

Universität Ulm
Institut für Physiologische Chemie
Direktor: Prof. Dr. Thomas Wirth

**Charakterisierung der humanen und murinen I κ B-Kinase β -Promotoren
zur Analyse der gewebsspezifischen Variationen in der Zusammensetzung des
I κ B-Kinase-Komplexes.**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Anna Teresa Gosemärker

aus Tett nang

Ulm, 2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

erster Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Marienfeld

zweiter Berichterstatter: PD Dr. Franz Oswald

Tag der Promotion: 20. Juni 2008

Inhaltsverzeichnis

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	I
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	III
<u>1. EINLEITUNG</u>	1
NFκB UND IKKβ.....	1
DIE NFκB-SIGNALWEGE	4
DER IKK-KOMPLEX	6
REGULATION DER IKK-SPIEGEL	8
ZIELSETZUNG	10
<u>2. MATERIAL UND METHODEN</u>	11
CHEMIKALIEN	11
ENZYME UND KITS	13
ZELLKULTURMATERIALIEN.....	14
OLIGONUKLEOTIDE UND VEKTOREN	15
EINMALARTIKEL	17
GERÄTE	17
LÖSUNGEN FÜR DNA-METHODEN	19
LÖSUNGEN UND PUFFER FÜR PROTEINMETHODEN.....	21
NUKLEINSÄUREMETHODEN	24
PROTEINMETHODEN	34
ZELLKULTURMETHODEN.....	37
<u>3. ERGEBNISSE</u>	41
ANALYSE DER DIFFERENTIELLEN EXPRESSION DER KOMPONENTEN DES IKK- KOMPLEXES	41
GENERIERUNG DER IKKβ-PROMOTORKONSTRUKTE	44
ANALYSE DER PROMOTORAKTIVITÄT DES MURINEN IKKβ-PROMOTORS	45

IDENTIFIZIERUNG MÖGLICHER BINDUNGSSTELLEN DURCH VERGLEICH MIT DEM HUMANEN IKKb-PROMOTOR.....	47
ANALYSE DES CREB-MOTIVS IM MURINEN IKKb-PROMOTOR.....	49
ANALYSE DES ETS-MOTIVS IM MURINEN IKKb-PROMOTOR	52
HUMANER IKKb-PROMOTOR	54
STIMULIERBARKEIT DER EXPRESSION VON IKKb	55
<u>4. DISKUSSION</u>	<u>58</u>
DER PUTATIVE IKKb-PROMOTOR IM VERGLEICH ZU ANDEREN PROMOTOREN.....	58
ZELLULÄRE PROTEINSPIEGEL VON IKKa, -b UND NEMO	59
DIE BASALE AKTIVITÄT DES PUTATIVEN IKKb-PROMOTORS	60
DAS CRE-MOTIV IM PUTATIVEN IKKb-PROMOTOR.....	60
DAS ETS-MOTIV IM PUTATIVEN IKKb-PROMOTOR.....	62
WEITERE MÖGLICHE ARBEITSSCHRITTE.....	62
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>64</u>
<u>6. LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>66</u>
DANKSAGUNG.....	73
LEBENS LAUF	74

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure(n)
ad	zu
AML-1a	acute myeloid leukaemia 1a
AP-1 = JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog
ATF-1	activating transcription factor 1
BCL-3	B-cell-leukaemia / -lymphoma-3
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Carma1 = CARD11	caspase recruitment domain family, member 11
Carma3 = CARD10	caspase recruitment domain family, member 10
Cdc37	cell-division-cycle-37 homolog
CDP	CCAAT displacement protein
CdxA	caudal type homeobox transcription factor 1
Ci	Curie
CRE	cAMP-responsive-element
CREB	cAMP-responsive-element binding protein
CREM	cAMP-responsive-element modulator
deltaE	transcription factor 8
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELKS	RAB6 interacting protein 2
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
et al.	et alii
Ets	v-ets-erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
FCS	fetal calf serum
Foxo3a	Forkhead box O3a
GATA-1	GATA binding protein-1
Her2/neu	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog
HSF1 -2	Heat shock factor1, -2
Hsp	Hitzeschockprotein
HTLV1	Human-T-lymphotropic-virus-1

Abkürzungsverzeichnis

I κ B α , - β , - γ , ϵ	Inhibitor-of-NF κ B- α , - β , - γ , - ϵ
IKK α , - β , - γ	Inhibitor-of-NF κ B-Kinase α , - β , - γ
kb	Kilobasen
MALT1	mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
MEKK1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
MHC	major histocompatibility complex
MMS2	Ubiquitin conjugating enzyme E2 variant 2
mRNA	messenger-RNA
MyoD	Myoblast-determination-protein
NEMO = IKK γ	NF κ B-Essential-Modulator
NF κ B	Nuclear-factor- κ B
NGF	Neurite-Growth-Factor
NIK	NF κ B-Inducing-Kinase
PBS	Phosphate buffered saline
Pbx-1	pre B-cell leukaemia transcription factor 1
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMA	Phorbolmyristataacetat
RAB6	RAB6, member of RAS oncogene family
RANKL	TNF-receptor-ligand-superfamily, member 11
Rel	reticuloendotheliosis oncogene
RIP	receptor (TNF-receptor-super-family) interacting protein
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyamidgelelektrophorese
SP1	SP transcription factor 1
SRY	sex determining region on chromosome Y
SUMO	Small-Ubiquitin-like-Modifier
TAK1	tumor growth factor-activated kinase 1 (MEKK7)
TANK	TRAF-family-member-associated NF κ B-activator
TBE	Tris Borat EDTA
TBS	Tris buffered saline
TNF α	Tumor-Necrosis-Factor- α

TNFRSF	TNF-receptor superfamily
TNT	Tris Natrium Triton
TRAF	TNF-Receptor-Associated-Family
TWEAK	Tumor-Necrosis-Factor-like-Weak-Inducer-of-Apoptosis
Ubc13	Ubiquitin conjugating enzyme 13
USF	upstream transcription factor
v-Myb	myeloblastosis viral oncogene homolog
YY1	YY transcription factor 1

Nukleotide

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanidin
T	Thymin
N	Nukleotid, A, T, G oder C
R	Purin, A oder G
Y	Pyrimidin, C oder T
NTP	Nukleotidtriphosphat
analog: ATP etc.	analog: Adenosintriphosphat etc.
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
analog: dATP etc.	analog: Desoxyadenosintriphosphat etc.
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
analog: ddATP etc.	analog: Didesoxyadenosintriphosphat etc.

SI-Einheiten und Präfixe

m	Meter
g	Gramm
s, min	Sekunde, Minute
m	milli-
μ	mikro-
n	nano-
p	piko

1. Einleitung

NFκB und IKKb

Die Bedeutung des NFκB-Systems

NFκB bezeichnet eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die erstmals als Regulator der Transkription der κ-Leichtkette in Plasmazellen beschrieben wurde (55). Inzwischen gelten mehr als hundert Gene als Zielgene von NFκB (19). Diese Zielgene spielen vor allem eine Rolle bei Entzündungs- und Immunreaktionen, so zum Beispiel der Akute-Phase-Reaktion der angeborenen Immunantwort. Durch seine zentrale Rolle bei der Reaktion auf proinflammatorische Stimuli und der Aktivierung von Entzündungsreaktionen liegen große therapeutische Hoffnungen auf Medikamenten, die die NFκB-Aktivität beeinflussen, insbesondere bei Autoimmunerkrankungen und chronisch entzündlichen Erkrankungen (54, 9). Bereits bekannte anti-entzündliche Medikamente wie Glucocortikoide und nichtsteroidale Antirheumatika entfalten einen Teil ihrer Wirkung durch die Beeinflussung von NFκB (3, 43, 60).

Aber auch außerhalb des Immunsystems spielt NFκB eine Rolle, zum Beispiel bei Differenzierungsprozessen, bei der Regulation von Apoptose sowie in Embryogenese und Krebsentstehung (6), und bei physiologischen und pathologischen Prozessen in Nervenzellen (36). In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise darauf, dass Entzündung und Krebsentstehung eng miteinander verknüpft sind (z. B. 11). NFκB scheint hierbei eine wichtige Rolle zu spielen (z. B. 49).

NFκB und IκB Proteine

Die NFκB-Familie besteht in Säugetieren aus fünf Transkriptionsfaktoren, Rel-A (p65), Rel-B, c-Rel, p100/p52 und p105/p50, die durch die gemeinsame Rel-Homologie-Domäne charakterisiert sind. Ihre Aktivität im Zellkern entfalten sie als Homo- oder Heterodimere in praktisch jeder Zusammensetzung nach Bindung an die Konsensussequenz GGRNNYYCC (N = Nukleotid, R = Purin, Y = Pyrimidin).

In unstimulierten Zellen befinden sich NFκB-Dimere im Cytoplasma gebunden an IκB-Proteine (Inhibitor-of-NFκB), IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε und BCL-3. Als weitere IκBs

1. Einleitung

gelten die Vorläuferproteine p100 und p105, die durch Prozessierung in die NF κ B-Transkriptionsfaktoren p52 und p50 umgewandelt werden (24) (Abbildung 1).

Zur Aktivierung von NF κ B erfolgt eine sequenzspezifische Phosphorylierung der I κ B-Proteine, die dadurch für eine nachfolgende Ubiquitinierung und proteasomalen Abbau markiert werden (s. u.). Interessanterweise bestehen jedoch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen I κ B-Proteinen hinsichtlich der Agonisten, die ihren Abbau induzieren, der Affinität an den unterschiedlichen NF κ B-Dimeren und ihrer Bindungskinetik. In Kombination mit der Tatsache, dass auch die verschiedenen NF κ B-Dimere unterschiedliche Zielgene haben, ermöglicht dies ein für den jeweiligen Stimulus spezifisches NF κ B-Profil. Die Komplexität des NF κ B-Systems ergibt sich darüber hinaus durch eine Reihe weiterer Mechanismen, wie die Prozessierung der Vorläuferproteine p100 und p105, unterschiedliche posttranslationale Modifikationen sowie die Bindung von Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren an NF κ B maßgeblich erhöht.

So entsteht eine Vielzahl an zelltyp- und stimulluspezifischen Reaktionen sowie Regulationsmöglichkeiten.

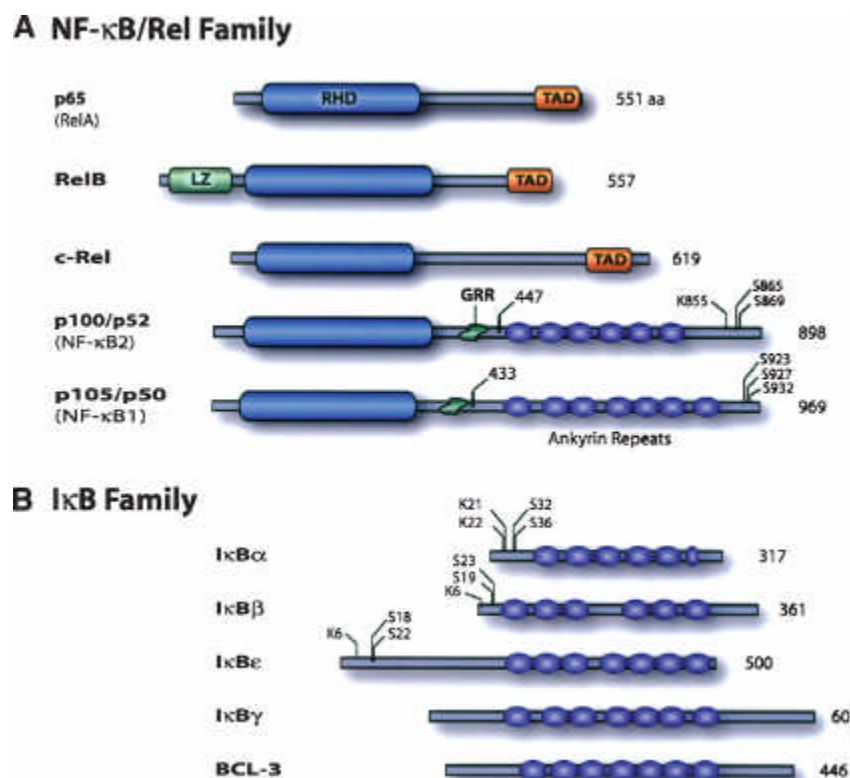


Abbildung 1: Schematische Darstellung der NF κ B-Familie und der I κ B-Familie. RHD = Rel-Homologie-Domäne. Abbildung aus (24), Seite 2196

NFκB und Differenzierungsprozesse

NFκB scheint bei zahlreichen Differenzierungsprozessen insbesondere im lymphatischen System aber auch darüberhinaus eine Rolle zu spielen. Bestimmte T-Zell-Funktionen wie Priming, B-Zell-Hilfe und Reaktionen im Keimzentrum sind ebenso NFκB-abhängig (50) wie die Differenzierung dendritischer Zellen und Makrophagen. Während bei der Differenzierung von dendritischen Zellen aus Monozyten zum Beispiel die Expression von p105/50, RelB und c-Rel drastisch erhöht wird, wird die Expression dieser Gene bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen reduziert. Auch die Expression von IKKβ wird bei der Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen gesteigert. Die Expression von IKKα und IKKγ ändert sich im Gegensatz dazu weder bei der Differenzierung zu dendritischen Zellen noch bei der Differenzierung zu Makrophagen (5). Ebenso hängt die Bildung von Osteoklasten sowie ihre gesteigerte Aktivität bei Entzündungen, zum Beispiel bei rheumatoider Arthritis, von NFκB und IKKβ ab. Mäuse, denen sowohl p100/52 als auch p105/50 fehlt, haben aufgrund einer reduzierten Osteoklastenfunktion eine erhöhte Knochenmasse (30). Auch bei der Differenzierung von Osteoklasten aus Monozyten spielt die Aktivierung von NFκB, insbesondere von p50/RelA- und p52/RelA-Dimeren durch die Bindung von RANKL an Rezeptor RANK eine Rolle. Allerdings wird auch vermutet, dass durch den RANK-Signalweg noch andere Transkriptionsfaktoren neben NFκB aktiviert werden (57). IKKβ ist für die TNFα- und RANKL-induzierte Osteoklastenaktivierung *in vitro* und *in vivo* notwendig. IKKα hingegen spielt bei der Differenzierung von Osteoklasten *in vivo* keine Rolle. (47)

Als weiteres Beispiel für die Bedeutung von IKKβ für Differenzierungsprozesse ist das Modell der neuronalen Differenzierung von PC12-Zellen zu nennen. Konstitutiv-aktives IKKβ reicht bereits für das Auswachsen von Neuriten in PC12-Zellen aus ohne weitere Zusätze von Wachstumsfaktoren wie NGF. Desweiteren wird die NGF-induzierte Differenzierung von PC12-Zellen durch dominant-negatives IKKβ blockiert (4). Auch weitere neuronale Entwicklungsprozesse sind NFκB abhängig, so weisen Embryonen, bei denen die Gene für IKKα und IKKβ inaktiviert wurden und die am zwölften Tag der Embryonalentwicklung absterben, Defekte im Verschluss der Neuralleiste im Bereich des Metencephalons auf, während sich die restlichen Neuralleisten zum Neuralrohr verschließen. Desweiteren ergaben sich bei diesen doppel-Knockout-Embryonen eine erhöhte Apoptoserate im Rückenmark und den Spinalganglien, jedoch keine Veränderungen in der neuronalen Differenzierung. (34). Außerdem gibt es Hinweise

1. Einleitung

darauf, dass Dexamethason über den NF κ B-Signalweg die Differenzierung von neuronalen Stammzellen zu Astroglia blockiert (48). Bestimmte NF κ B-Proteine werden selektiv in bestimmten Hirnarealen und Zelltypen exprimiert, so finden sich zum Beispiel RelA und p50 bei neugeborenen und erwachsenen Mäusen in der subventrikulären Zone und in bestimmten migrierenden neuronalen Vorläuferzellen, was ein Hinweis auf die Rolle von NF κ B bei der Proliferation neuraler Stammzellen sowie bei der Migration von neuronalen Zellen sein könnte (13). Auch weitere physiologische und pathophysiologische Prozesse im Zentralen Nervensystem stehen mit NF κ B in Zusammenhang (39, 37, 36).

Im Gegensatz zu den oben aufgeführten Beispielen spielt NF κ B/IKK β bei der Differenzierung von Muskelzellen eine hemmende Rolle. So führt das Mitglied der TNF-Familie Tumor-Necrosis-Factor-like-Weak-Inducer-of-Apoptosis (TWEAK) zu einer Aktivierung von NF κ B und zur Degradierung des MyoD-Proteins, eines muskelspezifischen Transkriptionsfaktors (33), und zur Hemmung der Expression von MyoD und Myogenin(14). Auch TNF α führt zu einer Hemmung der myogenen Differenzierung durch einen RelA-abhängigen erhöhten proteasomalen Abbau von MyoD (32).

Die NF κ B-Signalwege

Es werden prinzipiell der klassische und der alternative NF κ B-Aktivierungsweg unterschieden. Im klassischen Signalweg kommt es nach Stimulation von Zellen z.B. mit dem Zytokin TNF- α oder der Kombination des Phorbolsteres PMA und des Ionophors Ionomycin zur Aktivierung des IKK-Komplexes (I κ B-Kinase-Komplex), der aus den Kinasen IKK α und IKK β sowie der regulatorischen Unterinheit NEMO besteht. Dieser Proteinkomplex phosphoryliert I κ B α hauptsächlich über die Kinase-Domäne von IKK β , was zur Ubiquitylierung und anschließenden Degradation von I κ B α durch das Proteasom führt. Dadurch wird das an das I κ B α -Protein gebundene NF κ B-Dimer, klassischerweise RelA:p50, freigesetzt und kann in den Zellkern translozieren um dort als Transkriptionsfaktor zu wirken.

Im alternativen Signalweg kommt es zum Beispiel durch Stimulation mit Lymphotoxin β zur Aktivierung von NIK (NF κ B inducing kinase) und dadurch zur Bildung von IKK α -Homodimeren, welche p100 phosphorylieren, was anschließend zur Prozessierung von p100 in das reife p52-Protein führt. P52 bildet mit RelB Heterodimere, die so aktiviert

1. Einleitung

werden und im Zellkern spezifische Zielgene regulieren. Abbildung 2 zeigt eine Übersicht über die beiden Signalwege.

Die zwei Signalwege reagieren jeweils auf unterschiedliche Stimuli und, da auch unterschiedliche NF κ B-Dimere freigesetzt werden, unterscheiden sie sich auch hinsichtlich ihrer Zielgene. Aktivierung von Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Familie TNFR 1 und 2, des T- und B-Zell-Rezeptors sowie des Interleukin1-Rezeptors führen neben vielen anderen Stimuli zur Aktivierung des klassischen Signalweges. Durch Bindung an den Lymphotoxin β -Rezeptor und den CD40-Rezeptor wird der alternative Signalweg aktiviert. Interessanterweise führt die Stimulation der Zelle mit Agonisten des alternativen NF κ B-Signalwegs auch zur Aktivierung des klassischen NF κ B-Weges (24).

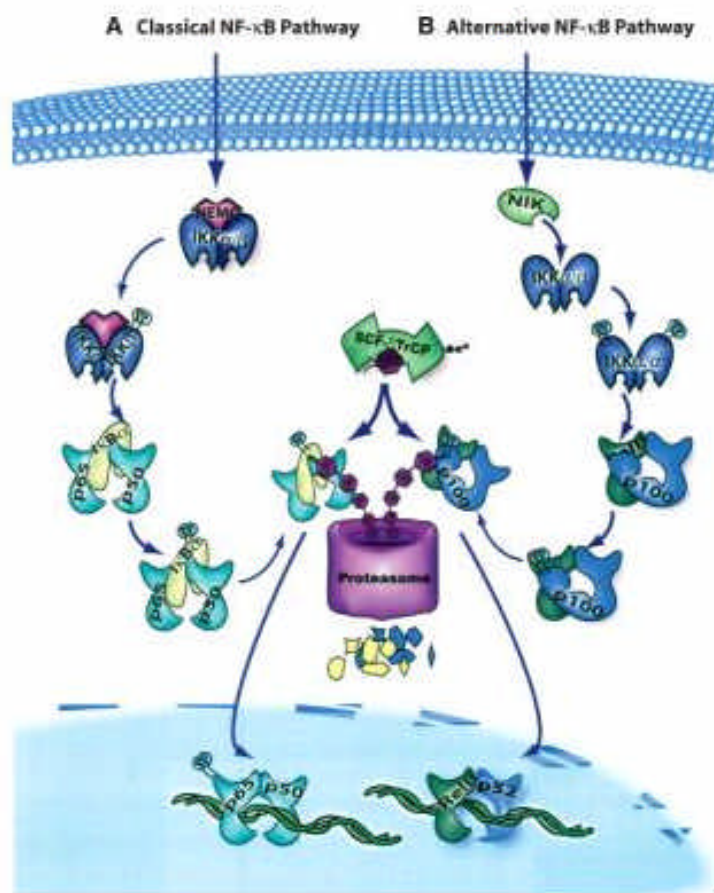


Abbildung 2: Schematische Übersicht über den klassischen und alternativen NF κ B-Signalweg. Abbildung aus (24), Seite 2197

Zusätzlich zu der Aktivierung durch extrazelluläre Stimuli wie z.B. die Ligandenbindung des T- und B-Zell-Rezeptors, welche also einen Signalweg vom extrazellulären Raum zum Zellkern darstellt, gibt es noch eine Aktivierung von NF κ B durch intrazelluläre Signale

1. Einleitung

wie genotoxischen Stress. Dies stellt einen Signalweg dar, der im Zellkern beginnt, jedoch im Cytoplasma die oben beschriebenen Signalkaskaden inklusive IKK-Aktivierung und NF κ B-Freisetzung induziert und letztlich wieder mit dem aktivierten NF κ B im Zellkern endet (29).

