

Funktion und Regulation des I κ B-Proteins I κ B- ζ

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Charlotte Lindenblatt

aus Düsseldorf

Düsseldorf, November 2008

Aus dem Institut für Molekulare Medizin
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Herr Prof. Dr. K. Schulze-Osthoff

Koreferent: Herr Prof. Dr. G. Groth

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Januar 2009

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	
	1. Der Nuklearfaktor- κ B	1
	1.1 Die Rel/NF- κ B-Familie	1
	1.2 Inhibitoren von NF- κ B: Die I κ B-Proteine	2
	1.2.1 Die zytoplasmatischen I κ B-Proteine	2
	1.2.2 Die nukleären I κ B-Proteine	5
	1.3 Der Mechanismus der NF- κ B-Aktivierung	8
	1.3.1 Der I κ B-Kinase (IKK)-Komplex	8
	1.3.2 Der klassische Weg der NF- κ B-Aktivierung	9
	1.3.3 Der alternative Weg der NF- κ B Aktivierung	11
	1.3.4 Atypische IKK-abhängige Signalwege der NF- κ B-Aktivierung	13
	1.3.5 Atypische IKK-unabhängige NF- κ B-Aktivierung	13
	1.4 Regulation der NF- κ B vermittelten Genexpression	14
	1.4.1 Posttranslationale Modifikation des NF- κ B-Signalweges	14
	1.4.2 Translationale Inhibition durch microRNAs	16
	1.5 Aktivatoren und Zielgene von NF- κ B	17
	1.6 Spezifität der NF- κ B vermittelten Genexpression	19
	1.7 Relevanz von NF- κ B	21
II.	Zielsetzung	24
III.	Material und Methoden	26
	1. Material	26
	1.1 Chemikalien	26
	1.2 häufig verwendete Puffer	26
	1.3 Biologisches Material	27
	1.3.1 Säugetierzellen	27
	1.3.2 Bakterienstämme	29
	1.4 Vektoren	30
	1.5 Oligonukleotide	34
	1.6 siRNA (kleine interferierende RNA-Moleküle)	36
	1.7 Antikörper	36
	1.8 Enzyme	38
	1.9 Größenmarker	38
	1.10 Häufig verwendete Reagenzien und Kits	39
	2. Methoden	40
	2.1 Transformation kompetenter Bakterienzellen	40
	2.2 Anlegen einer Glycerin-Stammkultur	40
	2.3 Molekularbiologische Methoden	40
	2.3.1 Plasmidpräparationen	40
	2.3.2 Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) aus eukaryontischen Zellen	41
	2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	42
	2.3.4 Polymerasekettenreaktion, DNA-Restriktion, -Dephosphorylierung und Ligation	42
	2.3.5 Agarosegelelektrophorese	44
	2.3.6 DNA-Sequenzierung	44
	2.3.7 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	44
	2.3.8 Real-Time quantitative PCR	45
	2.3.9 Ortsgerichtete Mutagenese (<i>site-directed-mutagenesis</i>)	46
	2.4 Integration von DNA in eukaryontische Zellen	46
	2.4.1 Transfektion von Zellen durch kationische Liposomen	46
	2.4.1.1 Transfektion von Phönixzellen zur Produktion von Retroviren	46
	2.4.1.2 Transfektion durch Neofektion	47
	2.4.2 Transduktion von HT1080-Zellen durch Retroviren	47
	2.4.3 Transfektion durch Verwendung kationischer Polymere	47

2.4.4	Kotransfektion von siRNA und Plasmiden	48
2.5	Proteinbiochemische Analyse eukaryontischer Zell-Lysate	48
2.5.1	Herstellung von Gesamtzell-Lysaten	48
2.5.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	49
2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	49
2.5.4	Western Blot	50
2.5.5	Immunopräzipitation und Co-Immunopräzipitation	50
2.6	Analyse der Proteinlokalisierung in der Zelle mittels Immunfluoreszenz	51
2.7	Generierung stabiler I κ B- ζ Tet-On-Zelllinien	51
2.8	Inhibition und Aktivierung von Signalwegen	52
2.8.1	Der NF- κ B-Signalweg	52
2.8.1.1	Induktion der I κ B- ζ -Expression durch Interleukin-1 β	52
2.8.2	Inhibition von Proteinkinasen	52
2.9	Spezielle microRNA-Methoden	53
2.9.1	Verwendung von Vorläufer-microRNA-Molekülen	53
2.9.2	Inhibition der DNA-Methylierung durch 5-Aza-2'-Deoxycytidin	54
2.10	Luciferase-Reportergenanalysen	54
2.10.1	Das pMIR-Report miRNA Reporter Vektor-System	54
2.10.2	Untersuchung der Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ mit dem Dual-Luciferase-System	55
2.11	Proteinanalytische Methoden	56
2.11.1	Analyse von Phosphotransferreaktionen	56
2.11.2	Phosphotransferreaktionen mit mutierten His-I κ B- ζ Proteinen	57
2.11.3	Aufreinigung von rekombinanten I κ B- ζ Konstrukten	57
2.12	Synchronisation von Zellen zur Zellzyklusanalyse	58
2.13	Durchflusszytometrie	59
2.13.1	Bestimmung der BrdU-Einlagerung in der S-Phase	59
2.13.2	Bestimmung des phospho Histon H3-Gehaltes	59
2.13.3	Zellsortierung	60
2.14	Auswertung	60
IV.	Ergebnisse	61
1.	Einfluss von I κ B- ζ auf den Zellzyklus	61
1.1	Verteilung der Zellzyklusphasen nach I κ B- ζ Überexpression	61
1.2	Einfluss von I κ B- ζ auf die Mitose	63
2.	Regulation der I κ B- ζ -Expression durch die miR-124a	66
3.	I κ B- ζ Transaktivierung und deren Regulation	72
3.1	I κ B- ζ besitzt eine Transaktivierungsdomäne, die im N-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert ist	72
3.2	NF- κ B beeinflusst die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ	74
3.3	I κ B- ζ wird durch Phosphorylierung posttranslational modifiziert	78
3.4	Die Phosphorylierung von I κ B- ζ wird nicht durch die IKK α oder die IKK β vermittelt	79
3.5	Regulation der Transaktivierung durch Kinasen	80
3.5.1	Die Proteinkinase-Inhibitoren Staurosporin, H89 und H7 haben keinen Einfluss auf die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ	80
3.5.2	Die Kinasen der JNK-Familie haben keinen Einfluss auf die I κ B- ζ -Transaktivierung	82
3.5.3	Einfluss des PI3 Kinase-Signalweges auf die I κ B- ζ Transaktivierung	82
3.5.4	p38 MAPK hat keinen Einfluss auf die I κ B- ζ Transaktivierung	85
3.5.5	Die extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK) 1 und 2 erhöhen die I κ B- ζ Transaktivierungsaktivität durch Phosphorylierung	86
3.5.6	Die Glykogensynthasekinase 3 (GSK 3) erhöht die Transaktivierung durch Phosphorylierung	89

3.5.7 MEK1/2, GSK3- und PI3K-Inhibitoren haben einen unterschiedlichen Einfluss auf den I κ B- ζ N-Terminus	91
3.5.8 Herstellung von I κ B- ζ Mutanten mit defizienten Phosphorylierungsstellen	92
3.5.9 Der Alanin-Aminosäure-Austausch an T93 und S219 verhindert die Phosphorylierung von I κ B- ζ durch ERK1 und ERK2, aber nicht durch GSK 3 β	94
4. Einfluss von Kinasen auf die I κ B- ζ abhängige Aktivierung von NF- κ B-Zielgenen	95
4.1 Eine Inhibition von ERK, GSK oder PI3K beeinflusst insbesondere die I κ B- ζ abhängige Aktivierung von GM-CSF	95
4.2 Mutationen an T93 und S219 vermindern die NF- κ B-Zielgenaktivierung durch I κ B- ζ	97
V. Diskussion	98
1. Beteiligung von I κ B- ζ an der Regulation des Zellzyklus	99
2. Regulation der I κ B- ζ -Proteinexpression durch miRNAs	100
3. I κ B- ζ -Transaktivierung und deren Regulation	102
4. Einfluss von Kinasen auf die I κ B- ζ abhängige Aktivierung von NF- κ B-Zielgenen	109
VI. Zusammenfassung/Summary	111
VII. Literaturverzeichnis	115
VIII. Abkürzungen	124
IX. Anhang	127
Abbildung 1. Schematische Darstellung der Mitglieder der NF- κ B und I κ B-Familie	3
Abbildung 2. Schematische Darstellung der Familie der IKK-Proteine	9
Abbildung 3. Signalwege zur NF- κ B-Aktivierung	12
Abbildung 4. Modell der miRNA-Biogenese und Funktion	17
Abbildung 5. Verteilung der Zellzyklusphasen nach I κ B- ζ Überexpression	62
Abbildung 6. I κ B- ζ hat keinen Einfluss auf die Mitose	64
Abbildung 7. I κ B- ζ hat keinen Einfluss auf die Mitose	65
Abbildung 8. Bindungsstelle der miR-124a in der I κ B- ζ mRNA und Expression der miR-124a in verschiedenen Tumorzelllinien	67
Abbildung 9. Induktion von I κ B- ζ in verschiedenen Glioblastomzelllinien vor und nach Demethylierung mit 5-AzaCyd	69
Abbildung 10. Die miR-124a inhibiert die Translation von I κ B- ζ , fördert jedoch nicht dessen mRNA-Degradation	70
Abbildung 11. Die Bindungsstelle für die miR-124a in der I κ B- ζ 3'UTR vermindert deutlich die Luciferase-Aktivität	71
Abbildung 12. Der N-Terminus von I κ B- ζ besitzt eine starke Transaktivierungsaktivität im Bereich von AS177-247	73
Abbildung 13. Die I κ B- ζ Transaktivierungsaktivität wird durch NF- κ B reguliert	75
Abbildung 14. I κ B- ζ und die NF- κ B Untereinheit p65 zeigen keine direkte Kolo-kalisation in subnukleären Strukturen des Zellkerns	77
Abbildung 15. I κ B- ζ hat keinen Einfluss auf die transkriptionelle Funktion der p50- und p65-NF- κ B-Untereinheiten	78
Abbildung 16. I κ B- ζ wird an Threoninen und Serinen phosphoryliert	79
Abbildung 17. I κ B- ζ wird nicht durch IKK α oder IKK β phosphoryliert	80
Abbildung 18. Die Proteinkinase-Inhibitoren Staurosporin, H89 und H7 sowie die JNK-Inhibitoren SP600125 oder JNK-1 haben keinen Einfluss auf die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ	81

Abbildung 19. Effekt des PI3K-Signalweges auf die Transaktivierungsaktivität und Phosphorylierung von I κ B- ζ	83
Abbildung 20. Die Transaktivierungsaktivität und Phosphorylierung von I κ B- ζ wird nicht über CK1 und 2 reguliert	85
Abbildung 21. ERK1 und ERK2 erhöhen die I κ B- ζ -Transaktivierungsaktivität, während p38 keinen Einfluss darauf hat	87
Abbildung 22. ERK1 und ERK2 phosphorylieren I κ B- ζ	88
Abbildung 23. Die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK 3) reguliert die I κ B- ζ Transaktivierungsaktivität	89
Abbildung 24. GSK3 α und GSK3 β phosphorylieren I κ B- ζ	90
Abbildung 25. Kinaseinhibitoren beeinflussen die N-terminale Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ	91
Abbildung 26. Aufreinigung von His-I κ B- ζ -Wildtyp- und -phosphorylierungsdefizienten Konstrukten	93
Abbildung 27. ERK1 und ERK2, aber nicht die GSK 3 β phosphorylieren I κ B- ζ spezifisch am Threonin 93 und Serin 219	94
Abbildung 28. Die Inhibition von ERK, GSK 3 oder PI3K beeinflusst die I κ B- ζ -abhängige Aktivierung von NF- κ B-Zielgenen	96
Abbildung 29. Die ERK-vermittelte Phosphorylierung an Threonin 93 und Serin 219 des I κ B- ζ -Proteins ist für dessen Zielgenexpression erforderlich	97

I. Einleitung

1. Der Nuklearfaktor- κ B

Der Nuklearfaktor-kappa B (NF- κ B) wurde zuerst im Jahre 1986 als konstitutiv aktiver Transkriptionsfaktor in reifen B-Lymphozyten beschrieben, der in der Enhancerregion der leichten Kette κ des Immunglobulins bindet. Seine Expression konnte in Vorläufer-B-Lymphozyten durch das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) induziert werden (Sen und Baltimore, 1986). Mittlerweile ist bekannt, dass NF- κ B durch eine Vielzahl von Stimuli aktivierbar ist und in den meisten eukaryontischen Zellen vorkommt. Die Funktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B liegt in der Regulation von Genen, die für eine Reihe regulatorischer Prozesse verantwortlich sind. Hierzu zählen die angeborene und erworbene Immunität, Entwicklung lymphatischer Organe, Entzündung, generalisierte Stressantwort, Zelladhäsion, Wachstumskontrolle und die Apoptose.

1.1 Die Rel/NF- κ B-Familie

Die Familie der Rel/NF- κ B Proteine besteht bei Säugetieren aus den fünf Mitgliedern p50, p52, p65 (RelA), c-Rel und RelB (Abb. 1), die durch die Gene *NF- κ B1*, *NF- κ B2*, *RELA*, *REL* bzw. *RELB* kodiert werden. Sie sind charakterisiert durch eine aus 300 Aminosäuren bestehende konservierte N-terminale Rel-Homologie Domäne (RHD), die für die Dimerisierung, DNA-Bindung, Kernlokalisierung und Bindung von Inhibitorproteinen, den I κ Bs, verantwortlich ist (Chen und Ghosh, 1999; Hayden und Ghosh, 2004).

Abhängig von der Sequenz, die C-terminal zur RHD gelegen ist, lassen sich die Rel/NF- κ B-Proteine in zwei Klassen einteilen: zur ersten Klasse zählen p50/p105 und p52/p100. Hier werden zunächst die Vorläuferproteine p105 und p100 gebildet, die am C-Terminus inhibitorische Ankyrinwiederholungssequenzen besitzen. Durch proteolytische Spaltung entsteht aus dem Vorläuferprotein p100 das reife Protein p52, während p50 durch konstitutive Prozessierung von p105 entsteht (Schmitz et al., 2004). Zur zweiten Klasse gehören die Proteine p65 (RelA), RelB und c-Rel, die als ausgereifte Proteine synthetisiert werden. Sie sind durch eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) gekennzeichnet, die den Proteinen p50 und p52 fehlt (Abb. 1A).

Mit Ausnahme von RelB, das nur Heterodimere mit p100, p52 und p50 formt, bilden alle Rel/NF- κ B-Proteine sowohl Hetero- als auch Homodimere (Baeuerle und Henkel, 1994). Diese binden an κ B-Bindungsstellen mit einer aus 10 Basen bestehenden Konsensussequenz 5'-GGGRNNYYCC-3' (Kucharczak et al., 2003) in der Promotor- oder Enhancerregion von Zielgenen. Hierbei kann eine positive Regulation der Genexpression nur durch NF- κ B-Proteine erfolgen, die eine TAD besitzen, während p50 und p52, die keine TAD

besitzen, als Homodimere die Transkription unterdrücken und auf diese Weise die Genexpression negativ kontrollieren. Eine Assoziation dieser Untereinheiten mit Proteinen, die Koaktivatoren an den Promotor rekrutieren, eine Heterodimerisierung mit transkriptionell aktiven NF- κ B-Proteinen wie p65 oder ein Austausch dieser transkriptionell inaktiven gegen transkriptionell aktive NF- κ B-Dimere führt wiederum zu einer positiven Regulation der NF- κ B-Zielgene (Hayden und Ghosh, 2008). Die Expression von NF- κ B-Zielgenen wird außerdem durch zusätzliche Bindung von Koaktivatoren oder Korepressoren in deren Promotor- oder Enhancerregion reguliert.

1.2 Inhibitoren von NF- κ B: Die I κ B-Proteine

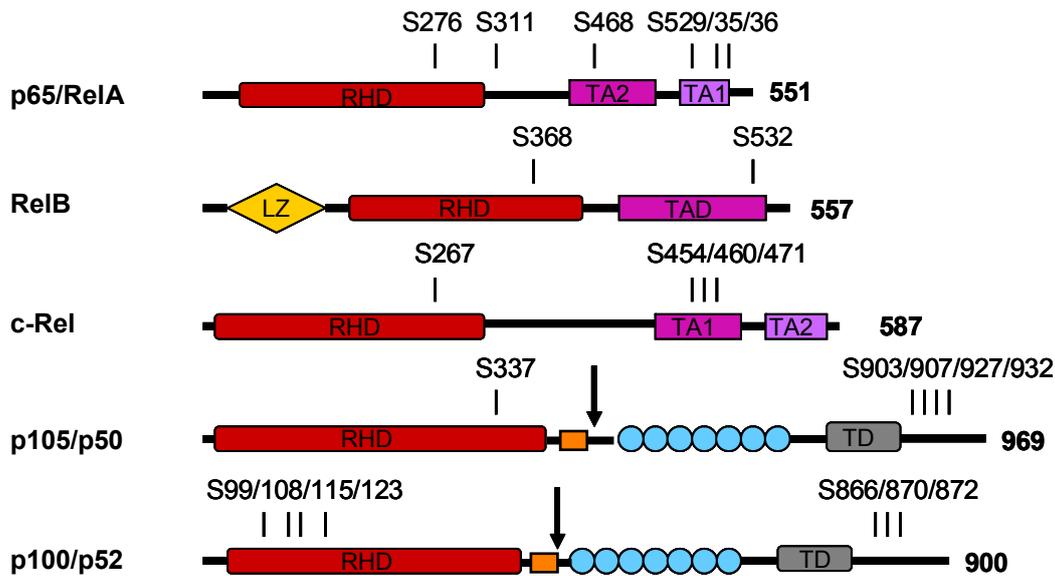
Die Aktivität von NF- κ B wird durch Assoziation mit I κ B-Proteinen reguliert. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie zeichnen sich durch fünf bis sieben Ankyrinwiederholungen (*ankyrin repeats*, AR) am C-Terminus aus, die sich in Form verlängerter Zylinder zusammenlagern und mit der RHD der NF- κ B-Proteine interagieren.

Zur Familie der I κ B-Proteine gehören acht Mitglieder, die sich in zwei Klassen unterteilen lassen. Zur ersten Klasse zählen die drei typischen I κ B-Proteine I κ B- α (*NFKBIA*), I κ B- β und I κ B- ϵ sowie I κ B- γ und I κ B- δ , die aus den Vorläuferproteinen p100 bzw. p105 synthetisiert werden. Diese I κ B-Proteine halten die NF- κ B-Proteine in ihrer inaktiven Form im Zytoplasma der Zelle zurück und sind in der Lage, die NF- κ B-Aktivierung signalabhängig zu regulieren. Die zweite Klasse beinhaltet die drei vornehmlich im Zellkern lokalisierten I κ B-Proteine Bcl-3, I κ B_{NS} und I κ B- ζ , welche in der Zelle nicht konstitutiv, sondern induzierbar exprimiert werden (Muta, 2006; Touma et al., 2007; Hayden und Ghosh, 2008). Sie fungieren als zusätzliche Kontrollinstanz der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B in Abhängigkeit von den Zielgenen.

1.2.1 Die zytoplasmatischen I κ B-Proteine

Die drei typischen I κ B-Proteine, I κ B- α , I κ B- β und I κ B- ϵ besitzen am N-Terminus spezifische Serinphosphorylierungsstellen, die für eine proteasomale Degradation wichtig sind, sowie am C-Terminus ein PEST-Motiv, das hauptsächlich im Proteinumsatz involviert ist (Karin, 1999). I κ B- α ist das am intensivsten untersuchte I κ B-Protein, es wird häufig als Prototyp der I κ B-Proteine bezeichnet und reguliert hauptsächlich die Aktivität des klassischen p65/p50 NF- κ B-Heterodimers.

A. Die Familie der NF- κ B-Proteine



B. Die Familie der I κ B-Proteine

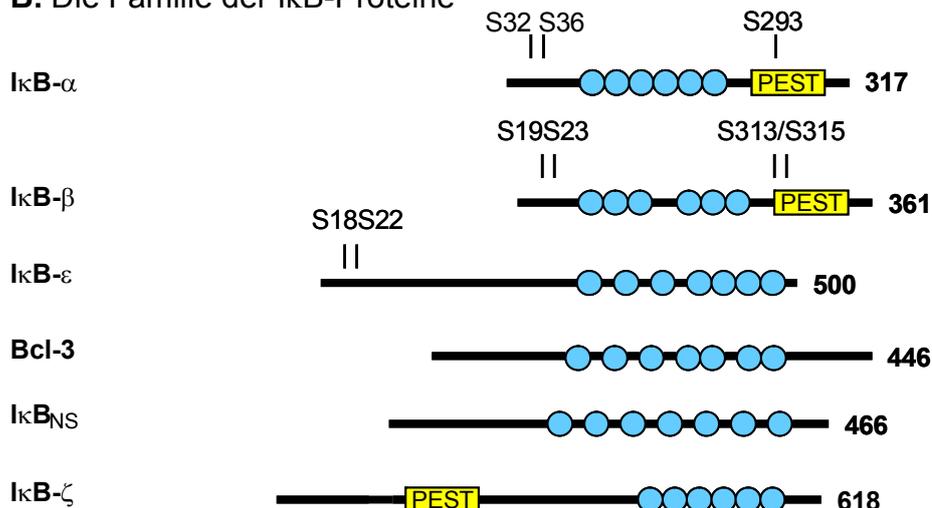


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Mitglieder der NF- κ B und I κ B-Familie

(A) In Säugetierzellen existieren fünf Mitglieder der NF- κ B-Familie. p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) und p52/p100 (NF- κ B2). p50 und p52 werden jeweils aus ihren längeren Vorläuferproteinen synthetisiert. Eine Glycin-reiche Region (GRR, orange) dient als Stoppsignal für die Proteolyse des C-Terminus. Alle NF- κ B-Familienmitglieder haben eine N-terminale Rel-Homologie-Domäne (RHD), die die Dimerisierung, DNA-Bindung und Bindung der I κ B-Proteine vermittelt und die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) beinhaltet. Die Rel-Proteine p65 (RelA), RelB und c-Rel haben zusätzlich eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD). Die p65- und c-Rel-TAD ist in TA1 und TA2 unterteilt.

(B) Die Familie der NF- κ B-Inhibitorproteine (I κ Bs) besteht aus den fünf vorwiegend zytoplasmatisch lokalisierten Mitgliedern I κ B- α , I κ B- β , I κ B- ϵ sowie I κ B- γ und I κ B- δ , die aus den C-terminalen Bereichen von p105 und p100 entstehen, und den drei nukleären I κ B-Familienmitgliedern Bcl-3, I κ B_{NS} und I κ B- ζ . Die I κ B-Proteine haben in ihrem C-Terminus Ankyrinwiederholungsdomänen (ARD, blau), die zur Bindung der NF- κ B-Proteine dienen.

Es sind generelle Strukturmerkmale dargestellt, die Anzahl der AS jedes Proteins ist rechts angegeben. LZ: Leuzin-Reißverschluss (leucin zipper); PEST: Prolin (P)-, Glutamat (E)-, Serin (S)- und Threonin (T)-reiche Domäne; S: Serinphosphorylierungsstelle; TD: zur Todesdomäne homologe Region.

Durch Interaktion der Ankyrinwiederholungsdomäne (*ankyrin repeat domain*, ARD) von I κ B- α mit dem p50/p65-Heterodimer ändert sich die Konformation der N-terminalen Immunglobulin-ähnlichen Domäne der p65-Untereinheit. Dadurch kann NF- κ B nicht mehr an die DNA binden (Baeuerle, 1998). Kristallographische Untersuchungen der an p65/p50- oder p65/c-Rel- Heterodimere gebundenen I κ B- α - und I κ B- β -Proteine zeigten, dass I κ B- α nur das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) von p65, allerdings nicht von p50 maskiert. Zusammen mit dem nukleären Exportsignal (NES) von I κ B- α und p65 können die I κ B- α /NF- κ B Komplexe sowie freies I κ B- α zwischen Kern und Zytoplasma der Zelle hin und her transportiert werden. Nach Degradation von I κ B- α wird das NLS von p65 freigesetzt und die NF- κ B-Dimere befinden sich hauptsächlich im Kern (Hayden und Ghosh, 2004). I κ B- β maskiert hingegen beide NLS des gebundenen NF- κ B-Dimers. Daher verbleiben NF- κ B/I κ B- β -Komplexe im Gegensatz zu den NF- κ B/I κ B- α -Komplexen ausschließlich im Zytoplasma (Malek et al., 2001). Ist I κ B- α nicht vorhanden, verspätet sich die Termination der NF- κ B-Aktivierung, bleibt aber nicht ganz aus. So haben wahrscheinlich die verschiedenen I κ B-Proteine, I κ B- α , I κ B- β und I κ B- ε , die Funktion der Termination der NF- κ B-Aktivität, allerdings sind sie zeitlich versetzt über unterschiedliche transkriptionelle Aktivierung der Promotoren reguliert (Hoffmann et al., 2002).

I κ B- ε spielt eine selektive Rolle in der Regulation von p65-Homodimeren sowie c-Rel/p65-Heterodimeren (Li und Nabel, 1997; Simeonidis et al., 1997; Whiteside et al., 1997). Die Degradation von I κ B- ε wird wie die von I κ B- α und I κ B- β durch verschiedene NF- κ B-Aktivatoren induziert. Die Aktivierung erfolgt an den konservierten Serinresten im N-Terminus von I κ B- ε , Serin 18 und Serin 22, und führt wie bei I κ B- α und I κ B- β zum proteasomalen Abbau, allerdings mit einer langsameren Kinetik. I κ B- ε hat durch ein NES ebenfalls eine geringe Fähigkeit zum Kern-Zytoplasma-Shuttling, jedoch sind NF- κ B-Komplexe mit I κ B- ε hauptsächlich zytoplasmatisch (Simeonidis et al., 1997; Tam et al., 2000; Lee und Hannink, 2002). Somit hat I κ B- ε höchstwahrscheinlich die Funktion, in späteren Phasen die Aktivierung von spezifischen NF- κ B-Zielgenen zu regulieren, deren Promotoren durch NF- κ B-Komplexe reguliert werden, die ausschließlich p65- und/oder c-Rel-Proteine enthalten.

I κ B- γ entspricht der C-terminalen Domäne von p105 und wird durch die mRNA eines internen intronischen Promotors des *nfkb1*-Gens kodiert. I κ B- γ inhibiert höchstwahrscheinlich nur das p50- und p52-Homodimer, sein Vorkommen scheint auf murine B-Zellen beschränkt zu sein (Baldwin, 1996; Ghosh et al., 1998). Die Funktion von I κ B- γ ist bis heute noch unklar (Inoue et al., 1992; Ghosh et al., 1998; Hayden und Ghosh, 2008). p105 wird nicht wie die übrigen I κ B-Proteine durch das Proteasom degradiert,

sondern unterliegt höchstwahrscheinlich einer konstitutiven Prozessierung (Hayden und Ghosh, 2004; Schmitz et al., 2004).

Ähnlich p105 entspricht die C-terminale Domäne von p100 dem I κ B- δ -Protein, das als ein spezifischer Inhibitor des RelB/p52-Heterodimers fungiert (Dobrzanski et al., 1995).

1.2.2 Die nukleären I κ B-Proteine

Im Gegensatz zu den klassischen I κ B-Proteinen sind Bcl-3, I κ B_{NS} und I κ B- ζ im Zellkern lokalisiert. Bcl-3 unterscheidet sich von den übrigen I κ B-Proteinen durch seine N-terminalen prolinreichen und C-terminalen serin/prolinreichen Sequenzen, die der Transkriptionsaktivierung der durch p50- oder p52-Homodimere vermittelten Genexpression dienen (Baeuerle und Baltimore, 1996). Bcl-3 nimmt eine Sonderstellung in der Familie der I κ B-Proteine ein, da es sowohl in der Lage ist, mit inhibitorischen p50- und p52-Homo- oder -Heterodimeren zu interagieren und sie von den κ B-Sequenzen zu entfernen (Hatada et al., 1992; Kerr et al., 1992; Franzoso et al., 1993; Naumann et al., 1993), als auch transkriptionell aktive Komplexe mit den beiden Homodimeren zu bilden (Bours et al., 1993; Fujita et al., 1993). Auf der anderen Seite stabilisiert Bcl-3 inhibitorische p50-Homodimere an den κ B-Bindungsstellen und verhindert auf diese Weise die Bindung von NF- κ B-Dimeren, die eine TAD besitzen (Carmody et al., 2007). Die Vielseitigkeit der Bcl-3-vermittelten Genregulation wird zudem durch Interaktion mit transkriptionellen Aktivatoren (Dechend et al., 1999) sowie Repressoren vermittelt (Viatour et al., 2004a). Auch Bcl-3 alleine kann eine Reihe von NF- κ B-Zielgenen aktivieren (Leung et al., 2004).

I κ B_{NS} hat sieben AR und wurde im Jahre 2002 bei der negativen Selektion von murinen Thymozyten identifiziert (Fiorini et al., 2002). Dieses Protein reguliert verschiedene NF- κ B-kontrollierte Zytokinpromotoren (Kuwata et al., 2006; Touma et al., 2007), inhibiert die Induktion von *Toll Like* Rezeptor (TLR)-abhängigen Genen und verändert somit die NF- κ B-regulierte Immunantwort (Hirota et al., 2005). I κ B_{NS} kann entweder direkt mit verschiedenen NF- κ B-Proteinen interagieren oder verhindert bzw. terminiert die NF- κ B-Aktivität an spezifischen Genpromotoren.

I κ B- ζ hingegen fungiert als positiver Regulator inflammatorischer Prozesse und ist daher wahrscheinlich ein Gegenspieler von I κ B_{NS}. I κ B- ζ wurde im November 2000 in der Maus identifiziert. Es wird abhängig von den induzierenden Stimuli auch als *molecule possessing ankyrin repeats induced by lipopolysaccharide* (MAIL) oder *interleukin (IL)-1 inducible nuclear ankyrin-repeat protein* (INAP) bezeichnet (Kitamura et al., 2000; Haruta et al., 2001; Yamazaki et al., 2001). I κ B- ζ besitzt sechs AR am C-Terminus, die zu den konservierten Domänen der I κ B-Proteine zählen. Hierdurch und aufgrund weiterer Sequenzhomologien, insbesondere mit Bcl-3 und I κ B_{NS}, aber auch mit anderen I κ B-

Proteinen, lässt sich I κ B- ζ in die Familie der I κ B-Proteine einordnen (Haruta et al., 2001). Am N-Terminus von I κ B- ζ befinden sich eine PEST- sowie eine Transaktivierungsdomäne und ein NLS, durch das I κ B- ζ nach seiner Synthese sofort in den Zellkern gelangt (Motoyama et al., 2004). I κ B- ζ interagiert präferentiell mit der NF- κ B Untereinheit p50 (Yamazaki et al., 2001).

In der Promotorregion des *MAIL*-Gens befindet sich eine TATA-Box und verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie NF-IL6 und NF- κ B (Shiina et al., 2001). Durch alternatives Spleißen des Gens entstehen zwei verschiedene I κ B- ζ -mRNAs: I κ B- ζ (L) und die verkürzte Spleißvariante I κ B- ζ (S) (Kitamura et al., 2000; Shiina et al., 2001; Yamazaki et al., 2001). Eine weitere Spleißvariante I κ B- ζ (D) mit einer größeren Deletion im zentralen Teil des Gens existiert für das humane I κ B- ζ (Motoyama et al., 2005). Nach Stimulation wird das 85 kDa I κ B- ζ (L)-Protein induziert, wobei zusätzlich eine größere Form erscheint, was auf eine Modifikation des Proteins hinweist. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um eine Phosphorylierung (Yamazaki et al., 2005). Die I κ B- ζ -mRNA wird besonders stark in der Milz, Lunge und den Lymphknoten der Maus exprimiert (Kitamura et al., 2000).

Interessanterweise wird die Expression der murinen I κ B- ζ -mRNA nach Stimulation des IL-1-/TLR-Signalweges (Yamamoto et al., 2004), jedoch nicht des Tumornekrosefaktor (TNF)- α -Signalweges stark induziert, obwohl eine Aktivierung der Transkription des I κ B- ζ -Gens nicht nur durch IL-1 β und LPS, sondern auch durch TNF- α erfolgte. Dies beruht auf einer Stimulus-spezifischen Stabilisierung der I κ B- ζ -mRNA. In Kombination mit IL-17 induziert TNF- α die Expression der I κ B- ζ -mRNA, was auf eine Stabilisierung der I κ B- ζ mRNA durch IL-17 zurückzuführen ist. Somit ist für die Induktion von I κ B- ζ sowohl die Aktivierung von NF- κ B als auch eine Stimulus-spezifische Stabilisierung der I κ B- ζ -mRNA erforderlich (Yamazaki et al., 2005).

Untersuchungen zur physiologischen Funktion von I κ B- ζ gaben Hinweise darauf, dass dieses Protein an der Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt ist, da in I κ B- ζ ^{-/-}-Makrophagen die LPS-induzierte IL-6-Produktion dramatisch herabgesetzt war. Nach Stimulation mit LPS wird I κ B- ζ an die κ B-Bindungsstelle im IL-6-Promotor rekrutiert und kann höchstwahrscheinlich mit der dort bereits gebundenen p50 NF- κ B-Untereinheit die IL-6 Produktion aktivieren und diese auch kontrollieren. Darüber hinaus ist I κ B- ζ essentiell für die Expression zahlreicher weiterer LPS-induzierbarer Gene wie Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor (*Csf2*), IL-12 p40 (*Il12b*), Granulozyten koloniestimulierender Faktor (*Csf3*), *CCAAT enhancer binding protein* (C/EBP)- δ (*Cebpd*) und Endothelin 1 (*Edn 1*) (Yamamoto et al., 2004; Yamazaki et al., 2005). Die transkriptionelle Aktivität wird durch die Aminosäuren 329 bis 402 von I κ B- ζ (L) vermittelt. Interessanterweise zeigte das komplette I κ B- ζ keine Transaktivierungsaktivität, sondern erst nach Koexpression mit einem GAL4-NF-

κ B-Fusionsprotein. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ erst nach Interaktion mit der NF- κ B p50 Untereinheit exprimiert wird (Motoyama et al., 2005).

Des Weiteren konnte eine Beteiligung von I κ B- ζ an der Immunantwort nachgewiesen werden. I κ B- ζ -defiziente Mäuse zeigten vier bis acht Wochen nach der Geburt eine der Neurodermitis ähnelnde Hauterkrankung mit Hautwunden im Bereich der Augen, Gesicht und Hals. Die erkrankten Gewebe zeichneten sich durch eine Infiltration von inflammatorischen Zellen aus, einhergehend mit einem erhöhten Serum IgE-Spiegel, sowie einer erhöhten Expression von Thymus- und Aktivierungs-regulierter Chemokine in den Hautwunden (Shiina et al., 2004). Erst kürzlich wurde I κ B- ζ als selektiver Regulator der angeborenen Immunität beschrieben, da es an verschiedenen Promotoren immunrelevanter Gene die Trimethylierung des Histons H3K4 und die Zusammenlagerung des Präinitiationskomplexes nach der Neuformierung des Nukleosoms selektiv reguliert (Kayama et al., 2008). Zudem wird I κ B- ζ nach Stimulation des B-Zellrezeptors exprimiert und reguliert zusammen mit NF- κ B transkriptionell auch die humorale Immunantwort (Hijioka et al., 2007).

In einem differentiellen Screening mit Apoptose-resistenten und -sensitiven HeLa-Zellen wurde in unserem Institut erstmalig das humane I κ B- ζ identifiziert und strukturell charakterisiert. Es ist in der Lage, mit den NF- κ B-Untereinheiten p65 und p50 zu interagieren und kann die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B inhibieren. Im Gegensatz zu den klassischen I κ B-Proteinen wird I κ B- ζ nach Stimulation in der Zelle nicht abgebaut, sondern erfährt eine starke Induktion seines Transkripts im Gegensatz zum murinen I κ B- ζ durch TNF- α und in Übereinstimmung mit dem murinen I κ B- ζ durch LPS oder IL-1 β , woraufhin es in den Zellkern gelangt und dort in Matrix-Assoziierten Deacetylase (MAD) Körperchen lokalisiert ist. Die I κ B- ζ -mRNA-Expression konnte in verschiedenen Geweben wie Lunge und Leber sowie in Leukozyten nachgewiesen werden und scheint eine Rolle in der Regulation apoptotischer Prozesse zu spielen (Totzke et al., 2006).

Kürzlich wurde eine Beteiligung des humanen I κ B- ζ an inflammatorischen Prozessen beschrieben. Die Expression von NGAL (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), einem siderophoren Bindeprotein, wird spezifisch durch IL-1 β , jedoch nicht durch TNF- α induziert, obwohl beide Zytokine eine Bindung von NF- κ B an den Promotor des Gens induzieren. I κ B- ζ wird bekanntlich ebenfalls spezifisch durch IL-1 β induziert. Es konnte gezeigt werden, dass dieses I κ B- ζ -Protein als Koaktivator für die IL-1 β -spezifische NGAL-Induktion über den NF- κ B-Signalweg erforderlich ist. Des Weiteren reguliert I κ B- ζ im Komplex mit NF- κ B-Proteinen auch die Transkription des humanen β -Defensin 2-Gens, welches ebenso wie NGAL für ein antimikrobielles Protein kodiert. Reporteranalysen zeigten, dass zusätzlich zur NF- κ B-eine flankierende C/EBP-Bindungsstelle in diesen Promotoren essentiell für die I κ B- ζ -vermittelte transkriptionelle Aktivierung ist (Cowland et al., 2006; Matsuo et al., 2007).

