentiation. 1-14. 2006
93. Perumal P, Vrontakis ME., Transgenic mice over-expressing galanin exhibit pituitary adenomas and increased secretion of galanin, prolactin and growth hormone. J Endocrinol. 179: 145-154. 2003

94. Pettit AR, Quinn C, MacDonald KP, Cavanagh LL, Thomas G, Townsend W, Handel M, Thomas R., Nuclear localization of RelB is associated with effective antigen-presenting cell function. J Immunol. 159: 3681-3691. 1997
95. Plata-Salaman CR., Regulation of hunger and satiety in man. Dig Dis. 9: 253-268. 1991
96. Ribon, V., and Saltiel, A.R., Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. Biochem. J. 324: 839–845. 1997
97. Richard D, Huang Q, Timofeeva E., The corticotropin-releasing hormone system in the regulation of energy balance in obesity. Int J Obes Relat Metab Disord. 36–39. 2000
98. Routtenberg A, Cantallops I, Zaffuto S, Serrano P, Namgung U., Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 7657-7662. 2000
99. Rudolph D, Yeh WC, Wakeham A, Rudolph B, Nallainathan D, Potter J, Elia AJ, Mak TW., Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. Genes Dev. 14: 854-862. 2000
100. Ryseck RP, Novotny J, Bravo R., Characterization of elements determining the dimerization properties of RelB and p50. Mol Cell Biol. 15: 3100-3109. 1995
101. Schmidt-Supprian M, Bloch W, Courtois G, Addicks K, Israel A, Rajewsky K, Pasparakis M., NEMO/IKK gamma-deficient mice model incontinentia pigmenti. Mol Cell. 5: 981-992. 2000
102. Schmitz ML, Mattioli I, Buss H, Kracht M. NF-□B: A Multifaceted Transcription Factor Regulated at Several Levels. ChemBioChem. 5: 1348-1358. 2004
103. Schwamborn J, Lindecke A, Elvers M, Horejschi V, Kerick M, Rafigh M, Pfeiffer J, Prullage M, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C., Microarray analysis of tumor necrosis factor alpha induced gene expression in U373 human glioblastoma cells. BMC Genomics. 4: 46. 2003
104. Schwyzer R., Structure and function in neuropeptides. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 210: 5-20. 1980
105. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M., Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. Science. 293: 1495-1499. 2001
106. Simeonidis S, Liang S, Chen G, Thanos D., Cloning and functional characterization of mouse IkappaBepsilon. Proc Natl Acad Sci U S A. 94: 14372-14377. 1997
107. Snapper CM, Zelazowski P, Rosas FR, Kehry MR, Tian M, Baltimore D, Sha WC., B cells from p50/NF-kappa B knockout mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line CH transcription, and Ig class switching. J Immunol. 156: 183-191. 1996
108. Swaab DF., Neuropeptides. their distribution and function in the brain. Prog Brain Res. 55: 97-122. 1982
109. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI., Identification and expression cloning of a leptin receptor OB-R. Cell. 83: 1263-1271. 1995
110. Tergaonkar V, Bottero V, Ikawa M, Li Q, Verma IM., IkappaB kinase-independent IkappaBalpha degradation pathway: functional NF-kappaB activity and implications for cancer therapy. Mol Cell Biol. 23: 8070-8083. 2003

111. Thompson JE, Phillips RJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S., I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. Cell. 80: 573-582. 1995

112. Vrontakis ME, Schroedter IC, Cosby H, Friesen HG., Expression and secretion of galanin during pregnancy in the rat. Endocrinology. 130: 458-464. 1992

113. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr., NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. Science. 281: 1680-1683. 1998

114. Weih F, Carrasco D, Bravo R., Constitutive and inducible Rel/NF-kappa B activities in mouse thymus and spleen. Oncogene. 9: 3289-3297. 1994

115. Weih F, Carrasco D, Durham SK, Barton DS, Rizzo CA, Ryseck RP, Lira SA, Bravo R., Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. Cell. 80: 331-340. 1995