Der IKK-Komplex

Der Aufbau des IKK-Komplexes

Der IKK-Komplex ist ein 800-900 kDa großer Proteinkomplex, der aus zwei katalytischen Untereinheiten (IKK α und IKK β) und der regulatorischen Untereinheit NEMO (NF κ B essential modulator, IKK γ) besteht. Außerdem gibt es Hinweise auf eine weitere Untereinheit namens ELKS als Bestandteil des IKK-Komplexes (15), die modulatorische Einflüsse haben soll.

Eine Reihe von zellulären und viralen Proteinen kann mit dem IKK-Komplex assoziieren. Hitzeschockproteine Hsp90 und Cdc37 führen zum Beispiel zu einer Stabilisierung des IKK-Komplexes und sind für die TNF α -induzierte Aktivierung wichtig (10). Die Bindung des Tax-Proteins des HTLV I-Virus führt über die Aktivierung von Kinasen wie MEKK1 und Serin/Threonin-Phosphatase 2A zu einer Aktivierung von IKK β und des IKK-Komplexes (17, 61).

IKK α und IKK β sind Serin-/Threoninkinasen, welche mit hoher Spezifität Serinreste phosphorylieren. Trotz verschiedener Aufgaben sind sie weitgehend homolog zueinander, sie haben annähernd dieselbe Größe (IKK α 745aa, IKK β 756aa) und denselben Aufbau mit einer N-terminalen Kinasedomäne, einem leucine-zipper-Motiv, einer Helix-Loop-Helix-Domäne und einer C-terminalen NEMO-Bindungsdomäne.

Im Gegensatz dazu weist NEMO keine katalytische Aktivität auf, sondern hat regulatorische Funktion und interagiert mit zahlreichen Proteinen wie beispielsweise Hsp70 (1).

IKK β phosphoryliert I κ B α an den Serinresten 32 und 36 und führt somit zur NF κ B-Aktivierung über den klassischen Signalweg. Da mehrere Stimuli, die den klassischen Signalweg aktivieren, in den IKK-Komplex konvergieren, spielt IKK β eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von NF κ B (24). Jedoch gibt es auch noch eine Zahl anderer Proteine, die ein Substrat für IKK β sind, so zum Beispiel TANK in der TNF α -Signalkaskade (7) oder der Transkriptionsfaktor Foxo 3a (26) außerhalb des NF κ B-Signalwegs.

IKK α ist, wie bereits erwähnt, im alternativen Signalweg von NF κ B von Bedeutung und führt über die Phosphorylierung des p100-Vorläuferproteins zur Aktivierung von p52:RelB-Heterodimeren. Im Gegensatz zu IKK β , welches eher die Reaktion der angeborenen Immunität aktiviert, ist IKK α für die adaptive Immunität und die Entwicklung lymphatischer Organe zuständig (8). Weitere Substrate sind das Histon H3 (42) und CyclinD1 (31). Außerdem reguliert es unabhängig von NF κ B und seiner Kinaseaktivität über die Differenzierung von Keratinozyten den Aufbau der Epidermis (28).

Das genaue stöchiometrische Verhältnis der einzelnen Bestandteile im IKK-Komplex ist unbekannt. Ebenso ist noch unbekannt, ob der IKK-Komplex stets denselben Aufbau hat oder ob je nach Zelltyp oder Stimulus unterschiedliche Zusammensetzungen entstehen. Allerdings scheinen IKK α und β hauptsächlich als Heterodimere vorzuliegen, jedoch kann man auch IKK α - und IKK β -Homodimere finden (46). NEMO liegt in der Regel als Dimer vor, jedoch gibt es auch Hinweise auf Tri- und Tetramere (1).

Aktivierung des IKK-Komplexes

Bei vielen pathophysiologischen Prozessen zeigt sich eine Aktivierung des IKK-Komplexes, so zum Beispiel bei chronisch entzündlichen Erkrankungen oder auch bei unterschiedlichen Differenzierungsprozessen. Somit könnte sowohl die Inaktivierung als auch die Aktivierung des IKK-Komplexes von therapeutischem Interesse sein. Jedoch sind die genauen Mechanismen, die zur Aktivierung des IKK-Komplexes führen, noch immer unbekannt. Da die Phosphorylierung der Serine 177 und 181 von IKK β und der korrespondierenden Serine 176 und 180 von IKK α für die Aktivierung des Komplexes nötig ist (12), wird nach möglichen IKK-Kinasen gesucht. MEKK1, NIK und TAK 1 sind solche potentiellen Kinasen, jedoch ist unklar, welche Rolle sie bei der Aktivierung des IKK-Komplexes spielen. MEKK1 und TAK1 lagern sich mit weiteren Adaptermolekülen wie RIP1 und Mitgliedern der TRAF an den TNF-Rezeptor an und bewirken eine Rekrutierung des IKK-Komplexes an den TNF-Rezeptor (22). NIK hingegen ist ein wesentlicher Bestandteil des alternativen NF κ B-Signalweges, da es in der Lage ist IKK α an den Serinen 176 und 180 zu phosphorylieren und somit zu aktivieren (51).

Ebenso wird eine stimulusinduzierte Konformationsänderung des IKK-Komplexes, zum Beispiel nach Phosphorylierung durch eine IKK-Kinase, mit anschließender Autophosphorylierung der Kinasen diskutiert (22). Somit würden die IKKs selbst als IKK-

1. Einleitung

Kinasen fungieren. (Auto-)Phosphorylierung der C-terminalen Serinreste könnte auch eine Rolle bei der Beendigung des Signals durch IKK β spielen (12).

Weitere Beispiele für posttranslationale Modifikationen, die für den Aktivierungsprozess des IKK-Komplexes eine wichtige Rolle spielen, sind die Ubiquitylierung und die SUMOylierung (SUMO = Small Ubiquitin-like Modifier) von NEMO. Die SUMOylierung von NEMO führt zu einer Aktivierung des IKK-Komplexes als Reaktion auf genotoxischen Stress und ist somit Teil eines Signalwegs zwischen Nucleus und Zytoplasma (29).

Unterschiedliche Lysinreste in der Zinkfingerdomäne von NEMO werden in vivo stimulluspezifisch ubiquityliert. So führt die Stimulation mit TNF α zur Ubiquitylierung an Lysin 6, genotoxischer Stress, der zuerst eine SUMOylierung von NEMO bewirkt, führt anschließend zu einer Ubiquitylierung an den Lysinresten 277 und 309, die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors wiederum führt zur Ubiquitylierung des Lysinrestes 399. Diese NEMO-Ubiquitylierung ist für die volle Aktivierung von NF κ B nötig (9).

Genauere Hinweise auf den Aktivierungsmechanismus des IKK-Komplexes geben Studien mit den Gerüstproteinen Carma1 und Carma3. Diese scheinen einen Adapter zu bilden, der NEMO als Teil des IKK-Komplexes mit einem Komplex von 2 Molekülen Bcl10 sowie je einem Molekül MALT1, Ubc13 und MMS2 verbindet und eine Konformationsänderung im letztgenannten Komplex hervorruft, die wiederum zur Ubiquitylierung von NEMO führt (56). Carma1 wird von der Proteinkinase C phosphoryliert und wirkt erst nach der Phosphorylierung als Adaptermolekül. Ebenso phosphoryliert die Proteinkinase C TAK1, welches wiederum eine IKK-Kinase ist. Die Proteinkinase C spielt insbesondere bei der NF κ B-Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor eine Rolle (52).

Regulation der IKK-Spiegel

Trotz der universellen Bedeutung des IKK-Komplexes für die klassischen NF κ B-Wege zeigen die zellulären Protein-Spiegel der unterschiedlichen IKK-Untereinheiten deutliche Unterschiede. Die Expression von IKK α , IKK β und NEMO zeigt auf mRNA-Ebene organspezifische Unterschiede. IKK β ist in lymphatischen Geweben besonders stark exprimiert, vor allem in Thymus, Milz und peripheren Leukozyten. Lunge und Leber weisen hingegen deutlich weniger IKK β auf (62). IKK α und NEMO zeigen geringer ausgeprägte Unterschiede zwischen den Organen. NEMO ist vor allem in Leber, Gehirn

1. Einleitung

und Skelettmuskel stark exprimiert, während Lunge und periphere Leukozyten nur geringe Konzentrationen aufweisen (2). IKK α wiederum weist in Niere, Kolon und Skelettmuskel hohe Konzentrationen auf, während es wie auch IKK β in Lunge und Leber nur schwach exprimiert ist (62). Desweiteren sind für NEMO und IKK α unterschiedliche Spleiß-Varianten beschrieben, die ebenfalls gewebespezifische Unterschiede aufweisen (2, 62). Ebenso führt Hitzeschock initial zu einer Veränderung der zytosolischen IKK α und IKK β -Konzentration. Die durch den Hitzeschock denaturierten IKK-Proteine werden an zytoplasmatische Membranen gebunden und damit unlöslich und funktionell inaktiv. Später kehren sie wieder zur löslichen Fraktion der zytoplasmatischen Proteine zurück. Diese vorübergehende Unlöslichkeit der IKK-Proteine folgt auf die Dissoziation von Hsp90. Ebenso führt die Konkurrenz um die Hsp90-Bindungsstellen durch Geldanamycin zu einem Abbau der IKK-Proteine (45). Somit könnten Unterschiede in Expression, Spleißen und Abbau zu spezifischen Unterschieden der zellulären Proteinspiegel von IKK α , IKK β und NEMO führen, welche wiederum zu unterschiedlichen Zusammensetzungen des IKK-Komplexes führen könnten oder auf Funktionen der einzelnen Partner außerhalb des IKK-Komplexes deuten könnten.

Für IKK α ist ein Promotor beschrieben, durch den die Transkription von IKK α über die Transkriptionsfaktoren p53 und Ets-1 reguliert wird. Ets-1 wirkt dabei stark transaktivierend auf die Transkription von IKK α , während p53, obwohl es selbst nicht direkt an den Promotor bindet die Ets-1-abhängige Transaktivierung reduziert (21).

Für NEMO sind mehrere Transkripte mit unterschiedlichen 5'-Exons (1a, 1b und 1c) beschrieben. Die Gene für die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase und für NEMO liegen Kopf an Kopf und teilen sich ein CpG-Insel als bidirektionalen Promotor. Das CpG-Insel wird für die Transkripte 1b und 1c sowie für das Transkript Glucose-6-Phosphatdehydrogenase als Promotor verwendet. Für das Transkript 1a ist ein zweiter Promotor beschrieben, der im zweiten Intron der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase liegt und nur eine geringe basale Aktivität hat. Diesem Promotor werden jedoch die stress- und/oder gewebsspezifische Expression von NEMO zugeschrieben (18).

Darüberhinaus sind für IKK β weitere Änderungen der Cytoplasmaspiegel bekannt. So weisen Zellen, in denen das Her2/neu-Onkogen stark überexprimiert wird, eine höhere IKK β -Proteinkonzentration auf (35). Ebenso geht die Differenzierung dendritischer Zellen mit Veränderungen im IKK β -Proteinspiegel einher (5). Auch die neuronale PC12-Zelllinie zeigt bei der Differenzierung mit Bildung von Nervenfortsätzen Veränderungen im IKK β -Spiegel (4). Die Hintergründe für die gesteigerten IKK-Spiegel sind weitgehend

1. Einleitung

unbekannt. Es konnte jedoch bereits im Fall von Her2/neu-positiven Zellen nachgewiesen werden, dass ein putativer Promotor von IKK β in Her2/neu-positiven Zellen aktiver ist, als in der parentalen Zelllinie (35).

Zielsetzung

Die genauere Kenntnis der Zusammensetzung des IKK-Komplexes kann helfen zelltyp- und gewebsspezifische Unterschiede der IKK-Funktion und damit der NF κ B-Aktivität zu erklären und somit spezifische therapeutische Strategien aufzudecken. Da die Zusammensetzung des IKK-Komplexes, insbesondere das stöchiometrische Verhältnis der Hauptkomponenten IKK α , IKK β und NEMO Einfluss auf die Funktion des IKK-Komplexes hat, sollen in dieser Arbeit zell- und gewebstypische Unterschiede der mRNA- und Proteinexpression der drei Hauptbestandteile des IKK-Komplexes untersucht werden. Um zu klären, welche Mechanismen zu diesen unterschiedlichen IKK-Spiegeln führen, soll exemplarisch für IKK β ein putativer Promotor anhand eines klonierten Promotorkonstrukts untersucht werden und Faktoren, welche die Expression von IKK β erhöhen, sollen identifiziert werden.

2. Material und Methoden

Chemikalien

β -Glycerolphosphat	SIGMA
^{32}P -markiertes α -dCTP und γ -ATP	AMERSHAM
Acrylamid	APPLICHEM
Agar	GIBCO BRL
Agarose	INVITROGEN
Ampicillin	APPLICHEM
APS	APPLICHEM
Bacto-Trypton	APPLICHEM
Borsäure	APPLICHEM
Bradford-Reagenz	BIORAD
Bromphenolblau	MERCK
DTT (Dithiothreitol)	SIGMA
EDTA	APPLICHEM
EGTA	APPLICHEM
Eisessig	MERCK
Ethanol, absolut	RIEDEL DE HAEN
Ethanol, technisch	APOTHEKE DES UNIVERSITÄTSKLINIKUMS ULM
Ethidiumbromid	SIGMA

2. Material und Methoden

Ficoll	APPLICHEM
Glycerin	APPLICHEM
Glycin	APPLICHEM
Hefeextrakt	APPLICHEM
HEPES	SIGMA
Kaliumacetat	APPLICHEM
KCl	MERCK
Leupeptin	APPLICHEM
Methanol, absolut	FLUKA
Methanol, technisch	APOTHEKE DES UNIVERSITÄTSKLINIKUMS ULM
MgCl ₂	MERCK
Na ₂ HPO ₃	APPLICHEM
NaCl	APPLICHEM
NaF	SIGMA
NaH ₂ PO ₃	MERCK
NaOH	APPLICHEM
PMSF	APPLICHEM
Reinstwasser (AMPUWA)	FRESENIUS KABI
SDS (Sodium dodecyl	APPLICHEM
TEMED	APPLICHEM
Tris	APPLICHEM

2. Material und Methoden

TritonX	SIGMA
Tween20	APPLICHEM
Xylenxyanol	SIGMA

Enzyme und Kits

Die Zusammensetzungen aller fertigen Kits und Enzyme sowie die Reaktionsbedingungen sind den Herstellerangaben zu entnehmen und wurden, soweit nicht anders vermerkt, auch so verwendet.

Restriktionsenzyme (DpnI, SpeI, XbaI, AMERSHAM HindIII)	NEW ENGLAND BIOLABS
T ₄ -Ligase	USB
alkalische Phosphatase (SAP)	ROCHE
Polynukleotidkinase	FERMENTAS
Pfx-PCR-Kit	INVITROGEN
Klenow-Fragment	FERMENTAS
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	INVITROGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
Push Columns	STRATAGENE
ECL-System	PROMEGA
Luciferase-Assay	PROMEGA
Gel-Extraktions-Kit	QIAGEN
Aufreinigungs-Kit zur Sequenzierung	GENAXXON
Sequenzierung Mix	GENAXXON

2. Material und Methoden

Pfu-Polymerase und Puffer	STRATAGENE
cDNA-Synthese-Kit	ROCHE
TRIzol	LIFE TECHNOLOGIES
Plasmid Mini und Midi Kit	QIAGEN

Zellkulturmaterialien

Gebrauchsfertige Medien und Chemikalien

D-MEM	GIBCO
RPMI	GIBCO
Trypsin-EDTA	GIBCO
Penicillin/Streptomycin	GIBCO
Glutamin	GIBCO
β -Mercapto-Ethanol	GIBCO
Fetales Kälberserum	GIBCO

Zelllinien und Stimulantien

MEF	murine embryonale Fibroblasten
HeLa	humane Karzinomzelllinie
293	humane embryonale Nierenepithelzellen
Jurkat	humane T-Zell-Lymphom-Zellen
EL-4	murine Thymomzellen
S107	murine B-Zellen

2. Material und Methoden

Namalwa	humane Burkitt-Lymphomzellen
KMH2	humane Hodgkin-Lymphomzellen
ep-RAS	mit Ras-Virus transformierte XT-Zellen
XT	humane epitheliale Zellen
5532	murine B-Zell-Lymphomlinie
TNF- α	Boehringer
PMA	Sigma
Ionomycin	Sigma
Forskolin	Sigma

Oligonukleotide und Vektoren

Alle Oligonukleotide wurden bei BIOMERS bestellt.

Primer zur Klonierung

m_ikk1500	5'-GAT CGG ATC CTT AGG CTA TGG GAG GTG AGC-3'
IKKfor1500	5'-GAT CGG ATC CAT TGC AGT TGT CCT GAC TGG-3'
IKKfor1000	5'-GAT CGG ATC CCA AAC GCT TAG AGT CCC CAG-3'
IKKrevint	5'-GAT CGG ATC CCC ACT TCC TCA AAC ACT Tcc-3'
IKKrev1000	5'-GAT CGG ATC CGA CTC TAA GCG TTT GAA CTC-3'
IKKrev500	5'-GAT CGG ATC CAA TCT CTG CTC CTC TGA AGG-3'

Oligonukleotide für EMSA

wtCREBfor 5'-GAT CCT AGT ACC CGT GAC GTC AGG GCA GGA AG-3'

wtCREBrev 5'-GAT CCT TCC TGC CCT GAC GTC ACG GGT ACT AG-3'

mutCREBfor 5'-GAT CCT AGT ACC CGT GTG GTC AGG GCA GGA AG-3'

mutCREBrev 5'-GAT CCT TCC TGC CCT CAG CAC ACG GGT ACT AG-3'

wtEtsfor 5'-GAT CTC AGG GCA GGA AGT GTT TGA GGA A-3'

wtEtsrev 5'-GAT CTT CCT CAA CAC CTT CCT GCC CTG A-3'

mutEtsfor 5'-GAT CTC AGG GCA AGA AGT GTT TGA GGA A-3'

mutEtsrev 5'-GAT CTT CCT CAA ACA CTT CTT CGG CTG-3'

AP-1for 5'-GAT CCG TTG ATG ACT CAG CCG GAA-3'

AP-1rev 5'-GAT CTT CCG GCT GAG TCA TCA AGC G-3'

Primer für die ortsgerichtete Mutagenese

CREBmutfor 5'-CGT CTA GTA CCC GTG TGG TCA GGG CAG G-3'

CREBmutrev 5'-CCT GCC CTG ACC ACA CGG GTA CTA GAC G-3'

Etsmutfor 5'-CGT CAG GGC AAG AAG TGT TTG AGG-3'

Etsmutrev 5'-CCT CAA CAC CTT CTT GCC CTG ACG-3'

Primer für Sequenzierung

500-3seq 5'-GAT CGG ATC CCC GCC AGG TCC TGC GCC GCC-3'

Plasmide

pTATA

pFlag

pcDNA3

Einmalartikel

Einmalküvetten	BRAND
Faltenfilter	SCHLEICHER&SCHNELL
Mikroreaktionsgefäße	SARSTEDT, EPPENDORF
Petrischalen und Flaschen für Zellkultur	FALCON, NUNC, GREINER
Pipettenspitzen	HIGH TECH LAB
Protran-Nitrocellulose Transfermembran	SCHLEICHER&SCHNELL
Röhrchen für Luciferase-Assay	GREINER
Röntgenfilm	FUJI
Spritzen und Kanülen	BRAUN MELSUNGEN
Sterilfilter	MILLIPORE
Whatman-Papier	VWR

Geräte

ABI Prism-Genetischer Analysator	SYNERGENE
Analysenwaage	SARTORIUS
Bidest-Anlage	MILLIPORE