1.3 Der Mechanismus der NF- κ B-Aktivierung

Eine Vielzahl von Stimulantien, darunter Zytokine, Infektionserreger und durch Bestrahlung induzierte DNA-Doppelstrangbrüche, führen zu einer schnellen Aktivierung der NF- κ B-Transkriptionsfaktoren. In unstimulierten Zellen liegt NF- κ B gebunden an inhibitorische I κ B-Proteine als inaktiver Komplex im Zytoplasma vor. Eine Aktivierung führt zur Phosphorylierung, Polyubiquitinierung und proteasomalen Degradation der I κ B-Proteine, wodurch NF- κ B aus dem NF- κ B-I κ B-Komplex freigesetzt wird und über ein NLS in den Zellkern gelangen kann.

Neben den zwei Hauptwegen der NF- κ B-Aktivierung, dem klassischen und dem alternativen NF- κ B-Signalweg, die beide auf der Aktivierung eines I κ B-Kinase (IKK)-Komplexes beruhen, existieren weitere Wege der NF- κ B-Aktivierung, deren Mechanismen allerdings noch nicht endgültig erforscht sind.

1.3.1 Der I κ B-Kinase (IKK)-Komplex

Die Induktion der NF- κ B-Antwort verläuft in den meisten Fällen über die Aktivierung des IKK-Komplexes, der aus den beiden katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β (DiDonato et al., 1997; Mercurio et al., 1997; Zandi et al., 1997; Zandi et al., 1998) und der regulatorischen Untereinheit IKK γ besteht (Rothwarf et al., 1998; Yamaoka et al., 1998; Mercurio et al., 1999). Die Identifizierung des Komplexes gelang erstmals 1997, als eine Proteinkinase entdeckt wurde, die spezifisch die Serinreste der N-terminalen regulatorischen Domäne von I κ B phosphoryliert und deren Aktivität durch TNF- α stimulierbar ist (DiDonato et al., 1997; Mercurio et al., 1997). IKK α (85 kDa) und IKK β (87 kDa) zeigen eine Sequenzhomologie von 52%, haben eine Protein-Kinase-Domäne am N-Terminus sowie einen Leucin-Reißverschluss (leucin zipper, LZ) und eine Helix-Schleife-Helix Domäne (helix-loop-helix, HLH) am C-Terminus. Beide Proteine können über die Mutation eines einzelnen Lysinrestes K44 in der ATP-Bindungsstelle inaktiviert werden (Mercurio et al., 1997; Woronicz et al., 1997; Zandi et al., 1997). IKK γ ist ein 48 kDa großes Protein, das auch als *NF- κ B essential modifier* (NEMO) oder IKKAP1 bezeichnet wird. Es besteht aus zwei großen superspiralisierten α -helikalen Regionen (*Coiled coil*, CC) sowie einem LZ und einer C-terminalen Zink-Finger-Domäne. IKK α und IKK β bilden ein Heterodimer über die LZs und assoziieren mit einem Dimer oder Trimer aus der regulatorischen Untereinheit IKK γ (Rothwarf et al., 1998) über die NEMO-Bindungsdomäne (Leu-Asp-Trp-Ser-Trp-Leu) am C-Terminus von IKK α (AS 738-743) und IKK β (AS 737-742). Zur Bindung von IKK α und IKK β

durch IKK γ werden die AS 47-80 in der ersten CC-Domäne benötigt (May et al., 2002; Drew et al., 2007).

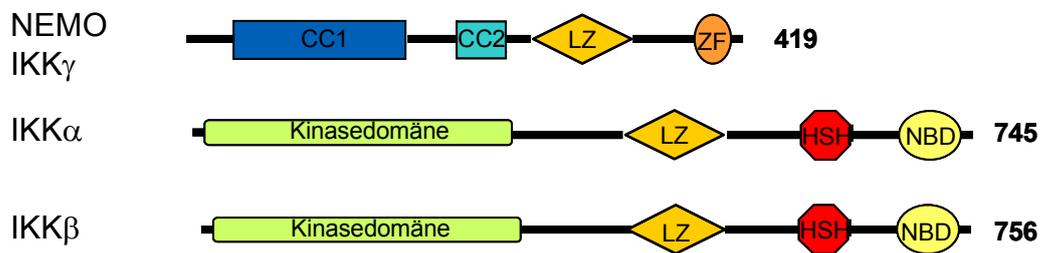


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Familie der IKK-Proteine

Dargestellt sind die drei Hauptuntereinheiten des $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinasekomplexes, die beiden katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β , sowie die regulatorische Untereinheit IKK γ (NEMO). Die strukturellen Merkmale und die Anzahl der AS jedes Proteins (rechts) angegeben. CC: coiled-coil; HSH: Helix-Schleife-Helix-Motiv; LZ: Leuzin-Reißverschluss (leucin zipper); NBD: NEMO-Bindedomäne; ZF: Zinkfingerdomäne.

1.3.2 Der klassische Weg der NF- κ B-Aktivierung

Die Aktivierung des klassischen NF- κ B-Signalweges erfolgt über proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder IL-1 β , Viren, verschiedene TLR-Liganden, wie das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglykane und Lipoproteine Gram-positiver Bakterien, bakterielle Flagelline, doppelsträngige Virus-RNA und Antigenrezeptoren. Nach Aktivierung rekrutieren die Rezeptoren Adaptermoleküle, hierunter TNF-Rezeptor assoziierte Todesdomäne (*TNF receptor-associated death domain*, TRADD) sowie Mitglieder der Familie der Rezeptor-interagierenden Proteine (*receptor interacting proteins*, RIP) an den Rezeptor.

Im nächsten Schritt wird das Signal an den IKK-Komplex weitergegeben. Hierbei wird zunächst IKK γ durch eine E3-Ligase, die abhängig vom Signalweg variiert, K63-abhängig ubiquitiniert (Burns und Martinon, 2004; Chen, 2005; Krappmann und Scheidereit, 2005). Die Ubiquitinierung von IKK γ führt zur Bindung von aktivierenden IKK-Kinasen, die ihrerseits die β -Untereinheit des IKK-Komplexes durch Phosphorylierung der Serinreste S177 und S181 aktivieren. Die wohl am besten untersuchte IKK-Kinase ist die TGF β -aktivierte Kinase (TAK1). TAK1 ist mit den TAK-Bindeproteinen TAB2 und TAB3, die an K63-polyubiquitinierte Proteine binden, assoziiert. Durch Bindung von TAB2 und TAB3 an IKK γ wird TAK1 an den ubiquitinierten IKK-Komplex gebracht (Burns und Martinon, 2004; Chen, 2005; Krappmann und Scheidereit, 2005; Chen et al., 2006).

Die beiden regulatorischen Serine von IKK β sind innerhalb einer Aktivierungsschleife lokalisiert, die einen Teil der Kinasedomäne darstellt (Delhase et al., 1999), die die

verschiedenen I κ B-Proteine an zwei konservierten Serinresten in der N-terminalen regulatorischen Domäne phosphoryliert. Als weitere Komponente des IKK-Komplexes wurde ELKS (Protein reich an Glutamat (E), Leucin (L), Lysin (K) und Serin (S)) identifiziert, die höchstwahrscheinlich eine Interaktion der IKK mit I κ B- α , aber nicht mit I κ B- β , vermittelt (Ducut Sigala et al., 2004). Im humanen I κ B- α werden die Serinreste S32 und S36 phosphoryliert (Brown et al., 1995), die entsprechenden Phosphorylierungsstellen in I κ B- β sind S19 und S23 (Brown et al., 1995; Maniatis, 1997). Die Phosphorylierung dient als Signal für die nachfolgende K43-abhängige Polyubiquitinierung, wodurch I κ B als Ziel für die Proteolyse durch das 26S Proteasom gekennzeichnet wird (Yaron et al., 1997).

Die Polyubiquitinierung der I κ B-Proteine erfolgt über Mitglieder der Skp1-Cullin-Roc1/Rbx1/Hrt-1-F-Box (SCF oder SCRF)-Familie der Ubiquitin-Ligasen in mehreren Schritten in verschiedenen enzymatischen Reaktionen, an deren Beginn das E1 Ubiquitin-aktivierende Enzym in einer ATP-abhängigen Reaktion die Bildung eines energiereichen E1 Ubiquitin-Thioesters katalysiert. Im nächsten Schritt wird das aktivierte Ubiquitin durch Transacylierung auf ein E2 Ubiquitin-konjugierendes Enzym übertragen. Im letzten Schritt wird das Substrat durch Transfer des Ubiquitinmoleküls mit Hilfe der E3 Protein-Ubiquitin-Ligase auf die ϵ -Aminogruppe der Lysinreste markiert. Die Ubiquitinierung von I κ B- α erfolgt an den Lysinen K21 und K22 (Scherer et al., 1995; DiDonato et al., 1996). Für die Proteolyse wird ein weiterer katalytischer Schritt benötigt, die Polymerisierung der Ubiquitin-Kette, die durch das gleiche E2-E3-Paar vermittelt wird, welches das erste Ubiquitin an das I κ B-Protein angelagert hat. Die Polyubiquitin-Kette dient dann als Erkennungsmarker für das 26S Proteasom (Abb. 3).

Da die Ubiquitinierung des N-terminal phosphorylierten I κ Bs eine konstitutive Aktivität darstellt (Yaron et al., 1998), ist der einzige regulatorische Schritt der I κ B-Degradation die Phosphorylierungsreaktion durch den IKK-Komplex (Yaron et al., 1997). Durch die I κ B-Degradation werden die beiden NLSs der Rel/NF- κ B-Untereinheiten freigelegt und der Transkriptionsfaktor ist in der Lage, von seiner inaktiven zytoplasmatischen Lokalisierung in den Kern zu translozieren, wo er die Expression einer Vielzahl von Genen, darunter Zytokine, Wachstumsfaktoren, Akutphase-Proteine, Immunorezeptoren, andere Transkriptionsfaktoren, Zelladhäsionsmoleküle, virale Proteine und Regulatoren der Apoptose, moduliert.

Das Gen, welches für I κ B- α kodiert, enthält selbst eine κ B-Bindungsstelle in seinem Promotor, so dass eine Aktivierung von NF- κ B gleichzeitig auch eine verstärkte Expression von I κ B- α nach sich zieht. Daraus resultiert eine Termination der NF- κ B-vermittelten Genexpression, indem neu synthetisiertes I κ B- α in den Kern transloziert, dort NF- κ B-Dimere von der DNA entfernt und diese zurück ins Zytosol transportiert (Arenzana-Seisdedos et al.,

1997; Sachdev et al., 1998), wodurch der ursprüngliche latent inaktive Zustand wiederhergestellt wird.

1.3.3 Der alternative Weg der NF- κ B-Aktivierung

Der alternative Weg der NF- κ B-Aktivierung, über den hauptsächlich RelB/p52-Dimere generiert werden, ist nur von IKK α -Homodimeren und nicht von IKK β und IKK γ abhängig (Senftleben et al., 2001; Dejardin et al., 2002).

Die Aktivierung der NF- κ B p52-Untereinheit erfolgt über den Lymphotoxin- β -Rezeptor (LT- β -R), *B cell activating factor* (BAFF, Blys), LPS und den CD40-Liganden (CD40L), die auch in der Lage sind, NF- κ B über den klassischen Weg zu aktivieren. Der erste Schritt der Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalweges ist die Phosphorylierung von IKK α an den Serinresten S176 und S180 durch die NF- κ B-induzierende Kinase (Senftleben et al., 2001). NIK phosphoryliert nicht nur IKK α , sondern transportiert diese auch zum p100-Protein (Xiao et al., 2004), wo sie wiederum p100 an den konservierten Serinresten S865 und S869 phosphoryliert, gefolgt von einer Polyubiquitinierung am Lysin K855 durch die Mitglieder der SCRF-Familie der Ubiquitin-Ligasen und anschließender Prozessierung zur p52 NF- κ B-Untereinheit (Fong und Sun, 2002). Hierbei wird nur der C-Terminus von p100 abgebaut, da dieser eine Todesdomäne (TD) enthält, die als inhibitorische Domäne der Prozessierung dient (Xiao et al., 2001). Zusätzlich fungiert eine Glycin-reiche Region (*glycine-rich region*, GRR) im N-Terminus als Stop-Signal für die Proteolyse, so dass aktive p52-NF- κ B-Komplexe freigesetzt werden können (Heusch et al., 1999).

Der alternative Weg der NF- κ B-Aktivierung kann in einigen Zelltypen auch über den Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI3K)-Signalweg aktiviert werden. Die PI3K phosphoryliert die Protein Kinase B (PKB/AKT), die wiederum IKK α am Threoninrest T23 phosphoryliert, was letztendlich zur Freisetzung des RelB-p52-NF- κ B-Heterodimers führt (Gustin et al., 2004; Gustin et al., 2006).

p52 enthaltende NF- κ B-Komplexe aktivieren Gene, die für Chemokine sowie verschiedene Zytokine kodieren oder Einfluss auf die Organbildung lymphoider Organe haben.

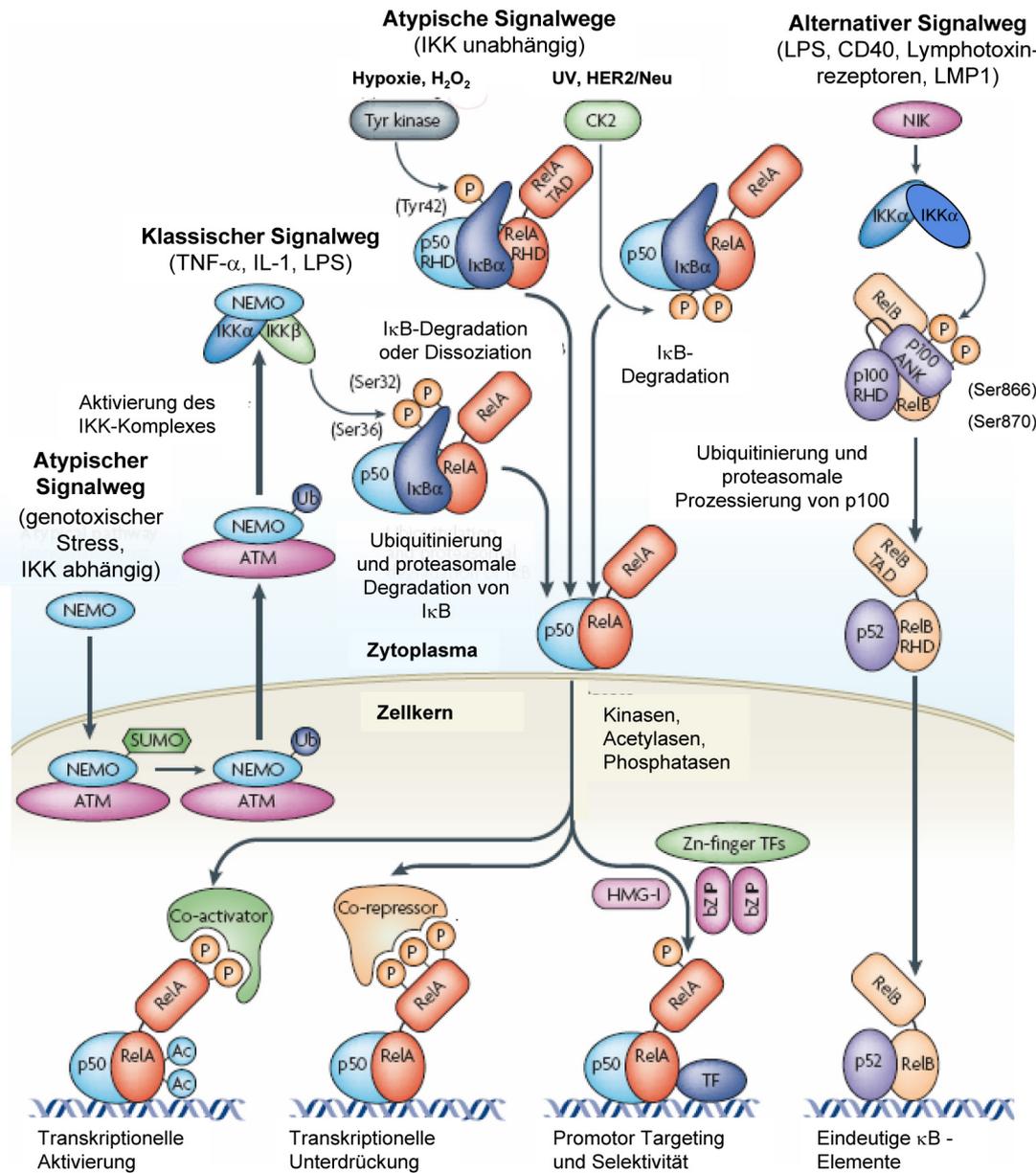


Abbildung 3. Signalwege zur NF-κB-Aktivierung (nach Perkins, 2007)

Der **klassische Signalweg** wird durch TNF-α, IL-1 und andere Stimuli induziert und ist von der IKKβ-Aktivierung abhängig. Dies resultiert in der Phosphorylierung von IκB-α an Ser32 und Ser36 mit darauffolgender Ubiquitinierung und Degradation durch das Proteasom. NF-κB wird freigesetzt und gelangt in den Kern. Im **alternativen NF-κB Signalweg** aktiviert NIK das IKKα-Homodimer. Dies führt zur Phosphorylierung von p100, Prozessierung in p52 und zur Aktivierung von p52-RelB Heterodimeren, die im Zellkern an eindeutige κB-Sequenzen binden. Die Phosphorylierung von NF-κB-Untereinheiten durch nukleäre Kinasen und deren Modifikation durch Acetylasen oder Phosphatasen führt entweder zur Aktivierung oder zur Unterdrückung der Transkription. Durch Interaktionen mit heterologen Transkriptionsfaktoren können NF-κB Dimere an die entsprechenden Promotoren rekrutiert werden. NEMO vermittelt den **atypischen IKK-abhängigen Signalweg** aufgrund von genotoxischem Stress. NEMO gelangt in den Zellkern, wird dort sumoyliert, durch die ATM Kontrollpunkt Kinase phosphoryliert und darauf ubiquitiniert. Zusammen mit der ATM Kontrollpunkt Kinase wandert NEMO wieder ins Zytoplasma zurück, wo die ATM zusammen mit dem Protein ELKS die IKKβ aktiviert. **Atypische IKK-unabhängige Signalwege** werden durch die CK2 oder über Tyrosin-Kinase-abhängige Signalwege vermittelt.

Ac: Acetylierung; bZIP: Leucin-Reißverschluss-enthaltender Transkriptionsfaktor; CK2: Casein Kinase 2; HMG-I: high-mobility-group protein I; I κ B: Inhibitor von κ B; IKK: I κ B-Kinase; LMP1: latentes Membranprotein 1; LPS: Lipopolysaccharid; NF- κ B: Nuklearfaktor- κ B; RHD: Rel-Homologie Domäne; TAD: Transkriptionsaktivierungsdomäne; TF: Transkriptionsfaktor; UV: ultraviolett; Zn-finger TF: Zink-Finger-Domäne enthaltender TF.

1.3.4 Atypische IKK-abhängige Signalwege der NF- κ B-Aktivierung

Die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch genotoxischen Stress, wie DNA-schädigende Reagenzien, erfolgt im Vergleich zu den anderen Signalwegen mit einer verlangsamten Kinetik. IKK γ gelangt in den Zellkern, wo die Lysine K277 und K309 sumoyliert werden. Dies dient als Signal für eine Phosphorylierung von IKK γ am Serin S85 durch die ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*)-Kontrollpunkt-Kinase. Hierauf folgend wird die SUMO-Modifikation durch eine Monoubiquitinierung ersetzt, die den Export des IKK γ -ATM-Komplexes aus dem Zellkern veranlasst. Die ATM-Kontrollpunkt-Kinase aktiviert im Zusammenspiel mit dem IKK-assoziierten Protein ELKS den IKK-Komplex (Huang et al., 2003; Wu et al., 2006).

IKK ϵ , das auch als IKK-i bezeichnet wird, ist eine weitere alternative NF- κ B-Kinase. IKK ϵ phosphoryliert I κ B- α im Gegensatz IKK β nur am Serin 36 und ist an der T-Zellrezeptor vermittelten NF- κ B-Aktivierung beteiligt. IKK ϵ interagiert außerdem mit dem p52-p65-Heterodimer, phosphoryliert p65 in diesem Komplex und ist somit an der späten TNF-Antwort beteiligt (Wietek und O'Neill, 2007).

1.3.5 Atypische IKK-unabhängige NF- κ B-Aktivierung

Der IKK-unabhängige Signalweg der NF- κ B-Aktivierung kann nach DNA-Schädigung infolge von UV-Bestrahlung oder durch Expression des Her2 Onkogens aktiviert werden. Die Casein Kinase 2 (CK2) phosphoryliert in diesem Fall I κ B- α in der PEST-Domäne im Bereich von Ser283 bis Thr299. Nach I κ B- α -Degradation erfolgt die Freisetzung des NF- κ B p50/p65-Heterodimers und dessen Translokation in den Zellkern (Viatour et al., 2005; Perkins, 2007).

In einem weiteren IKK-unabhängigen NF- κ B-Signalweg wird I κ B- α unter anderem nach H₂O₂-Stimulation in einem Tyrosinkinase-abhängigen Signalweg am Tyrosin 42 phosphoryliert und darauf folgend entweder degradiert oder es dissoziiert vom NF- κ B-Dimer, das nun den Zellkern gelangen kann (Viatour et al., 2005; Perkins, 2007).

Ein weiterer Signalweg, der noch nicht genauer untersucht wurde, führt zur Prozessierung des p105/p50-Komplexes, zur Freisetzung des p50-Homodimers und Translokation in den Zellkern, wo es mit Bcl-3 assoziiert (Gilmore, 2006).

1.4 Regulation der NF- κ B vermittelten Genexpression

Zusätzlich zur I κ B-Degradation, die einer der initiiierenden Schritte zur Aktivierung von NF- κ B-Proteinen ist, existieren weitere Mechanismen, die zur vollständigen NF- κ B Aktivierung notwendig sind. Diese Mechanismen können die NF- κ B-Antwort sowohl auf der Ebene der Translation als auch posttranslational regulieren. Hiervon sind nicht nur die NF- κ B-Proteine, sondern auch der IKK-Komplex und die I κ B-Proteine betroffen.

1.4.1 Posttranslationale Modifikation des NF- κ B-Signalweges

Posttranslationale Modifikationen der Proteine des NF- κ B-Signalweges sind ein wesentlicher Bestandteil der NF- κ B-Aktivierung und erforderlich, um entweder die I κ B-Proteine zu inaktivieren oder die NF- κ B-Untereinheiten direkt zu aktivieren. Sie bilden eine Verbindung zwischen den unterschiedlichen NF- κ B-Signalwegen und werden sowohl durch Komponenten des NF- κ B-Signalweges als auch durch Kinasen anderer Signalwege vermittelt. Die regulatorischen Modifikationen erfolgen Stimulus-abhängig und führen unter anderem zu Ubiquitinierung und darauffolgender Degradation, Stabilisierung, Inhibition oder Aktivierung, Erhöhung oder Inhibition der DNA-Bindung sowie zu einer verstärkten Transaktivierungsaktivität. Eine in der NF- κ B-Regulation bedeutende posttranslationale Modifikation ist die Phosphorylierung (Tab. 1), die in den meisten Fällen in der letzten Instanz eine Erhöhung der Transaktivierungsaktivität der NF- κ B-Proteine zur Folge hat.

Tabelle 1: Phosphorylierung von NF- κ B- und I κ B-Proteinen (Viatour et al., 2005; Perkins, 2006)

Substrate	Kinasen	AS-Reste	Effekte	biologische Stimuli
IκB-α	IKK β CK2	S32, S36	proteasomale Degradation	TNF- α , IL-1 β konstitutiv UV
		S293	Destabilisierung	
	S283-T299	Degradation		
IκB-β	Syk	Y42	Degradation	H ₂ O ₂
	IKK β CK2	S19, S23	proteasomale Degradation	TNF- α , IL-1 β
		S313, S315	NF- κ B-Inhibition	
IκB-ϵ p100	IKK β	S18, S22	proteasomale Degradation	TNF- α , IL-1 β CD40, BAFF, Lymphotoxin β
	IKK α	S108, S115, S123, S872	Prozessierung zu p52	
p105	PKAc	S337	erhöhte DNA-Bindung	TNF- α
	IKK β	S927, S932	Prozessierung zu p50	
	Tpl2	indirekt	Prozessierung zu p50	
	GSK 3 β	S903, S907	Stabilisierung	
Bcl-3	GSK 3	S394, S398	proteasomale Degradation	konstitutiv

Substrate	Kinasen	AS-Reste	Effekte	biologische Stimuli
p65/Rel A	PKAc	S276	DNA-Bindung u. Oligomerisierung	LPS
	MSK1/2	S276	erhöhte Transkriptionsaktivität (TA)	TNF- α
		S281	erhöhte TA	
	PKC ζ	S311	erhöhte TA	TNF- α
		T435	erhöhte TA	
	IKK ϵ , IKK β , GSK 3 β	S468	erhöhte TA	
		S468	Regulation der basalen Aktivität	konstitutiv
		S354-S551 4 Bindungsstellen	erhöhte TA	
	Chk1	T505	erhöhte TA	
	CK2	S529	erhöhte TA	TNF- α , IL-1 β
IKK α	S536	erhöhte TA	HTLV-1 Infektion, Lymphotoxin β	
IKK β	S536	erhöhte TA	TNF- α , T-Zell-Kostimulation (CD3/CD28)	
			IL-1 β	
	AKT, TBK1, IKK ϵ , RSK1	S536	erhöhte TA	
RelB		S368	Dimerisierung, p100 Stimulation	
		T84, S552	Degradation	T-Zell-Kostimulation (CD3/CD28)
c-Rel	PKA	S267	nukleäre Lokalisation, erhöhte TA	
		S454, S460	erhöhte TA	
	PI3K/PKC	S471	erhöhte TA	TNF- α
p50	PKAc	T		G-CSF
		S337	erhöhte DNA-Bindung	

Die Acetylierung ist eine weitere wichtige posttranslationale Modifikation, die die Transaktivierungsaktivität der Rel/NF- κ B-Proteine beeinflusst. Deren Acetylierungszustand wird durch Interaktion mit Transkriptions-Koaktivatoren (Histonacetyltransferasen) oder -Korepressoren (Histondeacetylasen) reguliert, die alle Substratspezifität besitzen. Acetylierungen von NF- κ B-Proteinen erhöhen, Deacetylierungen vermindern deren transkriptionelle Aktivität (Calao et al., 2008).

Zu den posttranslationalen Modifikationen der NF- κ B-Proteine zählen des Weiteren Ubiquitinierungen, Sumoylierungen, Nitrosylierungen und Oxydationsreaktionen. Diese Modifikationen erfolgen ebenfalls Stimulus-abhängig und haben ähnliche Effekte wie die beschriebenen Phosphorylierungen.

1.4.2 Translationale Inhibition durch microRNAs

Die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression wird durch kleine, im Schnitt etwa 21 Nukleotide große RNA-Moleküle, die MicroRNAs (miRNA), vermittelt. MiRNAs sind eine Gruppe nicht kodierender RNAs, die die Proteinexpression durch Kontrolle der Translation und Stabilität spezifischer mRNAs beeinflussen. Sie werden zum Großteil zell- und gewebespezifisch exprimiert und haben Einfluss auf Zelllinien- und Organentwicklung sowie die Embryogenese (Zhao und Srivastava, 2007). Fehlregulationen in der miRNA-Expression konnten in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden (Esquela-Kerscher und Slack, 2006).

MiRNAs sind auf unterschiedlichste Weise genomisch organisiert. Sie können intronisch oder exonisch, aber auch über eigene unabhängige Promotoren und Enhancer reguliert werden. Im Zellkern werden zunächst verschiedene Vorläuferstufen der miRNA prozessiert, die dann über einen Dicer- und *RNA induced silencing complex* (RISC)-abhängigen Mechanismus im Zytoplasma in die reife miRNA überführt werden (s. Abb. 4). MiRNAs können ihre Ziel-mRNAs, abhängig von der Stringenz ihrer Bindung, auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Eine genaue Paarung zwischen mRNA und miRNA führt zur Degradation oder Destabilisierung der mRNA, während eine inkomplette Bindung lediglich die Translation inhibiert (Zhao und Srivastava, 2007).

Die Fähigkeit von miRNAs, die Translation von mRNAs zu inhibieren, wurde bereits im Jahre 1993 am Beispiel der lin-4 miRNA von *Caenorhabditis elegans* entdeckt (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Allerdings gelangten diese kleinen RNA-Moleküle erst im Jahr 2000 durch die Erkenntnis, dass die Sequenz der let-7 miRNA von Würmern bis in das Genom von Säugetieren konserviert ist, in den Fokus der Wissenschaft (Zhao und Srivastava, 2007). Da die Bedeutung von miRNAs für die Expression von Proteinen noch nicht so lange bekannt ist, ist auch der Einfluss von miRNAs auf die NF- κ B-Regulation zum jetzigen Zeitpunkt nicht endgültig erforscht. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Expression der miR-146a durch LPS, aber auch in geringen Mengen durch IL-1 β und TNF- α NF- κ B-abhängig induziert wird. Die Induktion dieser miRNA wird durch eine NF- κ B-Bindungsstelle im Promotor reguliert. Die miR-146a wiederum kontrolliert die NF- κ B-Aktivierung durch die Inhibition der Translation von IRAK1 (*interleukin-1 receptor associated kinase 1*) und TRAF6 über einen negativen Rückkopplungsmechanismus (Taganov et al., 2006). Zwei weitere miRNAs, miR-125b und miR-155 werden LPS- und TNF- α -abhängig und

höchstwahrscheinlich auch in Abhängigkeit von NF- κ B reguliert. Während die Expression der miR-155 induziert wird, erfolgt eine Herunterregulierung der miR-125b-Expression. Eine

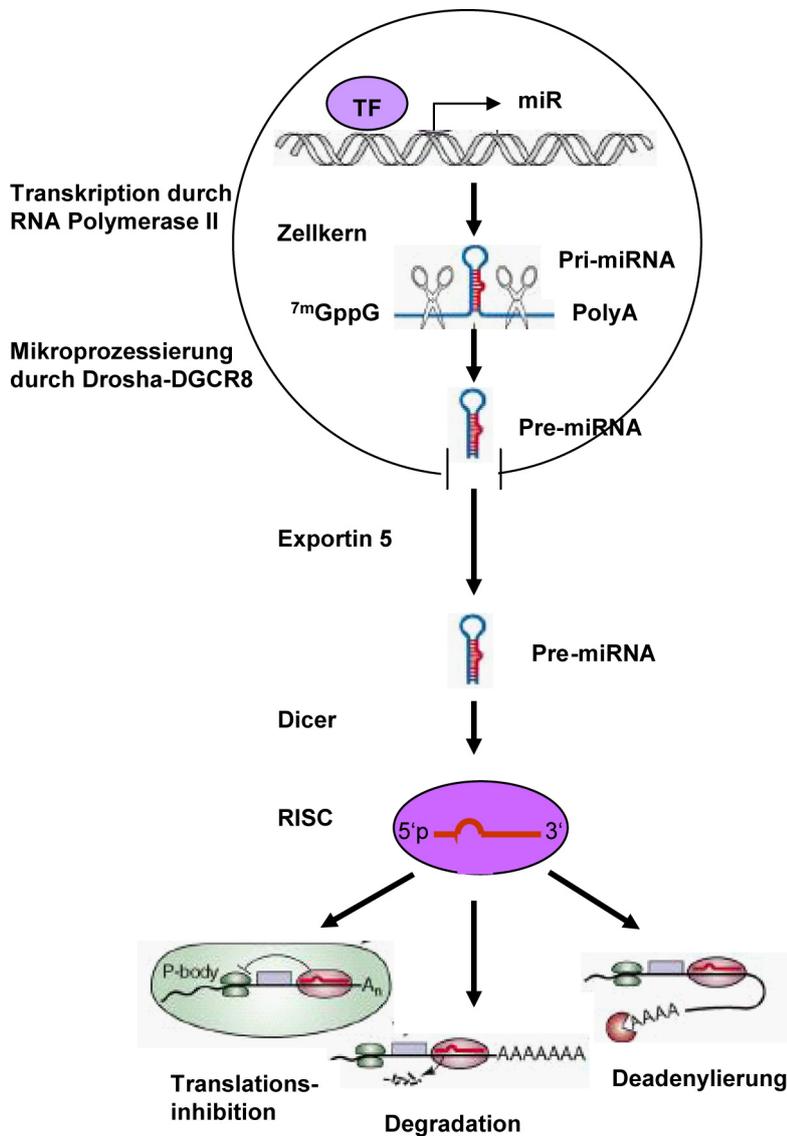


Abbildung 4. Modell der miRNA-Biogenese und -Funktion (nach Zhao und Srivastava, 2007)

Die initiale RNA wird durch die RNA-Polymerase II als primäre miRNA (Pri-miRNA) transkribiert. Sie kann einige hundert bis zu tausend Nucleotide (nt) lang sein. Die pri-miRNA einer jeden miRNA hat eine spezifische Schleifenstruktur, die von der Ribonuklease III (RNase III) Drosha im Zellkern erkannt und gespalten wird. Für die Spaltung wird der Proteinpartner DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene*), der eine doppelsträngige RNA-Bindedomäne (dsRBD) besitzt, benötigt. Das Produkt ist eine ~70 nt lange Vorläufer-miRNA (pre-miRNA), die durch Exportin-5 ins Zytoplasma transportiert wird. Im Zytoplasma prozessiert die RNase III Dicer zusammen mit dem dsRBD Proteinpartner *trans-activation response RNA-binding protein* (TRBP) und dem PKR-activating protein (PACT) die Pre-miRNA in die reife doppelsträngige miRNA (~21 nt). Die reife miRNA wird durch die Helikase entwunden und als einzelsträngiges Molekül in den *RNA induced silencing complex* (RISC) eingelagert. Dort kann die mRNA-Translation unterdrückt werden oder die mRNA-Transkripte durch Deadenylierung oder Spaltung destabilisiert werden.

Überexpression der miR-155 inhibiert die Translation verschiedener Proteine des LPS-Signalweges, hierunter FADD, IKK ϵ und die Rezeptor-interagierende Serin-Threonin Kinase 1 (Ripk1) und sorgt auf diese Weise für eine Kontrolle der LPS-Antwort. Die mir-125b inhibiert hingegen die TNF- α -Expression in unstimulierten Zellen (Taganov et al., 2006; Tili et al., 2007).

1.5 Aktivatoren und Zielgene von NF- κ B

Die große Anzahl der Zielgene und Aktivatoren des Transkriptionsfaktors NF- κ B macht deutlich, dass eine strikte Kontrolle der NF- κ B-Aktivität von großer Bedeutung ist. Waren im Jahre 1999 für den Transkriptionsfaktor NF- κ B der Vertebraten über 150

verschiedene Stimuli und über 150 Gene bekannt, die unter seinem regulatorischen Einfluss standen (Pahl, 1999), hat sich die Liste der Aktivatoren und Zielgene bis zum heutigen Datum stark erweitert (Gilmore, 2008). NF- κ B wurde häufig als „zentraler Mediator der humanen Immunantwort“ bezeichnet, da er von einer Vielzahl von Bakterien und Viren oder deren Produkten aktiviert werden kann. Viele Proteine, die durch NF- κ B-Zielgene kodiert werden, sind an der Immunabwehr beteiligt. Dazu zählen über 50 Zyto- und Chemokine sowie deren Modulatoren, immunrelevante Rezeptoren wie MHC-Moleküle, Akut-Phase-Proteine, Proteine der Antigenpräsentation sowie Rezeptoren für die Adhäsion neutrophiler Granulozyten und deren Transmigration durch Blutgefäßwände. NF- κ B ist jedoch auch an der Transkriptionskontrolle von Genen beteiligt, deren Funktion über die unmittelbare Immunantwort hinausgeht, und es existiert eine Vielzahl von Stimuli, die nicht viralen oder bakteriellen Ursprungs sind (Gilmore, 2008).

Da NF- κ B sowohl durch physiologischen und physikalischen als auch oxidativen Stress induziert werden kann, wäre „zentraler Regulator der Stressantwort“ eine treffendere Bezeichnung (Pahl, 1999). Zu den durch NF- κ B aktivierten Genen, die für die humane Stressantwort verantwortlich sind, zählen unter anderem Stickstoffoxyd synthase (Geller et al., 1993), Mangansuperoxiddismutase (Das et al., 1995), Cyclooxygenase 2 (Yamamoto et al., 1995) und Cu/Zn-Superoxiddismutase (Rojo et al., 2004).

Zellulärer Stress kann in seiner ausgeprägtesten Form zu Apoptose führen. In verschiedenen Zelltypen hat NF- κ B sowohl Einfluss auf pro- als auch anti-apoptotische Prozesse (Barkett und Gilmore, 1999). In den meisten Zelltypen kommt es allerdings zu einer Unterdrückung der pro-apoptotischen Prozesse. Die Kopplung eines Faktors des Stressgeschehens mit einem anti-apoptotischen Signalweg könnte dafür sorgen, dass die Zellen im Zuge der generalisierten Stressantwort nicht zugrunde gehen und NF- κ B daher das Überleben der Zelle garantiert. Da manche Mitogene und Wachstumsfaktoren zu einer Stimulation von NF- κ B führen und deren Gene teilweise über einen autokrinen Loop transaktiviert werden, kommt NF- κ B wahrscheinlich sogar eine allgemeinere Bedeutung innerhalb des Zellüberlebens zu (Pahl, 1999).