116. Weih F, Durham SK, Barton DS, Sha WC, Baltimore D, Bravo R., p50-NF-kappaB complexes partially compensate for the absence of RelB: severely increased pathology in p50(-/-)relB(-/-) double-knockout mice. J Exp Med. 185: 1359-1370. 1997

117. Whiteside ST, Epinat JC, Rice NR, Israel A., I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. EMBO J. 16:1413-1426. 1997

118. Yamamoto K, Arakawa T, Ueda N, Yamamoto S., Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. J Biol Chem. 270: 31315-31320. 1995

119. Yeh S, Lin C, Lee C, Gean P., A Requirement of Nuclear Factor-kB Activation in Fear-potentiated Startle. The Journal of Biological Chemistry. 277: 46720–46729. 2002

120. Yeh WC, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, de la Pompa JL, Ferrick D, Hum B, Iscove N, Ohashi P, Rothe M, Goeddel DV, Mak TW., Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. Immunity. 7: 715-725. 1997

121. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE., Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. Science. 293: 1673-1677. 2001

122. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman J.M., Positional cloning of the mouse obese gene and ist human homologue. Nature. 372: 425-32. 1994

7 Anhang

7.1 RT PCR Primer

Gen Name	Produktgröße	Primer Name	Primer Sequenz
BAC33	359bp	BAC33 up	CAGGGGGGCTGTAGCAAACTCG
		BAC33 down	GGCTGAGTCACTTTTTCCCCCCAC
C13 Rik	434bp	C13 Rik up	CTGCCTAGGCCGTATGGTGCG
		C13 Rik down	CACAAATGCCCTCAACCAACAGCG
D2E	482bp	D2E-down	CTGTCTCTGATGTGAGGCCGGAC
		D2E-up	GAGACACTAGTGCACTGCAGTCTG
Lisch7	530bp	Lisch7 up	GAGCCCTGTGGCACCCAAGAC
		Lisch7-down	GGGTGTGTGTCAGCTGCGCTG
MOE1	533bp	MOE1 up	GATTCCCGGACCCAGCTCCAG
		MOE 1 down	CTGGATGAGTACTACGGGCGCG
mIL6	514bp	mIL6 up	GTGACAACCACGGCCTTCCCTAC
		mIL6 down	GGATGGTCTTGGTCCTTAGCCACTC
mIL6ra	436bp	mIL6ra up	GGCACAGTGACAAGCCTGCCAG
		mIL6ra down	GCACCTGGAAGTCACTCTTCCCG
mIL6rb	375bp	mIL6rb up	GTCAGCACCAAGGATTTGGCTAGCG
		mIL6rb down	GGTAAGTCTCCCTTCCGGGGTC
mP100	418bp	mP100 up	CCCCTCCATCGTGGAGCCTAAG
		mP100 down	GCGGAGACGCTGCCTCTGAAG
Socs3	636bp	Socs3 fwd	GTTTCCCGCCGCCGGGATG
		Socs3 rev	GACGAGGGTTCCGTGGGTGG
Socs3		Socs3 up 2	CGGCTGCCAACATCTGGGCG
P518	266bp	P518 down2	CTCTCTCCGGGTCTGGGTTCC
B-Actin (mB-Actin)	521bp	B-Actin up	GGTCAGAAGGACTCCTATGTG
		B-Actin down	AGAGCAACATAGCACAGCTTC