2. Material und Methoden

Blockthermostat – Digital Heatblock	VWR
Brutschrank – Hera Cell	HERAEUS
Eismaschine	SCOTSMAN
Feinwaage	SCALTEC
Filmentwickler	KODAK
Gefrierschrank –80°C Hera Freeze	HERAEUS
Gel-Vakuumtrockner	HOEFER
Glaspipetten	BRAND
Kühl- und Gefrierschränke	LIEBHERR, KEDRO
Laufkammer für PAGE	VWR
Lumat LB 9507	BERTHOLD
Magnetrührer RCTbasic	IKA-WERKE
Mikropipetten	LABMATE
Mikrowelle	BOSCH
Mikrozentrifuge – Biofuge Pico	HERAEUS
Nassblotter – MWB3	VWR
PCR-Gerät: advanced Primus 96	PEQLAB
pH-Meter	KNICK
Photometer	EPPENDORF
Pipettierhilfe Accu-Jet	BRAND
Schüttelinkubator	INFORS AG

2. Material und Methoden

Schüttler Polymax 1040	HEIDOLPH INSTRUMENTS
Spannungsgerät Consort E861	DESAGA
Speedvac	BACHENHOFER
Sterilbank für Zellkultur – Hera Safe	HERAEUS
Umkehrmikroskope	LEICA
UV-Anlage	HEROLAB
Videosystem für UV-Anlage	SONY
Vortex Genie	SCIENTIFIC INDUSTRIES
Wasserbad	JULABO
Zentrifuge J2-21	BECKMAN COULTER

Lösungen für DNA-Methoden

Gelelektrophorese

50x TAE	242g	Tris
	57,1ml	Eisessig
	100ml	EDTA (0,5M ph=8)
	ad 1l	H ₂ O
1% Agarosegel	0,5g	Agarose
	50ml	1x TAE
	5µl	Ethidiumbromid (10 mg/ml)
10x DNA-Farbmarker	80%	Glycerin
	100mM	EDTA
	0,025%	Xylenyanol F
	0,025%	Bromphenolblau

2. Material und Methoden

Annealing

2x Annealingpuffer	60mM	NaCl
	200mM	MgCl
	200mM	Tris, pH=7,5

Transformation von Bakterien

Selektionsagar:

LB-Medium +	1,5%	Agar
	40mg/l	Ampicillin

DNA-Isolierung aus Bakterien

Alkalische Lyse von Bakterienzellen

LB-Medium	10g	Bacto-Trypton
	5g	Hefeextrakt
	5g	NaCl
	ad 1l	dest. H ₂ O
Puffer1	50mM	Tris; pH=8
	10mM	EDTA
	100µg/ml	RNAse A
Puffer2	200mM	NaOH
	10g/l	SDS
Puffer3	3M	Kaliumacetat

Lösungen und Puffer für Proteinmethoden

Gesamtzellextrakte

10x PBS	87,65g	NaCl
	2g	KCl
	11,7g	Na ₂ HPO ₃
	2,4g	NaH ₂ PO ₃
	ad 1l	H ₂ O
		pH=7,22
TNT-Lysispuffer	20mM	Tris/HCl, pH=8
	200mM	NaCl
	1%	TritonX
	1mM	Leupeptin
	0,5mM	DTT
	20mM	NaF
	20mM	β-Glycerol-Phosphat
	100mM	PMSF in Ethanol

Organextrakte

Waschpuffer	10mM	K ₂ HPO ₄
	1mM	EDTA
	0,15mM	NaCl
		pH=7,4
Homogenatpuffer	10mM	K ₂ HPO ₄
	1mM	EDTA
	1mM	EGTA
	0,5µg/ml	Leupeptin
	0,7µg/ml	PepstatinA
	1µM	PMSF
	10µM	Benzamidin
	500U	Trasylol

Cytoplasmatische und Nukleäre Extrakte

Puffer A ⁺	10mM	HEPES, pH = 7,9
	10mM	KCl
	0,1mM	EDTA
	0,1mM	EGTA
	1mM	DTT
	0,5mM	PMSF
	Puffer C ⁺	20mM
0,4mM		KCl
1mM		EDTA
1mM		EGTA
1mM		DTT
1mM		PMSF

SDS-PAGE

4,5% Sammelgel	2,5ml	0,25M Tris-HCl, pH = 6,8
	0,564ml	Acrylamid (40%, 37,5 :1)
	1,8ml	H ₂ O
	50µl	10% SDS
	125µl	1% APS
	10µl	TEMED
	10% Trenngel	5,6ml
2,8ml		Acrylamid (40%, 37,5 :1)
2,3ml		H ₂ O
224µl		10% SDS
280µl		1% APS
20µl		TEMED
6xSDS-Ladepuffer		300 mM
	12%	SDS
	0,6%	Bromphenolblau
	60%	Glycerin
	1mM	DTT

2. Material und Methoden

10xLaufpuffer	0,25M	Tris
bzw.	1,92M	Glycin
10xTransferpuffer	1%	SDS

Westernblot und Immunoblot

1xTransferpuffer	10%	10xTransferpuffer
	40%	Methanol
20xTBS	48,4g	Tris
	160g	NaCl
	ad 1l	H ₂ O
1xTBS-Tween	0,025%	Tween20 in 1xTBS

Gelretardationselektrophorese (EMSA)

10x TBE	121g	Tris
	62g	Borsäure
	7,4g	EDTA
	ad 1l	H ₂ O
6% Polyacrylamidgel	9ml	Acrylamid
	2,4ml	10x TBE
	48ml	dest. H ₂ O
	350µl	APS
	33µl	TEMED
3x Bindungspuffer	60mM	HEPES, pH = 7,9
	3mM	EDTA
	3mM	DTT
	150mM	KCl
	12%	Ficoll

Nukleinsäuremethoden

Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Proben werden mit dem 10x DNA-Farbmarker im Verhältnis 1:10 gemischt und in die Taschen des Agarosegels aufgetragen. Anschließend wird die Elektrophorese in einer Laufkammer, die mit 1x TAE-Puffer gefüllt ist, bei 150V gestartet. Die DNA-Banden können anschließend dank zugesetztem Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Ein ebenfalls aufgetragener Größenmarker dient zur Größenbestimmung der Banden.

Elution von DNA aus dem Agarosegel

Um ein DNA-Fragment, z.B. aus einer PCR, aufzureinigen kann man eine Agarosegel-Elektrophorese durchführen und das Fragment mit der gewünschten Länge aus dem Gel ausschneiden. Anschließend wird die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen nach dem Herstellerprotokoll aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR mit der Pfx-Polymerase

Zur mutationsfreien Vermehrung von DNA-Fragmenten wurde die Pfx-Polymerase (INVITROGEN) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Als Vorlage diente murine DNA aus Genotypisierungsanalysen. Die Primer hatten jeweils eine Länge von ca. 20bp und wurden so gewählt, dass sie den gewünschten DNA-Bereich einschlossen, mit mindestens zwei Nukleotiden „G“ oder „C“ endeten, um die Bindung an die DNA zu erhöhen, und eine Schmelztemperatur zwischen 60°C und 80°C hatten. Je nach Einsatzgebiet wiesen die Primer noch Überhänge mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme oder kürzere Überhänge für die DNA-Markierung auf. Zur Durchführung wurde der Thermocycler der Firma PeqLab benutzt.

Ein typischer Ansatz war:

400ng	DNA-Vorlage
2µl	Primer (Vorwärts- und Rückwärtsprimer)
5µl	10x PCR-Puffer
5µl	10x Enhancer-Solution

2. Material und Methoden

1µl	MgSO ₄
1,5µl	dNTP-Mix
1µl	Pfx-Polymerase
ad 50µl	Reinstwasser

Die Reaktionsbedingungen wurden am PCR-Gerät folgendermaßen eingestellt:

1x	2min	95°C
30x	30s	Annealingtemperatur
	60s	68°C
	15s	94°C
1x	30s	Annealingtemperatur
	8min	68°C

Die Annealingtemperatur wurde 5-10°C unterhalb der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur der Primer gewählt, die Extensionszeit im (im Beispiel 1min bei 68°C) wurde entsprechend der Länge des gewünschten DNA-Abschnitts so gewählt, dass für 1000bp 1min Extensionszeit gegeben wurde.

Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Es wurden unterschiedliche Restriktionsenzyme zum Verdau von DNA an definierten Stellen verwendet. Die Zusammensetzungen der Puffer und die Reaktionsbedingungen der Enzyme sind in den Angaben der entsprechenden Hersteller verzeichnet. Ein typischer Ansatz war:

8µl	DNA-Präparation
1µl	10x Puffer
5U	Restriktionsenzym
ad 10µl	Reinstwasser

Üblicherweise wurde ein Ansatz eine Stunde lang bei 37°C inkubiert.

Dephosphorylierung

Um Enden von DNA-Fragmenten zu dephosphorylieren wurde die shrimp-alkaline-phosphatase (SAP, ROCHE) verwendet. Dies war insbesondere nötig um die Enden von Vektoren, nachdem sie mit einem Restriktionsenzym aufgeschnitten worden waren, zu dephosphorylieren. Dies ermöglicht eine bessere Ligation mit dem gewünschten Insert und vermindert die Religation des Vektors ohne Insert.

Dafür wurden einem Restriktionsverdauansatz 1-2µl SAP zugegeben und für 10min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Inkubation bei 65°C für 5min inaktiviert.

Phosphorylierung

In manchen Fällen war es notwendig Oligonukleotide am 3'-Ende zu phosphorylieren, weil beispielsweise gelieferte Oligonukleotide nicht phosphoryliert waren, die für einen Ligationsansatz benötigt wurden. Dazu wurde die Polynukleotidkinase (FERMENTAS) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Der Reaktionsansatz bestand aus:

5µg	Oligonukleotid
2µl	rATP
2µl	10x Puffer
0,5µl	Polynukleotidkinase
ad 20µl	Reinstwasser

Der Ansatz wurde für 30min bei 37°C inkubiert.

Dieselbe Reaktion kann man auch für die radioaktive Markierung von Oligonukleotiden verwenden, wenn man statt rATP ^{32}P -markiertes γ -ATP einsetzt.

sticky-end-Ligation

DNA-Fragmente mit passenden Überhängen wurden mit der T4-Ligase ligiert, üblicherweise um amplifizierte DNA-Fragmente in einen Vektor zu klonieren. Dabei musste darauf geachtet werden, dass eines der DNA-Enden, die zusammenligiert wurden, dephosphoryliert war. Das amplifizierte Fragment wurde im Überschuss dazugegeben. Ein typischer Reaktionsansatz war:

2. Material und Methoden

1µl	10x Puffer
1µl	Vektor
7µl	Insert
1µl	Ligase

Der Reaktionsansatz wurde 2-12h lang im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in chemokompetente Bakterien transformiert.

Sequenzierung

Die klonierten Fragmente wurden nach der Sanger-Methode sequenziert, um ihre Orientierung im Plasmid und die korrekte Sequenz zu überprüfen.

Dazu wurde zuerst eine PCR mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs durchgeführt. Als Primer wurde einerseits ein Oligonukleotid verwendet, das im -Gen des pTATA-Vektors lag, andererseits wurde ein Oligonukleotid verwendet, das im proximalen Teil des klonierten Promotors lag. Die Polymerase, die markierten ddNTPs sowie der Reaktionspuffer waren Bestandteile des Sequenzierungsmixes (GENAXXON).

Der PCR-Ansatz war:

2µl	Primer (10pmol/µl)
2µl	zu sequenzierende DNA (300-600ng)
4µl	Sequenzierungsmix
ad 20µl	Reinstwasser

2. Material und Methoden

Das PCR-Programm war:

1x	96°C	2,5min
25x	52°C	20sec
	60°C	4min
	96°C	20min
1x	52°C	20sec
	60°C	10min

Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Centri Sep Spin Columns der Firma GENAXXON aufgereinigt und 1:5 mit Reinstwasser verdünnt zur Sequenzierung eingesetzt.

Annealing

Oligonukleotide wurden als Einzelstränge geliefert. Um komplementäre einzelsträngige DNA doppelsträngig zu machen wurde folgendes Protokoll benutzt:

5µg	des jeweiligen Oligonukleotids
100µl	2x Annealingpuffer
ad 200µl	Reinstwasser

Um die Sekundärstruktur der einzelnen Oligonukleotide aufzuschmelzen wurde der Ansatz für 10min im Heizblock auf 96°C erhitzt. Anschließend ließ man den Heizblock langsam über Nacht auf Raumtemperatur abkühlen.

radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden auf zweierlei Arten radioaktiv markiert. Entweder wurden sie nach Dephosphorylierung mit Hilfe der Polynukleotidkinase mit ³²P-markiertem γ-ATP markiert (siehe „Phosphorylierung“) oder man füllte DNA-Überhänge mit der Klenow-Polymerase und ³²P-markiertem α-dCTP (AMERSHAM, 1µl α-dCTP-Lösung hat ungefähr eine Aktivität von 1µCi).

Dafür benötigte man ein doppelsträngiges Oligonukleotid mit G-haltigen 5'-Überhängen, typischerweise hatte der Überhang die Sequenz GATC.

2. Material und Methoden

Der Reaktionsansatz für die Klenow-Polymerase (FERMENTAS) war wie folgt:

1µl	Template (annealte Oligonukleotide mit Überhang)
5µl	10x Klenow-Puffer
1,5µl	Mix aus dATP, dGTP und dTTP
5µl	³² P-dCTP
ad 50µl	Reinstwasser

Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das markierte Oligonukleotid über eine NucTrap Probe Purification Column der Firma STRATAGENE aufgereinigt, womit insbesondere nicht eingebaute markierte dCTPs entfernt wurden.

Ortsgerichtete Mutagenese

Um eine spezifische Mutation an einer definierten Stelle der Promotoren einzubringen wurde das Verfahren der ortsgereichten Mutagenese verwendet.

Dazu benötigt man Primer, die die gewünschte Mutation aufweisen und auf beiden Seiten ca. 10bp über diese hinausgehen. Mit diesen Primern und dem Plasmid, in das man die Mutation einbringen will, wird eine PCR mit der Pfu-Polymerase (STRATAGENE) durchgeführt, weil diese eine proof-reading-Aktivität hat.

Der PCR-Ansatz ist:

5µl	10x Puffer
200ng	Plasmid
200ng	Primer (jeweils forward und reverse)
1,5µl	dNTP-mix
1µl	Pfu-Polymerase
ad 50µl	Reinstwasser

Das PCR-Programm entspricht dem der Pfx (siehe oben). Die Annealingtemperatur wird auf 55°C eingestellt, die Extensionszeit wird nach folgender Formel berechnet:

$$t [\text{min}] = \text{Länge Plasmid [kb]} * 2 + 2$$

2. Material und Methoden

Anschließend wird die parentale, methylierte DNA mit DpnI verdaut, während die in vitro erzeugte, nicht methylierte DNA unverdaut bleibt. Hierfür gibt man 1µl DpnI dazu und inkubiert für eine Stunde bei 37°C.

Anschließend werden 10µl des unverdauten PCR-Produkts zur Transformation verwendet.

Transformation von chemokompetenten Bakterien

Plasmide wurden in chemokompetenten Bakterien vermehrt.

Dazu diente der *E. coli*-Stamm JM109.

Für die Vermehrung wurde das Plasmid (1-2µl Plasmidpräparation oder gesamter Ligationsansatz) mit 50µl der Bakterien für 30min auf Eis inkubiert und dann für 90s auf 42°C erhitzt. Nach Inkubation bei 37°C für eine Stunde in LB-Medium, wurden die Bakterien in entsprechende Selektionsmedien gegeben bzw. auf Selektionsagar ausplattiert.

DNA-Isolierung aus Bakterien

Plasmide kann man je nach Bedarf in unterschiedlichem Umfang und Reinheitsgrad aus transformierten Bakterien extrahieren. Das Miniprepverfahren dient zum Screening vieler Klone, um zu überprüfen, ob sie das gewünschte Plasmid aufgenommen haben. Das Midiprepverfahren dient zur Herstellung größerer Mengen des Plasmids für weitere Fragestellungen. Es wurden für die DNA-Isolierung aus Bakterien die Mini- und MidiPrep Kits der Firmen QUIAGEN und PROMEGA verwendet.

Alkalische Lyse von Bakterienzellen (Miniprep) ohne Säule

Zuerst werden Übernachtskulturen von Einzelkolonien gezüchtet. Dazu setzt man 3ml LB-Medium 40µg/ml Ampicillin zu und inokuliert eine Einzelkolonie. Die Bakterien werden über Nacht unter Schütteln (200rpm) bei 37°C inkubiert.

Anschließend überführt man 1-1,5ml in ein Mikroreaktionsgefäß und zentrifugiert bei 10000rpm für eine Minute. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellett wird in 100µl Puffer1 resuspendiert.

Darauf werden die Bakterien durch Zugabe von 100µl Puffer2 durch die darin enthaltene Natronlauge und SDS lysiert und die bakteriellen Proteine sowie die genomische DNA werden denaturiert. Plasmide, die „supercoiled“ vorliegen, werden durch die Verdichtung der DNA nicht denaturiert.

2. Material und Methoden

Nach einer Inkubation von 5min bei Raumtemperatur werden 100µl Puffer3 zugegeben und die Proteine und die genomische DNA werden ausgefällt und bei 13000rpm für 15min bei Raumtemperatur abzentrifugiert.

Der Überstand wird nun in ein neues Gefäß überführt und nach Zugabe von 1ml 100% Ethanol und 30µl 3M Natriumacetat (pH=5,2) wird für mindestens 20min bei -20°C inkubiert um die Plasmid-DNA auszufällen. Die ausgefallten Plasmide werden bei 13000rpm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wird das Pellet getrocknet und anschließend in 50µl Reinstwasser gelöst.

Alkalische Lyse von Bakterienzellen (Miniprep) mit Säule

Benötigt man nur eine kleine Menge reiner DNA, zum Beispiel für Sequenzierungen oder zur Probetransfektion, kann man das Qiagen Plasmid MiniPrep Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers verwenden.

alkalische Lyse von Bakterienzellen (Midiprep)

Um größere DNA-Mengen zu gewinnen, z.B. zur Transfektion eukaryotischer Zellen, kann man das Qiagen Plasmid MidiPrep Kit von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers verwenden. Dabei gewinnt man zwischen 200 und 600µg Plasmid-DNA.

Konzentrationsmessung von DNA und RNA

Die Konzentration einer wässrigen DNA-Lösung wird bei einer Wellenlänge von 260nm photometrisch bestimmt. Eine weitere Messung bei 280nm zeigt den Grad der Verunreinigung mit Protein an.

In einer Quarzküvette werden 2,5µl der DNA-Präparation mit destilliertem Wasser auf 500µl aufgefüllt und anschließend wird gegen eine Wasserprobe als Referenzwert die Extinktion (E) bestimmt. E = 1 entspricht 50µg/ml. Daraus ergibt sich für die DNA-Präparation eine Konzentration (c) von:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = E_{260\text{nm}} * 50 * 200 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

Klonierung der Promotorfragmente

Klonierung mit dem TOPO-Kloning-Kit

Die Promotorfragmente IKK1500 und IKK1000 wurden mithilfe des Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (INVITROGEN) vermehrt. Dieses nutzt die Topoisomerase I des Vacciniavirus zur blunt-end-Klonierung von PCR-amplifizierten Fragmenten.

Dafür wurden die Fragmente zuerst mit der Pfx-PCR amplifiziert, anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und die entsprechenden Banden aus dem Gel eluiert.

Anschließend wurde die Klonierungsreaktion angesetzt:

4µl	PCR-Produkt
1µl	salt-solution
1µl	TOPO-vektor

Diese wurde zwischen 5 und 30min bei Raumtemperatur inkubiert, und dann auf Eis gestellt. Anschließend wurden im Kit mitgelieferte Bakterien transformiert (Hitzeschock: 42°C, 30sec) und nach einer Stunde Vorkultur in 1ml mitgeliefertem SOC-Medium wurden unterschiedliche Volumina der Transformation auf Selektionsagarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden Minipreps hergestellt, und nach Verdau mit Bam HI wurde das gewünschte Insert in den pTATA-Leevektor umklont.

Direkte Klonierung

Die Fragmente IKK500/1, 500/2 und 500/3 wurden ohne vorherige TOPO-Klonierung direkt in die BamHI-Schnittstelle des pTATA-Vektors kloniert.

Partieller Verdau

Um das IKK200-Fragment zu generieren wurde das Konstrukt IKK500/3 für 60min mit SpeI verdaut, der linearisierte Vektor über ein Agarosegel aufgereinigt und anschließend für 5 bzw. 10min mit XbaI verdaut, weil das 500/3-Fragment eine XbaI-Schnittstelle 200 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt hat, und sich die SpeI- und XbaI-Schnittstellen sich wieder ligieren lassen. Um außerdem zu verhindern dass beide XbaI-Schnittstellen des Vektors verdaut werden, wurde die Inkubationszeit so kurz gewählt und nach anschließender Ligation wurden Bakterien mit dem neuen Plasmid transformiert und daraufhin nach solchen Klonen selektioniert, die die zweite Bam-H-Schnittstelle, die

2. Material und Methoden

zwischen der SpeI- und der XbaI-Schnittstelle lag, verloren haben. Ein weiterer Probeverlauf mit HindIII und BamHI lieferte weitere Hinweise auf richtig verdaute Klone, die anschließend sequenziert wurden.