Neben diesen zentralen Funktionen von NF- κ B wurde eine Reihe weiterer Funktionen postuliert. Zielgene wie Laminin, Kollagenase oder Gelatinase legen eine Beteiligung an der Regulation der Zellstruktur nahe, während Gene wie Cyclin D1 (Guttridge et al., 1999; Hinz et al., 1999; Toualbi-Abed et al., 2008), D2 (Huang et al., 2001; Schneider et al., 2006; Iwanaga et al., 2008) und D3 (Wang et al., 1996) sowie Skp2 (Schneider et al., 2006) eine Rolle in der Zellzyklusprogression implizieren.

NF- κ B kann auch die Transkription anderer Transkriptionsfaktoren, wie das Proto-Onkogen c-myc (Duyao et al., 1990) und den Tumorsuppressor p53 (Wu und Lozano, 1994)

induzieren. Daher kann die initiale NF- κ B-Aktivierung indirekt die Transkription von einer viel größeren Anzahl als 150 Zielgenen induzieren.

1.6 Spezifität der NF- κ B vermittelten Genexpression

Es existieren viele Regulationsmechanismen der NF- κ B-Antwort, um die Selektivität und Spezifität der Aktivierung der NF- κ B-Zielgene zu gewährleisten (Pahl, 1999). Ziel dieser Mechanismen ist, auf die Aktivierung von NF- κ B nicht mit der Expression der gesamten Bandbreite von Zielgenen zu antworten, sondern die Expression auf einzelne Gene zu beschränken.

Eine der Regulationsebenen stellt die Transkriptionskontrolle der NF- κ B-Zielgene durch selektive Aktivierung der verschiedenen Rel/NF- κ B-Dimere dar, da diese unterschiedliche DNA-Bindungssequenzen bevorzugen (Kunsch et al., 1992). Des Weiteren regulieren verschiedene Signalwege die Bildung bestimmter Rel/NF- κ B-Homo- und Heterodimere, wodurch sich die Spezifität für die Aktivierung von NF- κ B-Zielgenen erhöht.

Eine differentielle NF- κ B-Aktivierung wird durch I κ B-Proteine vermittelt, die stimulus- und zelltypabhängig degradiert werden. Die verschiedenen I κ B-Familienmitglieder interagieren nur mit bestimmten NF- κ B-Komplexen, so dass durch eine spezifische Degradation der I κ B-Proteine nur bestimmte NF- κ B-Dimere in den Kern gelangen können. Da die I κ B-Proteine zudem unterschiedlichen Degradationskinetiken unterliegen, resultiert hieraus auch eine Kontrolle der NF- κ B-Aktivierungsdauer.

Der Zelltyp, der Ziel der NF- κ B-Aktivierung ist, bildet einen weiteren Selektionsmechanismus. Nicht alle Zelltypen tragen den dem Stimulus entsprechenden Rezeptor oder besitzen die Signaltransduktionsmoleküle, um auf die gesamte Bandbreite der NF- κ B-induzierenden Stimuli zu reagieren (Karin, 1999).

Neben diesen Kontrollmechanismen existiert ein weiterer Selektionsmechanismus, über den die Aktivierung von NF- κ B-Zielgenen auf genomischer Ebene reguliert wird. Er wird als „kombinatorische Antwort der Promotor- und Enhancerregionen“ bezeichnet (Pahl, 1999). In den Promotor- und Enhancerregionen verschiedener Zielgene befinden sich mehrere „Response Elemente“ für verschiedene Transkriptionsfaktoren. Es müssen mehrere Transkriptionsfaktoren in der Promotor-/Enhancerregion des Zielgens binden, um die Transkription dieses Gens zu aktivieren. Das adäquate Signal, das zur Transaktivierung eines Gens führt, stellt daher ein spezifisches Muster von Transkriptionsfaktoren dar. Dieses Muster ist das Ergebnis der Integration aller eintreffenden Signale und gewährleistet so ein hohes Maß an Selektivität. Des Weiteren sind die Promotoren NF- κ B-regulierter Gene für Transkriptionsfaktoren unterschiedlich gut zugänglich. Während einige Promotoren konstitutiv und sofort zugänglich sind (*constitutive and immediately accessible*, CIA), muss

das Chromatin an anderen Promotoren zunächst Stimulus-spezifisch modifiziert werden (*regulated and late accessibility*, RLA). Mittlerweile sind unterschiedliche Proteinkomplexe bekannt, die die Expression inflammatorischer Gene durch Veränderung der Chromatinstruktur regulieren (Hayden und Ghosh, 2008).

Eine Feinmodulation der transkriptionellen Aktivität lässt sich über die Interaktion mit Transkriptions-Koaktivatoren oder -Korepressoren, die Wechselwirkung mit Bestandteilen der basalen Transkriptionsmaschinerie und über den Phosphorylierungsstatus der Rel/NF- κ B-Moleküle erreichen. Die Hyperphosphorylierung der p50-Untereinheit an Serinresten, erhöht die Stabilität der p50-DNA-Interaktion (Li et al., 1994), während eine Hypophosphorylierung zu einer Instabilisierung führt (Kushner und Ricciardi, 1999). Der Effekt der Hyperphosphorylierung konnte auch für die NF- κ B-Proteine p65 und c-Rel nachgewiesen werden, deren Phosphorylierung durch die PKA zu einer erhöhten DNA-Bindungsaktivität führt (Mosialos und Gilmore, 1993; Neumann et al., 1995). p65 wird durch eine große Anzahl an Kinasen phosphoryliert (unter 1.4.2 beschrieben), wodurch das Transaktivierungspotential erhöht wird. Diese Phosphorylierung ermöglicht die Bindung des transkriptionellen Koaktivators CBP/p300 mit darauf folgender Acetylierung von p65 und Zielgenaktivierung. In unstimulierten Zellen reguliert das inhibitorische p50-Homodimer zusammen mit dem SMRT (*silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*)-HDAC-3-Komplex die Expression an klassischen κ B-Promotoren. Nach TNF-Stimulation wird der inhibitorische Komplex von der DNA gelöst und durch ein aktivierendes p65-p50-Heterodimer ersetzt. In Assoziation mit SMRT und der Histonacetyltransferase p300 wird die p65-Untereinheit acetyliert und erst daraufhin das NF- κ B-Zielgen exprimiert (Hoberg et al., 2006).

Wie die Aktivierung der NF- κ B-Proteine ist auch die Termination des Signals über verschiedene Kontrollmechanismen reguliert. Ein wichtiges Zielgen von NF- κ B ist I κ B- α , das direkt nach NF- κ B-Aktivierung synthetisiert wird. I κ B- α entfernt NF- κ B von der DNA, vermittelt dessen Rücktransport ins Zytoplasma und kann so die NF- κ B-Antwort schnell beenden (Zabel und Baeuerle, 1990). Zudem unterdrückt IKK α die NF- κ B-Aktivierung durch beschleunigten Umsatz von p65 und c-Rel und Entfernung dieser Untereinheiten von proinflammatorischen Genpromotoren (Lawrence et al., 2005). Im Zellkern können die NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 durch Ubiquitin-E3-Ligasen wie SOCS1 (*suppressor of cytokine signaling*) ubiquitiniert werden, was zur sofortigen proteasomalen Degradation dieser Proteine führt (Ryo et al., 2003; Natoli und Chiocca, 2008).

Wie diese Übersicht verdeutlicht, erfolgt die Regulation der Transkriptionsaktivität von NF- κ B nicht biphasisch, mit einem inaktiven zytosolischen und einem aktiven nukleären Transkriptionsfaktor, sondern über eine Vielzahl von Regulationsstufen, die die Spezifität der NF- κ B-Antwort gewährleisten.

1.7. Relevanz von NF- κ B

Durch Untersuchungen an transgenen und Knockout-Mäusen konnten die physiologischen Funktionen einzelner Komponenten des NF- κ B-Signalweges nachgewiesen werden. Der Mangel an Molekülen des NF- κ B-Signalweges führt zu starken Immundefekten und ist in vielen Fällen letal. Der Knockout von Bestandteilen des regulatorischen IKK-Komplexes, aber auch der Knockout der NF- κ B-Untereinheit p65 führt zum Tod durch Leberapoptose, während Mäuse mit dem Knockout der NF- κ B-Untereinheiten p50, p52, RelB und c-Rel sowie der I κ B-Proteine in vielen Fällen auch bis zum Erwachsenenalter heranreifen und erst dann aufgrund von Immundefekten sterben oder sogar überlebensfähig sind (Tab. 2).

Tabelle 2: Phänotyp von Knockout-Mäusen des NF- κ B-Signalweges (Li und Verma, 2002)

Mutiertes Genprodukt NF- κ B-Familie	Phänotyp der Knockout-Mäuse
p65 (RelA)	sterben während der Embryogenese an Tag (E)15,5-E16,5; TNF-abhängige Leberapoptose; Defekt in der Aktivierung von Lymphozyten;
NF- κ B1 (p105 und p50)	Überleben bis ins Erwachsenenalter; Defekt in der Aktivierung von Lymphozyten;
NF- κ B2 (p100 und p52)	Überleben bis ins Erwachsenenalter; keine reifen B-Zellen und Defekt in der Aktivierung von Lymphozyten; unterbrochene Milz- und Lymphknotenarchitektur;
RelB	sterben nach der Geburt an der Entzündung vieler Organe; beteiligt an der Entwicklung dendritischer Zellen;
c-Rel	keine Defekte in der Entwicklung; Defekte in der Funktion von Lymphozyten und Makrophagen;
p65 und NF- κ B1	sterben an E 13,5-14,5;
NF- κ B1 und NF- κ B2	sterben nach der Geburt; keine reifen B-Zellen sowie Osteoblasten;
NF- κ B1 und RelB	sterben nach der Geburt aufgrund von Immundefizienz;
IκB-Familie	
I κ B- α	sterben nach der Geburt aufgrund von Immundefizienz, Hautentzündung und Granulozytose; konstitutive NF- κ B-Aktivität in Lymphozyten erhöht, aber nicht in MEFs (<i>mouse embryonic fibroblasts</i>);
I κ B- α und NF- κ B1	abgeschwächter Phänotyp der I κ B- α -Knockout-Mäuse;
I κ B- β -Knockin in I κ B- α -Knockout	stellt Defekte der I κ B- α -Knockout-Mäuse wieder her;
I κ B- ϵ	kein Defekt in der Aktivierung von NF- κ B; keine schweren Immundefekte;
I κ B- ζ	10% lebensfähig; 10 Wochen nach Geburt entwickelt sich eine der Neurodermitis ähnelnde Hauterkrankung mit Infiltration inflammatorischer Zellen in entzündete Gewebe;

Mutiertes Genprodukt	Phänotyp der Knockout-Mäuse
Bcl-3	unterbrochene Milzarchitektur;
NF- κ B1 Δ C (p105)	sterben nach der Geburt aufgrund von Immundefizienz;
NF- κ B2 Δ C (p100)	sterben nach der Geburt aufgrund von Immundefizienz;
IKK Komplexe	
IKK α (IKK1)	Defekte in der Keratinozytendifferenzierung, der Entwicklung von Knochen und Gliedmaßen sowie Neubildung des Brustepithels; keine reifen B-Zellen; beeinträchtigte RANKL (<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>)-induzierte Aktivierung von NF- κ B und NIK-induzierte Prozessierung von p100;
IKK β (IKK2)	sterben an E 13,5-14,5 aufgrund von TNF-abhängiger Leberapoptose; beeinträchtigte NF- κ B-Aktivierung durch IL-1 β , TNF- α und LPS;
IKK α und IKK β	sterben an E 11,5-12,5 aufgrund von TNF-abhängiger Leberapoptose; keine induzierte NF- κ B-Aktivierung in MEFs;
NEMO (IKK γ)	sterben an E 11,5-12,5 aufgrund von TNF-abhängiger Leberapoptose; keine induzierte NF- κ B-Aktivierung in MEFs;

Die Proteine des NF- κ B-Signalweges konnten interessanterweise mit der Entstehung einer Reihe inflammatorischer Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Inhibierung oder verstärkte Aktivierung von NF- κ B-Molekülen in transgenen Mäusen führte zur der Entstehung verschiedener inflammatorischer Erkrankungen hierunter rheumatoide Arthritis, entzündliche Darmerkrankung, Multiple Sklerose sowie Asthma, aber auch zu Krankheiten wie Leberversagen und Diabetes (Li und Verma, 2002; Pasparakis et al., 2006). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B, die I κ B-Proteine sowie der IKK-Komplex spielen zudem eine entscheidende Rolle bei der Entstehung maligner Tumorerkrankungen. Sie regulieren das Zellwachstum, kontrollieren die Apoptose, fördern die Angiogenese, stimulieren die Invasion von Tumoren ins Gewebe sowie die Bildung von Metastasen. Viele hämatologische Tumore zeigen eine erhöhte NF- κ B-Aktivität. In der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) ist die erhöhte NF- κ B Aktivität auf eine erhöhte IKK-Aktivität zurückzuführen. Weitere mit NF- κ B assoziierte hämatologische Tumore sind das Myelodysplastische Syndrom, eine Vorläufererkrankung der AML, die Akute Lymphoblastische Leukämie, HTLV-1 positive Leukämien, B-Zell-Lymphome, Mukosa-assoziiertes lymphoides Gewebe, sowie die chronisch myeloische Leukämie und das multiple Myelom (Kim et al., 2006). Eine durch chromosomale Translokation verursachte Überexpression des *BCL3*-Gens konnte in vielen Tumorarten insbesondere in chronisch lymphozytären B-Zell-Leukämien nachgewiesen werden (Viatour et al., 2004b). Eine erhöhte Expression der NF- κ B-Untereinheit p65 findet sich in vielen massiven Tumoren wie Tumoren der Prostata, der Brust und der Bauchspeicheldrüse sowie bei Melanomen und Adenokarzinomen der Lunge.

Auch viele NF- κ B-regulierte Gene sind mit der Proliferation, der Unterdrückung von Apoptose sowie der Invasion von Tumoren ins Gewebe assoziiert. Die Entstehung von Tumoren wird unter anderem durch Fehlregulationen bei der Expression von Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren vermittelt, was eine unkontrollierte Proliferation der Zellen zur Folge hat. Mutationen in Genen, die für Tumorsuppressorproteine kodieren, können zur Resistenz gegenüber Signalen, die das Zellwachstum inhibieren, führen. Eine erhöhte Expression von Zellzyklusproteinen sowie aktivierende Mutationen in Genen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, steigern das Zellwachstum. So führt zum Beispiel eine Erhöhung der Expression von Cyclin D1 oder des Protoonkogens c-myc zu erhöhter Zellproliferation, eine vermehrte Expression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 oder Bcl-xL sowie Veränderungen im Expressionsverhalten des proapoptotischen Proteins p53 verringern oder unterdrücken die Apoptose (Zhao und Srivastava, 2007). Eine Veränderung im Expressionsmuster von Zelladhäsionsmolekülen und Integrinen steigert die Fähigkeit von Zellen zur lokalen Gewebeinvasion, aber auch zur Metastasenbildung (Kim et al., 2006).

Auf Grund dieser Erkenntnisse spielen NF- κ B-Inhibitoren oder Inhibitoren des NF- κ B-Signalweges bereits eine Rolle in der Tumorthherapie. Eine Inhibierung von NF- κ B allein oder in Verbindung mit einer Tumorbehandlung führt zum Tod von Tumorzellen oder verhindert das Tumorwachstum. In der Chemotherapie werden zur Behandlung von Tumorerkrankungen, die mit erhöhter NF- κ B-Aktivität assoziiert sind, Inhibitoren des NF- κ B-Signalweges verwendet. Der IKK-Inhibitor PS-1145 wird zur Behandlung von Untergruppen diffuser großer B-Zell-Lymphome, die mit einer erhöhten NF- κ B-Aktivität einhergehen, eingesetzt. Viele Proteasominhibitoren zeigten *in vitro* die Fähigkeit, das Tumorwachstum einzuschränken. Hierzu zählt der Proteasominhibitor PS-341, der das Tumorwachstum inhibiert und zusätzlich Apoptose in Glioblastomzelllinien basierend auf einer Verminderung der Bcl-2- und Bcl-xL-Aktivität induziert. Proteasominhibitoren werden unter anderem zur Therapie des Multiplen Myeloms eingesetzt. Weitere NF- κ B-Inhibitoren wie Curcumin oder IKK-Inhibitoren wie BAY 11-7082 oder AS6022868 sind in der Lage, das Tumorwachstum zu inhibieren und Apoptose in unterschiedlichen hämatologischen Tumorzelllinien, basierend auf unterschiedlichen molekularen Mechanismen, zu induzieren (Kim et al., 2006). Eine Weiterentwicklung verschiedener Inhibitoren des NF- κ B-Signalweges zur Behandlung von Tumorerkrankungen könnte daher einen erheblichen Fortschritt in der Bekämpfung vieler maligner Tumore bewirken.

Da NF- κ B das Überleben der Zelle vermittelt, kann es im Falle einer Fehlregulation der NF- κ B-Aktivität zum Tod eines Organismus führen. Eine genaue Regulation des NF- κ B-Signalweges ist daher in Bezug auf die richtige Entscheidung zwischen Leben und Tod einer Zelle sehr wichtig.

II. Zielsetzung der Arbeit

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde das neue humane I κ B-Protein I κ B- ζ in unserer Arbeitsgruppe durch ein differentielles Screening von Apoptose-sensitiven und -resistenten Zellen identifiziert. Initiale Studien zeigten, dass I κ B- ζ mit den NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 interagiert und die transkriptionelle Aktivität dieses Transkriptionsfaktors inhibiert. Im Gegensatz zu den klassischen I κ B-Proteinen wird I κ B- ζ , ebenso wie die I κ B-Proteine Bcl-3 und I κ B_{NS}, induzierbar exprimiert und gelangt nach Expression sofort in den Zellkern. Hier ist I κ B- ζ in Matrix-assoziierten Deacetylase-Körperchen lokalisiert (Totzke et al., 2006).

Ziel dieser Arbeit war es, genauere Einblicke in die nukleären Funktionen von I κ B- ζ zu bekommen. Es sollte auf der einen Seite nachgewiesen werden, ob I κ B- ζ einen Einfluss auf die intrazelluläre Signaltransduktion ausübt, auf der anderen Seite sollte gezeigt werden, auf welche Weise die Expression und Aktivität von I κ B- ζ reguliert wird.

Bis auf die NF- κ B-regulierte I κ B- ζ -Expression sind bis zum jetzigen Zeitpunkt keine weiteren Mechanismen bekannt, die die translationale Expression von I κ B- ζ beeinflussen, eine Kontrolle, die insbesondere für Proteine des Zellkerns unverzichtbar ist. Eine sehr aktuelle Form der Expressionskontrolle von Proteinen, ist die Regulation durch kleine, nicht kodierende RNA-Moleküle, die MicroRNAs, die im so genannten RISC an ihre Ziel-mRNA in der 3'UTR binden. Eine Expressionskontrolle des nukleären Proteins I κ B- ζ durch miRNAs ist nicht unwahrscheinlich und sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Um Aufschluss über die Funktionen von I κ B- ζ zu bekommen, war bereits eine Micro-Array-Analyse mit HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) durchgeführt worden, in der unter anderem ein inhibierender Einfluss von I κ B- ζ auf Proteine, die am G2/M-Übergang des Zellzyklus oder an der Mitose selbst beteiligt waren, beobachtet wurde. Auch für andere Proteine des NF- κ B-Signalweges konnte bereits gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, aktiv in die Regulation des Zellzyklus einzugreifen. Aus diesen Gründen sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob und auf welche Weise I κ B- ζ an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist.

Anhand unserer Micro-Array-Analysen wurde gezeigt, dass I κ B- ζ nicht nur inhibierend auf die Genexpression wirkt, sondern, ähnlich wie Bcl-3, auch transkriptionelle Aktivität ausübt. Da darüber hinaus durch eine in unserem Labor durchgeführte Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchung nachgewiesen werden konnte, dass das humane I κ B- ζ eine N-terminale Transaktivierungsdomäne besitzt, sollte diese genauer charakterisiert und die Regulation der I κ B- ζ -Transaktivierungsaktivität insbesondere durch den NF- κ B-Signalweg genauer untersucht werden.

Die Aktivität von Proteinen wird maßgeblich durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst. Da auch für NF- κ B- und I κ B-Proteine eine Vielzahl von Modifikationen, darunter Phosphorylierungen, existiert, über die ihre Aktivität kontrolliert wird und des Weiteren die Transaktivität der NF- κ B-Proteine durch eine Reihe von Kinasen reguliert wird (Viatour et al., 2005; Perkins, 2006), sollte analysiert werden, ob auch I κ B- ζ einer Phosphorylierung unterliegt und ob dessen Transaktivierungsaktivität durch Kinasen beeinflusst wird. Gegebenenfalls sollte die sich daraus ergebende physiologische Konsequenz für die I κ B- ζ -vermittelte Aktivierung von NF- κ B-Zielgenen ermittelt werden.

III. Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und BD (Heidelberg) bezogen.

1.2 Häufig verwendete Puffer:

Lyse-Puffer	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris, pH 7,4
	1% (w/v)	NonidetP-40 (NP-40)
	1 mM	Dithiotreithol (DTT)
	1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
	10 µg/ml	Aprotinin
	10 µg/ml	Leupeptin
	1 µg/ml	Pepstatin
PBS	138 mM	NaCl
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4
	2,7 mM	KCl
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
50x TAE	2 M	Tris
	1 M	Essigsäure
	0,05 M	EDTA, pH 8,5
Probenpuffer reduz.	10% (v/v)	Glycerin
	2% (w/v)	SDS
	62,5 mM	Tris, pH 7,4
	3% (v/v)	β-Mercaptoethanol
	0,25 mg/ml	Bromphenolblau
Laufpuffer (SDS-Page)	25 mM	Tris
	0,192 M	Glycin
	0,1% (w/v)	SDS
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM	Tris
	0,192 M	Glycin
Waschpuffer (Western Blot, PBST)	1x	PBS
	0,2%	Tween-20

Weitere Lösungen sind in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt.

1.3 Biologisches Material

1.3.1 Säugetierzellen

Die Kultivierung eukaryontischer Zellen erfordert sterile Bedingungen, daher wurden alle Arbeiten an speziellen Sterilarbeitsbänken durchgeführt und ausschließlich gammabestrahlte Zellkulturmaterialien verwendet. Alle Zelllinien wurden bei 37°C in 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in einem Inkubator kultiviert. Für die Kultivierung von Phoenix Zellen wurden die Zellkulturschalen mit steriler 0,2% (w/v) Gelatinelösung beschichtet.

Zur Kryokonservierung eukaryontischer Zellen wurde dem entsprechenden Zellkulturmedium 20% (v/v) inaktiviertes fötales Kälberserum (FCS) sowie 10% (v/v) DMSO, eine kryoprotektive Substanz, zugegeben. Die Zellen wurden in einer Dichte von maximal 2-3x10⁷ Zellen/ml in Einfriermedium aufgenommen, zunächst auf -80°C, am darauffolgenden Tag in flüssigem Stickstoff auf -196°C abgekühlt und gelagert.

Zelllinie	Herkunft	Charakteristika	Zusätze	Bezugsquelle
A172	Humane Glioblastomzelllinie			ATCC
BdBak wt	Humane Glioblastomzelllinie, multiform	Bax defizient		Cartron, P.F., Département de Recherches en Cancérologie de Nantes
BeBak wt	Humane Glioblastomzelllinie, multiform	Bax effizient		Cartron, P.F.,
D98-HeLa	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie			Prof Dr. R. Jänicke, Universität Düsseldorf
HEK293	Humane embryonale Nieren-Zelllinie			ATCC
HeLa Tet-On	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie	enthält Tet-On Regulatorplasmid	500 µg/ml G418, Tetracyclin-freies FCS	Prof. Winterhager, Universität Duisburg-Essen
HeLa Tet-On V	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie	enthält Tet-On Regulatorplasmid und pTRE2hyg Leervektor, Induktion mit 2 µg/ml Doxyzyklin 48 h	500 µg/ml G418, 250 µg/ml Hygromycin, Tetrazyklin-freies FCS	

Zelllinie	Herkunft	Charakteristika	Zusätze	Bezugsquelle
HeLa Tet-On I κ B- ζ	Humane Zervixkarzinom- Zelllinie	enthält Tet-On Regulatorplasmid und pTRE2hyg- I κ B- ζ , Induktion mit 2 μ g/ml Doxozyklin 48 h	500 μ g/ml G418, 250 μ g/ml Hygromycin, Tetrazyklin- freies FCS	
HeLa Tet-On H	Humane Zervixkarzinom- Zelllinie	enthält Tet-On Regulatorplasmid und pTRE2hyg- GFP Leervektor, Induktion mit 2 μ g/ml Doxozyklin 48 h	500 μ g/ml G418, 250 μ g/ml Hygromycin, Tetrazyklin- freies FCS	
HeLa Tet-On I	Humane Zervixkarzinom- Zelllinie	enthält Tet-On Regulatorplasmid und pTRE2hyg- GFP-I κ B- ζ , Induktion mit 2 μ g/ml Doxozyklin 48 h	500 μ g/ml G418, 250 μ g/ml Hygromycin, Tetrazyklin- freies FCS	
HeLa Tet-Off	Humane Zervixkarzinom- Zelllinie	enthält Tet-Off Regulatorplasmid		ATCC
HepG2	Humane Leberkarzinom- Zelllinie			ATCC
HT1080	Humane Fibrosarkomzelllinie			ATCC
LN18	Humane Glioblastomzelllinie			ATCC
MEF	Murine embryonale Fibroblasten	Ursprung C57/BL6		Prof. M.L. Schmitz, Universität Gießen
MEF p50 ^{-/-}	Murine embryonale Fibroblasten	p50-defizient		Prof. F. Weih, Leibnitz Institut Jena
MEF p65 ^{-/-}	Murine embryonale Fibroblasten	p65-defizient		Prof. M.L. Schmitz

Zelllinie	Herkunft	Charakteristika	Zusätze	Bezugsquelle
Phoenix	Humane embryonale Nierenzelllinie basierend auf 293T Zellen	enthält Konstrukte, die die Fähigkeit besitzen, virale von den Gag-pol-Genen kodierte Proteine und Hüllproteine für ecotrope und amphotrope Viren zu exprimieren.		Prof. Stephan Ludwig, Universität Münster
T98	Humane Glioblastomzelllinie			ATCC
U87	Humane Glioblastomzelllinie; Astrozytom		1mM Pyruvat (Gibco)	ATCC

Die unterschiedlichen Zelllinien wurden abhängig von der Zelllinie in den Zellkulturmedien DMEM High, DMEM Low oder RPMI 1640 kultiviert und von der Firma PAA bezogen und mit 10% (v/v) FCS (Biowest, Nuaille, Frankreich) bzw. Tetrazyklinfreiem FCS (PAA, Cölbe) und 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin (PAA) supplementiert.

1.3.2 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> Stamm	Genotyp	Verwendung	Bezugsquelle
Top 10 F'	F' { <i>lacI^q</i> , Tn10(Tet ^R)} <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Vermehrung von Plasmiden	Invitrogen (Karlsruhe)
BL21 (DE3)Gold	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>galλ</i> (DE3) <i>endA Hte</i>	Vermehrung von Plasmiden, Expression rekombinanter Proteine	Stratagene (Heidelberg)

Die Bakterien wurden in LB-Medium (10 g/l Trypton/Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, pH 7,2 mit NaOH eingestellt) bei 37°C angezüchtet. Für die Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren 18 g/l Agar hinzugefügt. Zur Selektionierung wurde Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) zugegeben.

1.4 Vektoren

Vektoren, für die keine Bezugsquelle angegeben ist, wurden von mir kloniert.

Name	Verwendungszweck	Charakteristika	Bezugsquelle
pCMV-Tag 4	eukaryontischer Expressionsvektor	C-terminaler FLAG-tag	Stratagene
pCMV-Tag 4-I κ B- ζ	generiert zur Umklonierung von I κ B- ζ in anderen Expressionsvektor	Stop-Codon vor FLAG-tag	
pEGFP-C1	Vektor zur Expression in eukaryontischen Zellen	N-terminale GFP-Markierung	BD Biosciences (Heidelberg)
pEGFP-C1-I κ B- ζ	Expression von I κ B- ζ in eukaryontischen Zellen	I κ B- ζ mit N-terminaler GFP-Markierung	Dr. Gudrun Totzke
pEGFP-C1-I κ B- ζ N-Term	Expression von I κ B- ζ in eukaryontischen Zellen	I κ B- ζ N-Terminus mit N-terminaler GFP-Markierung	Dr. Gudrun Totzke
pEGFP-C1-I κ B- ζ C-Term	Expression von I κ B- ζ in eukaryontischen Zellen	I κ B- ζ C-Terminus mit N-terminaler GFP-Markierung	Dr. Gudrun Totzke
pEGFP-C1-I κ B- ζ T89 \rightarrow A	enthält I κ B- ζ T89 \rightarrow A	exprimiert I κ B- ζ mit N-terminaler GFP-Markierung; Threonin-Arginin-Aminosäureaustausch an Threonin 89	
pEGFP-C1-I κ B- ζ T93 \rightarrow A	enthält I κ B- ζ T93 \rightarrow A	exprimiert I κ B- ζ mit N-terminaler GFP-Markierung; Threonin-Arginin-Aminosäureaustausch an Threonin 93	
pEGFP-C1-I κ B- ζ S211 \rightarrow A	enthält I κ B- ζ S211 \rightarrow A	exprimiert I κ B- ζ mit N-terminaler GFP-Markierung; Threonin-Arginin-Aminosäureaustausch an Serin 211	
pEGFP-C1-I κ B- ζ S219 \rightarrow A	enthält I κ B- ζ S219 \rightarrow A	exprimiert I κ B- ζ mit N-terminaler GFP-Markierung; Serin-Arginin-Aminosäureaustausch an Serin 219	
pCFG5-IEGZ	Retroviraler Vektor, Expression von Proteinen in eukaryontischen Zellen	C-terminale EGFP-Markierung, R-, U5-, 3'LTR-Elemente unter der Kontrolle eines CMV-Promotors, Zeocin- und Ampicillinselektionsmarker	Prof. Stephan Ludwig

Name	Verwendungszweck	Charakteristika	Bezugsquelle
pCFG5-IEGZ-I κ B- ζ	Retroviraler Vektor, Expression von I κ B- ζ in eukaryontischen Zellen	Expression von I κ B- ζ	
pVSV-G	Retroviraler Expressionsvektor	kodiert für das Glykoprotein des vesikulären Stomatitisvirus	Prof. Stephan Ludwig
pGAG-Pol	Retroviraler Expressionsvektor	kodiert für die viralen gruppenspezifischen Antigene und die Enzyme Reverse Transkriptase, Protease und Integrase	Prof. Stephan Ludwig
pTRE2hyg	eukaryontischer Regulationsvektor	exprimiert Gene unter der Kontrolle einer Tetrazyklin-Bindungsstelle in Abhängigkeit von der Tetrazyklinzugabe	Clontech/BD (Heidelberg)
pTRE2hyg-I κ B- ζ	enthält I κ B- ζ Gesamtprotein	exprimiert I κ B- ζ unter der Kontrolle einer Tetrazyklin-Bindungsstelle in Abhängigkeit von der Tetrazyklinzugabe	
pTRE2hyg-GFP	enthält EGFP aus dem Expressionsvektor pEGFP-C1	exprimiert GFP unter der Kontrolle einer Tetrazyklin-Bindungsstelle in Abhängigkeit von der Tetrazyklinzugabe	
pTRE2hyg-GFP-I κ B- ζ	enthält EGFP-I κ B- ζ	Exprimiert I κ B- ζ mit N-terminaler GFP-Markierung unter der Kontrolle einer Tetrazyklin-Bindungsstelle in Abhängigkeit von der Tetrazyklinzugabe	
pCDNA 4-Myc/-His	eukaryontischer Expressionsvektor	CMV-Promotor, Ampicillin- und Zeocinresistenzgene	Invitrogen (Karlsruhe)
pCDNA3-flag	eukaryontischer Expressionsvektor	T7- und CMV-Promotor, Flag-Markierung, Ampicillin- und Neomycinresistenzgen	Invitrogen
pET28a (+)	prokaryontischer Expressionsvektor	Vektor zur Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> ; T7-Promotor; N- und C-terminale His-Markierung;	Novagen/Merck (Darmstadt)
pET28a-I κ B- ζ	enthält I κ B- ζ	exprimiert I κ B- ζ mit N- und C-terminaler His-Markierung	
pET28a-I κ B- ζ T89→A	enthält I κ B- ζ T89→A	exprimiert I κ B- ζ mit N- und C-terminaler His-Markierung; Threonin-Arginin-Aminosäureaustausch an Threonin 89	

Name	Verwendungszweck	Charakteristika	Bezugsquelle
pET28a-I κ B- ζ T93→A	enthält I κ B- ζ T93→A	exprimiert I κ B- ζ mit N- und C-terminaler His-Markierung; Threonin-Arginin-Aminosäureaustausch an Threonin 93	
pET28a-I κ B- ζ S211→A	enthält I κ B- ζ S211→A	exprimiert I κ B- ζ mit N- und C-terminaler His-Markierung; Serin-Arginin-Aminosäureaustausch an Serin 211	
pET28a-I κ B- ζ S219→A	enthält I κ B- ζ S219→A	exprimiert I κ B- ζ mit C- und N-terminaler His-Markierung; Serin-Arginin-Aminosäureaustausch an Serin 219	
pCDNA 4-p50	eukaryontischer Expressionsvektor	exprimiert NF- κ B p50 Untereinheit	Dr. Gudrun Totzke
pCDNA 4-p65	eukaryontischer Expressionsvektor	exprimiert NF- κ B p65 Untereinheit	Dr. Gudrun Totzke
pCDNA 3-RelB	eukaryontischer Expressionsvektor	exprimiert NF- κ B RelB Untereinheit	Gary Bren, Rochester
pCDNA 3-p52	eukaryontischer Expressionsvektor	exprimiert NF- κ B p52 Untereinheit	Prof. D. Krappmann
pCMV-c-Rel	eukaryontischer Expressionsvektor	exprimiert NF- κ B c-Rel Untereinheit	Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff
pCDNA4-IKK α	eukaryontischer Expressionsvektor	exprimiert I κ B-Kinase α mit C-terminaler Myc- und His-Markierung	Dr. Gudrun Totzke
pCDNA4-IKK β	eukaryontischer Expressionsvektor	exprimiert I κ B-Kinase β mit C-terminaler Myc- und His-Markierung	Dr. Gudrun Totzke
pCDNA3-flag-ERK1	eukaryontischer Expressionsvektor	exprimiert ERK1-MAP-Kinase mit Flag-Markierung	Dr. M. Weber, Seattle, USA
pCDNA3-flag-ERK2	eukaryontischer Expressionsvektor	exprimiert ERK1-MAP-Kinase mit Flag-Markierung	Dr. M. Weber
GSK3 β -HA wt	eukaryontischer Expressionsvektor	exprimiert GSK3 β -Kinase mit HA-Markierung	Prof. M.L. Schmitz
pCDNA3.1-ER wt	eukaryontischer Expressionsvektor	exprimiert den Östrogenrezeptor α	Dr. Niederacher, Universität Düsseldorf
pCMV-BD	eukaryontischer Expressionsvektor	exprimiert GAL4-DNA-Bindedomäne	Stratagene
pCMV-BD-I κ B ζ	enthält I κ B- ζ Gesamtprotein	exprimiert I κ B- ζ -GAL4-DNA-Bindedomäne-Fusionsprotein	Dr. Gudrun Totzke

Name	Verwendungszweck	Charakteristika	Bezugsquelle
pCMV-BD-I κ B ζ C-Terminus	enthält I κ B- ζ -C-Terminus	exprimiert C-Terminus (AS 318-618) des I κ B- ζ -Protein fusioniert mit der GAL4-DNA-Bindedomäne	
pCMV-BD-I κ B ζ N-Terminus	enthält I κ B- ζ -N-Terminus	exprimiert N-Terminus (AS 2-317) von I κ B- ζ fusioniert mit der GAL4-DNA-Bindedomäne	
pCMV-BD-I κ B ζ AS 2-176	enthält I κ B- ζ -N-Terminus AS 2-176	exprimiert N-Terminus (AS 2-317) von I κ B- ζ fusioniert mit der GAL4-DNA-Bindedomäne	
pCMV-BD-I κ B ζ AS 177-317	enthält I κ B- ζ -N-Terminus AS 177-317	exprimiert N-Terminus (AS 177-317) von I κ B- ζ fusioniert mit der GAL4-DNA-Bindedomäne	
pCMV-BD-I κ B ζ AS 2-128	enthält I κ B- ζ -N-Terminus AS 2-128	exprimiert N-Terminus (AS 2-128) von I κ B- ζ fusioniert mit der GAL4-DNA-Bindedomäne	
pCMV-BD-I κ B ζ AS 129-247	enthält I κ B- ζ -N-Terminus AS 129-247	exprimiert N-Terminus (AS 129-247) von I κ B- ζ fusioniert mit der GAL4-DNA-Bindedomäne	
pCMV-BD-I κ B ζ AS 248-317	enthält I κ B- ζ -N-Terminus AS 248-317	exprimiert N-Terminus (AS 248-317) von I κ B- ζ fusioniert mit der GAL4-DNA-Bindedomäne	
pRL-TK	Normalisierungsvektor für Luciferase-Reportergentests	exprimiert Renilla-Luciferase	
GAL4-TK-Luc	Reportervektor für Gal4-basierte Luciferase-Reportergentests	GAL4-Bindungsstelle im Thymidin-Kinase Promotor kontrolliert Luciferase-Expression	
GAL 4	eukaryontischer Expressionsvektor	exprimiert GAL 4-DNA-Bindedomäne	Prof. M.L. Schmitz
GAL 4-p50	enthält NF- κ B p50 Untereinheit	exprimiert Fusionsprotein aus GAL4-DNA-Bindedomäne und p50	Prof. M.L. Schmitz
GAL4-p65 1-551	enthält NF- κ B p65 Untereinheit	exprimiert Fusionsprotein aus GAL4-DNA-Bindedomäne und p65	Prof. M.L. Schmitz
GAL4-p65 Δ N	enthält NF- κ B p65 Untereinheit AS 286-550	exprimiert Fusionsprotein aus GAL4-DNA-Bindedomäne und p65	Prof. M.L. Schmitz,
GAL4-p65 Δ C	enthält NF- κ B p65 Untereinheit AS 1-285	Exprimiert Fusionsprotein aus GAL4-DNA-Bindedomäne und p65	Prof. M.L. Schmitz,