PBGD	66bp	PBGD up	GGACCTGGTCGTTCACTCCCTG
		PBGD down	GAGCAGCAAGCTGGCCAGGC
B-Glob up IKK-RT	589bp	B-Glob up	CAGCCTGCACCTGAGGAGTGAATTC
		IKK-RT	GGCGCTGGAACTGTTGCCCAAG
Jun B	566bp	Jun B up	CAGACACAGGCGCATCTCTGAAGC
		Jun B down	GGTCTTCCATGTTGATGGGGGACAC
mRack1	560bp	mRack1 up	GAGCGTGGCCTTCTCCTCTGAC
		mRack1 down	GGCCATCAGCAGACCATGCCAAAG
Socs3	636bp	Socs3 up	GTGCGCCTCATCGGCCCG
		Socs3 down	GGTCCCCGACTGGGTCTTGAC
iNOs	557bp	iNOs up	CAGTGGCTTCCAGCTCCCTGAG
		iNos down	CCTCGTGGCTTTGGGCTCCTC
neuNos	556bp	neuNos up	GACATGTACCCCGACGAGGTGC
		neuNos down	CGAGAGTTTCCCCTGCTGGGTC
PSD 95	574bp	PSD 95 up	CGCTCGCCCCATCATCATCCTTG
		PSD 95 down	GAGTCTCTCTCGGGCTGGGAC
mCox 2	552bp	mCox 2 up	CCAGTATCAGAACCGCATTGCCTC
		mCox 2 down	CCCACTTCGCCTCCAAAGGTGC
mNPYr	424bp	mNPYr fo	CTGTCATTTGGGTCCTTGCACTGGC
		mNPYr rev	CAGCAGATTGTGGTTGCAGGTGCC
DRD 2	535bp	DRD 2 up	CTCCGCAAGCGTCGGAAGCG
		DRD 2 down	GCGTGATGAAGAAGGGCAGCCAG
P518	266bp	P518 up	CTCACCTGCCCTTCTTAGAGCAGC
		P518 down	CTAGACGGAAGCCGGTGTGCTC
AGRP	246bp	AGRP up	GTCTGAATGGCCTCAAGAAGACAACTG
		AGRP down	GGCCGTACCCAGCTTGCGG
OX1R	525bp	OX 1R up	CTTCCGCAAGCTCTGGGGCC
		OX 1 R down	GGACAGCACGGTAGTGACGGTG
OX 2 R	589bp	OX 2R up	GCAGCAGCAGCCGGTTTCTCAG
		OX 2 R down	GCCAGGTGGACGGAGTGAAGATG
mNeuU	292bp	mNEUU up	GGACAATTGGCTGCTGCAACCGC

		mNEUU down	GGGACGAGCTGCAGCAACGG
dOpioR	474bp	dOpioR up	CCTAGCCATCGCCATCACCGC
		dOpioR down	GGACTGGGGAACTGGAGCATGC
KOpioR	464bp	kOpioR up	CCGAGGAGATCCAGGCCCTAC
		kOpioR down	GGGTGGCACACAGCAATGTAGCG
MuOpioR	636bp	MuOpioR up	CTGTGCCCTCAGACCGGCAG
		MuOpioR down	GCCCGACAGCATGCGGACAC
mNociR	542bp	mNociR up	GGAGTCCCTCTTTCCTGCCCC
		mNociR down	GGCCACATTAACGGCCTGGGC
CanR1	477bp	CanR1 up	CTGGGCGACAGGTGCCGAG
		CanR1 down	CGATGGCCAGCTGCTGGCTG
CanR2	382bp	CanR2 up	GGTCCCTGCTGGGTCTCCAG
		CanR2 down	GGCCAGGAAGTCAGCTCCAGC
GalR1	583bp	GalR1 up	CTGAGCATCGCAGACCTGGCC
		GalR1 down	CTCAGCCCAGAGGTGGACGAC
TRH	364bp	TRH-up	GCCCAGGAGGAAGGTGCTGTG
		TRH-down	GGGAAGGATCGCCAGCCAGG
TRHr	534bp	TRHr-up	GTGCCAATGATCCTGGCCACTGTG
		TRHr-down	GGTTGACACATACGTATCGGTGACGG
mPOMC	393bp	mPOMC - fo	GAGCTGGTGCCTGGAGAGCAG
		mPOMC- rev	CTCCGCCGACTCGTTCTCAGC
mMCH	357bp	mMCH-fo	GATACTGCAGAAAGATCCGTTGTCGCC
		mMCH-rev	GACCAGCAGGTATCAGACTTGCCAAC
PreProCRH	445bp	PreProCRH	GCAGAGGCAGCAGTGCGGG
		PreProCRH	CATCCTCGGCGCCGCGTTC
Htr1A	605bp	Htr1A-up	GGTAGTGGGGACTGCAGGCG
		Htr1A-down	GGGCGGGGATATTGAGTGAACAGG
mNPYr	424bp	mNPYr -fo	CTGTCATTTGGGTCCTTGCAGTGGC
		mNPYr- rev	CAGCAGATTGTGGTTGCAGGTGGC