Präparation von RNA aus Geweben

Die Präparation von RNA erfordert aufgrund des ubiquitären Vorkommens von RNasen besondere Vorsicht. Alle Plastikartikel sollten zumindest autoklaviert sein, alle Lösungen mit Wasser, das mit DEPC behandelt wurde, angesetzt sein und die Arbeitsfläche sollte mit 100% Ethanol oder im Handel erhältlichen Mitteln zur Zerstörung von RNasen abgewaschen sein. Außerdem sollte man bei allen Arbeitsschritten Einmalhandschuhe tragen.

Man gibt 50-100mg des zu untersuchenden Gewebes in ein Mikroreaktionsgefäß mit 1ml TRIzol (LIFE TECHNOLOGIES) und homogenisiert das Gewebe mit Hilfe eines Ultrathorax.

Nach Inkubation für 5min bei 30°C gibt man 200µl Chloroform/Isoamylalkohol dazu und schüttelt kräftig. Nach einer weiteren Inkubation von 3min bei 30°C zentrifugiert man für 15min bei 4°C und 13000rpm. Anschließend überführt man die wässrige Phase des Gemischs in ein frisches Mikroreaktionsgefäß, gibt 500µl Isopropanol zu und mischt gut. Durch Inkubation für 10min bei 30°C und Zentrifugation für 10min bei 4°C und 13000rpm erhält man ein RNA-Pellet. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 1ml 75% Ethanol/DEPC-H₂O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5min, 4°C, 10000rpm) wird der Überstand verworfen und das Pellet an der Luft für ca 10min getrocknet. Anschließend wird die RNA in 30µl DEPC-H₂O aufgenommen und für 10min auf 55°C erhitzt.

Die RNA kann dann bei -80°C gelagert werden.

Synthese von cDNA aus RNA

Das 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR der Firma ROCHE wurde für die cDNA-Synthese verwendet.

Auch hier war es nötig darauf zu achten die Arbeit nicht mit RNasen zu kontaminieren.

1µg der RNA-Präparation wurden für die Synthese eingesetzt. Als Primer diente der mitgelieferte Random-Primer.

2. Material und Methoden

Alle weiteren Reagentien und die einzelnen Reaktionsschritte wurden entsprechend den Herstellervorgaben eingesetzt und durchgeführt.

Proteinmethoden

Gesamtzellextrakte

Die Zellen werden geerntet und das Zellpellet wird ein Mal mit 1xPBS gewaschen und anschließend je nach Größe des Zellpellets mit 50-200µl TNT-Lysispuffer resuspendiert. Nach 1-2min auf Eis sind die Zellen lysiert und Membranreste können bei 4°C und 13000rpm für 15min abzentrifugiert werden. Die Zellextrakte werden bei –80°C aufbewahrt.

Organextrakte

Proteinextrakte von Mausorganen werden hergestellt, indem man das betreffende Organ oder Teile davon kurz in eiskaltem Waschpuffer schwenkt und anschließend in ein Mikroreaktionsgefäß mit 500-1000µl Homogenatpuffer gibt. In diesem wird das Organ dann mit Hilfe des Ultrathorax homogenisiert.

Danach zentrifugiert man für 15min bei 4°C mit 13000rpm und überführt den Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß. Die gewonnenen Extrakte werden bei –80°C gelagert.

Alle Arbeitsschritte sollten auf Eis, am besten in einem gekühlten Raum durchgeführt werden.

Cytoplasmatische und Nukleäre Extrakte

Für bestimmte Fragestellungen werden die nukleäre und die cytoplasmatische Proteinfraction getrennt voneinander isoliert.

Hierzu wird das Zellpellet zuerst in PBS gewaschen und anschließend in 100-300µl Puffer A⁺ resuspendiert und 15min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 5-15µl 1% NP-40 wird noch einmal für 2-3min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei platzen die Zellen auf. Kerne und Membranreste werden bei Raumtemperatur und 8000rpm für 2min abzentrifugiert. Der Überstand ist der cytoplasmatische Extrakt, der noch einmal bei 4°C und 13000rpm für 15min zentrifugiert wird. Dieser Überstand wird anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt.

2. Material und Methoden

Das Kernpellet wird in 200µl Puffer A⁺ gewaschen, abzentrifugiert und anschließend in 50µl Puffer C⁺ resuspendiert und bei 4°C für 45min geschüttelt. Anschließend werden Membranreste bei 4°C und 13000rpm abzentrifugiert und dann die Überstände in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bradfordassays bestimmt.

Dazu gibt man 2µl der Proteinpräparation in 1ml Bradford Reagenz (BIORAD, gebrauchsfertiges Reagenz, vor Gebrauch 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnen) gegeben und misst die Extinktion (E) bei 595nm gegen reines Bradford-Reagenz in Einmalküvetten. Über eine Eichgerade wurde festgestellt, dass eine Extinktion $E_{595nm} = 0,1$ einem Proteingehalt von 0,002µg/µl entspricht, d.h. bei der Verdünnung von 1:500 entspricht $E_{595nm} = 0,1$ einem Proteingehalt von 1µg/µl.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE nach Laemmli werden Proteine über ein zweischichtiges Prolyacrylamidgel in Gegenwart eines Detergenz und eines Reduktionsmittels entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt.

Die Gelkammern (VWR) werden gereinigt und nach Anleitung des Herstellers zusammengebaut, dann wird zuerst das Trenn- und anschließend das Sammelgel gegossen und nach Auspolymerisierung in der Elektrophoresekammer fixiert, deren Kammern mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt werden.

Bei den Proben werden gleiche Proteinmengen eingesetzt, eventuelle Volumenunterschiede werden mit dem entsprechenden Lysispuffer ausgeglichen, anschließend wird 6x SDS-Ladepuffer hinzugegeben, so dass er am Ende 1-2x konzentriert ist. Die Proben werden für 5min auf 95°C erhitzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Ein farbiger Größenmarker wird zur späteren Abschätzung des Molekulargewichts der durch Immunoblot nachgewiesenen Proteine mit aufgetragen. Eine Spannung von 150V wird angelegt und in der Regel wird die Elektrophorese so lange durchgeführt, bis das Bromphenolblau des Laufpuffers am unteren Rand des Gels austritt.

Westernblot und Immunoblot

Nach Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE werden die Proteine mittels Westernblot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu werden das Gel und die Membran in die mit 1x Transferpuffer gefüllte Nassblotkammer (VWR) eingebaut und bei einer Spannung von 80V wird für eine Stunde geblottet.

Anschließend wird die Membran kurz in 1xTBS-Tween geschwenkt und danach werden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran blockiert, indem man die Membran in 5% Magermilchpulver in TBS-Tween bei Raumtemperatur für eine Stunde schwenkt.

Die Detektion der Proteine erfolgt in der Regel mittels Immunoblot mit spezifischen Primärantikörpern gegen das gesuchte Protein und HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern gegen die Primärantikörper. Die Membran wird für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Primärantikörper geschwenkt, anschließend wird 30min lang mehrfach mit TBS-Tween gewaschen und der Sekundärantikörper für eine weitere Stunde zugegeben. Die Konzentration der Antikörper ist dem Datenblatt des Herstellers entnommen, der Primärantikörper ist üblicherweise in 5% Magermilchpulver in TBS-Tween angesetzt, der Sekundärantikörper nur in TBS-Tween. Nach erneutem gründlichem Waschen mit TBS-Tween wird ECL Western Blotting Substrate (PIERCE) dazugegeben und ein Röntgenfilm belichtet und entwickelt. Die HRP (horse reddish peroxidase) setzt das Westernblot-Substrat um und erzeugt dabei ein Lichtsignal. Die Belichtungszeiten bewegen sich je nach Antikörper und eingesetzter Proteinmenge zwischen 5sec und 1h.

Gelretardationselektrophorese (Electrophoretic Mobility Shift Assay; EMSA)

Mit dem EMSA werden Interaktionen von Proteinen mit spezifischen DNA-Motiven untersucht. Hierfür werden radioaktiv markierte Oligonukleotide mit der zu untersuchenden Sequenz benötigt (radioaktive Markierung: s.o.). Die Proteine binden an die DNA und verändern damit das Laufverhalten der Oligonukleotide im nativen PAA-Gel. Ein zugegebenes künstliches Oligonukleotid (poly dIdC) verhindert unspezifische DNA-Bindungen.

2. Material und Methoden

Ein typischer Reaktionsansatz für ein EMSA-Bindungsexperiment ist:

5µg	Protein
1-2µl	radioaktive DNA-Probe
0,5-1µl	poly dIdC
3,33µl	3x Bindungspuffer
ad 10µl	Puffer C ⁺

Nach 20min Inkubation auf Eis wird der Reaktionsansatz auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, an das zuvor bereits mindestens zwei Stunden lang eine Spannung von 150V gelegt worden war. Als Laufpuffer dient 0,4xTBE. Beim Auftragen der Proben auf das Gel trägt man in einer Spur 3µl DNA-Farbmarker auf und legt dann so lange 150V an, bis das Bromphenolblau des Farbmarkers 9cm weit gelaufen ist.

Dann überträgt man das Gel auf 2 Lagen Gel-Blotting-Papier und trocknet es im Vakuumtrockner bei 80°C für 1h. Anschließend belichtet man einen Röntgenfilm mit Hilfe von Verstärkerfolien bei -80°C für 15min bis 16h.

Zellkulturmethoden

Kultivierung von Zellen

adhärente Zellen

Alle adhärenen Zelllinien, die für diese Arbeit verwendet wurden, werden in D-MEM kultiviert, das mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Gewebezellen wurden in für Gewebekultur geeigneten Gefäßen kultiviert und bei Konfluenz der Zellen wurden diese passagiert. Beispielhaft ist dies hier für HeLa-Zellen in einer Schale mit 9cm Durchmesser dargestellt.

Das Medium wird komplett abgesaugt und die Zellen werden mit 5ml sterilem PBS vorsichtig gewaschen. Anschließend werden 2,5ml Trypsin-EDTA auf die Zellen gegeben und für 5min bei 37°C inkubiert. Dann werden 2,5ml Medium zugegeben und die Zellen sorgfältig suspendiert. 5-20% der Zellen werden auf eine neue Platte überführt und das Volumen auf 10ml mit Medium aufgefüllt.

Suspensionszellen

Von den verwendeten Suspensionszellen wurde die EL-4-Zelllinie in RPMI (10% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) und die Jurkat-Zelllinie in D-MEM (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,1% β -Mercapto-Ethanol) kultiviert. Die Zellzahl wurde jeden zweiten bis dritten Tag auf $1-2 \cdot 10^5$ /ml eingestellt.

Transfektion von Zellen

Transfektion mit Calciumphosphat

293-Zellen wurden nach der Calciumphosphatmethode transfiziert. Dazu wurden 5-10% einer Platte von 9cm Durchmesser mit konfluentem Zellrasen auf eine 24-Napf-Platte ausgesät (0,5ml/Napf). Am darauffolgenden Tag wurden für die Transfektion von zwei Näpfen 400ng des Luciferase-Reporters sowie 30ng Actin-Renilla als Kontrolle der Transfektionseffizienz gemischt. Falls noch weitere Plasmide in unterschiedlichen Konzentrationen cotransfiziert wurden, glich man die unterschiedlichen DNA-Mengen aus, indem man die jeweils fehlende Menge eines leeren Plasmids hinzugab. Anschließend wurden 45 μ l steriles Reinstwasser zugegeben sowie 5 μ l 2,5M CaCl₂. Nach sorgfältigem Mischen wurde für 5min bei Raumtemperatur inkubiert und auf Zugabe von 50 μ l 2xHeBS und erneutes Mischen folgten 5 weitere Minuten Inkubation bei Raumtemperatur. Jeweils 50 μ l wurden dann in einen Napf der 24-Napf-Platte getropft.

Transfektion mit Lipofectamin

Lipofectamin 2000 der Firma INVITROGEN wurde für die Transfektion von HeLa-Zellen verwendet. Hierfür wurden 20-25% einer 9cm-Platte mit konfluentem Zellrasen in antibiotikafreiem Medium in eine 24-Napf-Platte ausgesät. Die eingesetzten DNA-Mengen entsprachen denen der Calciumphosphattransfektion. Die DNA wurde in 100 μ l/2 Näpfe Medium verdünnt. Ebenso wurden für die Transfektion von 2 Näpfen 2 μ g Lipofectamin in 100 μ l Medium verdünnt. Das Lipofectamin-Medium-Gemisch wurde für 5min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit der DNA gemischt. Nach einer weiteren Inkubation von 20min bei Raumtemperatur wurden 100 μ l in jeden Napf gegeben.

Transfektion mittels Elektroporation

Suspensionszellen wurden mittels Elektroporation transfiziert.

2. Material und Methoden

Für einen Elektroporationsansatz verwendete man 5µg des zu untersuchenden Plasmids, bei Cotransfektionen entsprechend 5µg von jedem Plasmid und 500ng Actin-Renilla-Reporter. Pro Ansatz benötigte man $1 \cdot 10^7$ - $2 \cdot 10^7$ Zellen.

Die Zellen wurden abzentrifugiert und 5ml des alten Mediums wurden mit 4ml neuen Mediums in eine 9cm-Petrischale gegeben. Das Zellpellet wurde in 1ml frischem Medium resuspendiert und vorsichtig mit der DNA gemischt. Das Gemisch wurde anschließend möglichst ohne Schaumbildung in eine Elektroporationsküvette (BIORAD) überführt und die Zellen wurden bei 250mV und 975µF elektroporiert. Anschließend wurde die Küvette sofort auf Eis gestellt und die Zellen dann wieder in das bereitgestellte Medium überführt.

Luciferase assay

Mit dem Luciferase-Assay wird die Aktivität von Reporter genen bestimmt. Hierfür wurde das Dual Luciferase Assay-System der Firma PROMEGA verwendet. Voraussetzung für den Luciferase assay ist die Transfektion der Leuchtkäfer-Luciferase (Firefly) unter der Kontrolle eines entsprechenden Promotors und die Cotransfektion der Luciferase der Algenart *Renilla reniformis* unter der Kontrolle des Aktin-Promotors.

Die Zellen wurden mit 1xPBS gewaschen und anschließend in 100µl TNT lysiert. Bei adhärennten Zellen konnte dies direkt auf der Gewebekulturplatte geschehen. 10µl des Lysats wurden zu 30µl des Luciferase-assay-buffer II gegeben und die Lichtentwicklung im Lumat der Firma BERTOLD in relativen Lichteinheiten gemessen. Dann wurden 20µl Stop-and-Glow-Lösung zugegeben und erneut die Lichtentwicklung gemessen. Die Stop-and-Glow-Lösung unterbricht die Reaktion der Leuchtkäfer-Luciferase und startet die Reaktion der Renilla-Luciferase. Dafür muss die Lösung vor Gebrauch mit dem mitgelieferten Substrat im Verhältnis 50:1 gemischt werden.

Die Leuchtintensität der konstitutiv aktiven Renilla dient als Kontrolle der Transfektionseffizienz. Auf den kleinsten Renilla-Wert werden die Firefly-Werte eines Messansatzes a nach folgender Formel normiert:

$$\text{korrigierte Firefly (a)} = \text{Renilla (a)} / \text{kleinste Renilla} * \text{Firefly (a)}$$

Üblicherweise wurde anschließend die Aktivität nach folgender Formel als Vielfaches der Aktivität des Leervektors angegeben.

$$\text{relative Aktivität [RLU]} = \text{korrigierte Firefly (a)} / \text{korrigierte Firefly (Leervektor)}$$

2. Material und Methoden

Je nach Transfektionsart wurden entweder die Aktivitätswerte zweier getrennter Proben (a_1 und a_2) ermittelt (bei Calcimphosphat- und Lipofectamintransfektion) oder die Aktivität einer Probe doppelt bestimmt (Elektroporation). Anschließend wurde das arithmetische Mittel der beiden Werte berechnet, das Grundlage für die Diagramme war. Die Fehlerbalken zeigen die Werte der Einzelmessungen a_1 und a_2 an.

arithmetisches Mittel (MW):

$$MW(a_1, a_2) = (a_1 + a_2) / 2$$

3. Ergebnisse

Analyse der differentiellen Expression der Komponenten des IKK-Komplexes

In der Einleitung wurde bereits dargelegt, dass die Funktion des IKK-Komplexes von seiner stöchiometrischen Zusammensetzung beeinflusst wird und dass IKK α und IKK β unterschiedliche Funktionen bei der Aktivierung von NF κ B haben. Da Northernblot-Analysen gezeigt haben, dass sich die Expressionshöhe von IKK α und IKK β in verschiedenen Organen und Geweben unterscheidet, wurde die Expressionshöhe der einzelnen Bestandteile des IKK-Komplexes (IKK α , IKK β und NEMO) in unterschiedlichen Organen der Maus auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR (Abbildung 3) und auf Proteinebene mittels Immunoblot (Abbildung 4) untersucht, um Schlussfolgerungen über eine mögliche gewebsspezifische Zusammensetzung des IKK-Komplexes ziehen zu können.

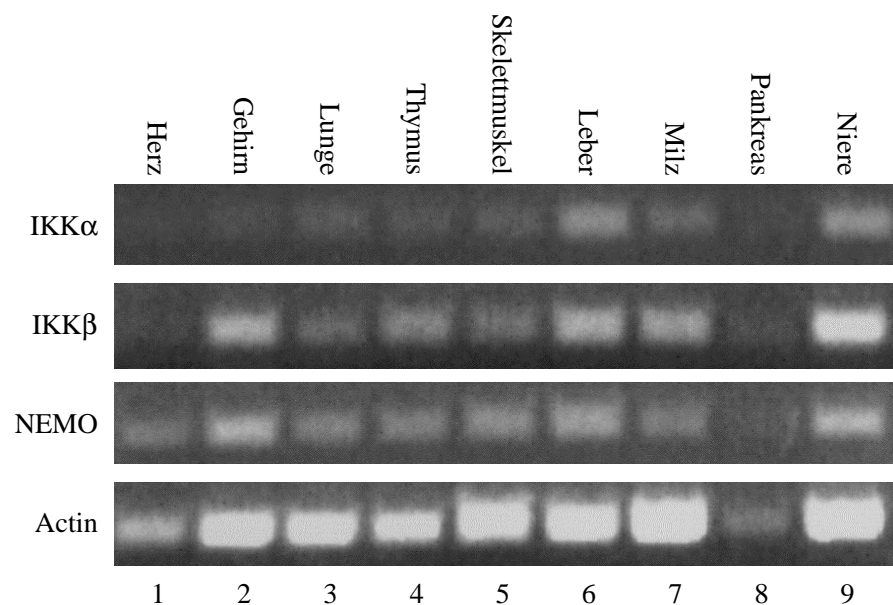


Abbildung 3: mRNA-Konzentration der Bestandteile des IKK-Komplexes in unterschiedlichen Organen der Maus: RT-PCR: IKK α , IKK β und NEMO in unterschiedlichen Mausorganen. Nach RNA-Isolation aus den Mausorganen, und cDNA-Synthese aus 1 μ g der gewonnenen Gesamt-RNA, wurde eine PCR mit der Taq-Polymerase und Primern, die spezifisch für IKK α , IKK β , NEMO und Aktin sind, durchgeführt. (RT-PCR = Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion, IKK α , - β = Inhibitor of κ β -Kinase α , - β , NEMO = Nuclear factor κ B Essential Modulator, RNA = Ribonukleinsäure, cDNA = copy-Desoxyribonukleinsäure) (Abbildung in Kooperation mit Frau Dr. Uta Marienfeld)

3. Ergebnisse

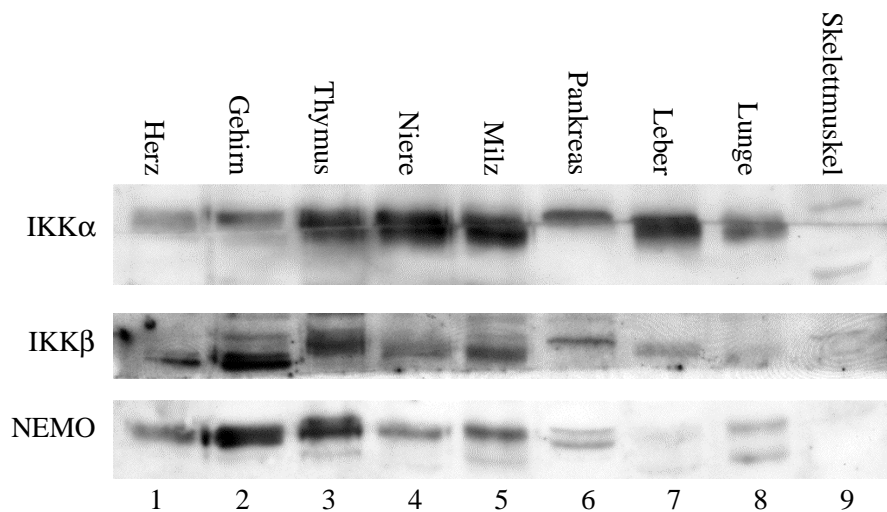


Abbildung 4: Proteinkonzentration der Bestandteile des IKK-Komplexes in unterschiedlichen Organen der Maus: Western Blot: IKK α , IKK β und NEMO in unterschiedlichen Mausorganen. 50 μ g Protein aus Organextrakten wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Der Nachweis erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen IKK α , IKK α/β (welcher mit einer Spezifität von 95% IKK β detektiert) und NEMO. (IKK α , - β = Inhibitor of κ β -Kinase α , - β , NEMO = Nuclear factor κ B Essential Modulator, SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyamidgelelektrophorese) (Abbildung in Kooperation mit Frau Dr. Uta Marienfeld)

Bei der semiquantitativen Analyse der RT-PCR fällt auf, dass NEMO in Leber und Gehirn recht stark exprimiert ist, in Niere, Milz und Lunge hingegen eher schwach. IKK α ist in Leber und Niere stark exprimiert. Ebenso IKK β , das darüberhinaus auch im Gehirn sowie in der Milz stärker exprimiert wird.