Name	Verwendungszweck	Charakteristika	Bezugsquelle
pMIR-Report Luciferase	eukaryontischer Expressionsvektor für miRNA Luciferase-Reportergentests	exprimiert <i>firefly</i> Luciferase unter der Kontrolle eines CMV-Promotor-Terminationssystems	Ambion (Austin, USA)
pMIR-Report Luciferase miR-124a	enthält Sequenz der mir124a-Bindungsstelle in I κ B- ζ mRNA	exprimiert <i>firefly</i> Luciferase unter der Kontrolle der miR-124a Bindungsstelle in I κ B- ζ mRNA	
pMIR-Report Luciferase miR-124a muta	enthält Sequenz der miR-124a Bindungsstelle in I κ B- ζ -mRNA, alle Bindungsstellen für mir124a sind mutiert	exprimiert <i>firefly</i> Luciferase unter der Kontrolle der miR-124a Bindungsstelle in I κ B- ζ mRNA	
pMIR-Report Luciferase miR-124a mutb	enthält Sequenz der mir124a Bindungsstelle in I κ B- ζ Bindungsstelle, 7mer-m8 Sequenz der mir124a-Bindungsstelle ist mutiert	exprimiert <i>firefly</i> Luciferase unter der Kontrolle der miR-124a Bindungsstelle in I κ B- ζ mRNA	
pMIR-Report β -gal Control Plasmid	Kontrollvektor für miRNA Luciferase-Reportergentests	exprimiert β -Galaktosidase	Ambion

1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen oder MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

Name	Sequenz (5' \rightarrow 3')	Verwendung	Besonderheit
CDC25B RT 5'	GAGCAGTTTGCCATCAGAC	RT-PCR	
CDC25B RT 3'	CACTTGCTGTACATGACGAG	RT-PCR	
CDC25C RT 5'	GTCCAGATGTCCCTAGAACTC	RT-PCR	
CDC25C RT 3'	GTGCGATATAGGCCACTTCTG	RT-PCR	
GAPDH 5'	GCCAAAGGGTTCATCATCTC	RT-PCR	
GAPDH 3'	GTAGAGGCAGGGATGTTC	RT-PCR	
GM-CSF 5'	ATGTGGCTGCAGAGCCTGCT	RT-PCR	
GM-CSF 3'	GAACCTGAAGGACTTTCTGC	RT-PCR	
I κ B ζ 5'	GCTAATCCCATGCAGACTTC	RT-PCR	
I κ B ζ 3'	GAACGTGTCACCATCTGCAT	RT-PCR	
IL-1 5'	AAGTACCTGAGCTCGCCAGT	RT-PCR	
IL-1 3'	GCAGGACAGGTACAGATTCT	RT-PCR	

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung	Besonderheit
IL-6 5'	GATTCCAAAGATGTAGCCGC	RT-PCR	
IL-6 3'	GAGAGTAGTGAGGAACAAGC	RT-PCR	
5' 124a Luci	CTAGTCCTGATGTATCTGTACA TAGACCATTTGCCTTATATTGG GCTAAGCCAAATGA	Sense Oligonucleotid miRNA Ligation	
3' 124a Luci 2	AGCTTCATTTGGCTTAGCCCAA TATAAGGCAAATGGTCTATGTA CAGATACATCAGGA	Antisense Oligonukleotid miRNA Ligation	
5' 124a Luci muta	CTAGTCCTGATGTATCTGTACA TAGACCATTCTAACCGTATTGG GCTAAGCCAAATGA	Sense Oligonucleotid miRNA Ligation	
3' 124a Luci muta	AGCTTCATTTGGCTTAGCCCAA TACGGTTAGAATAAGCTTGATA CAGATACATCAGGA	Antisense Oligonukleotid miRNA Ligation	
5' 124a Luci mutb	CTAGTCCTGATGTATCTGTACA TAGACCATTCTAACCGTATTGG GCTAAGCCAAATGA	Sense Oligonucleotid miRNA Ligation	
3' 124a Luci mutb	AGCTTCATTTGGCTTAGCCCAA TACGGTTAGAATGGTCTATGTA CAGATACATCAGGA	Antisense Oligonukleotid miRNA Ligation	
5' IκB-ζ C-Term 530	AAAGAATTCCAACAAATGATAG ACCAGGCT	PCR, Klonierung	EcoRI- Restriktions- schnittstelle
3' pGBKT7- NTerm	TTTGTCGACCTAAAGTGATTC CCTAACTG	PCR, Klonierung	Sall- Restriktionsschn ittstelle, Stop- Kodon
5' pGBKT7-IκB	AAAGAATTCGGGGTTGGCAGG CAGCAGAGA	PCR, Klonierung	EcoRI- Restriktions- schnittstelle
3' AS176	TTTGTCGACCTAGGAGCCCCT GACTTGGAA	PCR, Klonierung	Sall- Restriktions- schnittstelle, Stop-Kodon
5' IκB-ζ-C- Term740	AAAGAATTCAGGGAATCTGAGA ATATTGCT	PCR, Klonierung	EcoRI- Restriktions- schnittstelle
5' AS129	AAAGAATTCCTCGTTCCCTGA ACACAGTT	PCR, Klonierung	EcoRI- Restriktions- schnittstelle
3' AS247	TTTGTCGACCTATTGATCACCA AGAAGGGA	PCR, Klonierung	Sall- Restriktions- schnittstelle, Stop-Kodon

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung	Besonderheit
3' AS128	TTTGTCTGACCTAGCTGCATTCA TTCTTAAT	PCR, Klonierung	Sall- Restriktions- schnittstelle, Stop-Kodon
I κ B- ζ T89>A for	CATTCCCAATTTTTGGCACCAC CTCAAACAC	ortsgerichtete Mutagenese	ersetzt Threonin 89 gegen Alanin
I κ B- ζ T89>A rev	GTGTTTGAGGTGGTGCCAAAA ATTGGGAATG	ortsgerichtete Mutagenese	ersetzt Threonin 89 gegen Alanin
I κ B- ζ T93>A for	GACACCACCTCAAGCACCAAC GCCCGG	ortsgerichtete Mutagenese	ersetzt Threonin 93 gegen Alanin
I κ B- ζ T93>A rev	CCGGGCGTTGGTGCTTGAGGT GGTGTC	ortsgerichtete Mutagenese	ersetzt Threonin 93 gegen Alanin
I κ B- ζ S211>A for	CCAACTCTGGAATACGCTCCTT TTCCCATACC	ortsgerichtete Mutagenese	ersetzt Serin211 gegen Alanin
I κ B- ζ S211>A rev	GGTATGGGAAAAGGAGCGTAT TCCAGAGTTGGG	ortsgerichtete Mutagenese	ersetzt Serin211 gegen Alanin
I κ B- ζ S219>A for	CCCATACCTCCCCAGGCCCCC GCTTATGAAC	ortsgerichtete Mutagenese	ersetzt Serin219 gegen Alanin
I κ B- ζ S219>A rev	G TTCATAAGCGGGGGCCTGGG GAGGTATGGG	ortsgerichtete Mutagenese	ersetzt Serin219 gegen Alanin

1.6 siRNA (kleine interferierende RNA-Moleküle, small interfering RNAs)

Für den siRNA-Knockdown wurden siRNA-Moleküle von der Firma Dharmacon (Bonn) bezogen. Die Firma bietet einen Pool aus vier verschiedenen RNAs an, die gegen die mRNA des Proteins gerichtet sind, dessen Translation inhibiert werden soll.

Es wurden die ON-TARGETplus SMART pool siRNAs gegen die humanen Gene GSK3B (GSK 3 β), MAPK1 (ERK2), MAPK3 (ERK1), PI3CA (PI3 Kinase p110 α), PI3CB (PI3 Kinase p110 β) sowie eine Negativkontroll-siRNA und ein siGlo Green Transfektion Indikator als Transfektionskontrolle verwendet.

1.7 Antikörper

Primäre Antikörper:

Name	Spezies	Verwendung	Referenz
anti-AIM-1	Maus	WB, IF	BD Biosciences (Heidelberg)
anti- β -Actin	Maus	WB	Sigma-Aldrich
anti-CDK6	Maus	WB	Cell Signaling (Danvers, USA)

Name	Spezies	Verwendung	Referenz
anti-Cyclin B1	Kaninchen	WB	Santa Cruz (Heidelberg)
anti-Cyclin E	Maus	WB	BD Biosciences
anti-Flag-Tag	Maus	WB	Stressgen (Michigan, USA)
anti-Flag-Tag	Kaninchen	IP, IF	Sigma-Aldrich
anti-GFP (B-2)	Maus	WB	Santa Cruz
anti-GSK3 β	Maus	WB	BD Biosciences
anti-HA	Kaninchen	IP, IF	MBL (Wobum, USA)
anti-HA	Maus	WB	Upstate (Schwalbach)
anti-phospho- Histon H3 (Ser 10)	Kaninchen monoklonal	WB	Upstate
anti-phospho- Histon H3 (Ser10)-Alexa Fluor 488	Kaninchen	FACS	Cell Lab/Beckmann Coulter (Krefeld)
anti-I κ B- ζ	Maus	WB	Hybridomaüberstand hergestellt in unserem Labor
anti-I κ B- ζ	Kaninchen	IP	Serum immunisierter Kaninchen
anti-IKK α	Kaninchen	WB	Santa Cruz
anti-IKK α/β	Kaninchen	WB	Santa Cruz
anti-Myc-Tag	Kaninchen	IF	Cell Signaling
anti-NF- κ B, p50	Kaninchen	WB	Stressgen
anti-NF- κ B p50 (E-10)	Maus	WB	Santa Cruz
anti-NF- κ B2 p100	Kaninchen	WB	Cell Signaling
anti-NF- κ B p65 (F-6)	Maus	WB	Santa Cruz
anti-NF- κ B p65 (C-20)	Kaninchen	WB	Santa Cruz
anti-p44/p42 MAPK	Kaninchen	WB	Cell Signaling
anti-PI3K p110 α	Maus	WB	BD Biosciences
anti-PI3K p110 β	Kaninchen	WB	Cell Signaling
anti-pSerin	Kaninchen	IP, WB	abcam (Cambridge, UK)
anti-pThreonin Prolin	Maus	IP, WB	Cell Signaling

Sekundäre Antikörper:

Name	Herkunft
<i>goat anti-mouse</i> IgG	BioRad (München)
<i>goat anti-rabbit</i> IgG	BioRad
<i>rabbit anti-goat</i> IgG	Calbiochem (San Diego, USA)
<i>anti-rabbit-Alexa Fluor 594</i>	Molecular Probes (Karlsruhe)

1.8 Enzyme

Es wurden folgende Enzyme verwendet:

Enzyme	Bezugsquelle
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega (Mannheim)
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Eppendorf (Hamburg), Qiagen (Hilden)
Trypsin EDTA Lösung	Gibco BRL/Invitrogen (Karlsruhe)
T4 DNA Ligase	Promega
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase	Promega, MBI Fermentas (St.Leon-Roth)

Die verschiedenen Restriktionsenzyme, inklusive der dazu gehörigen Puffer, wurden von New England Biolabs (Frankfurt/Main), MBI Fermentas und Roche (Penzberg) bezogen.

1.9 Größenmarker

Name	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Gene Ruler 50bp DNA Ladder	DNA Größenmarker	MBI Fermentas
Smartladder	DNA Größenmarker	Eurogentec (Köln)
Page Ruler prestained Protein Ladder	Protein Größenmarker	MBI Fermentas

1.10 Häufig verwendete Reagenzien und Kits

Name	Bezugsquelle
Acrylamid-Bisacrylamid (30:0,8)	BioRad
Dharmafect Duo	Dharmacon (Bonn)
Doxyzyklin	Clontech/BD
Dual-Luciferase-Assay	Promega
ECL Detection Reagent	Amersham Bioscience (Buckinghamshire, UK)
Hygromycin B	Invitrogen
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Immobilin-P Transfer Membran	Millipore
Jet Pei	Polyplus Transfection (Illkirch, Frankreich)
Lipofektamin	Invitrogen
Lipofektamin 2000	Invitrogen
mirVANA microRNA Isolation Kit	Ambion/ABI (Darmstadt)
Plus Reagent	Invitrogen
siPort NeoFX	Ambion
Zeocin	Invitrogen

2. Methoden

2.1 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Die Transformation **chemokompetenter Bakterien** erfolgte mittels Hitzeschock. Hierzu wurde ein 100 µl Aliquot der chemokompetenten Top10F' *E.coli* auf Eis aufgetaut und mit 1-5 µg Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde die Hitzeschocktransformation für 45 sec bei 42°C durchgeführt und die Zellen 2 min auf Eis inkubiert. Zur Induktion der Antibiotikaresistenzgene wurden die Zellen in 900 µl antibiotikafreiem LB-Medium aufgenommen und bei 37°C und 180 rpm (Certomat BS-1, Braun Biotech Int.) 1 Stunde inkubiert. Zur Selektion Transformations-positiver Zellen wurden 50 µl und 200 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum zur Selektion enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Elektrokompetente Bakterienzellen wurden mittels Elektroporation transformiert. Durch Hochspannungspulse werden kurzzeitig Poren in die bakterielle Zellmembran eingebracht, durch die exogene DNA in die Bakterienzelle aufgenommen werden kann (Dower et al., 1988). Für die Transformation wurden 50 µl elektrokompetente Bakterien des Stammes *BL-21 (DE3) Gold* auf Eis aufgetaut und mit 1-5 µg Plasmid-DNA für 10 min auf Eis inkubiert. Die DNA-Bakteriensuspension wurde in eine gekühlte 1 mm Elektroporationsküvette überführt und einem elektrischen Puls von 1,8 kV, 25 µF, 200 Ω ausgesetzt. Die Bakteriensuspension wurde sofort in 950 µl antibiotikafreiem LB-Medium aufgenommen und bei 37°C und 180 rpm (Certomat BS-1, Braun Biotech Int.) 1 Stunde zur Induktion der Antibiotikaresistenzen inkubiert. 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agar, der die der Plasmid-Resistenz entsprechenden Antibiotika enthielt, ausgestrichen und bei 37°C über Nacht auf plasmidtragende Bakterien selektioniert.

2.2 Anlegen einer Glycerin-Stammkultur

Zum Anlegen von Glycerinkulturen wurden 500 µl der entsprechenden Vorkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 angezüchtet, mit 500 µl Glycerinlösung (65% (v/v) Glycerin, 0,1 M MgSO₄, 0,025 M Tris-HCl, pH 8) versetzt, gemischt und bei -80°C eingefroren.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Plasmidpräparationen

Zur analytischen Plasmidpräparation im kleinen Maßstab wurde eine *E.coli*-Einzelkolonie in 5 ml Antibiotika-haltigem LB-Medium inokuliert. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml der ÜNK in einem 1,5 ml ERG bei 14000 rpm und 4°C (5417R, Eppendorf) 5 min abzentrifugiert. Für die Lyse der Bakterienzellen wurden die Puffer aus dem QIAfilter Plasmid

Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer P1 (Resuspensionspuffer: 50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 (Lysepuffer: 200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS) wurde der Ansatz vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur (RT) wurden 350 µl Puffer P3 (Neutralisationspuffer: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5) hinzugegeben, gründlich gemischt und bei 14000 rpm und 4°C 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches ERG überführt, mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und der gesamte Ansatz 20 sec gemischt. Die Trennung der einzelnen Phasen erfolgte in einem weiteren Zentrifugationsschritt von 1 min bei 14000 rpm und 4°C. Die obere Phase wurde in ein weiteres ERG überführt und die DNA mit 1 ml eiskaltem Isopropanol bei einer Zentrifugation von 30 min, 14000 rpm und 4°C gefällt. Das DNA-Pellet wurde in eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, bei 14000 rpm und 4°C 20 min zentrifugiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in 20-30 µl sterilem a. bidest resuspendiert und die DNA bei -20°C gelagert. Mittels Restriktionsverdau und Auftrennung auf einem analytischen Agarosegel wurde überprüft, ob die Plasmid-DNA das gewünschte Insert enthielt.

Zur Plasmidpräparation im großen Maßstab wurden 500 µl Bakteriensuspension aus der Plasmidpräparation in kleinem Maßstab oder ein Aliquot aus der Glycerin-Stammkultur in 200 ml Antibiotika-haltigem LB-Medium inokuliert und bei 37°C und 180 rpm (Certomat BS-1, Braun Biotech Int.) über Nacht inkubiert. Die Plasmidpräparation erfolgte mit Hilfe des QIAfilter Plasmid Maxi Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die Plasmidpräparation wurde erneut mittels Restriktionsverdau und Auftrennung auf einem analytischen Agarosegel überprüft.

2.3.2 Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) aus eukaryontischen Zellen

RNA mit mehr als 200 Basen wurde mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert. Die Isolation erfolgte nach Herstellerangaben. Die Lysate wurden mit Hilfe einer QIAshredder Säule (Qiagen) homogenisiert. Die RNA wurde je nach Anzahl der Zellen in 30-50 µl Ribonuklease-freiem Wasser aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Da RNA mit weniger als 200 Basen nicht mit den herkömmlichen RNA-Isolationsmethoden gewonnen werden kann, wurden microRNA-Moleküle mittels des *mirVANA* miRNA Isolation Kit isoliert. Die Gesamt-RNA inklusive der microRNA oder nur die microRNA wurde nach Herstellerangaben isoliert und in 50 µl oder 100 µl Elutionspuffer aufgenommen.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA oder RNA erfolgt über die Messung der optischen Dichte im ultravioletten Bereich bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus der OD_{260} , der Verdünnung und einem für DNA spezifischen Multiplikationsfaktor. Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in der Plasmidpräparation wurde eine Verdünnung von 1:50 in sterilem destilliertem Wasser hergestellt und in 100 μ l dieses Ansatzes wurde die DNA-Konzentration bestimmt.

2.3.4 Polymerasekettenreaktion, DNA-Restiktion, -Dephosphorylierung und Ligation

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) dient dazu, einen definierten Nukleinsäureabschnitt selektiv zu amplifizieren. Dazu wird eine thermostabile DNA-Polymerase benötigt, Template-DNA, Oligonukleotidprimer und Nukleotide. Die PCR besteht aus 3 Schritten, der Denaturierung, dem Primerannealing und der Elongation, die in 30-40 Zyklen wiederholt werden. Die Denaturierung des DNA-Templates findet bei 95°C statt und hat die Funktion, die komplementären DNA-Stränge zu trennen. Danach lagern sich im Annealingschritt die beiden Primer, bei einer für den Primer spezifischen Temperatur, die abhängig vom GC-Gehalt des Primers ist, an das DNA-Template an. Im Elongationsschritt verlängert die DNA-Polymerase, auch bei einer spezifischen Temperatur, die bei der *Pfu*-Polymerase bei 74°C und bei der *Taq*-Polymerase bei 72°C liegt, die beiden DNA-Stränge.

Die PCR-Reaktionen wurden in der Regel nach folgendem Schema angesetzt:

1-2 μ g	DNA-Template
5 μ l	10x PCR-Puffer (Polymerase abhängig)
4 μ l	dNTPs (jedes 10 mM)
1 μ l	5' Primer (20 pmol)
1 μ l	3' Primer (20 pmol)
1 μ l	DNA-Polymerase
ad 50 μ l	dest. H ₂ O

Die PCR-Ansätze wurden mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und im Robocycler Gradient 40 (Stratagene) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung	2 min	95°C
2. Denaturierung	1 min	95°C
3. Annealing	1 min	50-60°C Primer-abhängig
4. Elongation	2 min pro kb (<i>Pfu</i>)	74°C
	1 min pro kb (<i>Taq</i>)	72°C
5. Primerextension	10 min	72°C bzw. 74 °C

Schritt 2-4: 30-40 Zyklen

Um eine Störung der im PCR-Puffer enthaltenen Salze bei der weiteren Verarbeitung des PCR-Produktes zu vermeiden, wurden diese mit Hilfe des QIAquick PCR-Purification Kits (Qiagen) aus dem Ansatz entfernt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die DNA wurde in 32 µl destilliertem Wasser aufgenommen.

Zum gesamten Ansatz der aufgereinigten PCR-Produkte (32 µl) wurden für den Restriktionsverdau 4 µl 10x Puffer und 4 µl Enzym hinzugegeben. Zum Restriktionsverdau von Plasmid-Vektoren wurden 1-2 µg DNA mit 1 µl Enzym und 1 µl 10x Puffer zusammengegeben und mit dest. H₂O auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Ansätze wurden für 1 Stunde bei 37°C im Thermomixer inkubiert und zur Auswertung oder zum Ausschneiden auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen.

Restriktionsverdaute Vektor-DNA wurde zusätzlich einer Dephosphorylierung unterzogen, um die Religation der DNA zu vermeiden. Die alkalische Phosphatase entfernt Phosphatgruppen vom 5' Ende der DNA und verhindert so das erneute Zusammenlagern der Vektor-DNA.

Die Dephosphorylierung wurde nach folgendem Schema angesetzt:

Vektor-Restriktionsverdau	20 µl
10x CIAP-Puffer	5 µl
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	1 µl
dest. H ₂ O	24 µl

Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 1 Stunde im Thermomixer. Anschließend wurde das Enzym bei 80°C für 10 min hitzeinaktiviert.

Hatten das PCR-Produkt und die Vektor-DNA die entsprechende Größe, wurden sie aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Entsprechend der Intensität der Banden auf dem Agarosegel wurden Vektor und Insert zusammengegeben und mit 1 μ l T4 DNA-Ligase, 2 μ l 10x T4 DNA-Ligase-Puffer und mit destilliertem Wasser auf 20 μ l aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte 3-5 Stunden bei Raumtemperatur. 10 μ l des Ligationsansatzes wurden zur Transformation von chemokompetenten Top10F' *E.coli*-Bakterien verwendet.

2.3.5 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese hat man die Möglichkeit, DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe über ein elektrisches Feld aufzutrennen. Die DNA-Fragmente wurden mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid, einem DNA interkalierenden Agens, durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

Die Untersuchung der DNA-Fragmente erfolgte in einem Ethidiumbromid (0,5 μ g/ml)-enthaltenden 1-3% (w/v) Agarosegel, das mit 1x TAE-Puffer überschichtet war. Zur Kalibrierung des Gels wurde ein DNA-Größenmarker aufgetragen, die DNA-Proben wurden 1:10 mit DNA-Probenpuffer (0,025% Bromphenolblau, 0,025% Xylencyanol, 3% (v/v) Glycerol) versetzt und bei 70 V bzw. 120 V für 30 – 60 min aufgetrennt.

2.3.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden kommerziell von den Firmen Qiagen, Hilden, oder MWG Biotech, Ebersberg, durchgeführt. Das DNA-Template wurde einem „Single Sequence Read“ bzw. „Value Read“, mit dem 700-900 bp sequenziert werden konnten, unterzogen.

2.3.7 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Durch die RT-PCR weist man die Transkriptionsrate eines bestimmten Gens nach. Sie wird in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wird die isolierte mRNA in eine cDNA (complementary DNA) umgeschrieben, im zweiten Schritt dient die cDNA als Vorlage für eine PCR.

Für die reverse Transkription wurden 1,5-2 μ g RNA, 2 μ l Random Hexamers (50 μ M, Applied Biosystems) mit Hepes (10 mM, 0,1 mM EDTA, pH 7,8) auf ein Gesamtvolumen von 16 μ l aufgefüllt. Zum Aufschmelzen der RNA-Sekundärstruktur wurde der Ansatz 5 Minuten bei 95°C inkubiert, zur Anlagerung der Primer anschließend 5 Minuten auf Eis gestellt. Daraufhin wurde ein Mastermix bestehend aus 8 μ l 10 mM dNTPs (in DEPC-H₂O), 3 μ l 0,1 M DTT, 2 μ l RNA Guard RNase Inhibitor (21.900U/ml, Amersham Biosciences), 8 μ l 5x First Strang buffer und 3 μ l MMLV-Reverser Transkriptase (200 U/ μ l, Invitrogen) hinzugegeben. Die reverse Transkription erfolgte in einem aus vier Zyklen bestehenden Programm (25°C, 5 Minuten; 30°C, 5 Minuten; 37°C, 90 Minuten; 95°C, 5 Minuten). Die

darauf folgende PCR wurde in einem 50 µl Gesamtansatz bestehend aus 2 µl RT-Probe, 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase, 5 µl 10x Puffer, 4 µl 10 mM dNTPs sowie je 1 µl 20 pmol 3' und 5' Primer durchgeführt. Der Ansatz wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die PCR wurde mit folgendem Programm (1. 94°C 5 Minuten, 2. 94°C 1 Minute, 60°C 1 Minute, 72°C 1 Minute 30 Sekunden, 3. 72°C, 20 Minuten) in 22-35 Zyklen (Schritt 2) durchgeführt. Die Annealingtemperatur in Schritt 2 wurde Primer-abhängig verändert. Zur Standardisierung der Messungen wurde die Transkriptionsrate des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) bestimmt. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und auf einem 1% (w/v) analytischen Agarosegel aufgetrennt.

2.3.8 Real-Time quantitative PCR

Die Quantifizierung von reifen microRNAs erfolgte über Real-Time quantitative RT-PCR mit Hilfe des Taq-Man MicroRNA Assays (Applied Biosystems), der wie die RT-PCR in zwei Schritten durchgeführt wird. Im ersten Schritt wird in einer reversen Transkription cDNA hergestellt. Hierzu werden Primer verwendet, die die für die Vorläufer-miRNA typische Schleife enthalten und so die Form der unreifen microRNA nachstellen. Somit können diese Primer spezifisch an reife microRNA Moleküle binden. Im darauf folgenden PCR Schritt macht man sich das TaqMan-Prinzip zu Nutze. Es wird eine MGB-Sonde (*minor groove binder*) verwendet, die am 5' Ende mit einem Reporterfarbstoff, hier: FAM-Farbstoff, gekoppelt ist. Am 3' Ende der Sonde befindet sich der „*minor groove binder*“, der die Schmelztemperatur erhöht, ohne dabei die Sondenlänge zu beeinflussen, sowie ein nicht fluoreszierender Dämpfer (*nonfluorescent quencher*), der die Fluoreszenz des Reportermoleküls unterdrückt.

Das Prinzip der PCR-Reaktion lässt sich in vier Schritten beschreiben. Im ersten Schritt, der Polymerisation, bindet die TaqMan-Sonde an die zu amplifizierende cDNA. Während der Amplifikation der cDNA wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase vom cDNA Strang entfernt und hierbei das Reportermolekül vom Rest der Sonde abgespalten. Der Dämpfer kann daher die Fluoreszenz des Reporters nicht mehr unterdrücken und die Fluoreszenz des Reportermoleküls kann detektiert werden. Nach Vervollständigung der Amplifikation des cDNA-Moleküls beginnt der nächste PCR-Zyklus.

Die Auswertung der PCR erfolgte mit Hilfe der vergleichenden C_T -Methode. Das Real-Time PCR-Gerät liefert eine logarithmische Grafik, der Messergebnisse. Die C_T -Werte werden in dem Bereich der Grafik ermittelt, in dem die Amplifikation noch exponentiell verläuft. Die ermittelten C_T -Werte wurden gegen den internen Standard RNU6B normalisiert.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Verwendet wurden der TaqMan MicroRNA Assay human hsa-miR-124a und RNU6B, der TaqMan MicroRNA Reverse

Transcription Kit sowie der TaqMan Universal PCR MasterMix No Amp Erase UNG (Applied Biosystems).

2.3.9 Ortsgerichtete Mutagenese (*site directed mutagenesis*)

Mit dem QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) können Punktmutationen und der Austausch von Aminosäuren an doppelsträngiger DNA vorgenommen werden. Die DNA sollte aus einem *E.coli*-Stamm isoliert sein, der DNA-Methylase exprimiert. Die DNA-Matrize wird im Anschluss an die PCR mit Hilfe des Enzyms *DpnI* restriktionsverdaut, das nur methylierte DNA schneidet. Die in der Mutagenese-PCR entstandene DNA ist nicht methyliert und kann daher nicht von diesem Enzym geschnitten werden.

Die Mutagenese wurde nach Herstellerangaben mit den Primern IκB-ζ T89>A, IκB-ζ T93>A, IκB-ζ S211>A, IκB-ζ S219>A sowie IκB-ζ T93>A, T89 (sense und antisense, s. Abschnitt 1.5) durchgeführt. Die Mutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt.

2.4 Integration von DNA in eukaryontische Zelllinien

2.4.1 Transfektion von Zellen durch kationische Liposomen

Lipofektamin und Lipofektamin 2000 sind polykationische lipidhaltige Reagenzien, mit deren Hilfe DNA, RNA oder Proteine in eukaryontische Zellen eingebracht werden können (Sells et al., 1995). Polykationische Lipide tragen eine positive Ladung, über die sie mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNA reagieren können. Es kommt zur Bildung von Liposomen, die die gewünschte DNA enthalten. Die Liposomen fusionieren dann mit der Zellmembran und die DNA wird in der Zelle freigesetzt. Die Transfektionseffizienz von Lipofektamin kann durch die Verwendung von Plus Reagent erhöht werden, da es die zu transfizierende DNA vor der Transfektion komplexiert.

HEK293-Zellen wurden mit einem Lipofektamin/Plus-Reagent-Ansatz transfiziert. Am Tag vor der Transfektion wurden 3×10^5 Zellen pro Vertiefung in einer 12-Loch-Platte ausgesät und am darauffolgenden Tag nach Herstellerangaben transfiziert. Bei Verwendung größerer Zellkulturplatten wurden Zellzahl und Reagenzmengen entsprechend erhöht.

2.4.1.1 Transfektion von Phönixzellen zur Produktion von Retroviren

Arbeiten mit Retroviren sind der Risikogruppe 2 zuzuordnen und wurden daher im S2-Labor durchgeführt. Zur Produktion von Retroviren wurden 3×10^6 Phönixzellen am Vortag auf mit 0,2% (w/v) Gelatine beschichteten Zellkulturschalen (Durchmesser: 10 cm) ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit 30 µl Lipofektamin 2000, 5 µg pVSV-G, 16 µg pGag-Pol und 7

μg des pCFG5-IEGZ-Plasmides, welches das $\text{I}\kappa\text{B}$ - ζ -Konstrukt enthielt. Die Hilfsvektoren pVSV-G und pGAG-Pol wurden zur Sicherheit, falls die Zelllinie die Fähigkeit zur Produktion der retroviralen Proteine verloren hatte oder diese Fähigkeit eingeschränkt war, verwendet. pGAG-Pol trägt die Gene, die bei der Synthese der viralen gruppenspezifischen Antigene und der Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase eine Rolle spielen, pVSV-G trägt Gene, die für das Glykoprotein des Virus kodieren.

Über 3 Tage wurden die retroviralen Mediumüberstände gesammelt, die bei -80°C gelagert wurden. Wurden die Phönixzellen erfolgreich transfiziert, bilden sie amphotrophe Retroviren, die weitere Zellen infizieren können.

2.4.1.2 Transfektion durch Neofektion

Das Prinzip der Neofektion oder reversen Transfektion beruht ebenfalls auf der Transfektion durch kationische Liposomen. Kleine RNA-Moleküle können hierbei in adhärenzte Zellen transfiziert werden, die sich in Suspension befinden.

$1,5\text{-}2 \times 10^5$ HEK293-Zellen oder $3\text{-}4 \times 10^5$ HepG2-Zellen wurden nach Herstellerangaben mit dem Transfektionsreagenz siPort NeoFX in Suspension transfiziert. HEK293-Zellen wurden in die Vertiefung einer 12-Loch-Platte, HepG2-Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät. Die Zellen wurden nach der Transfektion noch weitere 48 Stunden inkubiert.

2.4.2 Transduktion von HT1080-Zellen durch Retroviren

Die in den Phönixzellen produzierten Retroviren sind in der Lage, Zielzellen zu infizieren, in denen die retrovirale RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben wird, die sich daraufhin in das Genom der Zielzelle einbaut. Die Zielzellen können keine neuen Retroviren bilden.

3×10^5 HT1080-Zellen wurden am Tag vor der Infektion in 6-Loch-Platten ausgesät. Die retroviralen Überstände wurden bei RT aufgetaut, steril filtriert und mit $5 \mu\text{g/ml}$ Polybren, das der Anlagerung der Retroviren an die Zielzellen diente, versetzt. Pro Loch wurden 2 ml Überstand hinzugegeben und die Zellen 3 Stunden bei 2000 rpm (Multifuge, Heraeus) und 30°C zentrifugiert. Die Infektion erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Am dritten Tag konnten die Zellen für weitere Versuche verwendet werden.

2.4.3 Transfektion durch die Verwendung kationischer Polymere

Das Transfektionsreagenz JetPei (Polyplus Transfection) ist ein lineares Polyethyleniminin. Die DNA wird zu positiv-geladenen Partikeln verdichtet, die in der Lage

sind, mit den anionischen Proteoglykanen der Zelloberfläche zu interagieren. Die DNA wird durch Endozytose in die Zelle aufgenommen.

5×10^4 MEF wt und MEF p65^{-/-}, 8×10^4 MEF p50^{-/-} oder 6×10^4 HeLa Tet-Off-Zellen pro Vertiefung einer 12-Loch-Platte oder $1,5 \times 10^5$ HT1080 pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte wurden am Tag vor der Transfektion ausgesät und nach Herstellerangaben am nächsten Tag mit 4 μ l Jet Pei transfiziert.

2.4.4 Kotransfektion von siRNA und Plasmiden

Die Transfektion von kleinen interferierenden RNA-Fragmenten dient dazu, die Translation von Proteinen zu unterdrücken. siRNAs werden innerhalb der Zelle in den Proteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut. Dieser Komplex bindet mit Hilfe der inkorporierten RNA-Fragmente komplementär an die Ziel-mRNA. Der RISC-Komplex besitzt RNA-Helikase und Nuklease-Aktivitäten, die das Entwinden und Spalten der Ziel-mRNA zur Folge haben. Die RNA liegt nun in ungeschützter Form vor und wird durch intrazelluläre Nukleasen abgebaut und somit die Translation des Proteins verhindert. Eine partielle Bindung an die Ziel-mRNA reicht nicht aus, um deren Abbau zu induzieren, die Translation wird jedoch durch die Behinderung der Ribosomen blockiert. Diese Vorgänge werden als siRNA-vermittelter Knockdown bezeichnet.

Das Lipid-basierte Transfektionsreagenz DharmaFECT Duo wurde zur Kotransfektion von siRNA und Plasmiden verwendet. Einen Tag vor der Transfektion wurden 3×10^5 HEK293-Zellen oder 5×10^4 HT1080-Zellen pro Vertiefung einer 12-Loch-Platte, $1,2 \times 10^5$ HT1080-Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät. Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben mit 2 μ l bzw. 4 μ l des Transfektionsreagenzes. 24 Stunden nach Transfektion wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden für insgesamt 48-72 Stunden inkubiert.

2.5 Proteinbiochemische Analyse eukaryontischer Zell-Lysate

2.5.1 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten

Kultivierte Zellen wurden aus der Zellkulturplatte oder -schale gelöst, in ERG überführt und 5 Minuten bei 7000 rpm (5417R, Eppendorff) zentrifugiert und einmal mit 1x PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde entweder bis zur Verwendung bei -80°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet. Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurde das Zellpellet in 100 μ l Lyse-Puffer (Abschnitt 1.2) pro 10^6 Zellen resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 30 min bei 14000 rpm und 4°C wurde der Überstand in ein neues ERG überführt.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Der Proteingehalt der Zellextrakte wurde nach der Methode von **Bradford** bestimmt. Hierbei wird die Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau (CBB) ausgenutzt, in Gegenwart von Proteinen eine Rotverschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm zu zeigen (Compton und Jones, 1985). Der Grund für diese Verschiebung ist die Stabilisierung der unprotonierten Sulfonat-Form des Farbstoffes durch eine Komplexbildung mit kationischen, hydrophoben Seitenketten der Proteine.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 997 μ l des Bradford-Reagenzes (1:5 in Wasser verdünnt, Bio-Rad) mit 3 μ l der Probe versetzt, gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im **BCA-Proteinnachweis** (Pierce) erfolgt in zwei Schritten. Der erste Schritt beruht auf der Biuretmethode. Zweiwertige Kupferionen lagern sich im alkalischen Milieu an die Peptidbindungen der Proteine an und werden zu Kupferkationen reduziert. Im zweiten Schritt reagiert die Bicinchininsäure mit den Kupferkationen und es entsteht eine violette Färbung, die bei einer Wellenlänge von 560 nm detektierbar ist. Zur Standardisierung der Messung wurde eine BSA-Standardkurve erstellt. Mit dem BCA-Proteinnachweis wurde die Proteinkonzentration aufgereinigter Proteine bestimmt.

2.5.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe in einer porösen Gelmatrix müssen sie vollständig denaturiert werden. Dies geschieht durch Erhitzung und Behandlung der Proben mit SDS und β -Mercaptoethanol. In wässrigem Milieu binden die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen den aliphatischen Teil des SDS, während die negativ geladene Sulfatgruppe nach außen gerichtet ist. Die Eigenladung der Proteine wird dadurch überdeckt. Durch die Beladung von 1 g Protein mit etwa 1,4 g SDS entsteht ein konstantes Masse/Ladungsverhältnis, wodurch die Retardierung eines Proteins im Gel linear abhängig vom Molekulargewicht wird.