mMCHr	416bp	mMCHr-fo	CTGCAAGCCTCGTTGCTGTCCAC
		mMCHr-rev	GCGGTCAATGGCCATAGCAGTCAG
GFAP	400bp	GFAP-fo	CCAACCAACCCTTTCTTGACCCACC
		GFAP-tet-rev	CGATTCCGACCTCATTAAGCAGCTC
BDNF	332bp	BDNF-up	CCTTCCTGCATCTGTTGGGGAGAC
		BDNF-down	GGGCCGAACCTTCTGGTCCTC
Agouti	391bp	Agouti-fo	CCGCCTACTCCTGGCCACC
		Agouti-rev	GCTGCGTCAGCAGTTGGGGTTG
TNF-α	302bp	TNF-a up	CCGCGACGTGGAACTGGCAG
		TNF-a down	GCCACTCCAGCTGCTCCTCC
TSH-b	398bp	TSH-b-up	GCTGCCGTCCTCCTCTCC
		TSH-b-down	CCCCCAGATAGAAAGACTGCGGC
TSH-R	425bp	TSH-R up	GCAACTCTGCAGCGGCTGGAAC
		TSH-R down	GGTCCACTGTATACTCCTCCAAAGG
mGH	375bp	mGH-fo	GCTTCGCTTCTCGCTGCTGCTC
		mGH-rev	GCAGCAGAGACACTGGTGAGTGG
mGHRH	312bp	mGHRH-fo	GGATGCTGCTCTGGGTGCTCTTTG
		mGHRH-rev	CAAGCGTCCGCTGAAGGCTTCATC
mGHRHr	354bp	mGHRHr-fo	CCTGCTGAGGAAGCTGGAGCTTG
		mGHRHr-rev	CCTAGCACTCAGAGGTCAGCACC
mNPY	296bp	mNPY- fo	GCTAGGTAACAAGCGAATGGGGCTG
		mNPY- rev	CCCATCACCACATGGAAGGGTCTTC
Kalirin	287bp	Kalirin up	GCCGCGTTCCGAGTACATCGTG
		Kalirin down	CCTGGGCGGTCAGGGTGCC
SAP97	202bp	SAP97 up	GCCCGGCAGCCTTAGCCCTC
		SAP97 down	GCCCGGCAGCCTTAGCCCTC
SAP102	279bp	SAP102 up	GGCCAAGCTCATCCCCACAGG

		SAP102 down	CCTGCGATACTGAAGCCAAGGCC
Shank1	512bp	Shank1 up	GGCCTCTACCCGAGGCCTC
		Shank1 down	GGGCCGCCAGGGTCAAAGG
Shank2	474bp	Shank2 up	GCCCTTCACTCCTGGTGCCAAC
		Shank2 down	GCCATGCCACCCCACCTTCATC
Shank3	434bp	Shank3 up	GGTGGCCCGCCTGCTGGAC
		Shank3 down	GCTCCAGGTGCTGCACGTGTC
SPAR	359bp	SPAR up	GCGGCTGTGTCCGTCCTGG
		SPAR down	GGGCACCTTGGGAGAGGCTG
SPANK1	652bp	Spank1 up	CCCTGACGACGCCCACTTCAG
		Spank1 down	GTCAGCCCTCGTCGGTCCTTG

Danksagung

Ich danke allen die mir geholfen haben bei der Erstellung dieser Doktorarbeit –

Thomas Wirth für die interessante Fragestellung und die Betreuung meiner Doktorarbeit,

Bernd Baumann für die enge Begleitung des Projektes, sowie die ständige Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten,

Ute Leschik, Bianca Ries und Brigitte Anic für die Einarbeitung in Labortechniken und fortwährende Unterstützung,

den Mitarbeitern der Abteilung für Physiologische Chemie für die Bereitschaft theoretische und praktische Probleme zu diskutieren und zu lösen,

meinen Eltern, die mich bei allen Entscheidungen unterstützt und gefördert haben, und

meiner Frau, die mir immer den Rücken freigehalten und mich stets motiviert hat.