Durch die Western Blot-Analyse wird weiterhin deutlich, dass trotz relativ geringer mRNA-Konzentrationen IKK α in Lunge und Thymus relativ stark vorhanden ist, was eventuell auf Stabilisierung des Proteins nach der Translation hinweisen könnte.

IKK β hingegen ist in lymphatischen Organen wie Thymus und Milz sowie im Gehirn stärker exprimiert, während die Proteinkonzentration in der Niere eher schwach ist, verglichen mit der hohen m-RNA-Expression in diesem Organ. Bemerkenswert ist zusätzlich, dass es verschiedene Isoformen zu geben scheint, die sich in ihrem Molekulargewicht geringfügig unterscheiden.

NEMO ist vor allem im Gehirn, sowie in Thymus und Milz stark exprimiert. Auch hier lassen sich Unterschiede im Molekulargewicht erkennen. Die hohe Proteinkonzentration im Gehirn korreliert zudem gut mit dem Ergebnis der RT-PCR.

3. Ergebnisse

Insgesamt zeigt sich, dass die Konzentrationen von IKK α , IKK β und NEMO sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in unterschiedlichen Organen variieren. Ebenso korreliert die mRNA-Konzentration nicht zwingend mit der Proteinkonzentration, sodass man von weiteren Kontrollmechanismen ausgehen muss. Außerdem gibt die RT-PCR Hinweise darauf, dass sich die stöchiometrische Zusammensetzung der IKK-Komplexe in den einzelnen Organen unterscheiden könnte, oder aber, dass die einzelnen Bestandteile noch Funktionen außerhalb des IKK-Komplexes wahrnehmen.

Wegen der unterschiedlichen Expression in verschiedenen Organen lag die Vermutung nahe, dass sich die Konzentration von IKK β auch in verschiedenen Zelllinien unterscheidet. Darum wurde die Expression von IKK β und NEMO auf Proteinebene in mehreren Zelllinien unterschiedlicher Herkunft untersucht.

Besonders prominent zeigt sich der Unterschied zwischen humanen und murinen Zelllinien. In humanen Zelllinien (293, Namalwa, KMH2, Jurkat) ist die Expression von IKK β und NEMO wesentlich höher als in murinen Zellen (S107, XT, Ep-Ras) (Abbildung 5). Unterschiede zwischen Zelllinien einer Spezies sind kaum auszumachen.

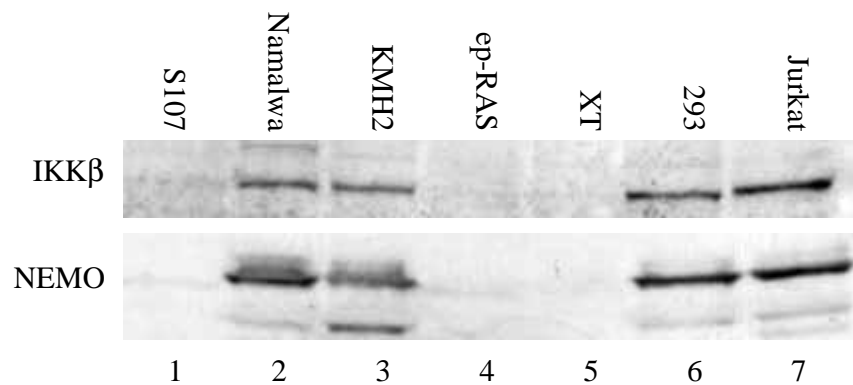


Abbildung 5: Proteinkonzentration von IKK β und NEMO in humanen (Spur 2, 3, 6 und 7) und murinen (Spur 1, 4 und 5) Zelllinien: Western Blot: Pro Spur wurden 30 μ g Protein aus Gesamtzellextrakten aufgetragen. Nach SDS-PAGE und Transfer erfolgte der Nachweis mit den Antikörpern IKK α/β und NEMO. (IKK α , - β = Inhibitor of κ B-Kinase α , - β , NEMO = Nuclear factor κ B Essential Modulator, SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyamidgelelektrophorese)

Generierung der IKK β -Promotorkonstrukte

Da sich in den einzelnen Organen und Zelllinien Unterschiede in der Expression von IKK β gezeigt hatten und weil IKK β im klassischen Aktivierungsweg von NF κ B eine wichtige Rolle spielt, wurde nach einem möglichen Promotor von IKK β gesucht um diese Unterschiede erklären zu können.

Um den putativen IKK β -Promotor zu finden wurde mit dem Programm TF-search im Sequenzbereich der 2000bp oberhalb des ersten Exons sowie im ersten Intron nach möglichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren gesucht. Im Bereich oberhalb des ersten Exons fanden sich deutlich mehr potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, zum Beispiel für Heat shock factor 1 und 2 (HSF1 und 2), die für die Antwort auf Hitzeschock und anderen zellulären Stress, aber auch für Entwicklungsprozesse von Bedeutung sind, für die Faktoren AML1a und USF sowie für die Transkriptionsfaktoren CREB und Ets. Interessanterweise fand sich kein Hinweis für eine TATA-box an typischer Position. Eine TATA-Box ist ein bei sehr vielen Genen vorkommender Sequenzabschnitt mit der Konsensussequenz TATAWAW (W = A oder T), der typischerweise ca. 25bp oberhalb des Transkriptionsstarts liegt. Allerdings ist eine TATA-Box keine zwingende Voraussetzung für einen Promotor, da bereits mehrere funktionierende TATA-lose Promotoren beschrieben wurden, wie zum Beispiel der TRAIL-R2-Promotor oder der Promotor des α IIb-Gens.

Das erste Intron, welches eine Länge von 359bp hat, wies nur drei wahrscheinliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren auf. Auffällig war in beiden Sequenzbereichen, dass sich mögliche Bindungsstellen auf kurze Sequenzabschnitte zu konzentrieren schienen, zwischen denen große Abschnitte mit nur wenigen möglichen Bindungsstellen lagen.

Der Bereich oberhalb des ersten Exons wurde wegen der höheren Zahl an möglichen Bindungsstellen als möglicher Promotor näher untersucht.

Abschnitte unterschiedlicher Länge aus dem Bereich vor dem ersten Exon des murinen *IKK β* -Gens wurden mit PCR amplifiziert. Als Template diente chromosomale murine DNA, die aus Mausschwänzen isoliert wurde. Die PCR-Produkte wurden nach Verdau mit BamHI vor die TATA-Box und die Luciferase in den pTATA-Vektor kloniert (Abbildung 6) und die entstandenen Reporterkonstrukte wurden durch Analyse mit Restriktionsendonukleasen und Sequenzierung auf die richtige Sequenz und ihre Orientierung im Vektor überprüft.

3. Ergebnisse

Die Konstrukte umfassen maximal ca. 1500bp und minimal ca. 200bp. Der reverse Primer für alle Konstrukte, die den Bereich unmittelbar vor dem Transkriptionsstart mit einschließen, liegt im ersten Exon an Position +6 bis +26.

Abbildung 6 zeigt die Länge der Konstrukte und ihre Position in der ursprünglichen Sequenz.

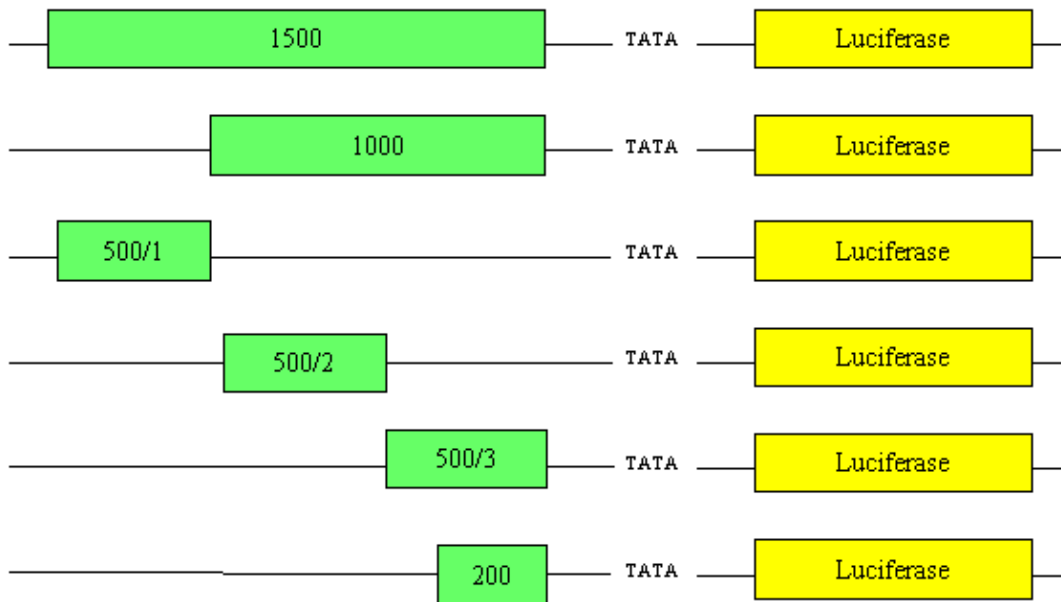


Abbildung 6: Reporterkonstrukte; die Zahlen bezeichnen die ungefähre Länge in Basenpaaren, die Position ihre Position in der ursprünglichen Sequenz. Alle Stücke wurden unmittelbar vor die TATA-Box in den pTATA-Vektor kloniert (T = Thymin, A = Adenosin).

Analyse der Promotoraktivität des murinen IKK β -Promotors

Humane embryonale Nierenzellen (293-Zellen) wurden mit den IKK β -Promotorkonstrukten transient transfiziert und durch Messung der Luciferase-Aktivität wurde die basale Aktivität der Konstrukte bestimmt. Durch Cotransfektion einer Renilla-Luciferase unter der Kontrolle des Aktin-Promotors konnten eventuelle Unterschiede der Transfektionseffizienz normalisiert werden. Die Aktivität wurde jeweils als Induktion im Vergleich zum Leervektor berechnet.

3. Ergebnisse

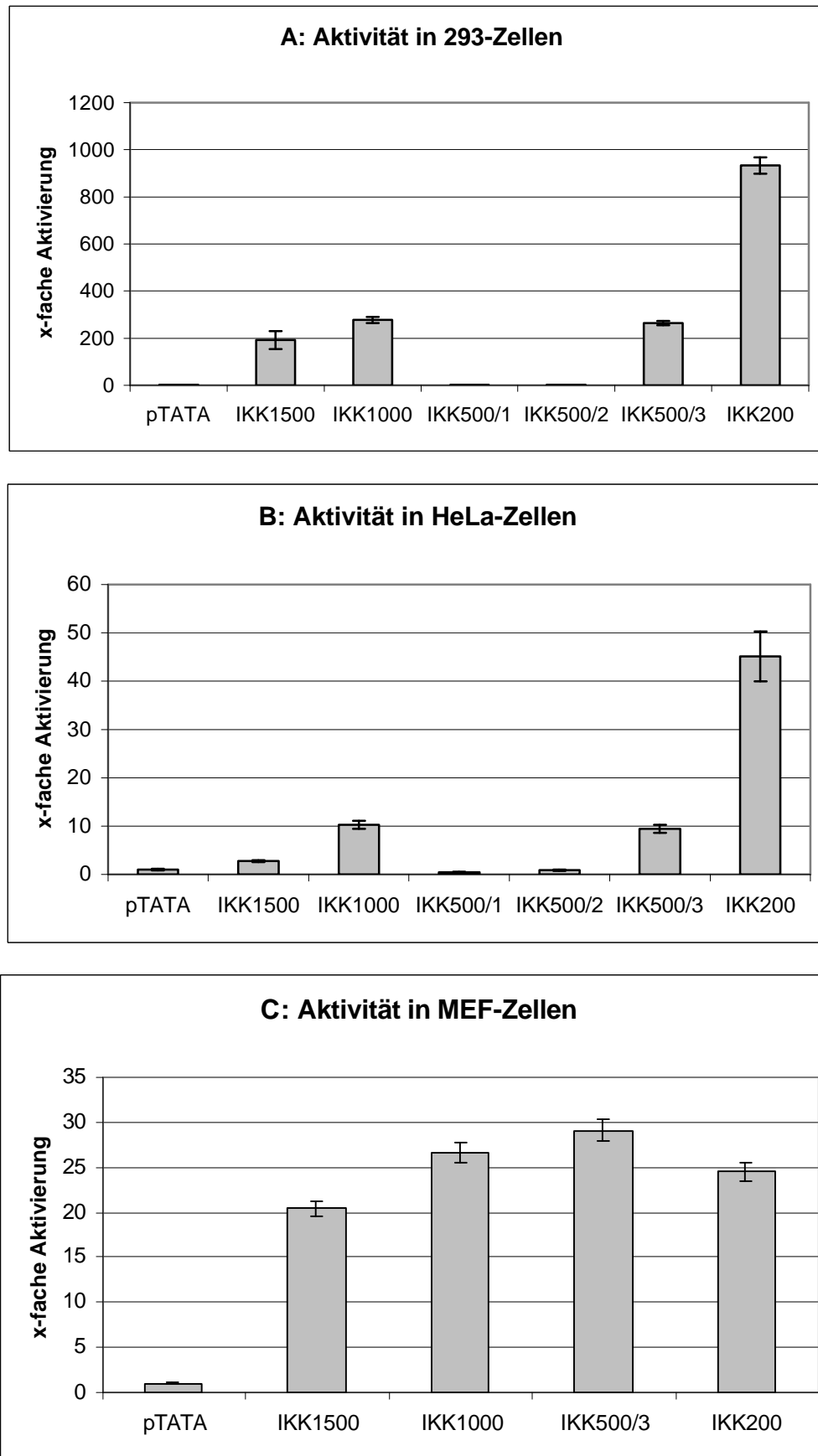


Abbildung 7 A, B und C: Basale Aktivität der Reporterkonstrukte in 293- und MEF-Zellen: Luciferaseassay: Transiente Transfektion des Leervektors pTATA und der Promotorkonstrukte IKK1500,

3. Ergebnisse

IKK100, IKK500/1, IKK500/2, IKK500/3, IKK200 (je 200ng) in 293- (A), HeLa (B) und MEF-Zellen (C). Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Es ist die relative Luciferaseaktivität der Konstrukte als Vielfaches des Leervektors gezeigt. Angegeben ist der Mittelwert zweier Proben (HEK-293, HeLa) oder zweier Messungen aus einer Probe (MEF).

Das Konstrukt mit 200bp Länge zeigte bei weitem die höchste Aktivität, während die Reporterkonstrukte, welche die Bereiche von -1500 bis -1000 sowie -1000 bis -500 abdeckten, praktisch keine Aktivität zeigten. Die 500bp unmittelbar vor dem ersten Exon zeigten eine deutliche Aktivität, die allerdings geringer war als in dem Konstrukt, das nur 200 bp enthielt (Abbildung 7A).

Ein ähnliches Bild, wenn auch mit einer weniger starken Aktivität der *IKKb*-Promotorkonstrukte zeigte sich bei derselben Transfektion von HeLa-Zellen (Abbildung 7B).

Auch in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF-Zellen) wurde sich eine hohe basale Aktivität der *IKKβ*-Promotorkonstrukte nach transienter Transfektion gemessen. Allerdings war diese geringer als in 293-Zellen. Außerdem war der Unterschied in MEF-Zellen zwischen den einzelnen Konstrukten weniger ausgeprägt und das Konstrukt IKK200 zeigte eine geringfügig schwächere Aktivierung als längere Konstrukte (Abbildung 7C).

Identifizierung möglicher Bindungsstellen durch Vergleich mit dem humanen IKKb-Promotor

Aufgrund der hohen Aktivität des Konstrukts, das die 200bp vor dem ersten Exon umfasst, wurde dieser Bereich von 200bp vor dem Transkriptionsstart als eigentlicher Promotor definiert und näher untersucht.

Um noch einen weiteren Hinweis auf konservierte Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zu bekommen wurde der Abschnitt mit der homologen Sequenz im humanen *IKKb* verglichen. Besonders interessant schien demnach ein Abschnitt von nur wenigen Basenpaaren Länge direkt vor dem ersten Exon zu sein, der eng mit dem Kernpromotor des *IKKβ*-Gens übereinstimmt (Abbildung 8).

3. Ergebnisse

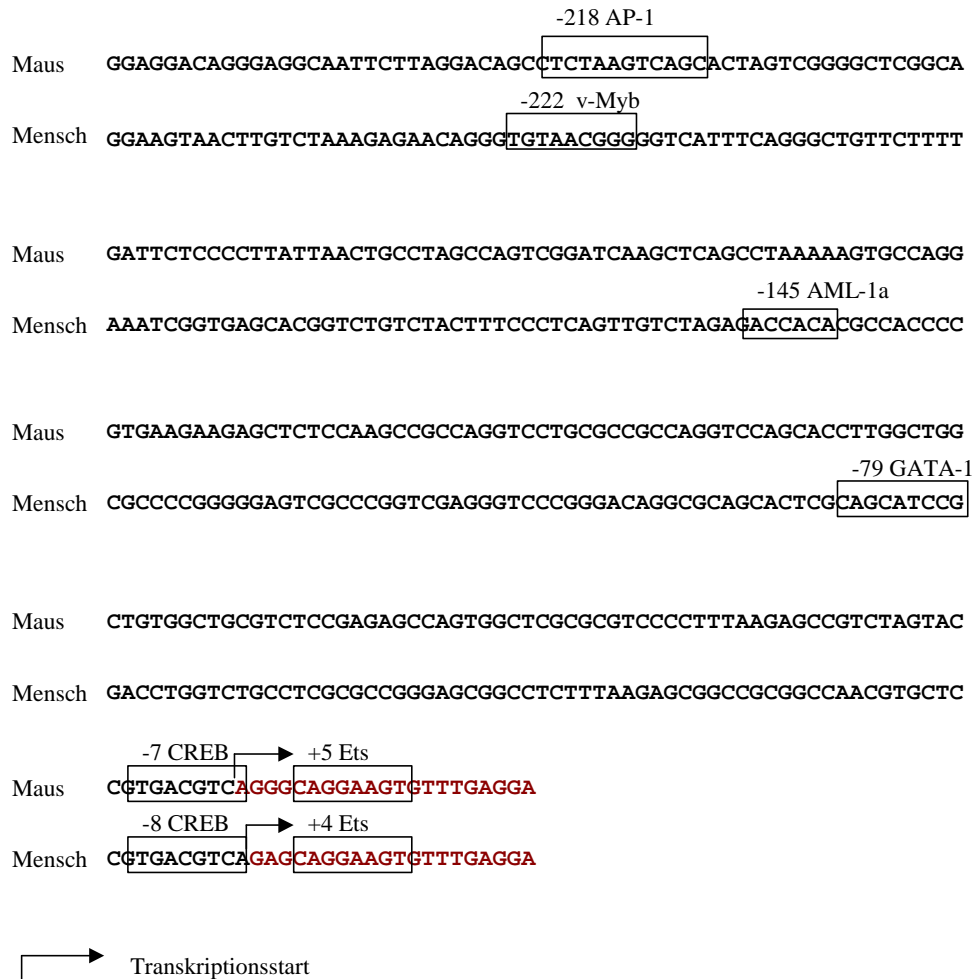


Abbildung 8: Mögliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen im core-Promotor des murinen *IKKb*-Gens: Darstellung der möglichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im Bereich von ca. 200bp vor dem Transkriptionsstart des *IKKb*-Gens bei Maus und Mensch. In **dunkelrot** ist der Transkriptionsstart angezeigt. Die Nummern geben die Position relativ zum Transkriptionsstart an.

Vor allem die beiden Bindungsstellen für CREB und Ets-1 unmittelbar vor dem Transkriptionsstart fielen durch eine hohe Homologie zwischen Mensch und Maus in Sequenz und Position auf. Außerdem fanden sich auch bei beiden Spezies mehrere mögliche Bindungsstellen für HSF1 weiter distal (Tabelle 1).