Die Proben wurden auf eine OD_{600} von 1,5 eingestellt und unter reduzierenden Bedingungen in 8%-, 10%-, 12,5%- oder 15%-igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Nach Anlegen einer Spannung von 30 mA/Gel wanderten die Chloridionen als Leitonen mit höchster Geschwindigkeit vor der Proteinfraction. Glycinionen, die bei pH 6,8 hauptsächlich als in der Summe ungeladene Zwitterionen vorliegen, bleiben dahinter zurück. Die SDS-Proteinmizellen werden zwischen diesen Leit- und Folgeionen in einer Zone geringer Leitfähigkeit aufkonzentriert und erreichen fokussiert das Trenngel, wo sie dann ihrem

Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt werden. Durch den höheren pH-Wert im Trenngel erhält das Glycin eine negative Nettoladung und wandert als Front vor der Proteinfraktion. Zur Molekulargewichtskontrolle sowie zur visuellen Kontrolle der Gelelektrophorese und anschließendem Transfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurde ein vorgefärbter Protein-Größenstandard verwendet.

2.5.4 Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels des „*Tank-Blot*“-Verfahrens elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine wandern zur Anode und somit aus dem Gel auf die Membran.

Dazu wurde in eine mit gekühltem Transferpuffer (Abschnitt 1.2) gefüllte Blotkammer (BioRad) eine Transfereinheit eingehangen. Vor Zusammenbau der Transfereinheit wurde die PVDF-Membran zunächst 15 sec in Methanol aktiviert, dann kurz in Wasser gewaschen und anschließend 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Membran und das aufliegende Gel wurden mit jeweils einem in Transferpuffer getränkten 3MM-Papier (Whatman) an beiden Seiten abgedeckt. Der Transfer erfolgte abhängig von der Proteingröße 1-1,5 Stunden bei 150 mA. Im Anschluß wurden unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers an die Membran durch Inkubation in Blockierungslösung (5% BSA, 0,2% Tween-20 in PBS oder 0,1% Tween-20 in TBS (100mM Tris-Cl, pH 8,0, 0,9% NaCl) für 1 Stunde unter leichtem Schütteln abgesättigt. Die Inkubation mit dem jeweiligen, primären Antikörper (IkB- ζ , Hybridomaüberstand 1:10 bzw. restliche Antikörper 0,2 μ g/ml in Blockierungslösung) erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran dreimal 20 min in PBST oder TBST (PBS, 0,2 % Tween-20; TBS, 0,1% Tween-20) gewaschen und für 1 Stunde bei RT mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiertem, sekundären Antikörper (100 ng/ml in Blockierungslösung) inkubiert. Nach erneutem Waschen dreimal 20 min in PBST/TBST erfolgte die Detektion mit Hilfe des Chemilumineszenz-Reagenz ECL. Nach Exposition des Films erfolgte seine Entwicklung.

2.5.5 Immunopräzipitation und Co-Immunopräzipitation

HEK-293 Zellen wurden mit je 5 μ g der zu analysierenden Plasmide, in der Co-Immunopräzipitation mit insgesamt 10 μ g Plasmid-DNA transfiziert, nach 24 Stunden geerntet und Gesamtzellextrakte mit Lysepuffer (Abschnitt 1.2, kein DTT) generiert. Die Lysate wurden zunächst 1 Stunde mit Protein G-Sepharose vorinkubiert, darauffolgend mit frischer Protein G-Sepharose und mit 2 μ g des entsprechenden Antikörpers oder nach Herstellerangaben bei 4°C über Nacht inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Sepharose viermal bei 14000 rpm, 4°C, 1 Minute mit 1 ml Waschpufferpuffer (Lysepuffer,

allerdings nur 0,5% (v/v) NP40, kein DTT) zentrifugiert (5417R, Eppendorff). Der Waschpuffer wurde abgenommen und die Protein G-Sepharose mit 60 μ l Probenpuffer bei 95°C für 10 Minuten aufgeköcht. Lysate, Überstände und Immunopräzipitate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.6 Analyse der Proteinlokalisierung in der Zelle mittels Immunfluoreszenz

Zur Analyse der Proteinlokalisierung wurden Hela Tet-Off-Zellen in einer 12-Loch-Platte auf einem Deckglas ausgesät und am darauffolgenden Tag mit je 1 μ g der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 30 Minuten mit 4% Formaldehyd fixiert und für 1 Stunde mit Immunfluoreszenzpuffer (IF-Puffer: 4% BSA, 0,05% Saponin in PBS) inkubiert. Der entsprechende Erstantikörper wurde im Verhältnis 1:500 in IF-Puffer zu den Zellen gegeben und bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen, für 4 Stunden mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit-AF594, 1:500 in IF-Puffer) inkubiert und wiederum mit PBS gewaschen. Der Zellkern wurde mit dem Kernfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), der sich an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA anlagert, in einer Konzentration von 1 μ g/ml für 2 Minuten inkubiert, die Zellen wurden wiederum mit PBS gewaschen und die Deckgläser mit Mounting Medium (Dako, Hamburg) auf dem Objektträger fixiert. Die Analyse erfolgte am konfokalen Mikroskop.

2.7 Generierung stabiler I κ B- ζ Tet-On Zelllinien

Das Tet Repressorprotein (TetR) ist ein Protein aus *E.coli*, das Gene des Tetrazyklin-Resistenz-Operons reguliert. In Abwesenheit von Tetrazyklin wird die Transkription der Tetrazyklin-Resistenzgene durch Bindung von TetR an die Sequenzen des Tet Operators verhindert. Im Tet-On Genexpressionssystem verwendet man einen reversen Tet Repressor, der durch eine Änderung von vier Aminosäuren in der Sequenz des TetR entstanden ist. Das entstandene Protein, der reverse Tet Transaktivator, wird vom pTet-On Regulationsplasmid kodiert und ist erst nach Zugabe von Tetrazyklin in der Lage, an das Tetrazyklinresonanzelement zu binden, wodurch die Expression des interessierenden Gens kontrolliert wird.

Um ein funktionierendes Tet-On System zu erhalten, benötigt man eine Zelllinie, die sowohl das Tet-On-Regulationsplasmid als auch das entsprechende Resonanzplasmid enthält. Zur Generierung einer Zelllinie, die I κ B- ζ unter der Kontrolle eines Tet-Regulationsplasmides exprimiert, wurde das für I κ B- ζ kodierende Gen aus dem Vektor pCMV-Tag4 in das pTRE2hyg Resonanzplasmid kloniert. Damit die Expression von I κ B- ζ auch visuell kontrollierbar war, wurden aus dem Vektor pEGFP-C1 und pEGFP-C1-I κ B- ζ

entweder nur der für EGFP kodierende DNA-Bereich oder der für das Fusionsprotein GFP-I κ B- ζ kodierende DNA Bereich ausgeschnitten und in den pTRE2hyg Resonanzvektor kloniert. Mit diesen Vektoren wurde eine weitere Tet-On-Zelllinie generiert.

HeLa-Zelllinien, die das Tet-On Regulationsplasmid exprimieren, wurden mit den oben genannten pTRE2hyg Vektoren durch das Transfektionsreagenz Lipofektamin 2000 transfiziert, und unter der Selektion mit 250 μ g/ml Hygromycin B und 100 μ g/ml oder 500 μ g/ml G418 wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Zelllinien hergestellt.

Um die Anzahl der GFP- und GFP-I κ B- ζ -exprimierenden Zellen zu erhöhen, wurden die polyklonalen Zelllinien mit Hilfe der Durchflusszytometrie „sortiert“ (Abschnitt 2.13.3). Die Expression von I κ B- ζ in den diversen Zelllinien durch Zugabe von Doxzyklin wurde mittels SDS-PAGE- und Western Blot-Analysen kontrolliert. Die Expression von GFP- oder GFP-I κ B- ζ in den HeLa Tet-On GFP-Zelllinien konnte mit Hilfe des GFP-Filters am Fluoreszenzmikroskop (Filterset #9, Zeiss) überprüft werden.

2.8 Inhibition und Aktivierung von Signalwegen

2.8.1 Der NF- κ B-Signalweg

Mit Hilfe des I κ B-Kinase-Inhibitors Bay 11-7082 wird die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges unterbunden. Zur Untersuchung des Einflusses von NF- κ B auf die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ wurden mit den entsprechenden Konstrukten (s. 2.10.2) transfizierte HEK293-Zellen entweder mit oder ohne einstündige Vorinkubation mit 25 μ M Bay 11-7082 (Biomol, Hamburg) für 6 Stunden mit 10 ng/ μ l TNF- α inkubiert.

2.8.1.1 Induktion der I κ B- ζ -Expression durch Interleukin-1 β

Zur Induktion der I κ B- ζ -Expression wurden verschiedene Zelllinien mit 2 ng/ml Interleukin-1 β (Roche) für 2 Stunden behandelt.

2.8.2 Inhibition von Proteinkinasen

Durch die Behandlung von Zellen mit Proteinkinaseinhibitoren können die Effekte unterschiedlicher Proteinkinasen studiert werden.

Um die Effekte von Proteinkinasen auf die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen 24 Stunden nach Transfektion mit den verschiedenen Luciferase-Plasmiden für 8 Stunden mit den unten aufgeführten Proteinkinaseinhibitoren behandelt und Luciferase-Reporter-Gen-Analysen (s. Abschnitt 2.9.2) durchgeführt. Es wurden verschiedene Inhibitorkonzentrationen getestet, die effektivsten sind fett gedruckt.

Inhibitor (Herkunft)	inhibierte Kinasen	Verwendete Konzentrationen
IC261 (Knippschild, U., Universität Ulm)	CKI δ und ϵ	2, 20 μ M
TBCAI (Calbiochem, San Diego, USA)	CKII	20, 100, 500 nM
SB415286	GSK3	5, 10, 30 μ M
SP600125	JNK	1, 10, 20, 100 μ M
JNK Inhibitor I (Calbiochem)	JNK-1	1, 3, 5, 10 μ M
SB203580	p38 α und p38 β MAPK, PDK1, SAPK/JNK	0,5, 1, 5, 50 μ M
PD98,059	MEK1 und MEK2	1, 10, 50 μ M
LY294,002	PI3 Kinase	10, 50 μ M
Wortmannin (Calbiochem)	PI3 Kinase	10, 50, 100, 250 nM; 1, 10 μ M
H7	PKA, PKG, PKC, MLCK	250 nM; 1, 3, 6 μ M
H89	PKA, PKG, PKC, AMPK, CHK1, MSK1, S6K1, Rock, SGK	10, 100 μ M
Staurosporin	PKA, PKC, PKG, CaMKII, LYN, MLCK, SYK, S6K1, SRC	250, 500 nM

Inhibitoren, deren Herkunft nicht angegeben ist, wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

2.9 Spezielle microRNA-Methoden

2.9.1 Verwendung von Vorläufer-microRNA-Molekülen

„Pre-miR miRNA Precursor“-Moleküle wurden kommerziell von der Firma Ambion erworben. Diese Vorläufer-miRNAs sind kleine, chemisch modifizierte, doppelsträngige RNA-Moleküle, die nach Transfektion direkt in den zellulären miRNA-Signalweg eintreten und in der Zelle zu reifen miRNA Molekülen prozessiert werden.

HepG2- oder HEK293-Zellen wurden mit 15 nM der Pre-miR miRNA Precursor Molecules-negative control#1 oder -hsa-miR-124a mittels Neofektion für 48 Stunden transfiziert und die Expression von I κ B- ζ 2 Stunden vor dem Ernten der Zellen durch Zugabe

von IL-1 β induziert. Die Auswertung erfolgte durch Luciferase-Reportergen- (s. Abschnitt 2.10), SDS-PAGE und Western Blot-, RT-PCR- oder Real-Time quantitative PCR-Analysen.

2.9.2 Inhibition der DNA-Methylierung durch 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-AzadCyd)

5-AzadCyd ist ein Nukelotidanalogue das in die DNA eingelagert wird und dort zu einer irreversiblen Inaktivierung der DNA-Methyltransferase führt. Es inhibiert spezifisch die DNA-Methylierung. Zur Induktion der microRNA-124a-Expression wurden $1,5 \cdot 10^5$ Zellen der Neuroblastomzelllinien T98, LN18, BeBak^{+/+}, BdBak^{+/+}, A172 sowie HepG2-Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 72 Stunden mit 1 μ M 5-AzadCyd (InvivoGen) oder dem entsprechenden Lösungsmittel behandelt. 5-AzadCyd wurde jeden Tag erneut zugegeben. Die Expression von I κ B- ζ wurde 2 Stunden vor dem Ernten der Zellen durch Zugabe von IL-1 β induziert.

2.10 Luciferase-Reportergenanalysen

In Luciferase-Reportergenanalysen kann die Genexpression in einem Zellsystem mit Hilfe der *firefly* Luciferase wiedergegeben werden. Die Luciferase dient hierbei als Reporter der Genaktivität. Da die Luciferaseaktivität auch von experimentellen Bedingungen, wie zum Beispiel der Transfektionseffizienz abhängig ist, wird immer ein zusätzliches Plasmid zur Normalisierung verwendet.

2.10.1 Das pMIR-Report miRNA Reporter Vektor-System

Mit dem pMir-Report miRNA Reporter- und Expressionsvektor lassen sich vermeintliche microRNA-Bindungsstellen testen. Der Vektor enthält ein Luciferase-Gen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors sowie eine Klonierungsstelle in 3' Richtung stromabwärts vom Luciferase-Gen. Wird nun eine Bindungsstelle für eine microRNA in den Vektor kloniert, wird durch Bindung der microRNA in der 3' untranslatierten Region (UTR) der Luciferase-mRNA die endogene Funktion der microRNA nachgestellt. Die Translation der Luciferase wird verhindert und es kann im Luciferase-Reporterigentest eine verringerte Luciferase-Aktivität gemessen werden. Das pMIR-Report Vektor System wurde von der Firma Ambion bezogen.

In die Klonierungsstelle wurden drei verschiedene Konstrukte eingebracht. Ein Konstrukt, das die Bindungsstelle für die hsa-mir-124a in der 3' UTR der I κ B- ζ -mRNA enthält, sowie zwei Konstrukte mit unterschiedlichen Mutationen in der vermeintlichen Bindungsstelle. Hierzu wurden die Plasmide 5' 124a Luci und 3' 124a Luci 2 (I κ B- ζ -3' UTR

wt), 5' und 3' 124a Luci muta sowie 5' und 3' 124a Luci mutb (Primersequenzen s. Abschnitt 1.5) verwendet.

Für Luciferase-Reportergentests wurden HEK293-Zellen durch Neofektion mit je 800 ng des Reporterplasmids, 50 ng pMIR-Report β -Galaktosidase Normalisierungsvektor sowie 15 nM pre-miR-124a oder 15 nM pre-miR-neg.ctrl. #1 miRNA precursor transfiziert und 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden in 50 μ l Puffer bestehend aus 25 mM Glycylglycin, pH 7,8, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 1 mM DTT und 1% Triton X-100 lysiert und bei 14000 rpm, 4°C, 5 Minuten (5417R, Eppendorff) zentrifugiert. 20 μ l Überstand wurden zu 100 μ l Reaktionspuffer (15 mM Kalium P_i, pH 7,8, 25 mM Glycylglycin, 15 mM MgSO₄, 4 mM Dithiotriethol und 2 mM ATP) gegeben und nach Zugabe von 100 μ l Luciferin (0,3 mg/ml) konnte die Lichtemission am Luminometer (Berthold Technologies) bestimmt werden. Die Normalisierung erfolgte mit 5 μ l des Lysats mittels des Galakto-Light chemiluminescent reporter gene assay systems (ABI) nach Herstellerangaben.

2.10.2 Untersuchung der Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ mit dem Dual-Luciferase-System

Zur Untersuchung der Transaktivierungsaktivität im Luciferase-Reportergentest kann man sich das Gal4-Protein der Hefe zu Nutze machen. I κ B- ζ -Konstrukte verschiedener Länge wurden in den pCMV-BD-Vektor, der die Gal4 DNA-Bindedomäne exprimiert, kloniert (Primer und Konstrukte s. Abschnitt 1.4 und 1.5). Der Vektor exprimiert ein Fusionsprotein aus I κ B- ζ mit N-terminaler Gal4-Bindedomäne, welche an die Gal4-Bindungsstelle im Reportervektor bindet und im Falle einer transaktivierenden Aktivität von I κ B- ζ die Luciferaseaktivität im Vergleich zum Leervektor erhöht.

Die Luciferase-Aktivität wurde mit dem Dual-Luciferase-Reporter-Assay-System (Promega) analysiert. Die Aktivitäten der *firefly*- und der *Renilla*-Luciferase wurden in einer Probe sequentiell gemessen. Zunächst wurde die Aktivität der *firefly*-Luciferase über das Luciferase-Assay Reagent II bestimmt, die anschließend durch Zugabe des Stop & Glo Reagenz getilgt wurde und in einem zweiten Schritt konnte dann die Aktivität der *Renilla*-Luciferase gemessen werden.

HEK293-Zellen wurden in einer 12-Loch-Platte ausgesät und mit je 1 ng pRL-TK, 150 ng pGAL4-TK und 150ng der verschiedenen pCMV-BD- oder GAL4-Konstrukte mittels Lipofektamin/Plus-Reagent transfiziert. Für weitergehende Analysen wurden zusätzlich 150 ng der verschiedenen pcDNA4-NF- κ B-Untereinheiten oder 300 ng der Kinasekonstrukte (s. Abschnitt 1.4) kotransfiziert. Der Einfluss von Kinasen auf die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ wurde zusätzlich durch Behandlung der Zellen 24 Stunden nach Transfektion für

8 Stunden mit unterschiedlichen Kinaseinhibitoren analysiert (s. Abschnitt 2.8.2). Die Messung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Dual-Luciferase-Reporter-Assay-System.

Für siRNA-Analysen wurden $0,5 \times 10^5$ HT1080-Zellen einen Tag vor der Transfektion in einer 12-Loch-Platte ausgesät und mit den Konstrukten des Transaktivierungstests sowie 20 nM der GSK3B, MAPK3, PI3CA oder PI3CB siRNA oder 40nM der MAPK1 siRNA mit dem Transfektionsreagenz DharmaFECT Duo kotransfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Messung mit dem Dual-Luciferase-Reporter-Assay-System nach Herstellerangaben.

2.11 Proteinanalytische Methoden

2.11.1 Analyse von Phosphotransferreaktionen

Um die von Proteinkinasen katalysierten Phosphotransferreaktionen zu untersuchen, wurden sogenannte *in vitro*-Kinase-Analysen durchgeführt. Hierzu wurde $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ als markiertes Donorsubstrat und GST-I κ B- ζ sowie spezifische Substrate für die untersuchten Kinasen als Akzeptormoleküle verwendet. Der Phosphotransfer kann als Anhäufung von ^{32}P -markiertem Protein gemessen werden. Für die *in vitro*-Kinase-Analysen wurden rekombinante Kinasen verwendet.

In jeder Kinase-Analyse wurde als Negativkontrolle je eine Reaktion ohne Substrat, ohne Enzym und mit hitzeinaktiviertem Enzym (10 Minuten bei 75°C) mitgeführt.

Casein-Kinase 2: 100 μM ATP (Cell Signaling) und 1 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Hartmann Analytic, Braunschweig) wurden in 5 μl 3x Testpuffer (1x Testpuffer: 5 mM MOPS pH 7,2, 2,5 mM β -Glycerophosphat, 100 mM MgCl_2 , 200 mM NaCl, 0,5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 20 mM PKA Inhibitor Peptide (Upstate)) sowie 10, 5 und 2,5 Units Casein Kinase 2 (Promega) in 10 μl 1x Testpuffer angesetzt. Je 2 μg der Substrate Casein (Sigma-Aldrich), GST oder GST-I κ B- ζ (in unserem Labor hergestellt und aufgereinigt) wurden in 10 μl Lysepuffer (Abschnitt 1.2) angesetzt und mit je 10 μl rekombinanter Kinase, sowie 5 μl ATP zusammengegeben und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 20 μl Probenpuffer gestoppt und bei 95°C für 5 Minuten erhitzt. Der Ansatz wurde auf ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Nach Auftrennung der Banden wurde das Gel für 30 Minuten in Coomassie-Puffer (50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) a.dest.) fixiert und im Gelrockner (Bio-Rad) für 1,5 Stunden bei 80°C getrocknet. Ein Röntgenfilm wurde bei -80°C für 18-48 Stunden exponiert und anschließend entwickelt.

Glykogen-Synthase Kinase-3 α und β : 250 μM ATP und 0,8 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ wurden in 5 μl 3x Testpuffer (1x Testpuffer: 5 mM MOPS, pH 7,2, 2,5 mM β -Glycerophosphat, 1 mM EGTA, 0,4 mM EDTA, 4 mM MgCl_2 , 0,05 mM DTT; GSK 3 β : + 40 ng/ μl BSA), 25 ng GSK 3 α oder

GSK 3 β (Cell Signaling) in 10 μ l 1x Testpuffer und die Substrate GST (2 μ g), GST-I κ B- ζ (2 μ g) sowie MBP (4 μ g; Millipore) oder Tau Protein (1 μ g) in 10 μ l Lysepuffer angesetzt. Je 10 μ l rekombinante Kinase, 10 μ l des entsprechenden Substrates sowie 5 μ l ATP wurden zusammengegeben und für 15 Minuten bei 30°C inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

ERK1, ERK2 und AKT1 Kinase: Der Ansatz für ERK1 und ERK2 sowie für die AKT1-Kinase erfolgte entsprechend dem der GSK 3-Kinase. Der 1x Testpuffer setzte sich aus 5 mM MOPS, pH 7,2, 2,5 mM β -Glycerophosphat, 1 mM EGTA, 0,4 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ und 0,5 mM DTT zusammen.

IKK α und IKK β : Die I κ B-Kinasen IKK α oder IKK β mit Myc-/His-Markierung wurden in HEK293-Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion geerntet, pelletiert und in 400 μ l Lysepuffer mit 1 mM PMSF, 10 μ g/ml Aprotinin, 10 μ g/ml Leupeptin, 1 μ g/ml Pepstatin, 1 mM Na₃VO₄ und 5 mM Benzamidin aufgenommen. 5 μ l des polyklonalen anti-Myc-Antikörpers (Cell Signaling) wurden in 100 μ l Lysepuffer gegeben und zusammen mit 15 μ l Protein G-Sepharose pro Ansatz für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Die Protein G-Sepharose wurde in zwei Schritten umgepuffert. Zunächst erfolgte eine Erhöhung der Natriumchloridkonzentration des Lysepuffers auf 5 M, im nächsten Schritt wurden die Kinasen in den Reaktionspuffer überführt (Rick-Kinase-Puffer: 10 mM MgCl₂, 25 mM Hepes pH 7,5, 3,5 mM β -Glycerophosphat, 5 mM Benzamidin, 0,5 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄). Für den Reaktionsansatz wurden 250 μ M ATP, 2 μ Ci [γ -³²P]ATP und entweder 2 μ g GST, GST-I κ B- ζ oder GST-I κ B- α mit der entsprechenden IKK in Rick-Kinase-Puffer für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Als Positivkontrolle für die IKK α diente ein Östrogenrezeptor α -Konstrukt, das nach dem gleichen Prinzip wie die Kinasen aufgereinigt wurde. Die Weiterbehandlung der Proben erfolgte wie oben beschrieben.

2.11.2 Phosphotransferreaktionen mit mutierten His-I κ B- ζ Proteinen

Aus *E.coli*-Lysaten aufgereinigte His-I κ B- ζ Konstrukte mit Mutationen in den potentiellen Phosphorylierungsstellen für die verwendeten Kinasen T89, T93, S211 und S219 wurden in einer Konzentration von 1,5 μ g für die Phosphotransferreaktionen verwandt. Die Inkubationszeit wurde auf 30 Minuten erhöht, es wurden 2 μ Ci [γ -³²P]ATP eingesetzt.

2.11.3 Aufreinigung von rekombinanten I κ B- ζ -Konstrukten

Die Expression von 6xHis-markierten I κ B- ζ -Wildtyp- und -Deletionskonstrukten wurde in einer 1 Liter-*BL21-E.coli*-Kultur bei einer OD₆₀₀ von 0,6 durch 1 mM Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert. Die Kultur wurde nach 4 Stunden Wachstum bei 37°C

durch Zentrifugation geerntet, das Zellpellet in 30 ml nativem Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin, 1 mg/ml Lysozym, pH 8) aufgenommen und für 1 Stunde bei 4°C auf dem Roller Mixer inkubiert. Daraufhin wurde die Suspension mit Ultraschall behandelt (75%, 7 x 1 Minute, 1 Minute auf Eis; Sonoplus, Bandelin) und für 20 Minuten bei 7500 rpm (Biofuge Stratos, Heraeus) pelletiert. Das Pellet wurde zur Auflösung von Einschlusskörpern in denaturierendem Puffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8M Harnstoff, pH 8) resuspendiert und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Roller Mixer inkubiert. Anschließend wurde die Suspension wiederum abzentrifugiert (7500rpm, RT, Biofuge Stratos, Heraeus), der Überstand mittels „schneller Verdünnung“ in 40 ml eiskalter 50 mM Tris-HCl, 5 mM DTT, pH 8 renaturiert und mit 4 ml 50% NiNTA-Matrix (Qiagen) über Nacht auf dem Roller Mixer bei 4°C inkubiert. Die NiNTA-Matrix wurde auf eine Chromatographie-Säule (Bio-Rad) aufgetragen und zunächst mit 20 ml Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8) und daraufhin mit 10 ml Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8) über einen Imidazol-Gradienten aufgereinigt. Die Fraktionen wurden auf einem SDS-PAGE-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung (0,25% Coomassie Brilliant Blau (R250), 50% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v), 40% a.dest (v/v)) 3 Stunden bei Raumtemperatur und Entfärbung in Coomassie-Puffer (50% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v), 40% a.dest. (v/v)) analysiert. Die Fraktionen, die das IκB-ζ-Protein enthielten, wurden kombiniert, mit einer Centricon-Säule (Centricon centrifugal filter unit, 10 kDa MWCO, Millipore) aufkonzentriert und umgepuffert. Die Proteine wurden in PBS/5 mM DTT aufgenommen und die Konzentration mittels BCA-Nachweis bestimmt.

2.12 Synchronisation von Zelllinien zur Zellzyklusanalyse

Um Effekte verschiedener Proteine auf den Zellzyklus zu untersuchen, ist es unerlässlich, die Zellen, die sich in der Regel asynchron verhalten, an einem bestimmten Punkt des Zellzyklus zu synchronisieren und anschließend für die weitere Analyse freizulassen. Um die Zellen effektiv zu blockieren, muss hierzu auch die Verdoppelungszeit der Zellen beachtet werden.

Durch Inhibition der DNA-Synthese werden Zellen am Übergang von der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus synchronisiert. Um die Nukleotidsynthese zu verhindern, wird Thymidin im Überschuss eingesetzt.

Zur Synchronisation mittels Doppel-Thymidin-Block wurden 2,5x10⁵ HeLa Tet-On-Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch Platte ausgesät und 18 Stunden mit 2 mM Thymidin inkubiert. Danach wurden die Zellen für 9 Stunden vom Thymidin-Block freigelassen und in

Wachstumsmedium ohne Thymidin inkubiert. Abhängig von der darauf folgenden Analyse erfolgte eine weitere Blockade für 14-28 Stunden mit 2 mM Thymidin. Nach Freilassen vom Thymidin-Block wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und mittels Durchflusszytometrie (Abschnitt 2.13) oder SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Mimosin ist ein Eisenchelator, der die DNA-Replikation verhindert und die Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus blockiert. HT1080-Zellen wurden im Anschluss an die Transduktion durch Retroviren mit 400 µM Mimosin für 16-24 Stunden synchronisiert.

2.13 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) können Zellen aufgrund der Emission von Licht unterschiedlicher Wellenlänge detektiert werden, wenn sie einen Laserstrahl passieren. Die Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und passieren einzeln einen Laserstrahl im Sensormodul. Volumen sowie Granularität der Zelle und Beschaffenheit des Zellkerns können bereits durch die Brechung des Lichts an ungefärbten Zellen im Vorwärts- (FSC: *forward scatter*) und Seitwärtsstreulicht (SSC: *sidewards scatter*) bestimmt werden. Gefärbte Zellen werden durch die Verwendung von Lasern unterschiedlicher Wellenlänge unterschieden.

2.13.1 Bestimmung der BrdU-Einlagerung in der S-Phase

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Analog des Nucleosids Thymidin und wird in der DNA-Synthese-Phase (S-Phase) der Zelle anstelle von Thymidin in die neusynthetisierte DNA eingebaut. Das in die Zelle eingebaute BrdU kann durch Verwendung eines Fluoreszenz-markierten Antikörpers angefärbt werden. Durch Gegenfärbung mit einem DNA-Farbstoff lassen sich in der Durchflusszytometrie sehr gut G₁-, S- und G₂/M-Phase unterscheiden. Zur Bestimmung der Zellzyklusphasen von HT1080-Zellen, die retroviral mit GFP oder GFP-IκB-ζ infiziert und mit Thymidin oder Mimosin synchronisiert waren, wurde der APC BrdU Flow Kit (BD Pharmingen) verwendet, der einen APC-markierten anti-BrdU-Antikörper und 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) zur DNA-Färbung beinhaltet. Die Färbung der Zellen sowie die Detektion am Durchflusszytometer erfolgte nach Herstellerangaben.

2.13.2 Bestimmung des phospho Histon H3-Gehaltes

Der phosphoHistonH3-Gehalt einer Zelle ist ein Marker für die Mitose. HeLa Tet-On-Zelllinien wurden über den Doppel-Thymidin-Block synchronisiert und zur Analyse der Zellzyklusprogression zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Freilassen vom Thymidin-Block mit Trypsin geerntet, anschließend 2 mal mit 1x PBS gewaschen (Zentrifugation 5 Minuten, 1500 rpm, Multifuge-3-S-R, Heraeus), mit 300 µl 0,5% Formaldehyd für 15 Minuten bei

Raumtemperatur fixiert, erneut 2 mal mit 1x PBS gewaschen, mit eiskaltem 70% Ethanol fixiert und für minimal 20 Minuten auf Eis inkubiert oder über Nacht bei -20°C gelagert. Daraufhin wurden die Zellen mit 1x PBS/0,25% Saponin gewaschen und in 95 µl Inkubationspuffer (0,5% BSA, 0,25% Saponin in 1x PBS) für 10 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurden 5 µl anti-phosphoHistonH3-AF 488 Antikörper für 60 Minuten hinzugegeben. Auf einen weiteren Waschschrift (1x PBS/0,25% Saponin) folgte eine 15 minütige RNase-Behandlung (100 µg/ml). Nach Zugabe von 400 µl Propidiumiodid (50 µg/ml in PBS), einem DNA-interkalierenden Agens, wurden 20.000 Zellen am Durchflusszytometer (FL-1 logarithmisch, FL-3 linear) gemessen.

2.13.3 Zellsortierung

Da die GFP-IκB-ζ-Expression der HeLa Tet-On GFP-Zelllinie sehr gering war, wurden die GFP-positiven Zellen am FACSaria sortiert und dadurch angereichert. Die Sortierung wurde extern am Lehrstuhl für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt.

Zur Vorbereitung wurden 1×10^6 HeLa Tet-On GFP- und HeLa Tet-On GFP-IκB-ζ-Zellen in einer Zellkulturschale (Durchmesser: 10 cm) ausgesät und für 48 Stunden mit 2 µg/ml Doxzyclin behandelt. Als Negativprobe wurden HeLa Tet-On GFP-Zellen, die nicht mit Doxzyclin inkubiert worden waren, mitgeführt. Die Zellen wurden mit Trypsin geerntet und in *cell dissociation solution* (Sigma-Aldrich), 1:1 mit PBS versetzt, aufgenommen, mit Hilfe eines Filters (Maschenweite <math><40\mu\text{m}</math>, BD Biosciences) vereinzelt und in einer Konzentration von $1,75 \times 10^6$ Zellen/ml für die Sortierung in FACS-Röhrchen angesetzt. Nach der Sortierung wurden die Zellen im Wachstumsmedium mit 20% FCS aufgenommen und in 6-Loch Platten ausgesät.

2. 14 Auswertung

Die aufgeführten Diagramme in dieser Arbeit stellen jeweils den Mittelwert und die daraus resultierende Standardabweichung aus drei unabhängig reproduzierten Messungen dar. Aufgezeigt ist jeweils ein exemplarischer Versuch, die unabhängigen Versuche wurden je 3fach durchgeführt.

IV. ERGEBNISSE

1. Einfluss von I κ B- ζ auf den Zellzyklus

NF- κ B reguliert viele biologische Prozesse, darunter auch die Kontrolle des Zellzyklus. Bereits im Jahre 1999 wurde bekannt, dass der humane Cyclin D1-Promotor zwei NF- κ B-Bindungsstellen besitzt, durch die die Expression von Cyclin D1, einem entscheidenden Regulator des G1-Kontrollpunktes, kontrolliert wird (Hinz et al., 1999). Mittlerweile weiß man, dass auf der einen Seite p52/p65-Heterodimere, auf der anderen Seite p52-Homodimere interessanterweise zusammen mit dem I κ B-Protein Bcl-3 als Koaktivator, die Cyclin D1-Expression und darüber hinaus die Expression von c-Myc und Skp2 (S-Phase Kinase assoziiertes Protein 2) in Assoziation mit Transkriptions-Koaktivatoren positiv regulieren. In der S- und G2-Phase des Zellzyklus erfolgt eine negative Regulation dieser Gene über die Assoziation dieser NF- κ B-Dimere mit transkriptionellen Korepressoren. Das mit dem p52-Homodimer assoziierte Bcl-3 wird ebenfalls durch einen Transkriptions-Korepressor wie mSin3A ersetzt (Park et al., 2006; Barre und Perkins, 2007). Auch eine weitere Komponente des NF- κ B-Signalweges, IKK α , hat Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus, indem sie die mitotische Kinase Aurora A phosphoryliert, was zu deren Aktivierung führt (Prajapati et al., 2006).

Basierend auf diesen Ergebnissen, insbesondere der Beteiligung des nukleären I κ B-Proteins Bcl-3 an der Zellzykluskontrolle, wurde der Frage nachgegangen, ob auch I κ B- ζ Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus nimmt. Dies wurde vor allem durch Genexpressionstudien unterstützt, die mittels Micro-Array-Analysen in Kooperation mit Prof. S. Ludwig und Prof. J. Roth (Universität Münster) durchgeführt wurden, die zeigten, dass eine I κ B- ζ -Überexpression in HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) zu einer verminderten Expression von Genen, die für Proteine kodieren, die am Übergang von der G2-Phase in die Mitose oder an der Mitose selbst beteiligt sind, führte.

1.1 Verteilung der Zellzyklusphasen nach I κ B- ζ -Überexpression

Um eine Beteiligung von I κ B- ζ am Zellzyklus zu untersuchen, wurde die Fibrosarkomzelllinie HT1080 retroviral mit einem I κ B- ζ oder Leervektor transduziert und anschließend durch Inkubation mit dem Eisenchelator Mimosin in der G1/S-Phase des Zellzyklus arretiert. Durchflusszytometrische Analysen, die vom Zeitpunkt des Freisetzens bis zu 8 h nach Freisetzen vom Mimosin-Block durchgeführt wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Zellzyklus-Phasen zwischen Leervektor- und I κ B- ζ -transduzierten Zellen. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Kontrolle) war ebenso kein deutlicher Unterschied erkennbar (Abb. 5A). Aus diesem Grund wurden die

Zeitpunkte der Analyse nach dem Freisetzen der Zellen vom Mimosin-Block drastisch auf 32-72 h erhöht. Doch auch hier konnte kaum ein Unterschied in der Verteilung der Zellzyklus-Phasen weder zwischen Leervektor- und $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -transduzierten, noch im Vergleich zu den nicht-blockierten Zellen detektiert werden (Abb. 5B).

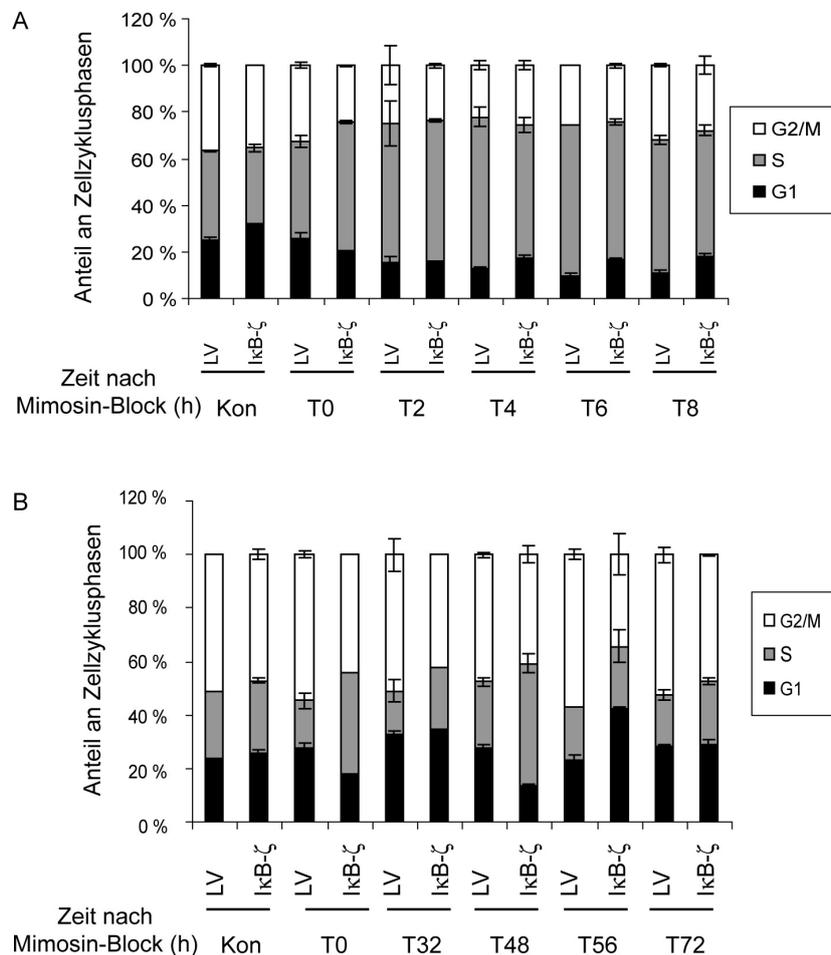


Abbildung 5. Verteilung der Zellzyklusphasen nach $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Überexpression

HT1080-Zellen wurden retroviral mit $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ oder dem entsprechenden Leervektor transduziert, mit 400 μM Mimosin in der G1/S-Phase blockiert und nach 24 h vom Mimosin-Block freigelassen. Zu den angegebenen Zeiten wurde die BrdU-Einlagerung durchflusszytometrisch bestimmt. Kon: unbehandelte Zellen; LV: Leervektor.