3. Ergebnisse

Tabelle 1: Position der mit TFsearch ermittelten möglichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Der Score von TFsearch gibt lediglich eine ungefähre Wahrscheinlichkeit an, spiegelt aber nicht die exakte statistische Signifikanz wieder. Die Position bezieht sich auf den Transkriptionsstart (+1 bedeutet erstes transkribiertes Basenpaar, -1 letztes nicht transkribiertes Basenpaar). * zeigt eine vom Transkriptionsstart abgewandte Orientierung der möglichen Bindungsstelle an. (Ets = v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog, CREB = cyclic adenosinemonophosphate responsive element binding protein, AP-1 = activating protein 1, CdxA = caudal type homeobox transcription factor 1, Pbx-1 = pre B-cell leukaemia transcription factor 1, GATA-1 = GATA binding protein-1 (G = Glutamin, T = Thymin), SRY = sex determining region on chromosome Y, YY1 = YY transcription factor 1, SP1 = SP transcription factor 1, AML-1a = acute myeloid leukaemia 1a, v-Myb = myeloblastosis viral oncogene homolog, deltaE = transcription factor 8, NFκB = nuclear factor κB, CDP = CCAAT displacement protein (C = Cytosin, A = Adenosin, T = Thymin))

murin			human		
Transkriptionsfaktor	TFsearch-Score	Position zum Transkriptionsstart	Transkriptionsfaktor	TFsearch-Score	Position zum Transkriptionsstart
Ets	91,2	+5bp bis +12bp	Ets	91,2	+4bp bis +11bp
CREB	100	+1bp bis -7bp	CREB	100	-1bp bis -8bp
AP-1	94,8*	-208bp bis -218bp	GATA-1	90,2*	-70bp bis -79bp
CdxA	92,1	-277bp bis -283bp	AML-1a	100	-140bp bis -145bp
Pbx-1	90,2*	-288bp bis -295bp	v-Myb	92,0	-214bp bis -222bp
GATA-1	90,2	-294bp bis -303bp	deltaE	91,1*	-247bp bis -257bp
GATA-1	94,7	-327bp bis -336bp	SP1	91,8	-291bp bis -300
GATA-2	92,1	-327bp bis -336bp	NFκB	93,8	-319bp bis -328bp
SRY	100	-376bp bis -382bp	NFκB	96,0*	-318bp bis -327bp
YY1	92,1	-397bp bis -419bp	CDP CR	93,2	-435bp bis -444bp
CdxA	96,2	-426bp bis -432bp	Pbx-1	90,2*	-438bp bis -446bp
CdxA	94,3*	-435bp bis -441bp	SRY	90,9	-485bp bis -491bp
SP1	90,4	-455bp bis -464bp			

Analyse des CREB-Motivs im murinen IKK β -Promotor

Da das Promotorkonstrukt, das die 200bp vor dem Transkriptionsstart umspannt, vor allem in 293-Zellen eine erstaunlich hohe Aktivität gezeigt hatte und sich in diesem Bereich auch

3. Ergebnisse

im Vergleich zwischen dem humanen und murinen IKK β -Promotor vielversprechende Transkriptionsfaktorbindungsstellen gezeigt hatten, wurde zunächst das CREB-Motiv, das 19bp oberhalb des Transkriptionsstarts liegt, näher untersucht.

Um die Funktionalität der CREB-Bindungsstelle im murinen IKK β -Promotor zu überprüfen, wurden Gelretardationsstudien durchgeführt. Dazu wurden ^{32}P -markierte Oligonukleotide verwendet, die der Sequenz des murinen IKK β -Promotors entsprechen und die CREB-Bindungsstelle aufweisen. Ebenso wurden Oligonukleotide verwendet, die statt der Wildtypsequenz TGACGTCA (wtCREB) die Mutation TGTGGTCA (mutCREB) tragen.

Es zeigten sich Komplexe unterschiedlicher Größe von nukleären Proteinen und den markierten Oligonukleotiden. Die beiden größten Komplexe waren in allen sechs getesteten Zelllinien vorhanden. Interessanterweise waren die Unterschiede im Bandenmuster nicht speziesspezifisch. Murine MEF-Zellen und humane HeLa- und 293-Zellen weisen sehr ähnliche Muster auf. Auch die Größen der Komplexe aus murinen Thymozyten (EL-4) und humanen T-Zell-Lymphom-Zellen (Jurkat) sind sich ähnlich. Im Gegensatz dazu scheint es jedoch zelltypspezifische Unterschiede in der Bindeaktivität an das CREB-Motiv zu geben. Außerdem war in lymphatischen Zelllinien der B- und T-Zell-Reihe (5532 ist eine murine B-Zell-Lymphom-Zelllinie) der kleinste der vier Protein-Nukleotidkomplexe kaum nachweisbar (Abbildung 9).

Um zu zeigen, dass die oben beschriebene Bildung der Protein-Nukleotidkomplexe von der intakten Sequenz des CREB-Motivs abhängig ist, wurde auch ein markiertes Oligonukleotid mit mutierter CREB-Sequenz (TGTGGTCA statt TGACGTCA) verwendet. Die Bindung nukleärer Extrakte verschiedener Zelllinien an die mutierten Oligonukleotide war deutlich reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Von diesem Verlust an Bindungsfähigkeit war der kleinste der vier beobachteten Komplexe am wenigsten betroffen, so dass dieser eher als unspezifisch zu werten ist (Abbildung 9).

Um die Spezifität der beobachteten Banden weiter zu klären wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Dazu wurden zusätzlich zum markierten wtCREB-Oligonukleotid unmarkierte Oligonukleotide (wtCREB, mutCREB oder AP-1) in ansteigenden Konzentrationen hinzugegeben. Das unmarkierte wtCREB-Oligonukleotid war bereits bei einer Konzentration von $0,005\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in der Lage das markierte wtCREB-Oligonukleotid aus seiner Bindung mit den nukleären Proteinen zu verdrängen, was sich in einer schwächer ausgeprägten Bande zeigt (Abbildung 10, Spuren 2-4). Bei Zugabe des unmarkierten mutCREB-Oligonukleotid hingegen, war auch noch in einer zehnfach

3. Ergebnisse

höheren Konzentration von $0,05\mu\text{g}/\mu\text{l}$ keine Veränderung der Interaktion des markierten wtCREB-Oligonukleotids mit nukleären Proteinen zu beobachten (Abbildung 10, Spuren 5-7). Das unmarkierte AP-1-Oligonukleotid wiederum war zwar in der Lage das markierte wtCREB-Oligonukleotid aus seiner Bindung mit nukleären Proteinen zu verdrängen, allerdings erst bei einer höheren Konzentration von $0,05\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und in geringerem Ausmaß als das unmarkierte wtCREB-Oligonukleotid (Abbildung 10, Spuren 8-10), obwohl AP-1 ebenso wie CREB zur Klasse der basic Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren gehört und somit eine stärkere Interaktion mit putativen CREB-Komplexen zu erwarten gewesen wäre.

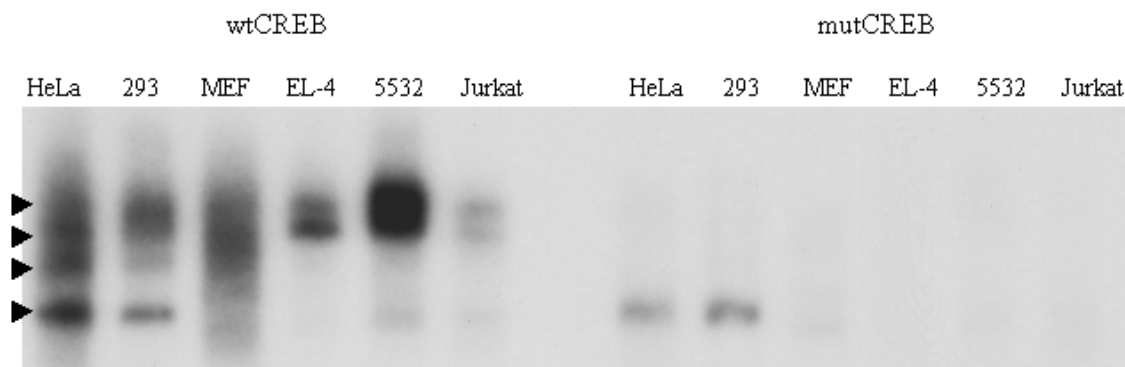


Abbildung 9: mutCREB weist eine geringere Interaktion mit nukleären Proteinen unterschiedlicher Zelllinien auf: Gelretardationselektrophorese mit ^{32}P -markierten Oligonukleotiden, die der Sequenz des Promotors entsprechen (wtCREB) bzw. eine Mutation der CREB-Bindungssequenz aufweisen (mutCREB), und nukleären Extrakten unterschiedlicher Zelllinien. Es wurden jeweils $5\mu\text{g}$ Protein pro Spur aufgetragen. Die spezifischen Komplexe sind mit ▶ gekennzeichnet. (CREB = cAMP responsive element binding protein, wt = wildtyp, mut = mutiert, P = Phosphor)

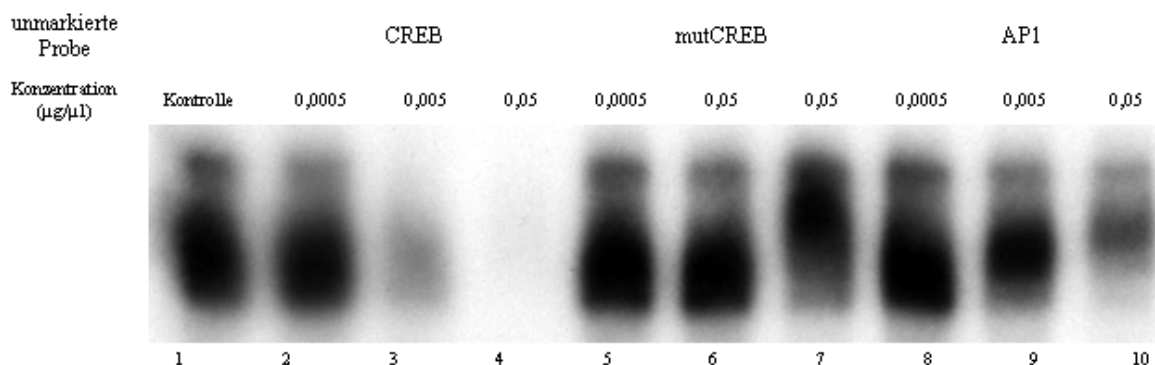


Abbildung 10: unmarkiertes mutCREB kann im Gegensatz zu unmarkiertem wtCREB die Interaktion von markiertem wtCREB mit nukleären Proteinen kaum kompetieren: Gelretardationselektrophorese mit ^{32}P -markiertem wtCREB, unterschiedlichen unmarkierten Proben (wtCREB, mutCREB, AP1) in den

3. Ergebnisse

angegebenen Konzentrationen und nukleären Extrakten von EL-4-Zellen (5µg Protein). (CREB = cAMP responsive element binding protein, wt = wildtyp, mut = mutiert, AP-1 = activating-protein-1, P = Phosphor)

Um die Funktion der CREB-Bindungsstelle in vivo zu testen wurde im Reporterkonstrukt IKK200 durch in-vitro-Mutagenese die oben beschriebene Mutation eingeführt. Das entstandene Konstrukt mutCREB wurde in EL-4- und Jurkat-Zellen transfiziert. Das parentale Konstrukt sowie der leere Vektor dienten als Kontrolle. In beiden Zelllinien konnte eine drastische Reduktion der basalen Aktivität des IKK200-Promotorkonstrukts durch die Mutation des CREB-Motivs beobachtet werden. Allerdings war die Aktivierung durch das ursprüngliche Konstrukt in den beiden Zelllinien sehr unterschiedlich.

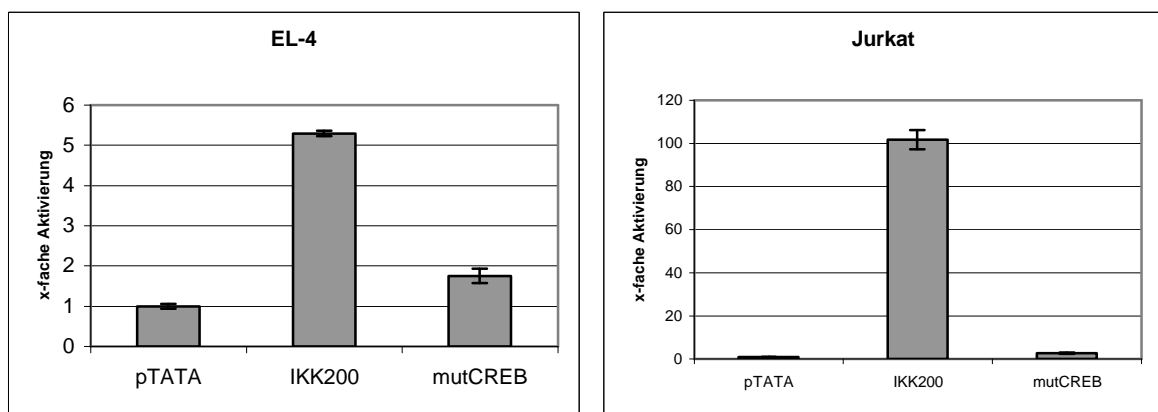


Abbildung 11: mutCREB weist eine geringere basale Promotoraktivität auf als das parentale Konstrukt: Luciferase assay: Transfektion von je 200ng Leervektor, IKK200 oder IKK200 mit einer Mutation der CREB-Bindungsstelle in EL-4 und Jurkat-Zellen mittels Elektroporation. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität als ein Vielfaches des Leervektors. Angegeben ist der Mittelwert zweier Messungen derselben Probe. (CREB = cyclic adenosinemonophosphate responsive element binding protein, mut = mutiert)

Analyse des Ets-Motivs im murinen IKK β -Promotor

Analog zur CREB-Bindungsstelle wurde bei einer weiteren möglichen Bindungsstelle für den Faktor Ets vorgegangen. Auch hier zeigte die wt-Probe mit der Kernsequenz CAGGAAGT eine stärkere Bindung mit Proteinen der nukleären Extrakte aus MEF- und EL-4-Zellen als die mutierte Probe mit der Kernsequenz CAAGAAGT (Abbildung 12).

Im Gegensatz zu der CREB-Bindungsstelle sieht man allerdings keinen deutlichen Unterschied mehr zwischen der mesenchymalen MEF-Zelllinie und der lymphatischen EL-

3. Ergebnisse

4-Zelllinie. Vergleichbar mit den Ergebnissen der Analyse des CREB-Motivs ist auch beim Ets-Motiv die am weitesten gewanderte Bande die am wenigsten spezifische.

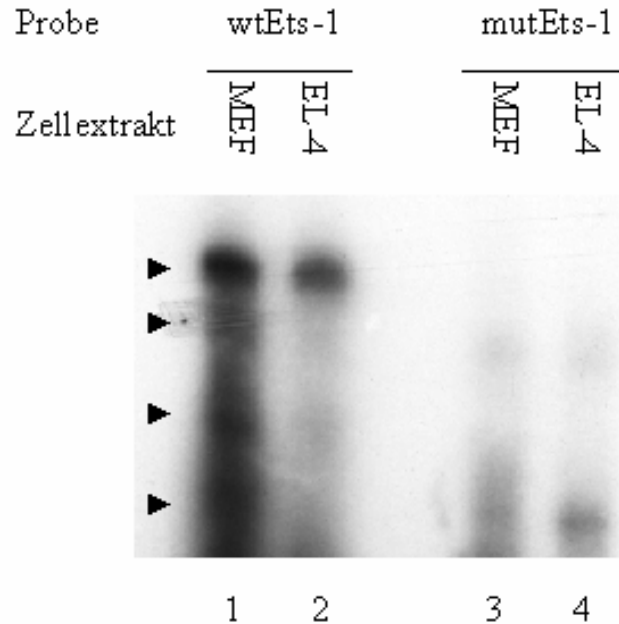


Abbildung 12: mutEts-1 interagiert geringer mit nukleären Proteinen als wtEts-1: Gelretardationselektrophorese mit 32 P-markierten Oligonukleotiden aus der Sequenz des Promotors bzw. einer Mutation in der Ets-1-Bindungsstelle und nukleären Extrakten (10 μ g Protein) von MEF- und EL-4-Zellen. Die Komplexe sind mit \blacktriangleright gekennzeichnet. (mut = mutiert, ETS-1 = v-ets-erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1, wt = wildtyp)

Ebenso war die Aktivität des Promotors in Luciferase-Reporter-assays in EL-4-Zellen im Vergleich zum unmutierten Konstrukt reduziert, wenn auch nur ungefähr um die Hälfte, im Gegensatz zur Reduktion der Aktivität nach Mutation des CREB-Motivs um mindestens 80%.

3. Ergebnisse

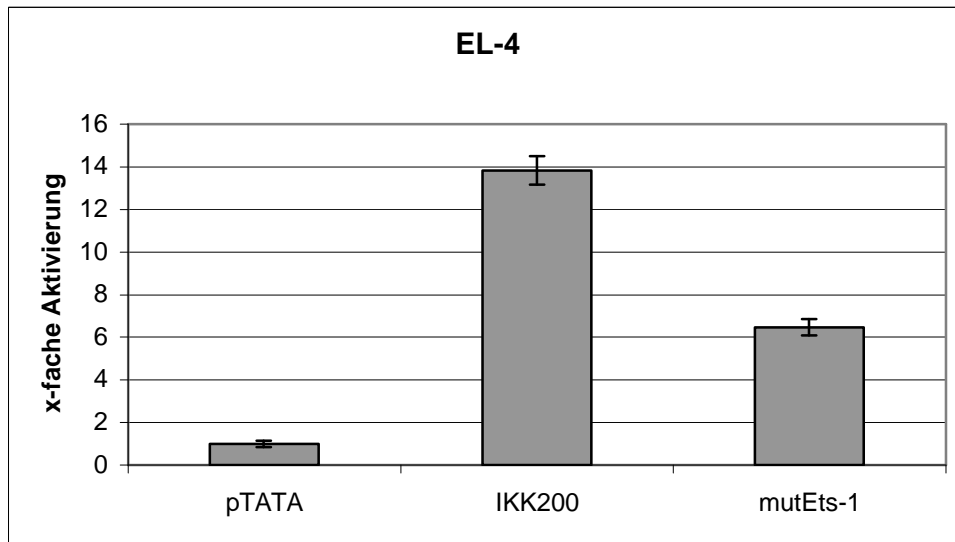


Abbildung 13: mutEts-1 hat eine geringere basale Promotoraktivität als das parentale Konstrukt: Luciferaseassay: transiente Transfektion von je 200ng Leervektor, IKK200 und IKK200 mit einer Mutation der Ets-1-Bindungsstelle in EL-4-Zellen mittels Elektroporation. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen. Die Luciferaseaktivität ist als Vielfaches des Leervektors dargestellt. Angegeben ist der Mittelwert aus zwei Messungen derselben Probe. (mut = mutiert, Ets = v-ets-erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1, IKK = inhibitor of κ B kinase)

Humaner IKK β -Promotor

Da die Konzentration von IKK β in humanen und murinen Zellen unterschiedlich ist und da sich die Promotoren auch in ihrer Sequenz unterscheiden, wurde die Aktivität des murinen Reporterkonstrukts mit einem Reporterkonstrukt des humanen IKK β -Promotors verglichen.

Reporterkonstrukte vergleichbarer Länge und Lokalisation wurden in Jurkat-Zellen transfiziert und die Luciferaseaktivität nach ca. 24h gemessen. Überraschenderweise unterscheidet sich die Luciferaseaktivität des murinen und humanen Konstrukts nicht (Abbildung 14).

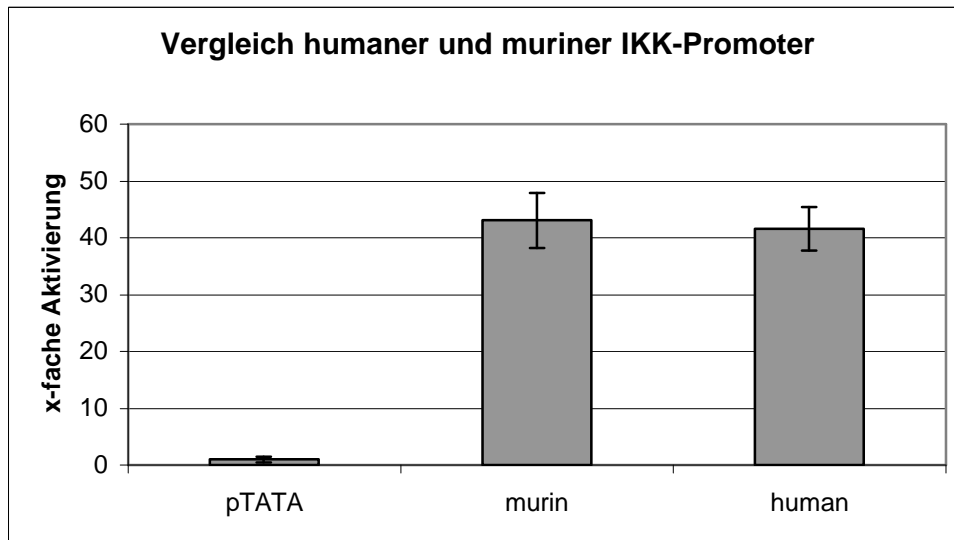


Abbildung 14: Die basale Aktivität des humanen und des murinen IKK β -Promotors unterscheidet sich nicht: Luciferaseassay: Luciferaseaktivität in Jurkat-Zellen, die mit 200ng des Kontrollvektors (pTATA) bzw. des murinen und humanen IKK β -Promoterkonstrukts transfiziert wurden. (IKK β = inhibitor of κ B kinase β) (Abbildung in Kooperation mit Frau Dr. Uta Marienfeld)

Stimulierbarkeit der Expression von IKK β

Die Stimulierbarkeit der Expression von IKK β über diese möglichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, sowie über andere Mechanismen wurde abschließend untersucht.