Da eine effiziente Blockierung in der G1-/S-Phase mit Mimosin und weiteren Zellzyklus-Inhibitoren (Daten nicht gezeigt) in HT1080-Zellen nicht erreicht wurde, ist anzunehmen, dass diese Zelllinie für Zellzyklus-Analysen nicht geeignet ist. Zudem beansprucht die retrovirale Transduktion zusätzlich zur 24- 48 h dauernden Behandlung mit den Zellzyklusinhibitoren einen Zeitraum von drei Tagen. Um dies zu umgehen, sollte ein Zellsystem verwendet werden, in dem die Zellsynchronisation und $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Induktion zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt werden konnten. Aus diesem Grund war es unabdingbar, für weitere Zellzyklus-Analysen ein induzierbares System zu verwenden. Daher wurden sowohl mono- als auch polyklonale Klone einer HeLa Tet-On Zelllinie, in der die Expression dieses $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Proteins durch Zugabe von Doxozyklin induziert werden konnte, und als Kontrolle zusätzlich Leervektor-exprimierende Zellen generiert.

1.2 Einfluss von I κ B- ζ auf die Mitose

Um den Einfluss von I κ B- ζ auf die Mitose zu untersuchen, wurden polyklonale Leervektor- und I κ B- ζ -exprimierende Zellen entweder unbehandelt belassen oder mit Doxyzyklin behandelt und mittels Doppel-Thymidin-Block in der G1/S-Phase des Zellzyklus blockiert. Die Analyse erfolgte in einem Zeitraum von 10-18 h nach Freisetzen vom Thymidin-Block. Die Expression von Cyclin B1, ein Protein, das hauptsächlich in der G2/M-Phase des Zellzyklus exprimiert wird und zusammen mit dem Protein p34 (CDC2) den Mitose-fördernden Faktor (MPF, *mitosis-promoting factor*) bildet, zeigte keinen Unterschied in I κ B- ζ -exprimierenden Zellen verglichen mit den Doxyzyklin behandelten Leervektorklonen. Im Expressionsniveau des Mitosemarkers phospho Histon H3 zeigte sich nur ein geringer Unterschied zwischen unbehandelten und mit Doxyzyklin behandelten I κ B- ζ Klonen, wobei der Expressionsgrad in Doxyzyklin behandelten Zellen generell geringer war. Auch die Aurora B-Kinase, ein Protein, das erst im Anschluss an die Anaphase exprimiert wird, wurde nicht unterschiedlich zwischen Leervektor und I κ B- ζ sowie unbehandelten und Doxyzyklin behandelten Zellen exprimiert. Ein großes Problem für die Auswertung des Versuchs stellte der Nachweis der I κ B- ζ -Expression in diesem Zellsystem dar. Nach der Thymidin-Behandlung war die Expression von I κ B- ζ in den Doxyzyklin behandelten Zellen verglichen mit den unbehandelten Zellen sowie dem Leervektor nicht mehr eindeutig zu detektieren und lies sich zwischen den verschiedenen Zelllinien nur schwer unterscheiden (Abb. 6A).

In einem weiteren Versuch wurde die Expression von phospho Histon H3 durchflusszytometrisch bestimmt. Verglichen wurden HeLa Tet-On Wildtyp (WT)- und I κ B- ζ -Zellen, die entweder unbehandelt waren oder mit Doxyzyklin behandelt wurden. Analysiert wurden unblockierte Zellen, Zellen direkt sowie 9-16 h nach dem Freisetzen vom Doppel-Thymidin-Block. Die Wildtypzellen hatten über einen weiten Zeitraum eine stärkere phospho Histon H3-Expression im Vergleich zu den I κ B- ζ -Klonen. Zum Zeitpunkt T9 lag der Wert für den WT bei 18 % und für die I κ B- ζ -Zellen bei 12 %. Ein signifikanter Unterschied zwischen der unbehandelten und zugehörigen Doxyzyklin behandelten Zelllinie war allerdings nicht erkennbar (Abb. 6B).

In der Micro-Array-Analyse war die Expression der Protein-Tyrosin-Phosphatasen CDC25B und CDC25C (*cell division cycle homolog 25*, Zellteilungszyklus Homolog 25) durch die Überexpression von I κ B- ζ in HUVECs vermindert. Diese beiden Proteine spielen eine entscheidende Rolle in der Zellzyklusregulation, da sie den Übergang von der G2-Phase in die Mitose durch Aktivierung des p34 (CDC2)/CyclinB1-Komplexes vermitteln. Um zu untersuchen, ob die CDC25B- und CDC25C-mRNA-Expression auch in dem induzierbaren HeLa Tet-On-System von I κ B- ζ beeinflusst werden, wurden WT- sowie I κ B- ζ - mono- oder polyklonale Zelllinien mittels Doppel-Thymidin-Block synchronisiert und

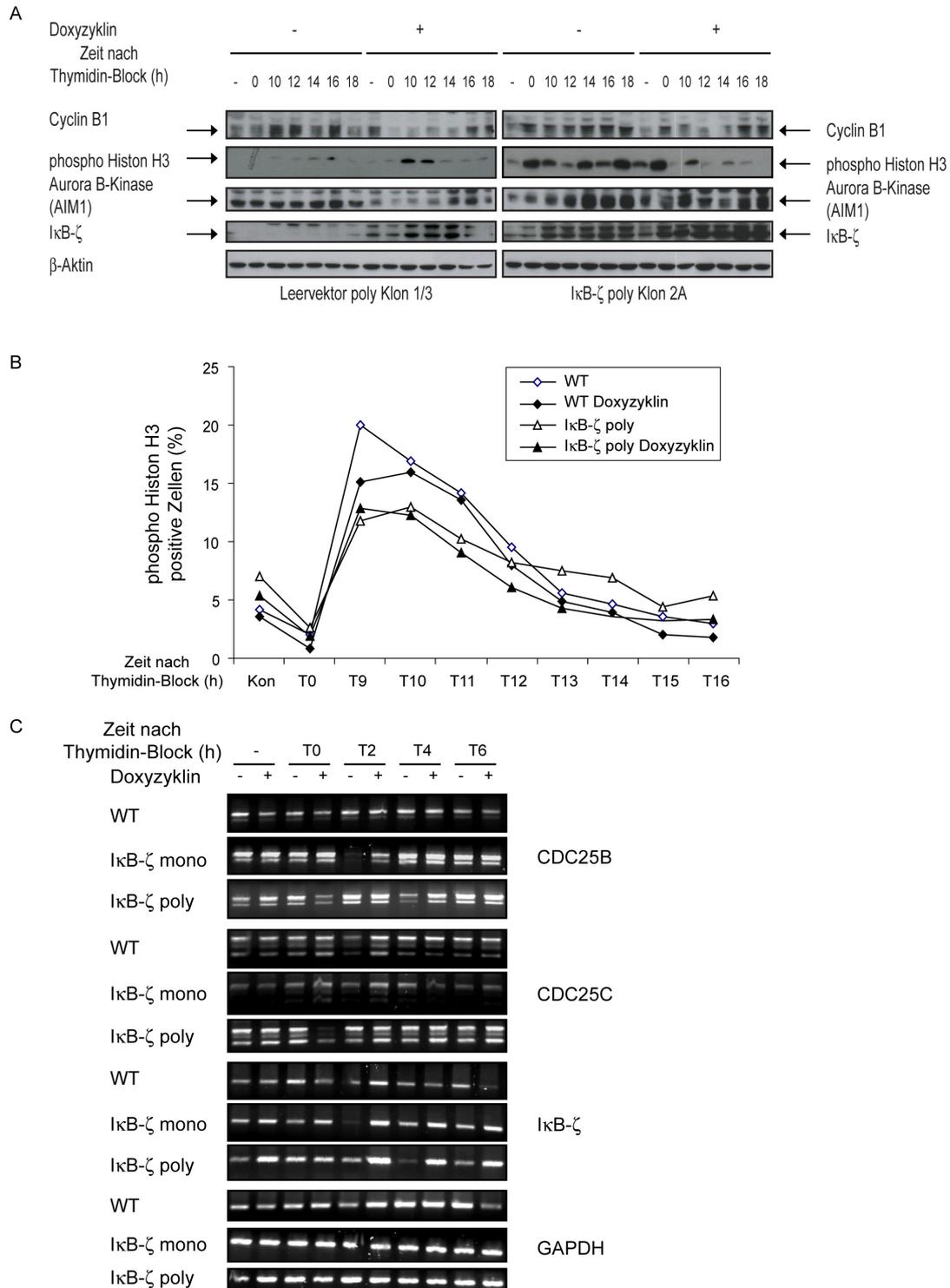


Abbildung 6. I κ B- ζ hat keinen Einfluss auf die Mitose

Polyklonale I κ B- ζ - und Leervektor- oder WT-HeLa Tet-On-Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder mit 2 μ g/ml Doxyzyklin inkubiert und mittels Doppel-Thymidin-Block in der G1/S-Phase blockiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Freisetzen vom Thymidin-Block wurden die Zellen geerntet und **(A)** der Einfluss von I κ B- ζ auf die angegebenen Zellzyklusphasen-Proteine mittels Western Blot analysiert. **(B)** Mitotische Zellen wurden mittels einer phospho Histon H3 Färbung durchflusszytometrisch detektiert und **(C)** der Einfluss von I κ B- ζ auf den Übergang von der G2-Phase in die Mitose durch mRNA-Expression von CDC25B und C mittels RT-PCR analysiert. Als Ladekontrolle diente die GAPDH mRNA-Expression.

entweder unbehandelt belassen oder mit Doxyzyklin inkubiert. Die mRNA-Expression wurde bis zu 6 h nach Freisetzen vom Doppel-Thymidin-Block analysiert. Es konnte kein Einfluss von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ auf die CDC25B- sowie CDC25C-mRNA-Expression nachgewiesen werden (Abb. 6C). Allerdings zeigte sich hier vergleichbar mit der Proteinexpression im Western Blot (Abb. 6A) eine basale Expression der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -mRNA in unbehandelten $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ - und WT-Zellen.

Um das Resultat dieser Versuche, eine fehlende Beteiligung von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ an der Zellzyklusprogression, zu verifizieren, wurde ein Wechsel auf ein weiteres induzierbares System vorgenommen, in dem die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Expression eindeutig nachzuweisen war.

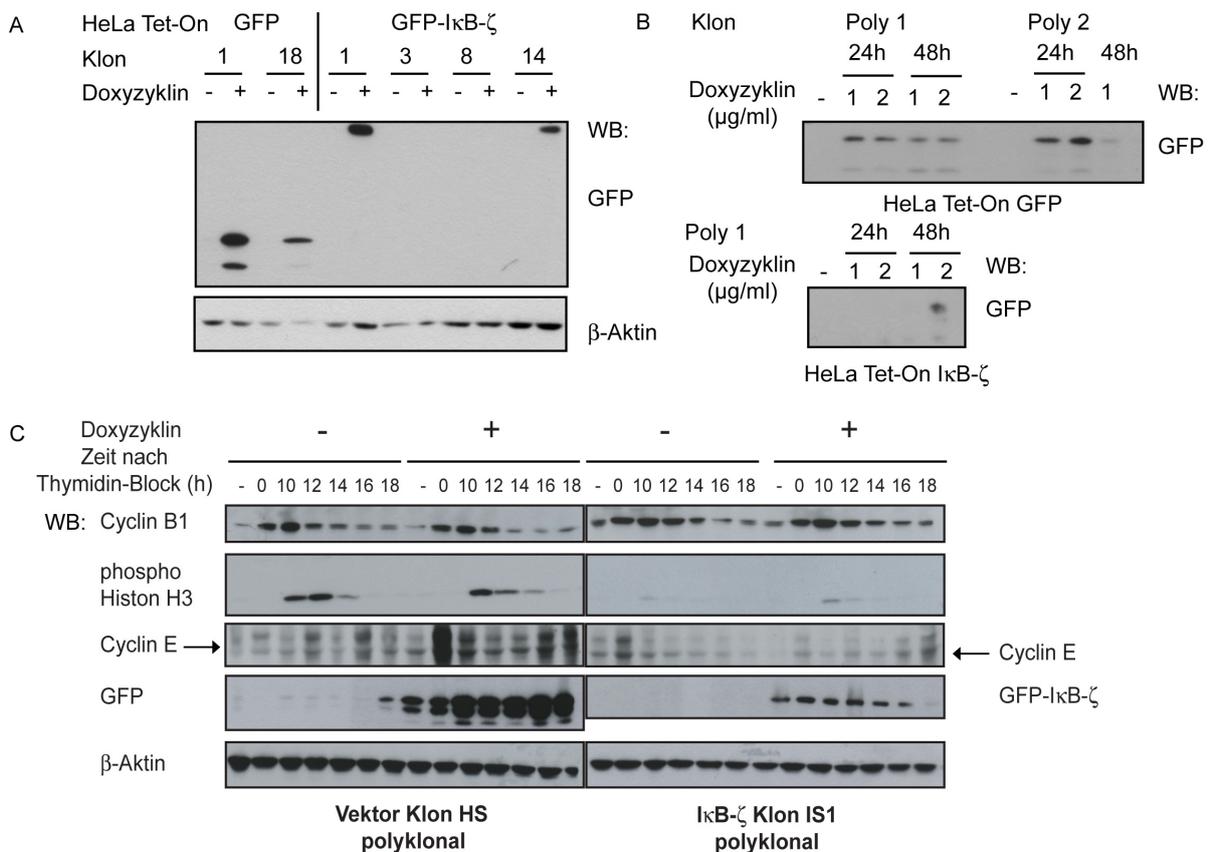


Abbildung 7. $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ hat keinen Einfluss auf die Mitose

Western Blot Analysen zum Nachweis der Expression von GFP oder GFP- $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ nach Zugabe von 2 $\mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin für **(A)** 48 h in monoklonalen und **(B)** 24-48 h in polyklonalen HeLa Tet-On-Zellen. **(C)** Analyse des Einflusses von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ auf die Mitose-Proteine Cyclin B1 und phospho Histon H3 in durchflusszytometrisch sortierten GFP- und GFP- $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ Klonen mittels Western Blot. Die Zellen wurden mit 2 mM Thymidin im Doppelthymidin-Block in der G1/S-Phase blockiert und zu den angegebenen Zeiten nach Freisetzen vom Thymidin-Block geerntet. Die Expression von Cyclin E diente als Kontrolle der Synchronisation durch Thymidin und die Expression von β -Actin als Ladekontrolle.

Hierzu wurden sowohl mono- als auch polyklonale HeLa Tet-On Zelllinien, die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ mit N-terminaler GFP-Markierung oder den Leervektor (GFP) exprimierten, generiert. Die Expression von GFP bzw. $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ nach Induktion durch Zugabe von Doxyzyklin in den

monoklonalen (Abb. 7A) und polyklonalen (Abb. 7B) Zelllinien wurde mittels Western Blot-Analysen nachgewiesen. Die Transfektionseffizienz der HeLa Tet-On Zelllinie betrug nur ~15%. Daher war die Expression von GFP- und GFP-I κ B- ζ in den polyklonalen Zelllinien nach Induktion durch Doxyzyklin entsprechend gering (Abb. 7B). Um die I κ B- ζ -Expression für weitere Versuche zu erhöhen, wurden diese Zelllinien am Durchflusszytometer sortiert. Nach Zugabe von Doxyzyklin konnte die Expression von GFP oder GFP-I κ B- ζ eindeutig detektiert werden (Abb. 7C). Auch in diesem induzierbaren System zeigte sich kein Einfluss von I κ B- ζ auf den Übergang von der G2-Phase in die Mitose oder auf die Mitose selbst. Der CyclinB1-Expressionsgrad war in derselben Zelllinie in unbehandelten und Doxyzyklin behandelten Zellen gleich. Die GFP-I κ B- ζ -Klone zeigten zwar ein geringeres Expressionsniveau von phospho Histon H3 im Vergleich zur GFP-Zelllinie, es war aber auch hier keine zeitliche Verschiebung im Zeitraum von 10-18 h nach Freisetzen vom Doppel-Thymidin-Block erkennbar. Die Effizienz des Doppel-Thymidin-Blocks wurde durch die Cyclin E-Expression kontrolliert (Abb. 7C).

Basierend auf diesen Ergebnissen kann man eine Beteiligung von I κ B- ζ am Übergang von der G2-Phase des Zellzyklus in die Mitose sowie an der Progression späterer Mitosephasen, zumindest in humanen Zervixkarzinom-Zellen, ausschließen.

2. Regulation der I κ B- ζ -Expression durch die miR-124a

Da I κ B- ζ ein im Zellkern lokalisiertes Protein ist (Totzke et al., 2006) und bereits in der mit HUVECs durchgeführten Micro-Array-Analyse gezeigt wurde, dass I κ B- ζ über 100 Zielgene signifikant hoch- oder runterreguliert, ist eine intensive Regulation der I κ B- ζ Genexpression unabdingbar. Weil I κ B- ζ induzierbar exprimiert wird, ist es besonders interessant, ob nach der Induktion eine weitere Kontrolle auf translationaler Ebene existiert. Ein sehr aktueller Mechanismus der posttranskriptionellen Regulation der Proteinexpression ist die Inhibition durch kleine, nicht-kodierende, einzelsträngige RNAs, die so genannten microRNAs. Sie binden in der Regel in der 3'Untranslatierten Region (UTR) von mRNAs und verhindern die Proteinexpression entweder durch eine Destabilisierung der mRNA oder durch Inhibition der mRNA-Translation, was die Expression des Genproduktes direkt unterbindet.

Um zu untersuchen, ob die Expression von I κ B- ζ durch miRNAs reguliert wird, wurde die *Sanger miRNA target scan Datenbank* (<http://microrna.sanger.ac.uk/targets>; Version 2) nach potentiellen Bindungsstellen in der *nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor ζ* (NFKBIZ) mRNA durchsucht. Das in unserem Labor identifizierte humane I κ B- ζ , Transkriptvariante 3, ist eine Isoform des MAIL-Proteins, das auch als NFKBIZ bekannt ist. Daher wird im Folgenden die 3'UTR dieser mRNA als 3'UTR der I κ B- ζ -

mRNA bezeichnet. In der 3'UTR der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -mRNA wurde eine potentielle Bindungsstelle für miR-124a vorhergesagt (Abb. 8A). Die Sequenz der reifen miR-124a wurde der *Sanger miRNA* Registrierung entnommen (Abb. 8B).

In verschiedenen humanen Tumorzelllinien wurde zunächst der Expressionsgrad der miR-124a in unbehandelten Zellen und nach Stimulation mit IL-1 β , ein Stimulus, der zur Expression von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ führt, mittels Real-Time PCR bestimmt. Hierbei stellte sich heraus, dass die miR-124a in den Glioblastomzellen A172, BdBak^{+/+}, BeBak^{+/+}, LN18, T98 und U87, der Leberkarzinom-Zelllinie HepG2, den Zervixkarzinom-Zelllinien HeLa D98 sowie HeLa Tet-Off sowie der Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 nicht oder nur in sehr geringen Mengen exprimiert wurde (Abb. 8C-F).

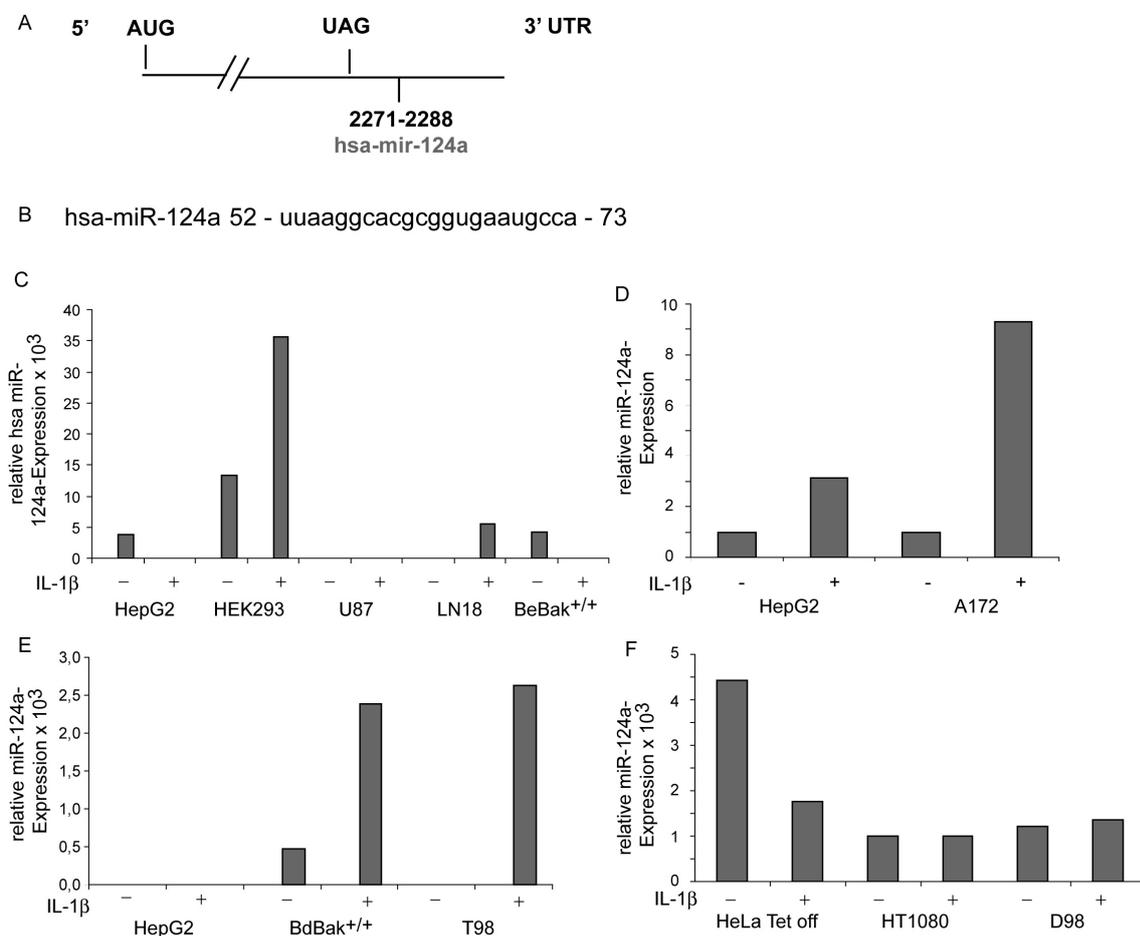


Abbildung 8. Bindungsstelle der miR-124a in der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ mRNA und Expression der miR-124a in verschiedenen humanen Tumorzelllinien

(A) potentielle Bindungsstelle für die hsa-miR-124a in der 3'UTR der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -mRNA nach der *Sanger miRNA target scan* Datenbank (<http://microrna.sanger.ac.uk/targets>; Version 2). (B) Sequenz der reifen miRNA-124a nach *Sanger miRNA* Datenbank. (C-F) Die RNA der angegebenen unbehandelten oder für 2 h mit IL-1 β (2 ng/ml) behandelten humanen Tumorzelllinien wurde isoliert und die Expression der miR-124a mittels Real-Time-PCR bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels komparativer CT-Wert-Methode.

Lediglich die Nierenkarzinom-Zelllinie HEK293 zeigte eine deutliche basale Expression, die durch Stimulation der Zellen mit IL-1 β noch erhöht wurde (Abb. 8C). Zur Auswertung wurde die komparative CT-Wert-Methode angewandt, bei der die CT-Werte versuchsintern auf die Zelllinien mit der geringsten miRNA-Expression normalisiert werden. Für miR-124a lagen die gemessenen CT-Werte, wenn überhaupt messbar, im Schnitt bei 40-45 Zyklen.

Da die miR-124a vorzugsweise im Gehirn exprimiert wird (Lim et al., 2005), wurde in den Glioblastomzelllinien A172, BdBak^{+/+}, BeBak^{+/+}, LN18, T98 und U87 zunächst überprüft, ob I κ B- ζ durch IL-1 β induzierbar war. Abgesehen von der Zelllinie U87 konnte die Expression von I κ B- ζ in allen untersuchten Zelllinien induziert werden (Abb. 9A). Allerdings wurde die miR-124a unter diesen Bedingungen nicht oder nur in geringem Maße exprimiert (Abb. 8C-E). Wie kürzlich nachgewiesen werden konnte, ist die Expression dieser miRNA in humanen Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs durch die Hypermethylierung von CpG-Inseln unterbunden. Dies führt zur Aktivierung der Cyclin D Kinase 6 (CDK6) und zur Phosphorylierung des Retinoblastoma Tumorsuppressorgens (Lujambio et al., 2007). Versuche, die miR-124a in den Nervenzelllinien durch den Methylierungsinhibitor 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-AzaCyd) zu induzieren, waren in der Zelllinie A172 in geringem Maße und in den Zelllinien BdBak^{+/+} sowie BeBak^{+/+} sehr erfolgreich, wohingegen sich in den LN18- und T98-Zellen nach Behandlung mit 5-AzaCyd sogar eine Reduktion der miR-124a-Expression (Abb. 9B) zeigte. Als zusätzliche Kontrolle der miR-124a-Expression nach Behandlung der Zellen mit 5-AzaCyd wurde in Western Blot-Analysen die Expression der CDK6 untersucht. Hierbei zeigte sich dem Expressionsgrad der miR-124a entsprechend (Abb. 9B) in den Zelllinien T98 und LN18 kein Effekt, in den Zelllinien A172, BdBak^{+/+} und BeBak^{+/+} war die Expression der CDK6 verringert (Abb. 9C).

In weiterführenden Versuchen sollte der Einfluss der 5-AzaCyd-induzierten miR-124a-Expression auf die Induktion der I κ B- ζ -mRNA und dessen Zielgen IL-6 in BeBak^{+/+}- und A172-Zellen untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass bereits das 5-AzaCyd-Lösungsmittel die Induktion der I κ B- ζ -mRNA durch IL-1 β sowie die IL-6-mRNA-Expression komplett verhinderte. In LN18-Zellen wurden die I κ B- ζ - und IL-6-mRNA zwar exprimiert, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von IL-1 β - und 5-AzaCyd beobachtet werden. In den unbehandelten HepG2-Zellen, die als Positivkontrolle für die IL-1-induzierte I κ B- ζ -Expression in einem bekannten Zellsystem dienen, konnte die I κ B- ζ mRNA noch induziert werden (Abb. 9D). Insgesamt lässt sich unter diesen Versuchsbedingungen daher keine Aussage über den Einfluss der miR-124a auf die I κ B- ζ -Expression treffen. Aus diesem Grund wurde der experimentelle Ansatz für weitere miR-124a-Analysen verändert.

Die miR-124a wird in HepG2-Zellen weder basal exprimiert noch ist sie durch IL-1 β induzierbar (Abb. 8C). Aus diesem Grund ist diese Zelllinie ein optimales System, um zu

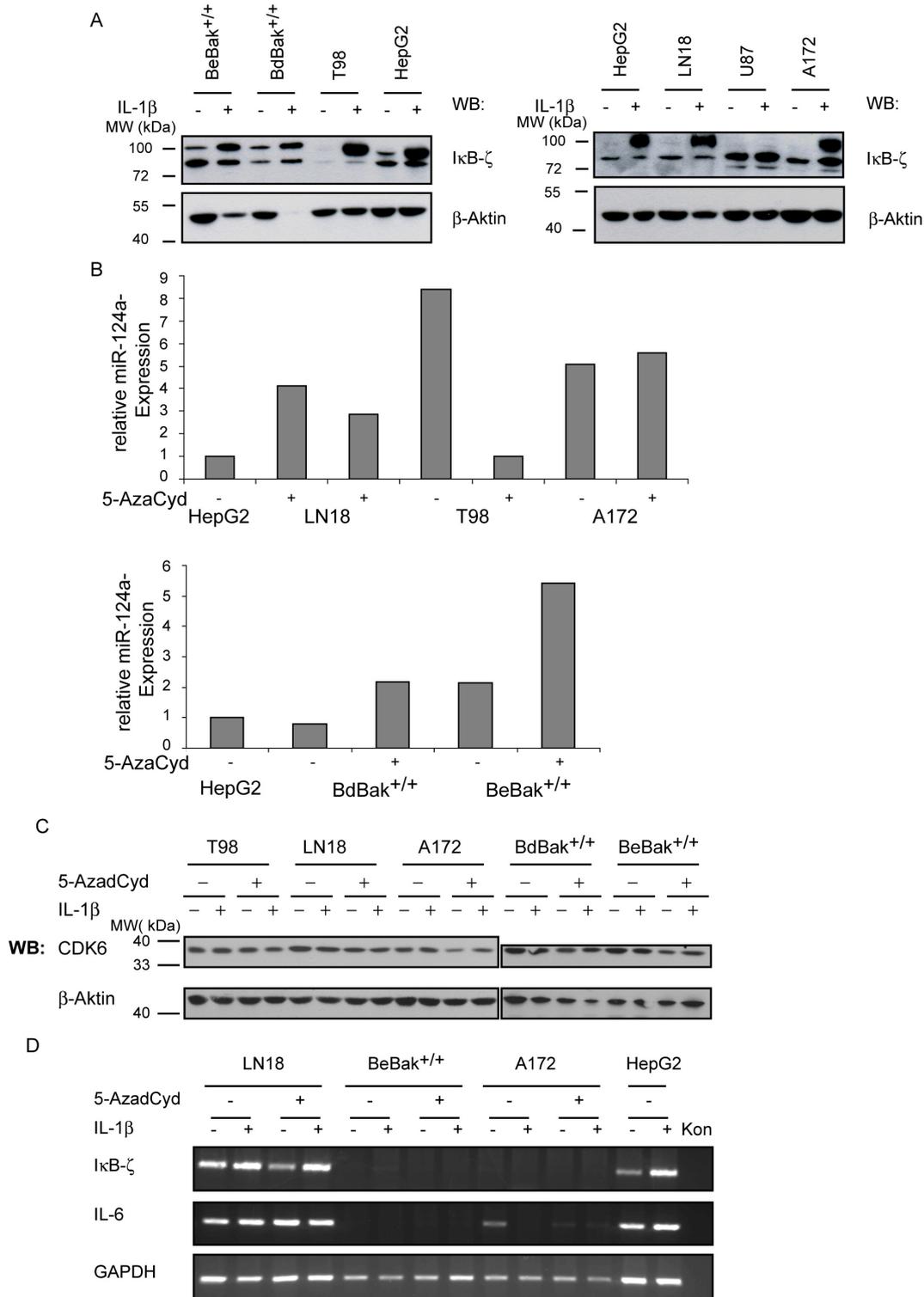


Abbildung 9. Induktion von I κ B- ζ in verschiedenen Glioblastomzelllinien vor und nach Demethylierung mit 5-AzaCyd (A) Western Blot Analysen zum Nachweis der Induktion der I κ B- ζ -Expression in verschiedenen Nervenzelllinien durch IL-1 β (2 ng/ml) für 2 h (B) Glioblastomzelllinien wurden mit 1 μ M 5-AzaCyd und dem entsprechenden Lösungsmittel (LM) für 72 h behandelt. Die Expression der miR-124a wurde in der Real-Time PCR kontrolliert. (C-D) Verschiedene Nervenzelllinien wurden mit 1 μ M 5-AzaCyd oder dem entsprechenden LM für 72 h behandelt und anschließend für 2 h mit IL-1 β (2 ng/ml) behandelt. (C) Western-Blot-Analysen zum Nachweis der CDK6-Expression. (D) RT-PCR-Analysen zum Nachweis der I κ B- ζ und IL-6-Expression.

untersuchen, ob die miR-124a die IL-1 β -induzierte I κ B- ζ -Expression reguliert. HepG2-Zellen wurden transient entweder mit einem miR-124a Vorläufermolekül oder einer Negativkontrolle (pre-miR neg.ctrl.) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die I κ B- ζ -Expression durch Behandlung der Zellen mit IL-1 β für 2-4 h induziert. Der I κ B- ζ mRNA-Level wurde durch die Expression der miR-124a im Vergleich zu untransfizierten oder mit der Negativkontrolle transfizierten Zellen kaum beeinflusst, die I κ B- ζ -Expressionslevel blieben vergleichbar (Abb. 10A). Ein anderes Bild bot sich beim Vergleich der I κ B- ζ Proteinexpression. In den

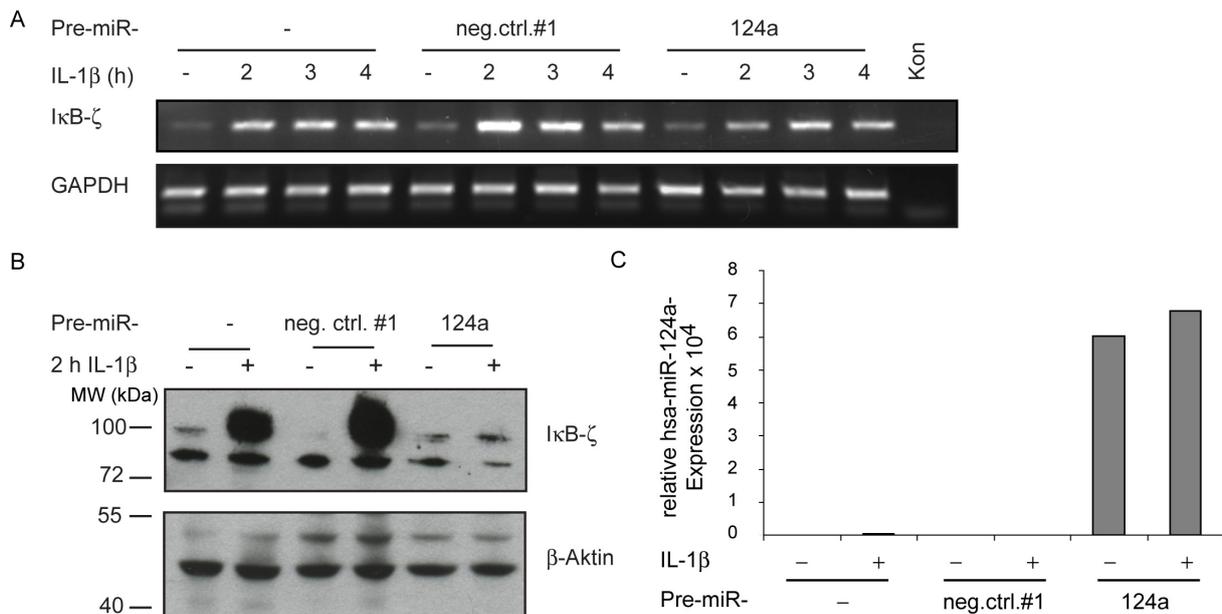


Abbildung 10. Die miR-124a inhibiert die Translation von I κ B- ζ , fördert jedoch nicht dessen mRNA-Degradation

HepG2-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit 15 nM der Pre-miR-Negativkontrolle (neg.ctrl. #1) oder der Pre-miR-124a für die angegebenen Zeitpunkte mit 2 ng/ml IL-1 β zur Induktion der I κ B- ζ Expression stimuliert. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet. Nachweis der I κ B- ζ -Expression erfolgte mittels (A) RT-PCR- und (B) Western Blot-Analyse. (C) Die Expression der miR-124a wurde mittels Real-Time PCR kontrolliert. Kon: RT ohne Template.

untransfizierten Zellen und in den mit der Kontroll-miRNA transfizierten Zellen war die Expression von I κ B- ζ durch IL-1 β stark induzierbar, wohingegen die I κ B- ζ Proteinexpression in den mit der miR-124a transfizierten Zellen interessanterweise stark inhibiert wurde (Abb. 10B). Somit reguliert die miR-124a die I κ B- ζ -Expression über eine translationale Inhibition eher als über eine mRNA-Degradation. Die Überexpression der miR-124a für diesen Versuch wurde in den miR-124a transfizierten HepG2-Zellen mittels Real-Time PCR nachgewiesen (Abb. 10C).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die miR-124a tatsächlich in der Lage ist, an die vermeintliche Bindungsstelle in der I κ B- ζ 3'UTR zu binden und so die Expression von I κ B- ζ zu unterbinden. Wichtig für die Erkennung der Ziel-mRNA durch die miRNA ist eine

für die Nukleotide 13-16 der miRNA. Die miRNA Bindungsstelle sollte in der 3'UTR der mRNA mindestens 15 Nukleotide vom Stop-Codon entfernt liegen und nicht zentral in einer langen 3'UTR gelegen sein (Grimson et al., 2007).