Zuerst wurde TNF α , ein Cytokin, das den klassischen Signalweg von NF κ B aktiviert, in humanen Jurkat- und in murinen EL-4-Zellen bei einer Konzentration von 40ng/ml getestet. Da TNF α die Aktivität von NF κ B erhöht und der humane IKK β -Promotor Bindungsstellen für NF κ B aufweist (Tabelle 1), wurde vermutet, dass die Zugabe von TNF α zu humanen Zellen im Gegensatz zu murinen Zellen die IKK β -Proteinkonzentration erhöhen könnte. In Jurkat-Zellen ist nach 8h ein leichter Anstieg der IKK β -Konzentration zu sehen (Abbildung 15), in EL-4 konnte IKK β nicht nachzuweisen werden, wahrscheinlich wegen der geringeren Expression von IKK β in murinen Zellen.

Ein ebenso klassischer NF κ B-Aktivator wie TNF α , die Kombination aus dem Phorbolster PMA und Ionomycin (50ng/ml und 500ng/ml), brachte keinen eindeutigen Hinweis auf die Induzierbarkeit von IKK β in Jurkat-Zellen (Abbildung 15).

3. Ergebnisse

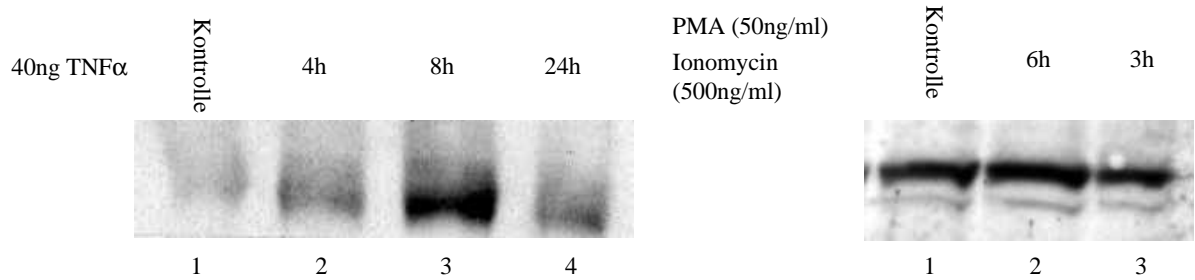


Abbildung 15: Stimulierbarkeit der Expression von IKKb: Western Blot: Stimulation von Jurkat-Zellen mit 40ng/ml TNF α für 4h, 8h, und 24h und 50ng/ml PMA + 500ng/ml Ionomycin für 3h und 6h. Es wurden jeweils 50 μ g Protein aus Gesamtzellextrakten aufgetragen. Der Nachweis erfolgte mit dem IKK α/β -Antikörper. (TNF α = tumor necrosis factor α , PMA = Phorbolmyristatacetat, IKK α/β = inhibitor of κ B α/β)

Wegen des CREB-Motivs in den Promotoren beider Spezies wurde Forskolin als Stimulans versucht (Abbildung 16). Forskolin aktiviert die Adenylatzyklase und erhöht somit die cAMP-Konzentration in der Zelle, sodass bestimmte Mitglieder der cAMP-responsive-element-binding-protein (CREB)-Familie aktiviert werden.

Allenfalls zeigt sich bei einer Konzentration von 5 μ mol/l ein leichter Anstieg von IKK β nach 2 Stunden Stimulationszeit. Auch ein Versuch der Kombination von PMA, Ionomycin und Forskolin brachte keinen Erfolg (Daten nicht gezeigt).

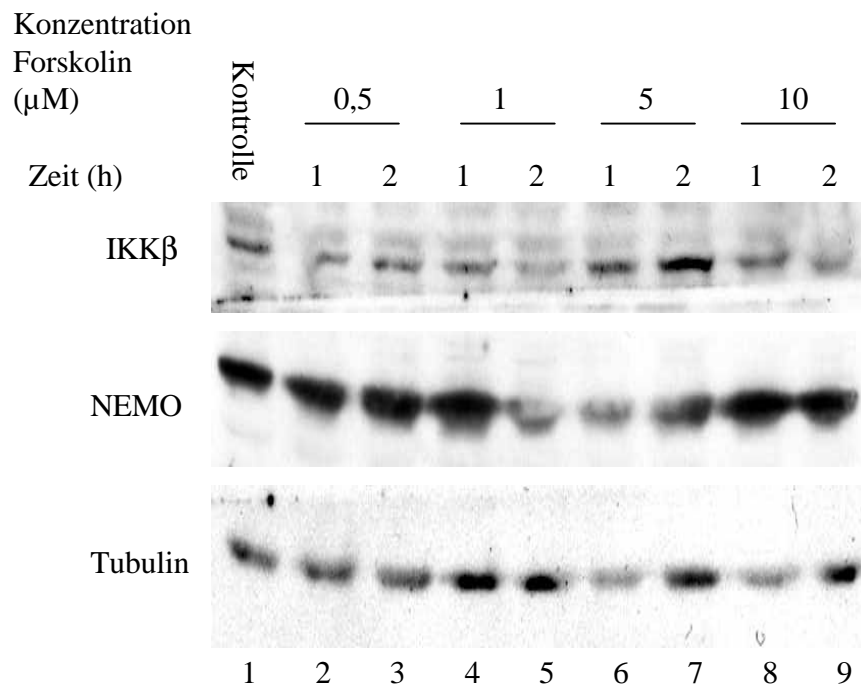


Abbildung 16: Forskolin hat keinen Einfluss auf die IKKb und NEMO-Konzentration in EL-4 Zellen: Western Blot: IKK β und NEMO nach Stimulation von EL-4-Zellen mit 0,5-10 μ M Forskolin für

3. Ergebnisse

1+2 Stunden. Es wurden jeweils 50µg Protein von Gesamtzellextrakten aus unstimulierten oder stimulierten Zellen aufgetragen. Der Nachweis erfolgte mit dem IKKα/β und dem NEMO-Antikörper. (IKKβ = inhibitor of κB kinase β, NEMO = nuclear factor κB essential modulator)

Stimulation der Zellen mit Hitzeschock, der HSF1 (Heat shock factor) aktiviert, führte je nach Zelllinie zu unterschiedlichen Ergebnissen.

In 293-Zellen stieg die IKKβ-Konzentration 8h nach Hitzeschock an um dann wieder abzufallen, in HeLa-Zellen blieb die Konzentration hingegen konstant (Abbildung 17).

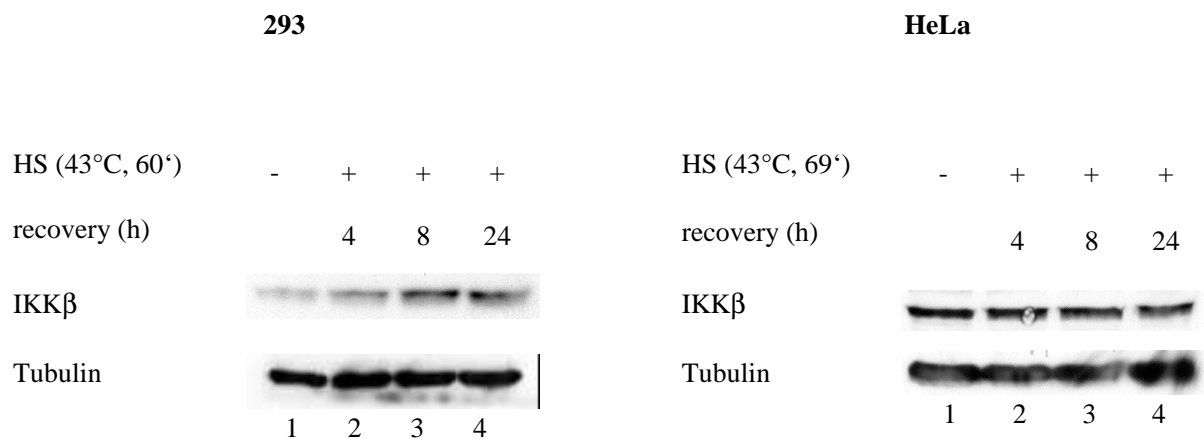


Abbildung 17: Einfluss von Hitzeschock auf die Proteinkonzentration von IKKβ: Western Blot: 293- und HeLa-Zellen wurden entweder für eine Stunde bei 43°C inkubiert (Spuren 2-4 und 6-8) oder bei 37°C belassen (Spuren 1 und 4), und 4h, 8h oder 24h nach Hitzeschock geerntet. Pro Spur wurden 50µg Protein aus Gesamtzellextrakten aufgetragen. Der Nachweis erfolgte mit dem IKKα/β-Antikörper, der mit hoher Spezifität IKKβ erkennt. (IKKα/β = inhibitor of κB kinase α/β)

4. Diskussion

Der putative IKK β -Promotor im Vergleich zu anderen Promotoren

Vergleich der Promotorsequenz mit Konsensuspromotoren

Gene, die für Proteine kodieren, haben sehr variable Promotoren, die mehrere Kilobasen lang sein können. Den Kern dieser Promotoren bildet klassischerweise die TATA-Box bei ca. -25 Basenpaaren, sowie die Initiationssequenz YYCARR (Y = C oder T, R = A oder G), die um die Position -1 liegt. Im *IKK β* -Promoter lässt sich weder in der menschlichen noch der murinen Sequenz an der zu erwartenden Stelle eine TATA-box finden, die der Konsensussequenz TATAWAW (W = A oder T) entspricht. Ebenso ist es schwierig die Initiationssequenz auszumachen. Im murinen *IKK β* -Promotor findet man bei -15 bp die Sequenz GTCAGG, die bis auf das erste G der Konsensussequenz entspricht, jedoch nicht der typischen Position. Näher an dieser, aber immer noch nicht typisch gelegen, ist die Sequenz GGCAGG bei -10 bp, die zwei Abweichungen von der Konsensussequenz hat. Im humanen *IKK β* -Promotor findet sich bei -4bp die Sequenz GTCAGA, die nur eine Abweichung zur Konsensussequenz hat. Das GTCA-Motiv dieser möglichen Initiationssequenz ist sowohl im murinen als auch im humanen *IKK β* -Promotor Teil des CREB-Motivs, das im humanen im Vergleich zum murinen Promotor auch um 11 bp zum Transkriptionsstart hin verschoben ist. Ob es sich also bei dem GTCAGG/A-Motiv um die Initiationssequenz handelt, ist unklar. Allerdings sind auch funktionierende Promotoren ohne TATA-box und Initiationssequenz beschrieben worden, die jedoch eine höhere Variabilität des Transkriptionsstarts aufweisen. Da aber das erste Exon des *IKK β* -Gens ohnehin nicht translatiert wird, könnte diese Variabilität durchaus möglich sein.

Vergleich des putativen IKK β -Promotors mit dem IKK α -Promotor

Da angenommen wird, dass *IKK α* und *IKK β* zu gleichen Teilen im *IKK*-Komplex vorliegen, ist eine koordinierte Expression mittels Promotoren mit hoher Homologie sehr wahrscheinlich denkbar. Allerdings sind die Funktionen trotz der Homologie unterschiedlich und die mRNA und Proteinspiegel sind in einzelnen Organen ebenfalls nicht gleichsinnig kontrolliert, was auch auf Unterschiede in der Promotoraktivität hindeuten kann. Der humane *IKK α* Promotor wurde 2004 von Zhou et al. charakterisiert (21). Dabei zeigten sich Bindungsstellen für Ets-1 und p53. Außerdem wiesen Montminy

et al. auf eine mögliche CREB-Bindungsstelle im humanen und murinen IKK α Promotor hin (63). Die Ets-1-Bindungsstelle im IKK α -Promotor liegt 46-39 bp vor dem Transkriptionsstart, also ähnlich nahe wie die im murinen IKK β -Promotor, die unmittelbar vor dem Transkriptionsstart liegt. Bindungsstellen für p53 wurden im IKK β -Promotor nicht gefunden, es zeigte sich jedoch auch im IKK α -Promotor, dass die p53-Bindungsstellen nicht funktional sind und dass p53 nicht direkt an den Promotor bindet, sondern über eine Interaktion mit Ets-1 die Genexpression reprimiert (21). Eine eigene Suche mit Tfsearch 1.3 ergab für den humanen und murinen IKK α -Promotor ebenfalls keine TATA-box.

Zelluläre Proteinspiegel von IKK α , - β und NEMO

Die starke Signal in der RT-PCR für IKK α in Leber und Niere korreliert nur im Fall der Niere mit Daten aus Northernblot-Experimenten (62). Die Tatsache, dass sich auf Proteinebene auch in Thymus und Milz hohe Konzentrationen von IKK α finden, legt nahe, dass zusätzlich zu transkriptionellen Unterschieden in den einzelnen Organen auch weitere Mechanismen zur Kontrolle der Proteinspiegel von IKK α , beispielsweise auf Translationsebene oder in Unterschieden im Abbau, zum Beispiel durch posttranslationale Modifikationen und zusätzliche Faktoren, existieren. Ein Beispiel für einen solchen zusätzlichen Faktor, der die Stabilität von IKK α und IKK β beeinflusst, wäre die Einwirkung von Hitzeschock. Er führt zu einer reversiblen Bindung von IKK α und IKK β an die Membranen des endoplasmatischen Retikulums und somit zu einer zeitweisen Reduktion der zytosolischen IKK-Spiegel (45).

Die Korrelation der IKK β -Spiegel in RT-PCR und den Northernblot-Ergebnissen von Karin et al. (62) ist wie bei IKK α nicht zufriedenstellend. In Leber, Niere und Gehirn ist im Northernblot im Gegensatz zur RT-PCR nur wenig IKK β nachweisbar, in den lymphatischen Organen Milz und Thymus hingegen zeigt sich eine gewisse Ähnlichkeit der Ergebnisse aus Northern blot und RT-PCR. Ebenso sind die IKK β -Proteinspiegel in Thymus und Milz eher hoch. Auch für IKK β scheinen zumindest in einigen Organen, wie zum Beispiel der Leber, noch weitere Mechanismen zur Kontrolle des Proteinspiegels zu bestehen.

Bei der m-RNA-Expression von NEMO zeigt sich eine Ähnlichkeit zwischen unseren RT-PCR-Ergebnissen und den Northernblot-Ergebnissen von Nelson et al. (2). Auch dort

wurden relativ hohe Mengen an NEMO-mRNA in Gehirn und Leber und Skelettmuskel gefunden. Ebenso wie bei den beiden anderen IKKs korrelieren die Proteinspiegel von NEMO nicht zwingend mit der m-RNA-Konzentration. Also wird scheinbar auch der Proteinspiegel von NEMO noch anderweitig reguliert.

Die basale Aktivität des putativen IKK β -Promotors

Die Daten der Reporteragen-Analysen ergeben eine starke Transaktivierung durch die klonierten Promotorstücke, am stärksten transaktivierend wirken dabei die proximalen Promotorstücke von -200bp bis +26 bp bzw -500bp bis +26 bp, sodass angenommen werden kann, dass hier der Kernpromotor liegt. Zwischen verschiedenen Zelltypen liegen zum Teil starke quantitative Unterschiede in der Promotoraktivität, so zum Beispiel eine fast tausendfache Induktion in 293-Zellen (Abbildung 7) im Gegensatz zu einer fünf- bis 14-fachen Induktion in EL-4 Zellen (Abbildung 11, Abbildung 13). Dies kann z.B. durch zelltypspezifische Unterschiede oder Differenzierungsstufen der Zellen bedingt sein.

Da sich die basale Aktivität der Promotorkonstrukte mit Stimulantien wie Forskolin, TNF α oder PMA/Ionomycin nicht steigern ließ, könnte es möglich sein, dass zusätzlich zu diesem basalen Promotor noch ein weiterer induzierbarer Promotor existiert, wie dies für das MHC-Class II-*Trans*-Activator-Gen gezeigt wurde, dessen Expression von vier Promotoren reguliert wird, die zelltypabhängig konstitutionell oder induzierbar aktiv sind (25, 40, 44). Ebenso könnte es möglich sein, dass diese Stimulantien allein nicht für eine Transaktivierung ausreichen, sondern dass bestimmte Konditionen vorherrschen müssen, wie z.B. bestimmte Methylierungsmuster der Promotor-DNA oder Acetylierungen/Deacetylierungen der entsprechenden Histone, um eine Antwort im Sinne einer Steigerung der Expression von IKK β zu erreichen. Diese Vorbedingungen könnten durch andere Stimuli gesteuert werden, die im in-vitro-System so nicht nachvollziehbar sind.

Das CRE-Motiv im putativen IKK β -Promotor

Die Analyse der Region oberhalb des ersten Exons von *IKK β* zeigte in der humanen und murinen Sequenz unter anderem ein CRE-Motiv (CRE = cAMP-responsive-element). An ein CRE-Motiv binden Transkriptionsfaktoren der CREB/ATF-Familie. Dies ist eine große und diverse Familie von b-Zip-Transkriptionsfaktoren. Zu der Untergruppe des cAMP-

4. Diskussion

responsive-element-binding-protein (CREB) gehören die Faktoren CREB, CREM und ATF-1.

Eine genomweite Analyse von CRE-Motiven ergab, dass der Großteil der konservierten und wahrscheinlich funktionellen CRE-Motive maximal 200 bp vom Transkriptionsstart entfernt ist (63), wie auch das im IKK β -Promotor gefundene CRE-Motiv, das 19 bp (murin) bzw. 8 bp vor dem Transkriptionsstart im humanen IKK β -Promotor liegt. Bei dieser Analyse wurde interessanterweise nur in murinen und nicht in humanen Geweben ein funktionelles CRE-Motiv im IKK β -Promotor gefunden.

Dies legte nahe, dass die Aktivität des murinen IKK β -Promotors durch Forskolin, einen cAMP-Agonisten, aktivierbar sein müsste. Leider ließ sich dies weder in Luciferase assays mit den Promotorkonstrukten in 293-Zellen (Daten nicht gezeigt) noch auf Proteinebene in EL-4-Zellen (Abbildung 16) nachweisen. Allerdings konnten auch Montminy et al. bei der Analyse von CREB-Bindungsstellen in 293-Zellen nur bei weniger als 2% aller Gene, an deren Promotor CREB bindet, eine Induzierbarkeit durch Forskolin nachweisen (63). cAMP induziert die Phosphorylierung von CREB an Serin 133 (20). Allerdings ist diese Phosphorylierung von Serin 133 nicht in jedem Fall ausreichend für die transaktivierende Potenz von CREB. So wird für die volle Transaktivierung in PC12-Zellen die zusätzliche Phosphorylierung von Serin 129 durch die Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK 3) benötigt (16). Somit könnte Forskolin zumindest in 293- und EL-4-Zellen nicht für eine Stimulation des IKK β -Promotors ausreichen.

Ebenfalls zu den b-Zip-Transkriptionsfaktoren gehört die AP-1-Familie mit ihren Mitgliedern Jun und Fos. Interessanterweise konnte in EMSA-Experimenten die unmarkierte AP-1-Bindungsstelle die markierten CREB-Oligonukleotide nur dann teilweise aus ihrer Proteinbindung verdrängen, wenn sie in mehrfachem Überschuss vorlagen. Dies ist umso interessanter, wenn man bedenkt, dass CREB Heterodimere mit AP-1 bildet (23). Somit scheint die Bindung von CREB an die Sequenz TGACGTCA relativ spezifisch zu sein und zumindest keine anderen b-Zip-Transkriptionsfaktoren zuzulassen. Außerdem gibt dies einen Hinweis darauf, dass zumindest die von uns verwendete AP-1-Bindungsstelle nicht in höherem Maße mit CREB/AP-1-Heterodimeren interagiert.

Das Ets-Motiv im putativen IKK β -Promotor

Montmigny et al. zeigten bei ihrer Analyse der CRE-Motive, dass Bindungsstellen bestimmter anderer Transkriptionsfaktoren in den Promotoren möglicher CREB-Zielgene überrepräsentiert sind. Dies gilt auch für den Transkriptionsfaktor c-Ets (63). C-Ets steht für eine Familie von Transkriptionsfaktoren, welche alle die Ets-Domäne gemeinsam haben, eine Variante des Winged Helix-Turn-Helix-Motivs. Ets-1 und Ets-2 sind hierbei Mitglieder der Ets-Unterfamilie (53). Ets-1 spielt eine Rolle bei dem Überleben von T-Zellen und der Differenzierung der natürlichen Killerzellen (53) und wird in lymphatischen Organen und im Endothel exprimiert, Ets-2 kommt ubiquitär vor (32).

Da auch für den *IKK α* -Promotor eine Ets-1-Bindungsstelle beschrieben ist (21), wäre es durchaus denkbar, dass die Expression von *IKK α* und *IKK β* trotz ihrer unterschiedlichen Funktionen unter bestimmten Bedingungen gleichsinnig gesteuert wird. Somit könnte Ets1 auch eine weitere Verbindung zwischen dem alternativen und dem klassischen Aktivierungsweg darstellen.

Interessanterweise führt die Überexpression von Her2/neu zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von Ets-Faktoren (32), was eine Erklärung für die Aktivierung des *IKK β* -Promotors in Her2/neu-positiven Zellen (35) sein könnte.

Weitere mögliche Arbeitsschritte

Im Weiteren wäre es interessant herauszufinden, welche Mitglieder der CREB- und respektive der Ets-Familie an den *IKK β* -Promotor binden. Da insbesondere die CREB-Familie eine sehr große und heterogene Familie von Transkriptionsfaktoren ist, dürfte die technische Umsetzung allerdings nicht ganz einfach werden.

Weiterhin wäre die Untersuchung der anderen Promotoren für *IKK α* und *NEMO* interessant. Ein erster Schritt hierbei könnte ein formaler Vergleich der putativen Bindungsstellen sein, wie dies in der vorgelegten Arbeit für den humanen und den murinen *IKK β* -Promotor gezeigt wurde. Da auch für den *IKK α* -Promotor eine Ets-1-Bindungsstelle bereits beschrieben wurde (21), könnten sich daraus erste Hinweise auf die Homologie der Promotoren ergeben. Wenn eine Möglichkeit gefunden würde, mit der die Expression von *IKK α* und *IKK β* über diese Ets-1-Bindungsstelle zu stimulieren wäre, könnte man z.B. die Kopplung der *IKK α* und *IKK β* -Expression in verschiedenen Geweben untersuchen.

4. Diskussion

Ebenso wäre die Suche nach Stimulantien der IKK β -Expression und einer eventuell gekoppelten Expression von IKK α und NEMO interessant.

Da bereits die IKK β -Spiegel bei der Differenzierung dendritischer Zellen und PC12-Zellen beschrieben wurden, wären auch die IKK-Spiegel bei der Differenzierung weiterer Zelllinien, insbesondere bei Zellen des Immun- und Nervensystems von Interesse. Dies wäre auch wegen des bereits beschriebenen Zusammenhangs zwischen IKK β -Expression und Her2/neu-Expression aus onkologischer Sicht interessant. Insbesondere wären auch bei diesen Prozessen Unterschiede in der Kinetik der einzelnen Mitglieder des IKK-Komplexes interessant, weil sich durch unterschiedliche stöchiometrische Zusammensetzungen unterschiedliche Funktionen des IKK-Komplexes erklären lassen könnten.

5. Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor Nuclear-factor- κ B (NF κ B) spielt eine wichtige Rolle bei Prozessen der angeborenen und adaptiven Immunität sowie bei Differenzierungsprozessen und der Krebsentstehung. Der Inhibitor-of-NF κ B-Kinase-Komplex (IKK-Komplex) mit seinen Komponenten IKK α , IKK β und NEMO (NF κ B-Essential-Modulator) ist einer der wichtigsten Regulatoren des NF κ B-Signalweges. In Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion- und Westernblot-Analysen von verschiedenen Geweben der Maus wurden gewebsspezifische Unterschiede in der Expressionshöhe der einzelnen Bestandteile des IKK-Komplexes beobachtet. Dies könnte auf eine unterschiedliche stöchiometrische Zusammensetzung des Komplexes und somit auf unterschiedliche Funktionen des IKK-Komplexes in verschiedenen Organen hindeuten. Zudem implizieren diese Befunde einen hohen Regulationsgrad der IKK-Expression. Auf Grund der herausragenden Rolle von Promotoren für die Genexpression wurden die Promotoren des humanen sowie des murinen IKK β -Gens kloniert und in ein Luciferase-Reporterkonstrukt inseriert. Bei einer näheren Charakterisierung beider Promotoren zeigte sich eine hohe konstitutive Expression, die sich jedoch durch unterschiedliche Agonisten, wie z.B. Tumor-Necrosis-Factor- α oder Forskolin, nicht beeinflussen ließ. In einer nachfolgenden Analyse mit Deletionsmutanten des murinen IKK β -Promotors zeigte der IKK β -Promotorbereich -200 Basenpaare unmittelbar vor dem Transkriptionsstart die stärkste Aktivität. Dort weist der Promotor des murinen IKK β -Gens mögliche Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren CREB (cAMP-responsive-element binding protein) und Ets-1 (v-ets-erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1) sowie weiter distal mögliche Bindungsstellen für zusätzliche Transkriptionsfaktoren auf. Die Mutation der CREB-Bindungsstelle führte zu einer drastischen Reduktion der Reporterexpression. Ähnliches ließ sich in geringerem Ausmaß auch für die Ets-1-Bindungsstelle nachweisen. Zudem konnten in Gelretardationsstudien spezifische Proteinkomplexe nachgewiesen werden, die an die wildtypischen, jedoch nicht an die mutierten, CREB- und Ets-1-Motive des murinen IKK β -Promotors binden. Interessanterweise wurden dabei zelltyp-spezifische Unterschiede in der Zusammensetzung der desoxyribonukleinsäurebindenden Proteinkomplexe beobachtet. Somit könnten Mitglieder der CREB/ATF-Familie (ATF=activating-transcription-factor) und der Ets-Familie an der Regulation der beobachteten Gewebsspezifität der IKK β -Expression beteiligt sein und darüber hinaus

5. Zusammenfassung

möglicherweise auch in einigen Zelltypen eine Kopplung der IKK α - und IKK β -Expression ermöglichen, da für den Promotor des IKK α -Gens eine Ets-1-Bindungsstelle beschrieben wurde.

6. Literaturverzeichnis

1. Agou F, Ye F, Goffinont S, Courtois G, Yamaoka S, Israel A, Véorn M: NEMO Trimerizes through Its Coiled-coil C-terminal Domain. *J Biol Chem* 277: 17464-17475 (2002)
2. Aradhya S, Woffendin H, Jakins T, Bardaro T, Esposito T, Smahi A, Shaw Ch, Levy M, Munnich A, D'Urso M, Lewis R A, Kenwrick S, Nelson D L: A recurrent deletion in the ubiquitously expressed NEMO (IKK γ) gene accounts for the vast majority of incontinentia pigmenti mutations. *Hum Mol Genet* 10: 2171-2179 (2001)
3. Auphan N, DiDonato J A, Rosette C, Helmberg A, Karin M: Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 270: 286-290 (1995)
4. Azoitei N, Wirth T, Baumann B: Activation of the I κ B kinase complex is sufficient for neuronal differentiation of PC12 cells. *J Neurochem* 93: 1487-501 (2005)
5. Baltathakis I., Alcantara O., Boldt D. H.: Expression of Different NF- κ B Pathway Genes in Dendritic Cells (DCs) or Macrophages Assessed by Gene Expression Profiling. *J Cell Biochem* 83: 281-290 (2001)
6. Basseres D S, Baldwin A S: Nuclear factor- κ B and inhibitor of κ B kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 25:6817-30. (2006)
7. Bonif A, Meuwis M-A, Close P, Benoit V, Heyninck K, Chapelle J-P, Bours C, Merville M-P, Piette J, Beyaert R, Chariot A: TNF α - and IKK β -mediated TANK/I-TRAF phosphorylation: implications for interaction with NEMO/IKK γ and NF- κ B activation. *Biochem J* 394: 593-603 (2006)
8. Bonizzi G, Karin M: The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25: 280-88 (2004)
9. Burns K A, Martinon F: Inflammatory Diseases: Is Ubiquitinated NEMO at the Hub?. *Curr Biol* 14: 1040-1042 (2004)
10. Chen G, Cao P, Goeddel D V: TNF-Induced Recruitment and Activation of the IKK Complex Require Cdc37 and Hsp90. *Molecular Cell* 9: 401-410 (2002)

11. Correa P, Houghton J: Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 133: 659-672 (2007)
12. Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, Karin M: Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science* 284: 309-13 (1999)
13. Denis-Donini S, Caprini A, Frassoni C, Grilli M: Members of the NF- κ B family expressed in zones of active neurogenesis in the postnatal and adult mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res* 154:81-9 (2005)
14. Dogra C, Changotra H, Subburaman M, Kumar A: Tumor Necrosis Factor-like Weak Inducer of Apoptosis Inhibits Skeletal Myogenesis through Sustained Activation of Nuclear Factor- κ B and Degradation of MyoD Protein. *J Biol Chem* 281: 10327-36 (2006)
15. Ducut Sigala J L, Bottero V, Young D B, Shevchenko A, Mercurio F, Verma I M: Activation of transcription factor NF- κ B requires ELKS, in I κ B kinase regulatory subunit. *Science* 304. 1963-67 (2004)
16. Fiol C J, Williams J S, Chou C H, Wang Q M, Roach P J, Andrisani O M: A secondary phosphorylation of CREB341 at Ser129 is required for the cAMP-mediated control of gene expression. A role for glycogen synthase kinase-3 in the control of gene expression. *J Biol Chem* 269: 32187-93 (1994)
17. Fu D, Kuo Y, Liu B, Jeang K, Giam C: Human T-lymphotropic Virus Type I Tax Activates I- κ B Kinase by Inhibiting I- κ B Kinase-associated Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A. *J Biol Chem* 278: 1487-1493 (2003)
18. Galgoczy P, Rosenthal A, Platzer M: Human-mouse comparative sequence analysis of the NEMO gene reveals an alternative promoter within the neighboring G6PD gene. *Gene* 271:93-8 (2001)
19. Garg A, Aggarwal B B: Nuclear transcription factor- κ B as a target for cancer drug development. *Leukemia* 16: 1053-68 (2002)
20. Gonzalez G A, Montminy M R: Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59: 675-80 (1989)

21. Gu L, Zhu N, Findley H W, Woods W G, Zhou M: Identification and Characterization of the IKK α Promoter; Positive and Negative Regulation by Ets-1 and p53 Respectively. *J Biol Chem* 279: 52141-52159 (2004)
22. Haecker H, Karin M: Regulation and Function of IKK and IKK-Related Kinases. *Sci STKE* re 13 (2006)
23. Hai T, Hartman M G: The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP response element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273: 1-11 (2001)
24. Hayden M S, Ghosh S: Signaling to NF- κ B. *Genes Dev* 18: 2195-2224 (2004)
25. Holling T M, Van der Stoep N, Quinten E, van den Elsen P J: Activated human T cells accomplish MHC class II expression through T cell specific occupation of CIITA promoter III. *J Immunol* 168: 763-70 (2002)
26. Hu M C, Lee D F, Xia W, Golfman L S, Ou-Yang F, Yang J Y, Zou Y, Bao S, Hanada N, Saso H, Kobayashi R, Hung M C: IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* 117:225-37 (2004)
27. Hu M C, Lee D F, Xia W, Golfman L S, Ou-Yang F, Yang J Y, Zou Y, Bao S, Hanada N, Saso H, Kobayashi R, Hung M C: 2004. IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* 117: 225-37 (2004)
28. Hu Y, Baud V, Oga T, Kim K I, Yoshida K, Karin M: IKK α controls formation of the epidermis independently of NF- κ B. *Nature* 410: 710-14 (2001)
29. Huang T T, Wuerzberger-Davis S M, Wu Z-H, Miyamoto S: Sequential Modification of NEMO/IKK γ by SUMO-1 and Ubiquitin Mediates NF- κ B Activation by Genotoxic Stress. *Cell* 115: 565-576 (2003)
30. Iotsova V, Caamano J, Loy J, Yang Y, Lewin A, Bravo R: Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat Med* 3:1285-1289 (1997)
31. Kwak Y T, Li R, Becerra C R, Tripathy D, Frenkel E P, Verma U N: IkappaB kinase alpha regulates subcellular distribution and turnover of cyclin D1 by phosphorylation. *J Biol Chem* 280:33945-52 (2005)

32. Langen R C, Van Der Velden J L, Schols A M, Kelders M C, Wouters E F, Janssen-Heininger Y M: Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization: *FASEB J* 18:227-37 (2004)
33. Li L, Olson E N: Regulation of muscle cell growth and differentiation by the MyoD family of helix-loop-helix proteins. *Adv Cancer Res* 58:95-119 (1992)
34. Li Q, Estepa G, Memet S, Israel A, Vermal I M: Complete lack of NF- κ B activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation. *Genes Dev* 14: 1729-1733 (2000)
35. Makino K, Day C P, Wang S C, Li Y M, Hung M C: Upregulation of IKKalpha/IKKbeta by integrin-linked kinase is required for HER2/neu-induced NF-kappaB antiapoptotic pathway. *Oncogene* 23:3883-7 (2004)
36. Mattson M P, Meffert M K: Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ* 13: 852-60 (2006)
37. Mattson M P: NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons. *Neurochem Res.* 30: 883-93 (2005)
38. McKenzie F R, Connelly M A, Balzarano D, Muller J A, Geleziunas R, Marcu K B: Functional isoforms of IkappaB kinase alpha (IKKalpha) lacking leucine zipper and helix-loop-helix domains reveal that IKKalpha and IKKbeta have different activation requirements. *Mol Cell Biol* 20:2635-49 (2000)
39. Memet S: NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem Pharmacol* 72:1180-95 (2006)
40. Muhlethaler-Mottet A, Di Berardino W, Otten L A, Mach B: Activation of MHC class II transactivator CIITA by interferon- γ requires cooperative interaction between Stat 1 and USF-1. *Immunity* 8: 157-66 (1998)
41. Oikawa T: Ets transcription factors: Possible targets for cancer therapy. *Cancer Sci* 95: 626-633 (2004)
42. Park G Y, Wang X, Hu N, Pedchenko T V, Blackwell T S, Christman J W: NIK Is Involved in Nucleosomal Regulation by Enhancing Histone H3 Phosphorylation by IKK α . *J Biol Chem* 281: 18684-18690 (2006)

43. Pierce J W, Read M A, Ding H, Luscinskas F W, Collins T: Salicylates inhibit I κ B-phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J Immunol* 156: 3961-3969 (1996)
44. Piskurich J F, Linhoff M W, Wang Y, Ting J P T: Two distinct γ -interferon-inducible promoters of the major histocompatibility complex class II transactivator gene are differentially regulated by STAT1, interferon regulatory factor 1, and transforming growth factor β . *Mol Cell Biol* 19: 431-40 (1999)
45. Pittet, J-F., Lee, H., Pespeni, M., O'Mahony, A., Roux, J, Welch, W. J.: Stress-Induced Inhibition of the NF- κ B Signaling Pathway. Results from the Insolubilization of the I κ B Kinase Complex following Its Dissociation from Heat Shock Protein 90. *J Immunol* 174: 384-394 (2005)
46. Rothwarf D M, Zandi E, Natoli G, Karin M: IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature* 395: 297-300 (1998)
47. Ruocco M G, Maeda S, Park J M, Lawrence T, Hsu L-C, Cao Y, Schett G, Wagner E F, Karin M: I κ B kinase β (IKK β), but not IKK α , is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation induced bone loss. *J Exp Med* 201. 1677-87 (2005)
48. Sabolek M, Herborg A, Schwarz J, Storch A: Dexamethasone blocks astroglial differentiation from neural precursor cells. *Neuroreport* 17: 1719-1723 (2006)
49. Scalabas G M, Uwagawa T, Schmidt Ch, Hess K R, Evans D B, Abbruzzese J L, Cio P J: Nuclear Factor Kappa B Activation Is a Potential Target for Preventing Pancreatic Carcinoma by Aspirin. *Cancer* 103: 2485-2490 (2005)
50. Schmidt-Supprian M, Tian J, Ji H, Terhost C, Bhan A K, Grant E P, Pasparakis M, Casola S, Coyle A J, Rajewsky K: I κ B Kinase 2 Deficiency in T Cells Leads to Defects in Priming, B Cell Help, Germinal Center Reactions, and Homeostatic Expansion. *J Immunol* 173: 1612-19 (2004)
51. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten F R, Krahn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun S C, Karin M: Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* 293: 1495-99 (2001)

52. Shambharkar P B, Blonska M, Pappul B P, Li H, You Y, Sakurai H, Darnay B G, Hara H, Penninger J, Lin X: Phosphorylation and ubiquitination of the I κ B-kinase complex by two distinct signaling pathways. *EMBO J* 26: 1794-1805 (2007)
53. Sharrocks A D: The Ets-Domain Transcription Factor Family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:827-37 (2001)
54. Sigal L H: Basic science for the clinician 39: NF-kappaB-function, activation, control, and consequences. *J Clin Rheumatol* 12:207-11. (2006)
55. Singh H, Sen R, Baltimore D, Sharp P A: A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature* 319, 154 – 158 (1986)
56. Stilo R, Liguoro D, Di Jeso B, Formisano E C, Leonardi A, Vito P: Physical and Functional Interaction of CARMA1 and CARMA3 with I κ B-Kinase γ -NF κ B Essential Modulator. *J. Biol Chem* 279: 34323-31 (2004)
57. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie M T, Martin T J: Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20:345–357. (1999)
58. Tang E D, Wang C-Y, Xiong Y, Guan K-L: A Role for NF- κ B Essential Modifier/I κ B Kinase- γ (NEMO/IKK γ) Ubiquitination in the Activation of the I κ B Kinase Complex by Tumor Necrosis Factor- α . *J Biol Chem* 278: 37297-305 (2003)
59. Tegethoff S., Behlke J, Scheidereit C: Tetrameric oligomerization of IkappaB kinase gamma (IKKgamma) is obligatory for IKK complex activity and NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 23:2029-41 (2003)
60. Yin M-J, Yamamoto Y, Gaynor R B: The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature* 396: 77-80 (1998)
61. Yin, M J, Christerson, L B, Yamamoto, Y, Kwak, Y T, Xu, S, Mercurio, F, Barbosa, M, Cobb, M H, Gaynor, R B: HTLV-I Tax protein binds to MEKK1 to stimulate IkappaB kinase activity and NF-kappaB activation. *Cell* 29: 875-84 (2003)
62. Zandi E, Rothwarf D M, Delhase M, Hayakawa M, Karin M: The I κ B Kinase Complex (IKK) Contains Two Kinase Subunits, IKK α und IKK β , Necessary for I κ B Phosphorylation and NF- κ B Activation. *Cell* 91: 243-252 (1997)

63. Zhang X, Odom D T, Koo S-H, Conkright M D, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker J R, Emerson B, Hogenesch J B, Unterman T, Young R A, Montminy M: Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4459-4464 (2005)

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Ralf Marienfeld für die Vergabe dieser interessanten Doktorarbeit sowie für die exzellente Betreuung während der ganzen Zeit.

Herrn PD. Dr. Franz Oswald für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau PD. Dr. Cornelia Brunner und Herrn Prof. Dr. Thomas Mertens für die freundliche Bereitschaft sich als Wahlprüfer zur Verfügung zu stellen.

Frau Dr. Uta Marienfeld für die gute Kooperation bei einigen Teilen dieser Arbeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Marienfeld, insbesondere meinen Laborkolleginnen Julia Leidner, Lysann Palkowitsch und Iris Kinmann, und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des gesamten Instituts für Physiologische Chemie unter Leitung von Prof. Dr. Thomas Wirth für die interessanten Anregungen sowie für die freundliche Unterstützung und Geduld, die sie einer Anfängerin wie mir entgegenbrachten.

Meinem Lebensgefährten Christian Tremmel für seinen distanzierten Blick auf diese Doktorarbeit sowie seine fachliche und persönliche Unterstützung.

Meinen Eltern, der bischöflichen Studienförderung Cusanuswerk und allen, die mich während meiner gesamten Studienzzeit unterstützen.

Lebenslauf

Persönliche Daten: Anna Teresa Gosemärker
geboren 24. Juni 1982
in Tettngang
ledig

Studium: seit 2001 Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
voraussichtlicher Abschluss: Staatsexamen 2008

Praktisches Jahr am ALK Schwäbisch Gmünd seit Februar 2007,
Wahlfach Pädiatrie

Promotion seit 2005 am Institut für Physiologische Chemie
Thema: Charakterisierung der humanen und murinen I κ B-Kinase β -
Promotoren zur Analyse der gewebsspezifischen Variationen in der
Zusammensetzung des IKK-Komplexes.

Auslandsemester an der Oulun Yliopisto, Oulu, Finnland 2004

Stipendium der bischöflichen Studienförderung Cusanuswerk

Schullaufbahn: 1992-2001 Montfort-Gymnasium Tettngang
Abitur 2001, Durchschnittsnote 1,2

1988-1992 Grundschule Schillerschule Tettngang

Fremdsprachen: Englisch flüssig in Wort und Schrift

Französisch gut

Finnisch und Schwedisch Basiskenntnisse

Latein und Altgriechisch

Ulm, 03. Dezember 07

Anna Teresa Gosemärker