Die meisten dieser Merkmale treffen auf die Bindungsstelle für die miR-124a in der I κ B- ζ mRNA zu. Die Bindungsstelle befindet sich in einem Abstand von 70 Nukleotiden vom Stop-Codon und nicht in der Mitte der 3'UTR. Des Weiteren existieren zwei 3mer Bindungsstellen für die miRNA im Bereich der Nukleotide 12-14 und 17-19 der miR-124a (Abb. 11A). Aufgrund dieser Merkmale ist eine Bindung der miR-124a in der I κ B- ζ 3'UTR sehr wahrscheinlich.

Drei unterschiedliche Luciferase-Konstrukte wurden generiert, um die Bindung der miR-124a in der I κ B- ζ 3'UTR nachzuweisen. Ein Konstrukt enthielt die I κ B- ζ Wildtyp 3'UTR (I κ B- ζ 3'UTR), zwei weitere Konstrukte enthielten Mutationen in der vermeintlichen Bindungsstelle, wovon ein Konstrukt Mutationen in der Bindungsstelle für die 7mer Keimregion (I κ B- ζ 3'UTR mut b) und ein zweites zusätzlich Mutationen in den beiden 3mer Regionen (I κ B- ζ 3'UTR mut a) hatte (Abb. 11B). HEK293-Zellen, die mit dem Vorläufermolekül der miR-124a sowie dem I κ B- ζ 3'UTR-Konstrukt kotransfiziert wurden, zeigten eine deutliche Erniedrigung der Luciferase-Aktivität, wohingegen Zellen, die mit der Pre-miR-124a und einem der beiden mutierten Konstrukte kotransfiziert waren, keine Erniedrigung der Luciferase-Aktivität im Vergleich zum Leervektor zeigten (Abb. 11C). Die leichte Erniedrigung in den mit der Negativkontroll-miRNA und dem I κ B- ζ 3'UTR-Konstrukt transfizierten Zellen (Abb. 11C) ist wahrscheinlich auf die geringe basale Expression der miR-124a in den HEK 293-Zellen zurückzuführen (Abb. 8C). Die Expression der miR-124a wurde in der Real-Time PCR kontrolliert (Abb. 11D).

Insgesamt zeigte sich somit, dass die I κ B- ζ mRNA ein Ziel der miR-124a ist und darüber hinaus, dass die 7mer Bindungsstelle ausreicht, um die I κ B- ζ -Expression zu regulieren, da kein erkennbarer Unterschied in der Luciferase-Aktivität zwischen den beiden mutierten Konstrukten existierte.

3. I κ B- ζ Transaktivierung und deren Regulation

3.1 I κ B- ζ besitzt eine Transaktivierungsdomäne, die im N-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert ist

Anhand unserer Microarray-Analysen wurde nachgewiesen, dass I κ B- ζ nicht nur inhibierend auf die Genexpression wirkt, sondern auch transkriptionelle Aktivität ausübt. Diese transaktivierende Funktion sollte mittels eines auf dem GAL4-Protein der Hefe basierenden Luciferase-Reportergentests verifiziert werden. Hierbei zeigte sich, dass I κ B- ζ im Vergleich zum Leervektor in der Tat eine 2,6fach erhöhte Transaktivierungsaktivität

aufwies. Dieses Ergebnis bestätigte auch die Beobachtung aus dem in unserem Labor durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-System, dass das humane $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Gesamtprotein eine endogene Transaktivierungsaktivität besitzt. Durch diesen Test wurde des Weiteren ermittelt, dass die Transaktivierungsdomäne von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ im N-Terminus lokalisiert ist. Um auch dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden Luciferase-Reportergentests mit dem N- (AS 2-317) und C-Terminus (AS 318-618) des $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Proteins durchgeführt. Während für den $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ C-Terminus keine Transaktivierungsaktivität nachweisbar war, führte der N-Terminus verglichen mit dem Leervektor zu einer dramatischen Erhöhung der transkriptionellen Aktivität, die mit dem 52fachen Wert sogar weit über der des $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Gesamtproteins lag. Anhand dieser Daten konnte somit das Ergebnis aus unserem Hefe-Zwei-Hybrid-System bestätigt werden, dass die Transaktivierungsdomäne von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ eindeutig im N-Terminus lokalisiert ist.

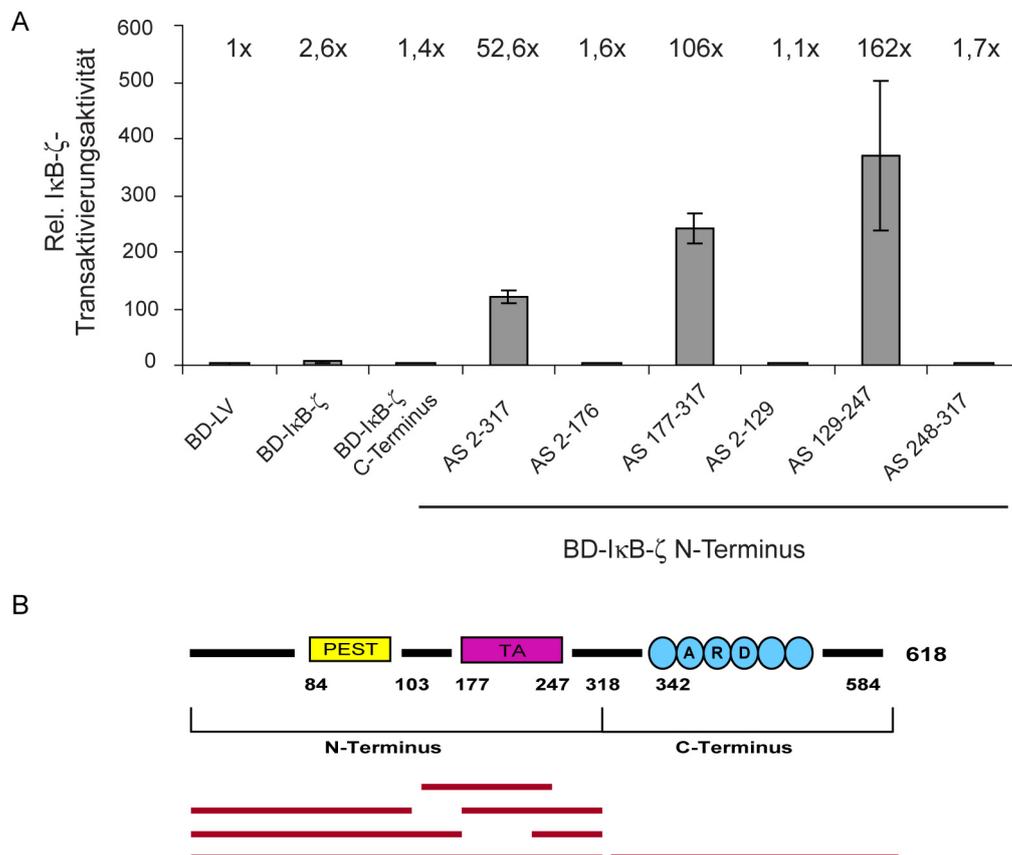


Abbildung 12. Der N-Terminus von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ besitzt eine starke Transaktivierungsaktivität im Bereich von AS177-247

(A) Luciferase-Reportergen-Analysen zum Nachweis der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Transaktivierungsaktivität. HEK293-Zellen wurden mit den verschiedenen BD- $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Konstrukten oder dem BD-Leervektor sowie einem *firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Plasmid für 24 h kotransfiziert. (B) Schematische Darstellung des $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Proteins. In Rot sind die verwendeten Konstrukte zur Bestimmung der Lokalisation der Transaktivierungsdomäne gekennzeichnet. ARD: Ankyrinwiederholungs-Domäne; LV: Leervektor; NLS: nukleäre Lokalisationssequenz; PEST: Prolin (P)-, Glutamat (E)-, Serin (S)- und Threonin (T)-reiche Domäne; TA: Bereich mit starker Transaktivierungsaktivität.

Um im Weiteren die transaktivierende Domäne von I κ B- ζ genauer zu charakterisieren, wurde dessen Proteinsequenz im Programm EMBnet Austria (<https://emb1.bcc.univie.ac.at>) analysiert und auf potentielle Transaktivierungsdomänen untersucht. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden verschiedene Konstrukte des I κ B- ζ N-Terminus synthetisiert und deren Transaktivierungsaktivität mittels des Luciferase-Reportergentests analysiert.

Insbesondere Konstrukte, die die AS177-317 oder AS129-247 beinhalten, wirkten stark transaktivierend, wohingegen die Konstrukte mit den AS 2-176, 2-129 und 248-317 keine erhöhte Transaktivierungsaktivität aufwiesen (Abb.12A). Somit konnte durch die Verwendung von Konstrukten, die verkürzte Bereiche des I κ B- ζ N-Terminus (AS 2-317) enthielten, die Lokalisation der Transaktivierungsdomäne weiter eingegrenzt werden. Abbildung 12B stellt die im Luciferase-Reportergentest verwendeten Konstrukte in Bezug zu den für I κ B- ζ bekannten Domänen dar.

3.2 NF- κ B beeinflusst die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ

Wir konnten bereits zeigen, dass I κ B- ζ die Promotor-Aktivität von NF- κ B inhibiert und dass der C-Terminus, aber nicht der N-Terminus von I κ B- ζ für dieses Inhibitionsvermögen verantwortlich ist (Totzke et al., 2006). Um nun zu untersuchen, ob NF- κ B im Gegenzug die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ reguliert, wurden HEK293-Zellen, die entweder mit einem I κ B- ζ -Plasmid oder dem Leervektor transfiziert waren, mit oder ohne Vorinkubation (1h) mit dem IKK-Inhibitor Bay 11-7082, wodurch selektiv und irreversibel die induzierbare Phosphorylierung von I κ B- α inhibiert wird, für 6 h mit TNF- α inkubiert. Zusätzlich wurden als Kontrolle transfizierte Zellen ausschließlich mit Bay 11-7082 behandelt. Im Luciferase-Reportergentest zeigte sich, dass TNF- α zu einer deutlichen Erhöhung der Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ führte, welche nach Vorinkubation mit Bay 11-7082 stark inhibiert wurde. Bay 11-7082 alleine hatte nur einen marginalen Effekt auf die I κ B- ζ -Transaktivierungsaktivität (Abb. 13A). Dieses Ergebnis wurde in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) bestätigt. In Wildtyp-MEFs, die mit dem I κ B- ζ -Plasmid transfiziert wurden, war die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ im Vergleich zu MEFs, die mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert waren, 16fach erhöht. In MEFs, die eine Defizienz für die NF- κ B-Untereinheiten p50 oder p65 aufwiesen (Abb 13C), die beide in der Lage sind, mit I κ B- ζ zu interagieren, wurde eine bedeutend verminderte I κ B- ζ -Transaktivierungsaktivität gemessen (Abb 13B). Auch in einem weiteren Zellsystem zeigte sich eine starke Abhängigkeit der transaktivierenden Funktion von I κ B- ζ vom Transkriptionsfaktor NF- κ B. In HEK293-Zellen zeigte eine Kotransfektion der NF- κ B-Untereinheiten p50, p65, RelB, p52 sowie c-Rel mit den Plasmiden des Luciferase-Systems, dass p50 und p52, die beide keine

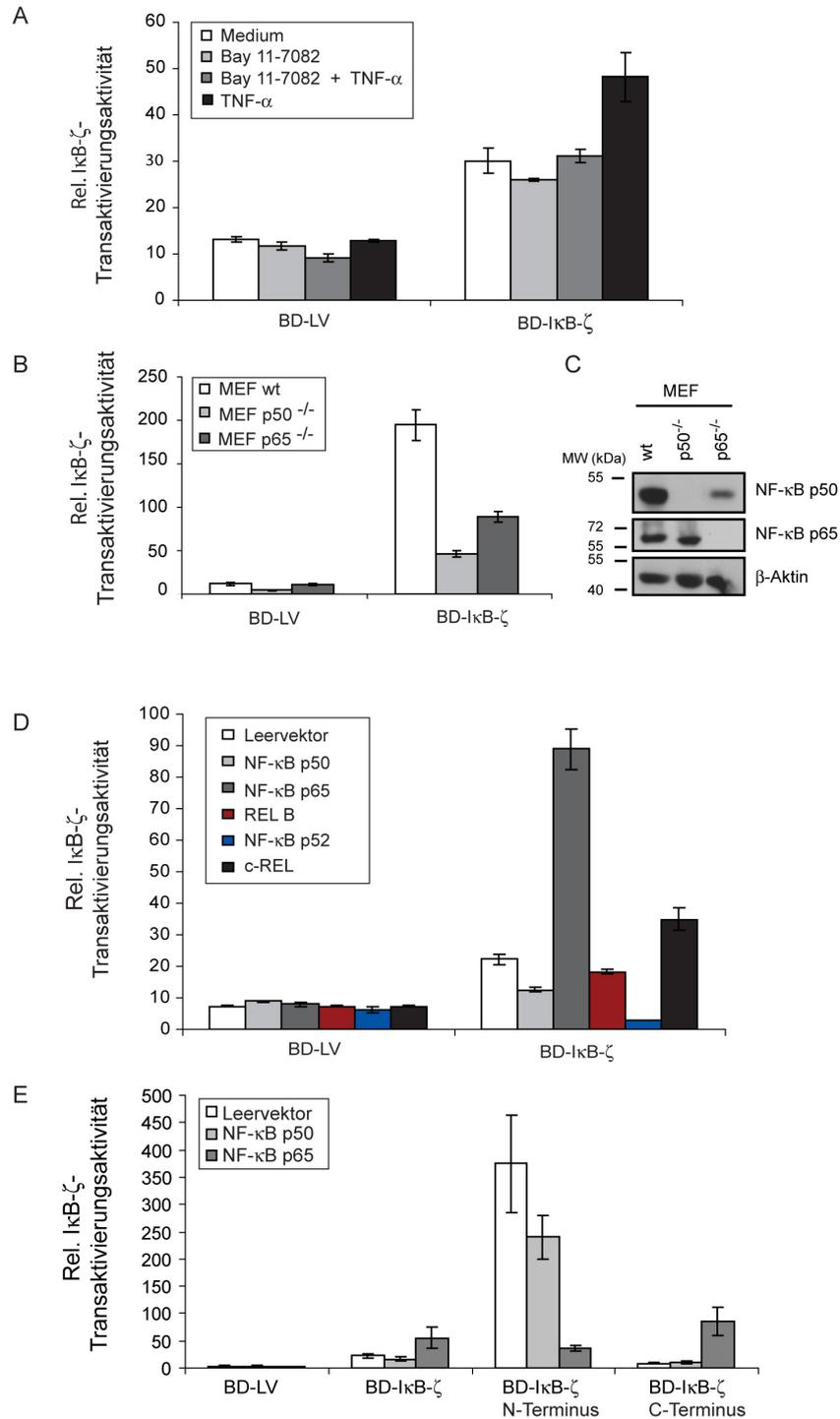


Abbildung 13. Die IκB-ζ-Transaktivierungsaktivität wird durch NF-κB reguliert

(A,B,D,E) Luciferase-Reportergen-Analysen zur Bestimmung der IκB-ζ-Transaktivierungsaktivität. HEK293-Zellen (A, D, E) oder MEFs mit den angegebenen NF-κB Defizienzen (B) wurden mit dem BD-IκB-ζ-Konstrukt, dem BD-IκB-ζ N- oder C-Terminus oder dem BD-Leervektor sowie einem *firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Plasmid und, wenn angegeben, mit den aufgeführten NF-κB-Untereinheiten für 24 h kotransfiziert. Die Zellen wurden nach Transfektion entweder (A) mit oder ohne Vorinkubation (1 h) mit dem IKK-Inhibitor Bay 11-7082 (25 μM) für 6 h mit TNF-α (10 ng/ml) behandelt sowie als Kontrolle nur mit Bay inkubiert oder (B,D,E) direkt geerntet. (C) Der Expressionsstatus von p50 und p65 in MEF-Wildtyp (wt)-, p50^{-/-}- und p65^{-/-}-Zellen wurde mittels Western Blot-Analyse kontrolliert. LV: Leervektor.

TAD besitzen, die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ drastisch verminderten, wohingegen NF- κ B-Untereinheiten, die eine Transaktivierungsdomäne besitzen, unterschiedliche Effekte auf die I κ B- ζ -Transaktivierung hatten. Während p65 zu einer dramatischen Erhöhung der I κ B- ζ -Transaktivierungsaktivität führte, erhöhte c-Rel diese nur leicht und RelB hatte sogar keinen Effekt auf die Transaktivierung von I κ B- ζ (Abb.13D).

Um nun zu analysieren, ob p65 und p50 die N-terminale I κ B- ζ -Transaktivierungsaktivität direkt beeinflussen können und ob die p65-vermittelte Zunahme der Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ auf einer kombinierten Transaktivierungsaktivität der beiden Proteine beruht, wurden Konstrukte, die den N- oder C-Terminus von I κ B- ζ exprimieren, mit den NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 kotransfiziert und Transaktivierungstests durchgeführt. In diesem Experiment zeigte sich, dass wie für das I κ B- ζ Gesamtprotein, die Transaktivierungsaktivität des I κ B- ζ N-Terminus durch die NF- κ B-Untereinheit p50 reduziert wurde. Dies traf im Gegensatz zu den Ergebnissen für das I κ B- ζ Gesamtprotein auch auf die NF- κ B-Untereinheit p65 zu.

Obwohl der C-Terminus von I κ B- ζ keinerlei Transaktivierungsaktivität aufwies, konnte diese nach Koexpression mit p65 induziert werden, was nur durch die Transaktivierungsdomäne im p65-Molekül vermittelt werden konnte (Abb. 13E). Dementsprechend hatte die NF- κ B-Untereinheit p50 keinen Effekt nach Koexpression mit dem C-Terminus von I κ B- ζ . Insgesamt weisen diese Daten darauf hin, dass die Suppression der I κ B- ζ -Transaktivierungsaktivität durch p50 wahrscheinlich über die TAD des I κ B-Proteins vermittelt wird, wohingegen der positive Effekt von p65 auf die transaktivierende Aktivität von I κ B- ζ vermutlich durch Interaktion mit dessen Ankyrinwiederholungen im C-Terminus ausgeübt wird. Sind diese nicht vorhanden, hat p65 wie p50 einen negativen Effekt auf die I κ B- ζ -Transaktivierungsaktivität, die ebenso wahrscheinlich über dessen TAD vermittelt wird.

Somit wurde nachgewiesen, dass die NF- κ B-Untereinheit p65 die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ durch Bindung an I κ B- ζ und Koexpression ihrer eigenen Transaktivierungsaktivität erhöht und p50 die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ vermindert. Eine NF- κ B-abhängige Regulation von I κ B- ζ -Zielgenen ist daher sehr wahrscheinlich.

Im nächsten Schritt sollte analysiert werden, ob die p65-abhängige Zunahme der I κ B- ζ -Transaktivierungsaktivität auf eine Kolokalisation dieser Proteine im Zellkern zurückzuführen sein könnte. Während p65 erst nach Aktivierung in den Zellkern gelangt, ist I κ B- ζ ein nukleäres Protein, das in Matrix-assoziierten Deacetylase (MAD)-Körperchen mit HDAC5 und dem transkriptionellen Korepressor SMRT kolokalisiert ist (Totzke et al., 2006). Für die Lokalisationsstudien wurden HeLa Tet-Off Zellen mit der NF- κ B-Untereinheit p65 und I κ B- ζ kotransfiziert. In einer Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich erwartungsgemäß, dass die p65-Untereinheit von NF- κ B in unstimulierten Zellen im Zytoplasma der Zelle und I κ B- ζ in

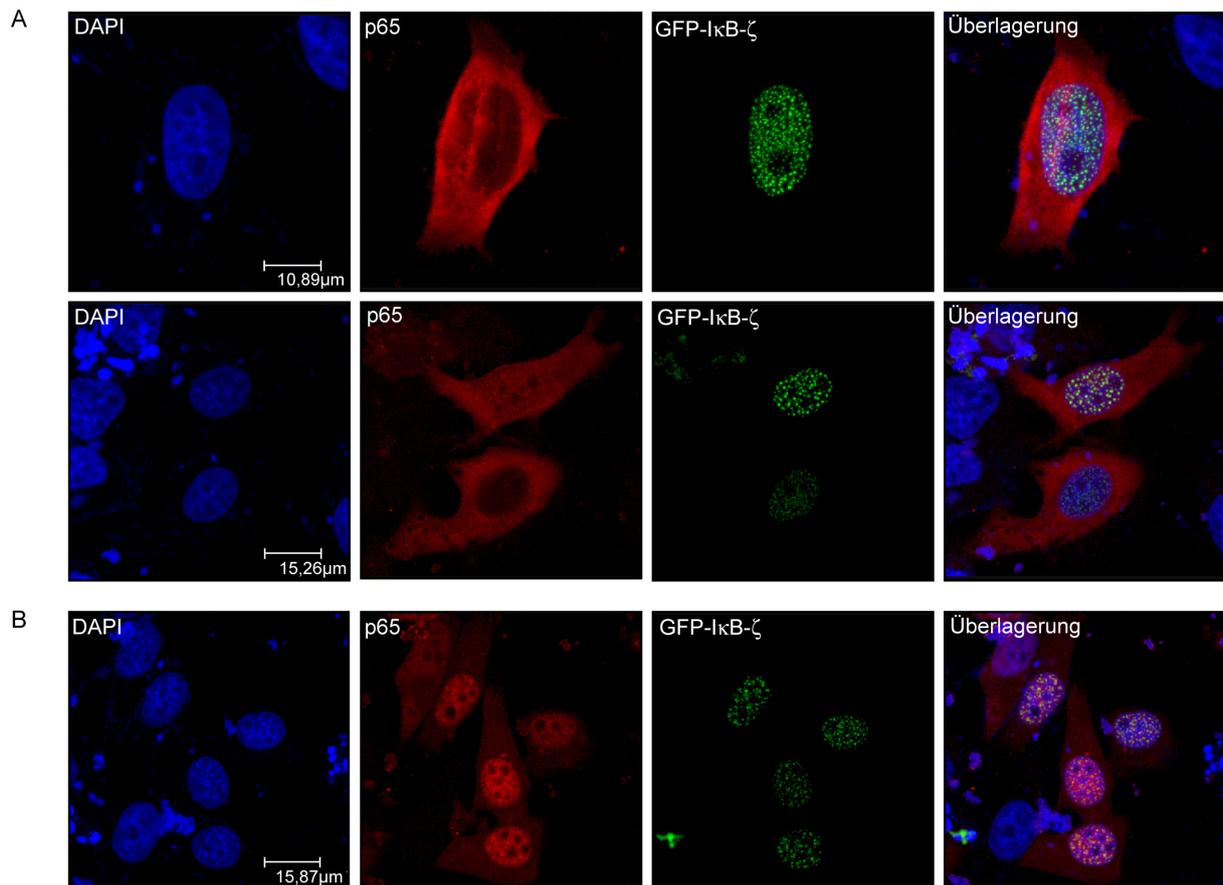


Abbildung 14. IκB-ζ und die NF-κB-Untereinheit p65 zeigen keine direkte Kolokalisation in subnukleären Strukturen des Zellkerns

(A,B) Kolokalisationsstudien von IκB-ζ und p65 mittels Immunfluoreszenz-Analysen. HeLa Tet-Off Zellen wurden mit einem p65-Myc/His-Konstrukt und GFP-IκB-ζ kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen entweder (A) direkt fixiert oder (B) 30 min vor der Fixation mit TNF-α (10 ng/ml) stimuliert und mit einem anti-p65-Antikörper und darauf einem AF-594 markierten sekundären inkubiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

den für dieses Protein typischen MAD-Körperchen im Zellkern lokalisiert war (Abb. 14A). In einigen unstimulierten Zellen war die p65-Untereinheit allerdings bereits nach IκB-ζ Koexpression homogen im Zellkern verteilt (Abb. 14A). Nach Stimulation des TNF-α Signalweges gelangte die NF-κB-p65-Untereinheit in den Zellkern und zeigte dort eine homogene Verteilung, während IκB-ζ in den MAD-Körperchen lokalisiert blieb (Abb. 14B).

In einem umgekehrten Versuchsansatz sollte untersucht werden, ob IκB-ζ die Genregulation der NF-κB-Untereinheiten p50 und p65 beeinflussen kann. Hierzu wurden GAL4-Konstrukte von p50, p65 sowie des p65 C- und N-Terminus (Schmitz und Baeuerle, 1991) entweder mit dem pEGFP-Leervektor oder pEGFP-IκB-ζ in HEK293 Zellen koexprimiert und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Erwartungsgemäß zeigte das GAL4-p50-Konstrukt ebenso wie der -p65 N-Terminus keine Transaktivierungsaktivität, doch auch nach Koexpression mit IκB-ζ wurde keine Veränderung beobachtet. Im Vergleich zum Leervektor wurde die Transaktivierungsaktivität des p65-Gesamtproteins durch Koexpression von IκB-ζ

leicht herabgesetzt, ein Einfluss auf die starke Transaktivierungsaktivität des p65 C-Terminus konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Abb. 15). Somit beeinflussen zwar p50 und p65 die $\kappa\text{B-}\zeta$ -Transaktivierung, $\kappa\text{B-}\zeta$ aber offenbar nicht oder nur in geringem Maße die transkriptionelle Funktion von p50 oder p65.

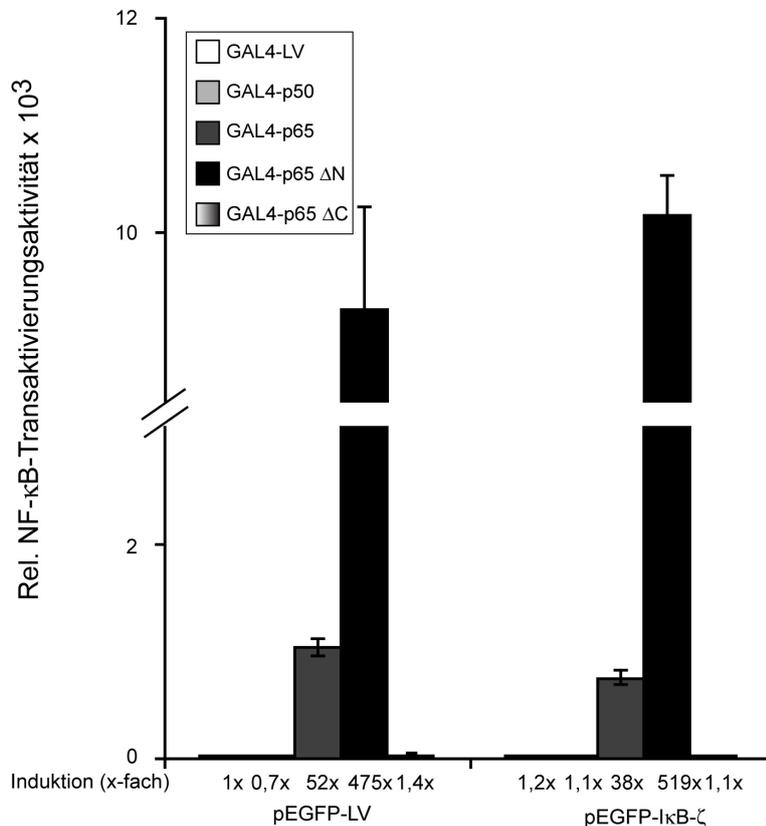


Abbildung 15. $\kappa\text{B-}\zeta$ hat keinen Einfluss auf die transkriptionelle Funktion der p50- oder p65-NF- κ B-Untereinheiten

HEK293-Zellen wurden mit dem GAL4-Leervektor (GAL4-LV) oder den GAL4-Fusionsproteinen der NF- κ B-Untereinheiten p50 (GAL4-p50), p65 (GAL4-p65), p65 mit TAD (GAL4- Δ N) und ohne TAD (GAL4- Δ C), dem pEGFP-Leervektor (LV), oder pEGFP- $\kappa\text{B-}\zeta$ sowie dem *firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Plasmid kotransfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde nach 24 h mittels einer Luciferase-Reportergen-Analyse bestimmt.

3.3 $\kappa\text{B-}\zeta$ wird durch Phosphorylierung posttranslational modifiziert

Da die Phosphorylierung eine weit verbreitete Proteinmodifikation zur Regulation der NF- κ B- sowie κB -Proteine ist, stellte sich die Frage, ob die $\kappa\text{B-}\zeta$ -Transaktivierung ebenso durch eine Phosphorylierung reguliert sein könnte. Daher wurde zunächst untersucht, ob dieses κB -Protein einer Phosphorylierung unterliegt. Die Analyse der $\kappa\text{B-}\zeta$ Proteinsequenz im Programm Motif Scan (<http://scansite.mit.edu>) ergab tatsächlich eine Vielzahl potentieller Phosphorylierungsstellen von $\kappa\text{B-}\zeta$ mit unterschiedlicher Stringenz. Die Phosphorylierungsstellen mit hoher Stringenz befanden sich im $\kappa\text{B-}\zeta$ N-Terminus und waren entweder als Serin- oder als Threonin-Prolin-Phosphorylierungsstellen angegeben. Mittels Immunopräzipitationen wurde das Vorhandensein solcher Phosphorylierungsstellen mit gegen $\kappa\text{B-}\zeta$, phosphorylierte Serine oder phosphorylierte Threonin-Prolin-Stellen gerichteten Antikörpern in HEK293 Zellen überprüft, die entweder mit dem pEGFP-Leervektor oder mit

pEGFP-I κ B- ζ transfiziert worden waren. I κ B- ζ konnte sowohl durch einen gegen Threonin-Prolin-Stellen gerichteten Antikörper, als auch durch den polyklonalen I κ B- ζ -Antikörper präzipitiert werden. In einer darauf folgenden Western Blot-Analyse mit Antikörpern, die

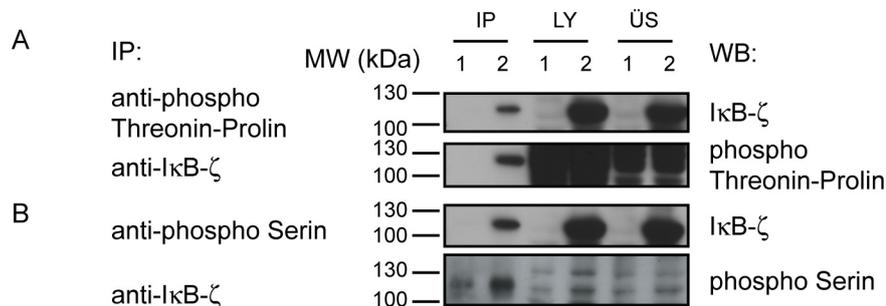


Abbildung 16. I κ B- ζ wird an Threoninen und Serinen phosphoryliert

Immunopräzipitationen zum Nachweis von Phosphorylierungsstellen im I κ B- ζ -Protein. HEK293 Zellen wurden mit dem pEGFP-Leervektor (1) oder pEGFP-I κ B- ζ (2) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Proteine entweder mit einem gegen (A) phosphorylierte Threonin-Prolin-Stellen, (B) phosphorylierte Serine oder (A,B) I κ B- ζ gerichteten Antikörper präzipitiert. Die Detektion erfolgte mittels Western Blot. IP: Immunopräzipitation; LY: Lysat; ÜS: Überstand.

entweder gegen I κ B- ζ oder gegen phosphorylierte Threonin-Prolin-Reste gerichtet waren, konnte die Existenz von phosphorylierten Threonin-Prolin-Stellen im I κ B- ζ -Protein detektiert werden (Abb.16A). I κ B- ζ besitzt somit funktionelle Threonin-Prolin-Phosphorylierungsstellen. Zur Analyse der Serinphosphorylierungsstellen im I κ B- ζ -Protein wurde eine Immunopräzipitation mit einem gegen I κ B- ζ oder phosphorylierte Serine gerichteten Antikörper durchgeführt. Im Western Blot, der mit einem gegen phosphorylierte Serine oder gegen I κ B- ζ gerichteten Antikörper durchgeführt wurde, zeigte sich, dass im humanen I κ B- ζ ebenfalls funktionelle Serinphosphorylierungsstellen existieren (Abb 16B).

3.4 Die Phosphorylierung von I κ B- ζ wird nicht durch die IKK α oder die IKK β vermittelt

IKK α und IKK β sind Serin-Kinasen, die hauptsächlich durch Phosphorylierung von I κ B-Proteinen die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges regulieren. Aus diesem Grund erscheint eine Phosphorylierung von I κ B- ζ durch IKK α oder IKK β sehr nahe liegend. Da IKK α in der Lage ist, sich nach Aktivierung zwischen Kern und Zytoplasma hin- und her zu bewegen (Birbach et al., 2002), ist aufgrund der nukleären Lokalisation von I κ B- ζ eher dessen Phosphorylierung durch IKK α als durch IKK β wahrscheinlich.

In einer *in vitro* Kinase-Analyse, konnte keine Phosphorylierung von GST-I κ B- ζ durch die IKK α nachgewiesen werden. Die Negativkontrollen zeigten keine unspezifische Phosphorylierung, das nukleäre Rezeptorprotein Östrogenrezeptor α (ER α) wurde als

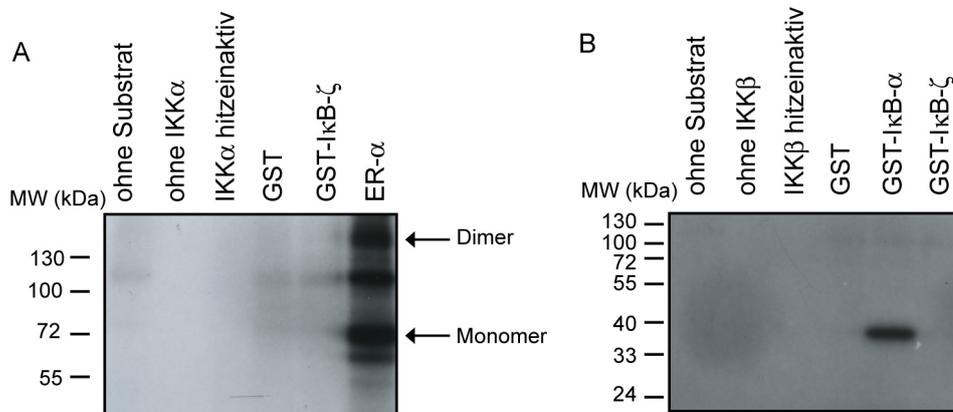


Abbildung 17. I κ B- ζ wird nicht durch IKK α oder IKK β phosphoryliert

(A) IKK α - oder (B) IKK β -*in vitro* Kinase-Analysen zur Detektion von I κ B- ζ -Kinasen. Als markiertes Donorsubstrat wurde [γ - 32 P]ATP verwendet, als Substrat diente GST-I κ B- ζ , Positivkontrolle für (A) ER- α , für (B) GST-I κ B- α und Negativkontrollsubstrat war GST, weitere Negativkontrollen wie angegeben. Für nähere Erläuterungen siehe Material und Methoden.

Positivkontrolle mitgeführt (Scheidereit, 2006) und zeigte eine starke Phosphorylierung durch IKK α (Abb. 17A). In einer weiteren Kinase-Analyse wurde untersucht, ob GST-I κ B- ζ durch IKK β phosphoryliert werden konnte. Auch hier zeigten die Kontrollen das erwartungsgemäße Phosphorylierungsmuster, die Negativkontrollen zeigten keine unspezifische Phosphorylierungsreaktion, wohingegen GST-I κ B- α , das als Positivkontrolle diente, eine intensive Phosphorylierung durch IKK β aufwies. GST-I κ B- ζ wurde allerdings auch nicht durch die IKK β phosphoryliert (Abb. 17B).

3.5 Regulation der Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ durch Kinasen

3.5.1 Die Proteinkinase-Inhibitoren Staurosporin, H89 und H7 haben keinen Einfluss auf die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ

Da die Phosphorylierung von I κ B- ζ darauf hinweist, dass dessen Transaktivierungsaktivität durch Kinasen beeinflusst werden könnte, wurden unterschiedliche Kinaseinhibitoren in Luciferase-Reporter-Gen-Analysen eingesetzt. Zunächst wurde Staurosporin getestet, das anfangs nur als ein Inhibitor der Proteinkinase C (PKC) galt. Später wurde aber deutlich, dass er auch in der Lage war, die Proteinkinase A (PKA) und G (PKG), die Ca $^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), die S6 Kinase (S6K), die Myosin-leichte Kette Kinase (MLCK), ebenfalls eine Ca $^{2+}$ /Calmodulin abhängige

Proteinkinase, die SRC Kinase, die FGR-, LYN- und die SYK-Tyrosinkinase im nanomolaren Bereich zu inhibieren. Eine geringe Aktivität von Staurosporin existiert auch bei der Inhibition der extrazellulär-regulierten Kinase 1 (ERK1), der C-terminalen SRC Kinase (CSK), der IGF-IR, Casein Kinase 1 und 2 (CK1, CK2) im μ molaren Bereich. Der Proteinkinase-Inhibitor H89 reguliert ein ähnliches Spektrum an Proteinkinasen. Er wird als selektiver Inhibitor der PKA und PKG sowie der Proteinkinase C μ Isoform beschrieben. Weitere durch H89 inhibierte Kinasen sind ROCKII, CaMKII, CK1 sowie MLCK.

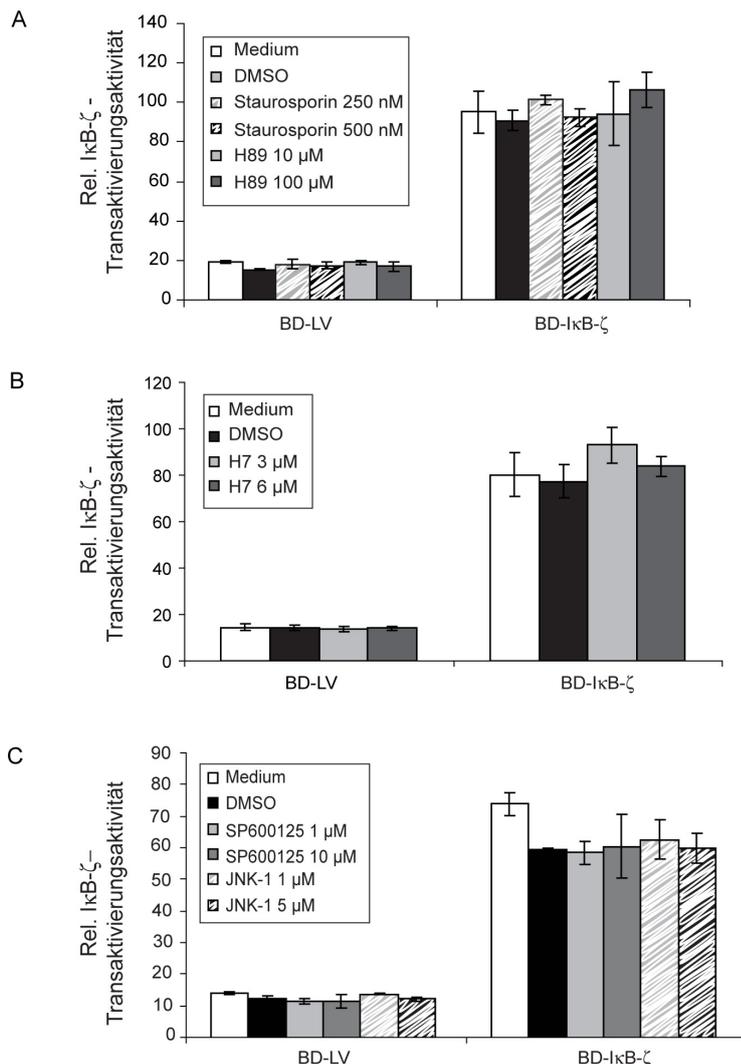


Abbildung 18. Die Proteinkinase-Inhibitoren Staurosporin, H89 und H7 sowie die JNK-Inhibitoren SP600125 oder JNK-1 haben keinen Einfluss auf die Transaktivierungsaktivität von IκB-ζ

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Kinaseinhibitoren auf die IκB-ζ Transaktivierungsaktivität wurden HEK293-Zellen entweder mit dem BD-Leervektor (BD-LV) oder BD-IκB-ζ sowie einem *firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Konstrukt kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit (A) Staurosporin, H89, (B) H7 oder (C) den JNK-Inhibitoren SP600125 sowie JNK-1 in den angegebenen Konzentrationen für 8 h behandelt, lysiert und in einem Luciferase-Reporter-gentest analysiert. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO inkubiert.

HEK293-Zellen wurden mit dem BD-IκB-ζ- oder -Leervektor- sowie den Luciferase-Reporter-gen-Konstrukten für 24 h transfiziert und anschließend mit Staurosporin (250 und 500 nM) oder H89 (10 und 100 μ M) für 8 h behandelt. Für beide Inhibitoren lies sich kein Einfluss auf die Transaktivierungsaktivität von IκB-ζ nachweisen (Abb. 18A).

Der Kinaseinhibitor H7 ist wesentlich spezifischer als die beiden zuvor beschriebenen Kinaseinhibitoren, er inhibiert die PKC, PKA, PKG und die MLCK, die allerdings durch die beiden vorab erwähnten Inhibitoren bereits abgedeckt werden. HEK293-Zellen wurden mit

den oben beschriebenen Plasmiden für 24 h transfiziert und mit dem Kinaseinhibitor H7 für 8 h inkubiert. Auch hier konnte kein Unterschied in der Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ im Vergleich zu den unstimulierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 18B). Somit kann eine Beteiligung der durch die verwendeten Kinaseinhibitoren inhibierten Kinasen an der Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ ausgeschlossen werden.

3.5.2 Die Kinasen der JNK-Familie haben keinen Einfluss auf die I κ B- ζ -Transaktivierung

Zur Familie der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK), eine Untergruppe der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), zählen die drei Kinasen JNK1, 2 und 3, die als stress-aktivierte Proteinkinasen beschrieben werden (Johnson und Lapadat, 2002). Die Beteiligung von JNK an der Transaktivierung von I κ B- ζ wurde durch einen wie unter Abschnitt 3.5.1 beschriebenen Versuchsansatz untersucht. 1 sowie 10 μ M des relativ selektiven JNK1, 2 und 3 Inhibitors SP600125 wurden für 8 h zu den mit den BD-I κ B- ζ - oder -Leervektor- sowie den Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukten transfizierten HEK293-Zellen gegeben. Eine Analyse der Luciferase-Aktivität zeigte keinen Unterschied in der I κ B- ζ -Transaktivierungsaktivität im Vergleich zur DMSO-Lösungsmittelkontrolle (Abb. 18C). Der spezifische JNK1 Inhibitor JNK-1 wurde für einen ähnlichen Versuchsansatz in Konzentrationen von 1 und 5 μ M verwendet. Auch hier konnte kein Unterschied zur DMSO-Lösungsmittelkontrolle im Luciferase-Reporter-Gen-Test detektiert werden. Somit kann auch ein Einfluss der JNK-Kinase auf die Transaktivierung von I κ B- ζ ausgeschlossen werden (Abb. 18C).

3.5.3 Einfluss des PI3 Kinase-Signalweges auf die I κ B- ζ Transaktivierung

Die Phosphoinositid 3 Kinase (PI3K) ist ein Enzym, das Phosphatidylinositol und Phosphatidylinositide, eine Gruppe von Membranlipiden, spezifisch an der 3' Position des Inositol Ringes phosphoryliert. Die Phosphoinositid-Kinasen lassen sich in die Klassen IA, IB, II und III unterteilen. Klasse I PI3K produzieren nach ihrer Aktivierung das Phosphoinositid-3,4,5-P₃, das neben Phosphoinositid-3,4-P₂ von allen Phosphoinositiden zu den wichtigen intrazellulären Mediatoren von Signalwegen zählt. Diese Moleküle haben die Funktion eines sekundären Botenstoffs, der durch extrazelluläre Stimuli in der Zelle aktiviert wird. Mitglieder der Klasse IA der Phosphoinositid-Kinasen setzen sich immer aus einer regulatorischen (85 kDa) und einer katalytischen (110 kDa) Untereinheit zusammen. Effektormoleküle der PI3 Kinasen enthalten in der Regel eine Pleckstrin Homologie Domäne, die spezifisch Klasse I Lipidprodukte bindet. Zu den Effektoren der PI3 Kinase zählen unter anderem die Protein Kinase B (PKB/AKT) und die Phosphoinositid-abhängige Kinase (Vanhaesebroeck et al.,

2001; Wymann et al., 2003). Als spezifische Inhibitoren der PI3 Kinase gelten Wortmannin, das die PI3 Kinase bereits in einer Konzentration von 10-100 nM durch kovalente Modifikation von Lysin-802 in der katalytischen Untereinheit inhibiert (Wymann et al., 1996) und LY294002, das die ATP-Bindungsstelle der katalytischen Untereinheit blockiert (Vlahos et al., 1994).

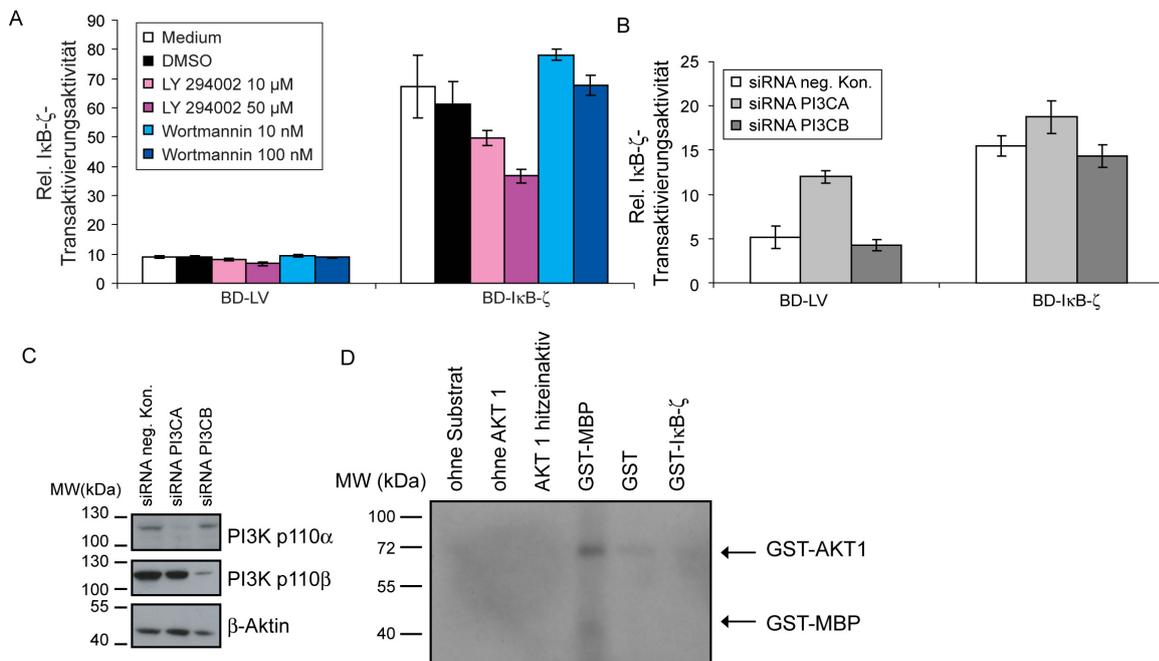


Abbildung 19. Effekt des PI3K-Signalweges auf die Transaktivierungsaktivität und Phosphorylierung von IκB-ζ.

(A,B) Luciferase-Reportergen-Analysen zur Untersuchung des Einflusses des PI3K-Signalweges auf die IκB-ζ Transaktivierungsaktivität. (A) HEK293- oder (B) HT1080-Zellen wurden entweder mit dem BD-Leervektor oder BD-IκB-ζ sowie einem *firefly*- und einem *Renilla*-Luciferase-Konstrukt kotransfiziert. (A) 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit den angegebenen Proteinkinaseinhibitoren 8 h behandelt. (B) HT1080-Zellen wurden zusätzlich mit entweder 20 nM der siRNA-Negativkontrolle (neg. Kon.) oder gegen die PI3 Kinase-Untereinheiten p110α (PI3CA) oder p110β (PI3CB) gerichteten siRNAs kotransfiziert und nach 48 h geerntet. (C) Western Blot-Analyse zur Kontrolle des siRNA-Knockdowns zu (B). (D) AKT1-*in vitro* Kinase-Analyse zur Untersuchung einer Phosphorylierung von GST-IκB-ζ. Als markiertes Donor-Substrat diente [γ - 32 P]ATP, als Substrat GST-IκB-ζ, als Positivkontrolle GST-MBP und als Negativkontrolle GST; weitere Negativkontrollen wie angegeben.

Zur Untersuchung des Einflusses der PI3 Kinase auf die IκB-ζ Transaktivierungsaktivität wurden HEK293-Zellen wiederum mit dem IκB-ζ- oder Leervektor sowie den Luciferase-Konstrukten transfiziert und für 8 h mit LY294002 (10 und 50 μM) oder Wortmannin (10 und 100 nM) inkubiert. Es zeigte sich für den Inhibitor Wortmannin kein Effekt auf die IκB-ζ Transaktivierung, wohingegen für den Inhibitor LY294002 bereits in einer Konzentration von 10 μM eine Verminderung der IκB-ζ-Transaktivierungsaktivität gemessen werden konnte, die bei Verwendung einer erhöhten Konzentration von 50 μM noch

intensiviert wurde (Abb. 19A). Um diesem widersprüchlichen Ergebnis auf den Grund zu gehen, wurde die Expression der PI3K mittels der RNAi-Technologie supprimiert. Dazu wurden HT1080 Zellen mit den oben aufgeführten Konstrukten und einer Negativkontroll siRNA (neg. Kon.) oder siRNAs, die gegen die katalytischen Untereinheiten der PI3 Kinase p110 α (PI3CA) oder p110 β (PI3CB) gerichtet waren, transfiziert. Da die PI3K Untereinheiten p110 γ und p110 δ vorwiegend in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, wurden sie nicht in die Analysen mit einbezogen. In diesem Versuch konnte ebenfalls kein Effekt der PI3K auf die I κ B- ζ -Transaktivierungsaktivität nachgewiesen werden. Die Inhibition von p110 α schien eher einen geringfügig stimulierenden als inhibierenden Effekt gegenüber der Negativkontrolle zu haben (Abb. 19B). Der siRNA Knock-down wurde mittels Western Blot-Analyse bestätigt (Abb. 19C).

Die PI3 Kinase aktiviert nach ihrer eigenen Aktivierung eine Reihe von Effektorinasen, darunter die PKB/AKT, die als Prototyp der PI3K-Effektorinasen gilt. Da der Effekt von LY294002 auf die Transaktivierung von I κ B- ζ sehr intensiv war, sollte nachgewiesen werden, ob dies durch die Effektorinase AKT vermittelt wird. In einer *in vitro* Kinase-Analyse konnte keine Phosphorylierung von GST-I κ B- ζ durch AKT1 beobachtet werden. Als Positivkontrolle wurde GST-MBP (*myelin basic protein*) verwendet. Die Negativkontrollen (Ansätze ohne Substrat, ohne oder mit hitzeinaktivierter AKT1) wurden erwartungsgemäß nicht phosphoryliert (Abb. 19D). Somit ist mit hoher Wahrscheinlichkeit AKT in seiner Funktion als Effektorinase der PI3 Kinase nicht an der Transaktivierung von I κ B- ζ beteiligt.

Für den PI3 Kinaseinhibitor LY294002 ist beschrieben, dass er bereits in einer Konzentration von 6,9 μ M die Casein Kinase (CK)2 inhibieren kann, ein Effekt, der für Wortmannin nicht bekannt ist (Vanhaesebroeck et al., 2001). Daher könnte der Unterschied zwischen Wortmannin und LY294002 in Bezug auf die Transaktivierung von I κ B- ζ der CK2 zugeschrieben werden. Um dies zu klären, wurden Luciferase-Reportergen-Analysen mit dem CK2-Inhibitor TBCA1 und darüber hinaus mit einem Inhibitor der CK1 δ und CK1 ϵ , IC261 (Behrend et al., 2000), durchgeführt. Allerdings konnte eine Beteiligung dieser beiden Kinasen an der Transaktivierung von I κ B- ζ nicht nachgewiesen werden (Abb. 20A,B). Obwohl kein Einfluss der CK2 auf die Transaktivierung von I κ B- ζ nachgewiesen werden konnte, ist eine Phosphorylierung von I κ B- ζ durch die CK2 nicht vollkommen ausgeschlossen. Da bekannt ist, dass die CK2 I κ B- α , I κ B- β und auch die NF- κ B-Untereinheit p65 phosphoryliert, wurde als zusätzliche Kontrolle in einer *in vitro* Kinase-Analyse untersucht, ob die CK2 in der Lage ist, auch I κ B- ζ zu phosphorylieren. Als Positivkontrolle wurde Casein verwendet, das intensiv phosphoryliert wurde, während GST-I κ B- ζ sowie die Negativkontrollen nicht durch CK2 phosphoryliert wurden (Abb. 20C).

Diese Daten belegen eindeutig, dass I κ B- ζ nicht durch die CK2 phosphoryliert wird und die CK1 δ und ϵ sowie CK2 nicht an der I κ B- ζ vermittelten Transaktivierung beteiligt sind.

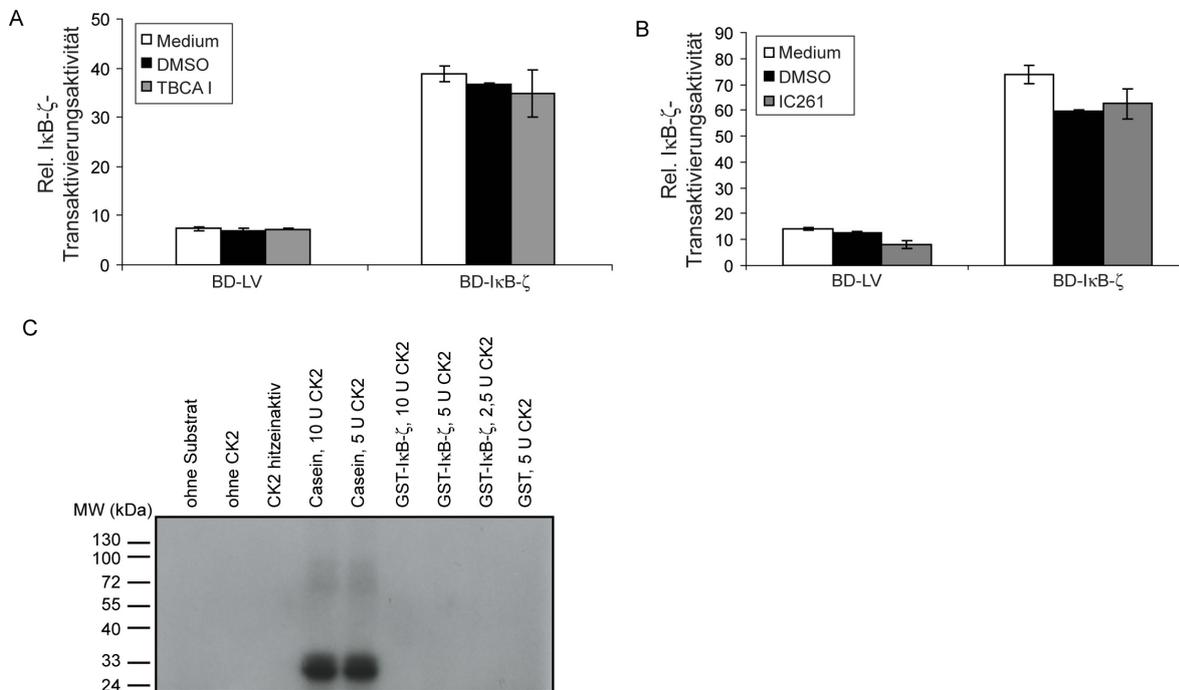


Abbildung 20. Die Transaktivierungsaktivität und Phosphorylierung von I κ B- ζ wird nicht über CK1 und 2 reguliert.

Luciferase-Reportergen-Analysen zur Untersuchung des Einflusses von CK-Inhibitoren auf die I κ B- ζ Transaktivierungsaktivität. HEK293-Zellen wurden entweder mit dem BD-Leervektor oder BD-I κ B- ζ sowie einem *firefly*- und einem *Renilla*-Luciferase-Konstrukt kotransfiziert und nach 24 h mit (A) TBCA1 und (B) IC261 8 h inkubiert. (C) CK2-*in vitro* Kinase-Analyse zur Untersuchung einer Phosphorylierung von GST-I κ B- ζ . Als markiertes Donor-Substrat diente [γ - 32 P]ATP, als Substrat GST-I κ B- ζ , als Positivkontrolle GST-MBP und als Negativkontrollen GST, weitere Negativkontrollen wie angegeben.

Trotz dieser Ergebnisse kann eine Beteiligung des PI3K Signalwegs an der Regulation der I κ B- ζ -Transaktivierung nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da der PI3K-Inhibitor LY294002 einen sehr intensiven Effekt auf die Transaktivierung von I κ B- ζ zeigte.

3.5.4 p38 MAPK hat keinen Einfluss auf die I κ B- ζ Transaktivierung

Zur Gruppe der p38 MAPK gehören die vier Kinasen p38 α , β , γ und δ , die die Expression vieler Zytokine regulieren. Eine Beteiligung von p38 α an der Transaktivierung von I κ B- ζ wurde durch Verwendung des p38 α Inhibitors SB203580 in den Luciferase-Reportergen-Analysen untersucht (Sturgill, 2008). Dazu wurden HEK293-Zellen mit den oben aufgeführten Plasmiden transfiziert und anschließend mit SB203580 in

Konzentrationen von 0,5-50 μM für 8 h inkubiert. Eine Veränderung in der Transaktivierungsaktivität von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 21A).

3.5.5 Die extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK) 1 und 2 erhöhen die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ Transaktivierungsaktivität durch Phosphorylierung

Eine weitere Familie der MAPKinasen bilden die extrazellulär-regulierten Kinasen. Zwei wichtige und intensiv erforschte Mitglieder dieser Familie sind ERK1 und ERK2, zwei zu ~85% identische Proteinkinasen, die viele gleiche, aber auch einige unterschiedliche Funktionen haben. MAPKinasen werden über einen Signalweg aktiviert, der in drei Schritten verläuft. Das erste Molekül der Aktivierungskaskade bildet eine MAPKKK, darauf folgt eine MAPKK (auch MEK) und am Ende der Kaskade steht eine MAPK. Die MEKs, die ERK1 und ERK2 aktivieren, sind die MEK1 und MEK2 (Sturgill, 2008).

Für weitere Luciferase-Reportergentests wurden HEK293 Zellen mit den entsprechenden Konstrukten wie oben transfiziert und zur Untersuchung des Einflusses von ERK1 und ERK2 auf die Transaktivierung von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ mit dem MEK1/2/5 Inhibitor PD98,059 (Sturgill, 2008) in den Konzentrationen 10 und 50 μM für 8 h behandelt. Mit steigender Konzentration des Inhibitors zeigte sich eine Abnahme der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Transaktivierungsaktivität (Abb. 21B). Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde der Einfluss der ERK1- oder ERK2-Überexpression auf die Transaktivierungsaktivität von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ untersucht. HEK293- (Abb. 21C) oder HT1080-Zellen (Abb. 21D) wurden zusätzlich zu den Plasmiden für den Transaktivierungstest entweder mit dem Leervektor, ERK1, ERK2 oder beiden ERKinasen kotransfiziert. In beiden Zelllinien konnte nachgewiesen werden, dass ERK1 die Transaktivierungsaktivität von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ verdoppelte, während ERK2 sie nur leicht erhöhte. Beide Konstrukte zusammen zeigten einen Wert, der zwischen denen der Einzeltransfektionen lag. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen führte ein siRNA Knock-down sowohl von ERK1 (MAPK3) als auch von ERK2 (MAPK1) zu einer stark verminderten Transaktivierungsaktivität von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ in HT1080-Zellen (Abb. 21E). Die Überexpression bzw. Suppression der ERKinasen wurde in Western Blot-Analysen bestätigt.

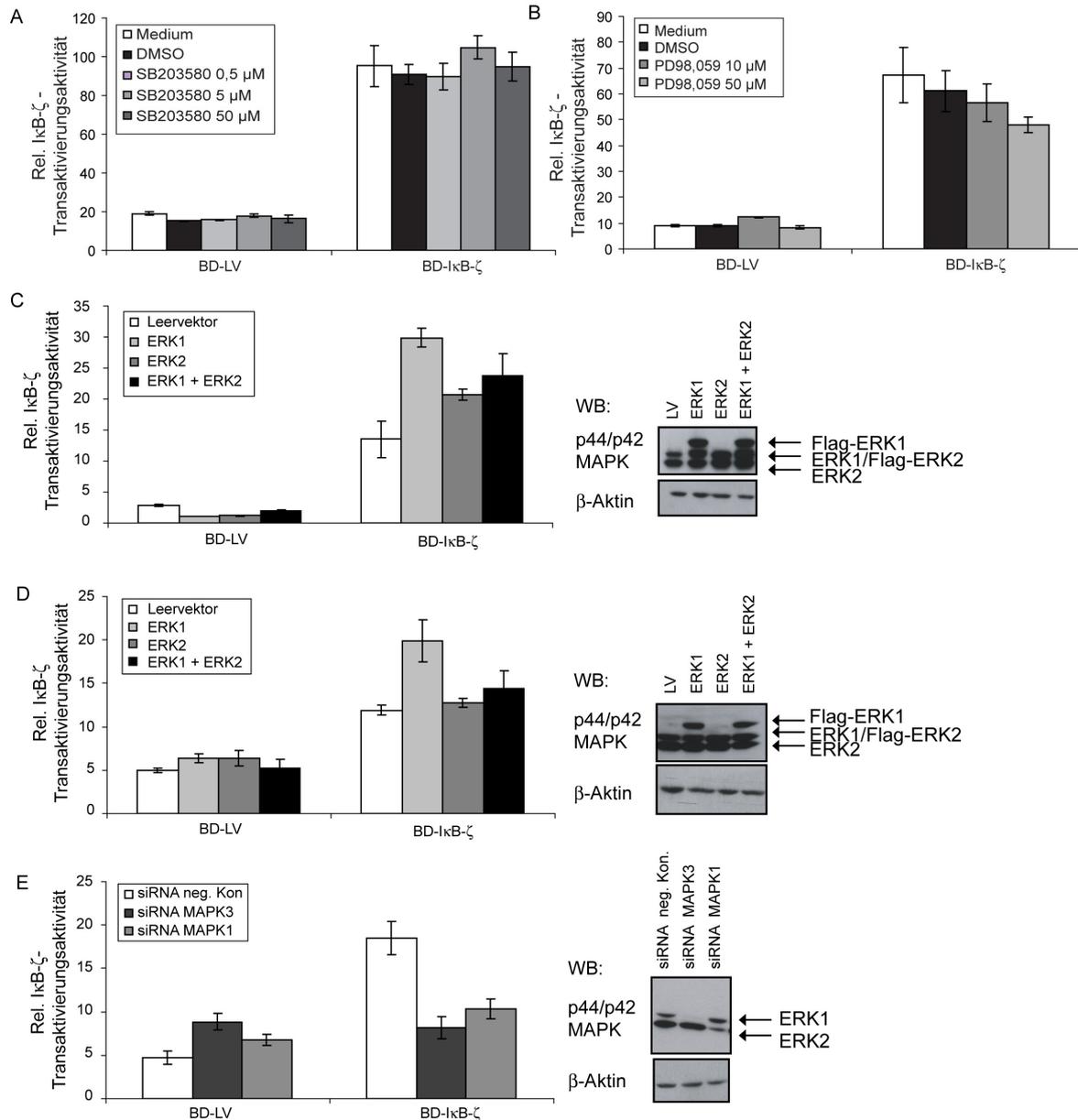


Abbildung 21. ERK1 und ERK2 erhöhen die IκB-ζ-Transaktivierungsaktivität, während p38 keinen Einfluss darauf hat

Zellen wurden entweder mit dem BD-Leervektor oder BD-IκB-ζ sowie einem *firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Konstrukt kotransfiziert. HEK293-Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit (A) SB203580 oder (B) PD98,059 in den angegebenen Konzentrationen 8 h behandelt. Als Kontrolle erfolgte eine Inkubation mit DMSO. (C) HEK293- und (D) HT1080-Zellen wurden zusätzlich mit einem ERK1-, ERK2- oder Leervektor 24 h kotransfiziert. (E) HT1080-Zellen wurden zusätzlich mit einer MAPK3 (ERK1)-, MAPK1 (ERK2)- oder Negativkontroll-siRNA (siRNA neg. Kon.) für 48 h kotransfiziert. Anhand von Luciferase-Reportengen-Analysen wurde der Einfluss von ERK1, ERK2 und p38 auf die IκB-ζ-Transaktivierungsaktivität untersucht. Die Überexpression oder Suppression der ERKinasen wurde mittels Western Blot-Analysen kontrolliert.

Um nun zu überprüfen, ob der Einfluss der ERKinasen auf die Transaktivierung von IκB-ζ auf direkte Phosphorylierung des IκB-Proteins durch ERK1 oder ERK2 zurückzuführen sein könnte, wurden *in vitro*-Phosphotransferreaktionen durchgeführt. Hierbei zeigte sich in der Tat, dass GST-IκB-ζ sowohl durch ERK1 als auch durch ERK2 phosphoryliert werden

konnte. Das als Positivkontrolle verwendete GST-MBP wurde ebenfalls durch beide Kinasen phosphoryliert, während in den Negativkontrollen keine Phosphorylierungen nachgewiesen werden konnten (Abb. 22A, B). Im Weiteren wurde überprüft, ob die Phosphorylierung von I κ B- ζ durch eine direkte Interaktion zwischen ERK und I κ B- ζ vermittelt wird. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit dem GFP-I κ B- ζ - oder Leervektor sowie einem Flag-getaggen ERK1- oder ERK2-Plasmid transfiziert und mittels Co-Immunopräzipitation und anschließender Western Blot-Analyse auf eine mögliche Interaktion hin untersucht. I κ B- ζ wurde mit einem polyklonalen Antikörper präzipitiert und die mögliche Bindung von ERK1 oder ERK2 unter Verwendung eines monoklonalen Flag-Antikörpers im Western Blot- untersucht (Abb. 22C). Umgekehrt wurden ERK1 oder ERK2 mit einem polyklonalen Flag-Antikörper präzipitiert und ein Western Blot mit einem gegen I κ B- ζ gerichteten monoklonalen Antikörper durchgeführt (Abb. 22C). In beiden Versuchsansätzen konnte keine Interaktion von ERK1 oder ERK2 mit I κ B- ζ nachgewiesen werden.

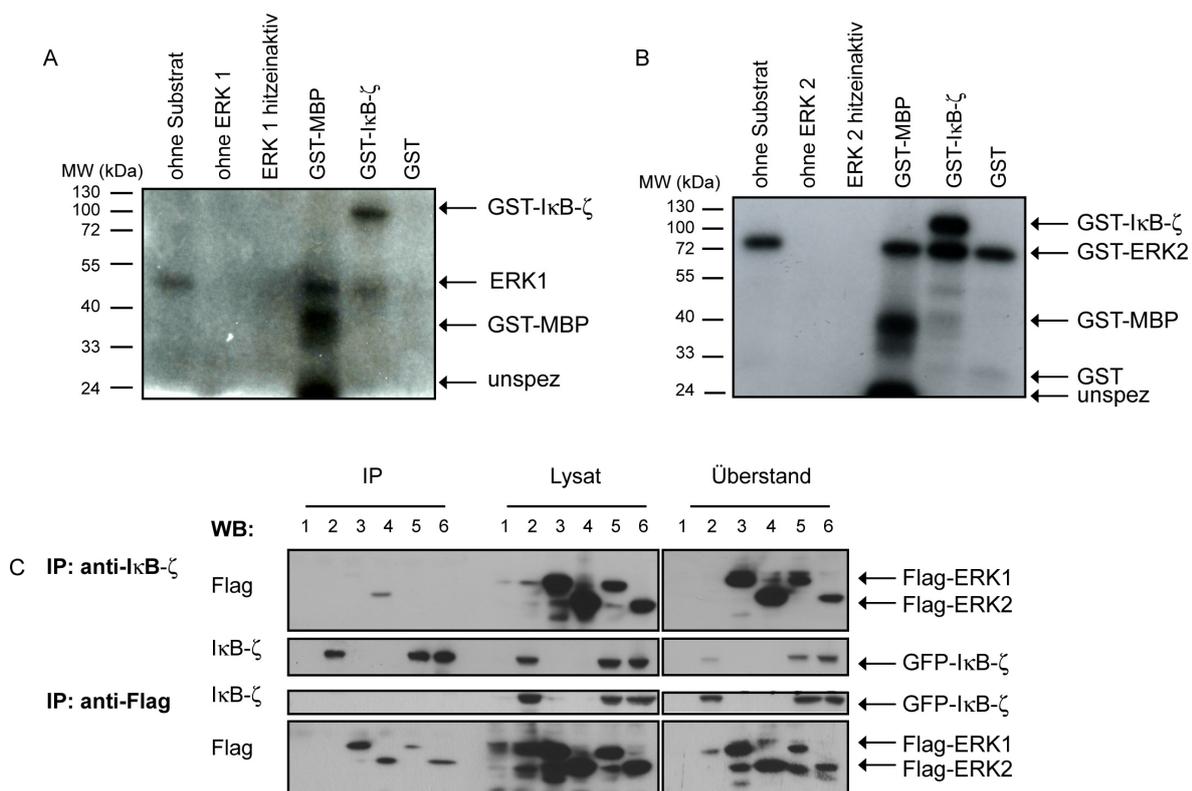


Abbildung 22. ERK1 und ERK2 phosphorylieren I κ B- ζ

In vitro Kinase-Analysen zum Nachweis der Phosphorylierung von GST-I κ B- ζ durch (A) ERK1- und (B) ERK2. Als markiertes Donor-Substrat diente $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, als Substrat GST-I κ B- ζ , als Positivkontrolle GST-MBP und als Negativkontrolle GST; weitere Negativkontrollen wie angegeben. (C) Zum Nachweis möglicher Interaktionen von I κ B- ζ und ERK1 oder ERK2 wurden HEK293-Zellen mit pEGFP-I κ B- ζ und ERK1-Flag (5) oder pEGFP-I κ B- ζ und ERK2-Flag (6) und als Kontrolle auch mit dem pEGFP-Leervektor (1), pEGFP-I κ B- ζ (2), ERK1-Flag (3) und ERK2-Flag (4) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Proteine entweder mit einem polyklonalen (C) I κ B- ζ oder Flag-Antikörper präzipitiert. Die Western Blotts wurden entweder mit einem monoklonalen I κ B- ζ oder Flag-Antikörper durchgeführt. IP: Immunopräzipitation.

Somit wird zwar $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ durch ERK1 und ERK2 phosphoryliert, diese Phosphorylierung wird aber nicht durch eine direkte Interaktion der Proteine vermittelt.

3.5.6 Die Glykogensynthasekinase 3 (GSK 3) erhöht die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ Transaktivierung durch Phosphorylierung

Von der GSK 3 existieren zwei Isoformen, GSK 3α und GSK 3β , die in Geweben von Säugetieren ubiquitär exprimiert werden. Die Sequenz der katalytischen Domänen der

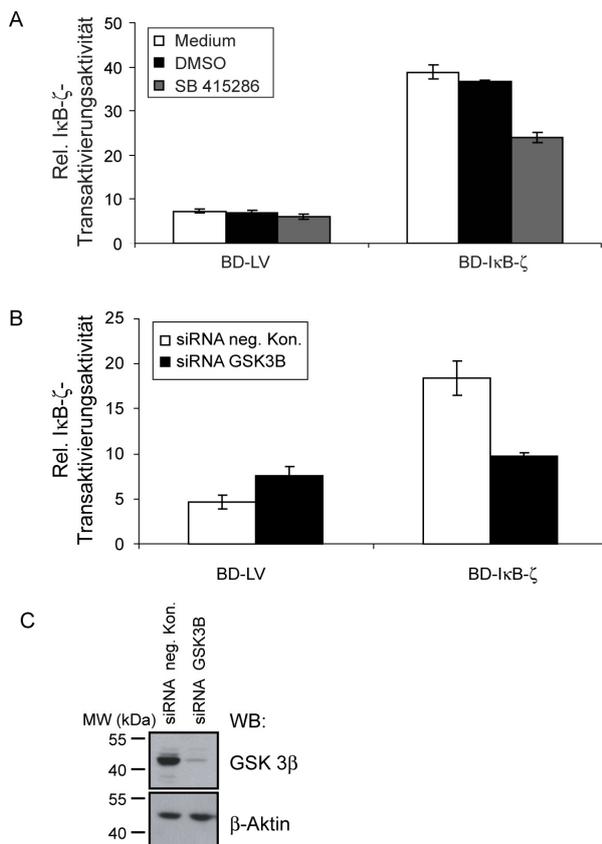


Abbildung 23. Die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK 3) reguliert die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Transaktivierungsaktivität

Luciferase-Reportergen-Analysen zum Nachweis des Einflusses der GSK3 auf die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Transaktivierungsaktivität. **(A)** HEK293- oder **(B)** HT1080-Zellen wurden entweder mit dem BD-Leervektor oder BD-I $\kappa\text{B-}\zeta$ sowie einem *firefly*- und einem *Renilla*-Luciferase-Konstrukt kotransfiziert. **(A)** Nach 24 h wurden die Zellen mit 30 μM des GSK 3-Inhibitors SB 415286 für 8 h behandelt und daraufhin geerntet. **(B)** Die Zellen wurden zusätzlich mit 20 nM der siRNA-Negativkontrolle (neg. Kon.) oder einer gegen die GSK 3 β (GSK3B) gerichteten siRNA kotransfiziert und nach 48 h geerntet. **(C)** Western Blot-Analyse als Expressionskontrolle zu (B).

beiden Isoformen ist zu 97% identisch, sie unterscheiden sich allerdings deutlich in den anderen Proteinbereichen. Die GSK 3 ist konstitutiv aktiv und wird durch Phosphorylierung inaktiviert (Frame und Cohen, 2001). Eine Beteiligung der GSK 3 an der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Transaktivierung wurde durch Verwendung des selektiven Inhibitors SB415286 im Luciferase-Reportergentest untersucht (Coghlan et al., 2000). Hierbei stellte sich heraus, dass der GSK 3-Inhibitor zu einer Verminderung der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ Transaktivierungsaktivität führte (Abb. 23A). Dieses Ergebnis wurde durch Verwendung einer gegen die GSK 3 β gerichteten siRNA (GSK3B) bestätigt (Abb. 23B). Die Suppression der GSK 3-Expression wurde im Western Blot nachgewiesen (Abb. 23C).

Um zu untersuchen, ob der Einfluss der GSK 3 auf die I κ B- ζ -Transaktivierung durch eine Phosphorylierung vermittelt werden könnte, wurden *in vitro*-Kinase-Analysen mit GSK 3 α (Abb. 24A) und GSK 3 β (Abb. 24B) durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass beide GSK 3-Isoformen in der Lage sind, I κ B- ζ zu phosphorylieren. Interessanterweise war die Phosphorylierung durch GSK 3 β wesentlich stärker (Abb. 24B) als durch GSK 3 α (Abb. 24A), was auf eine differentielle Regulierung des I κ B- ζ -Phosphorylierungsgrades durch beide Kinasen hinweist. GSK 3 α zeigte eine intensivere Autophosphorylierung als GSK 3 β . Als Positivkontrolle für GSK 3 α diente das TAU-Protein, welches stark phosphoryliert wurde, die Positivkontrolle für GSK 3 β , MBP, hingegen wurde nur leicht phosphoryliert.

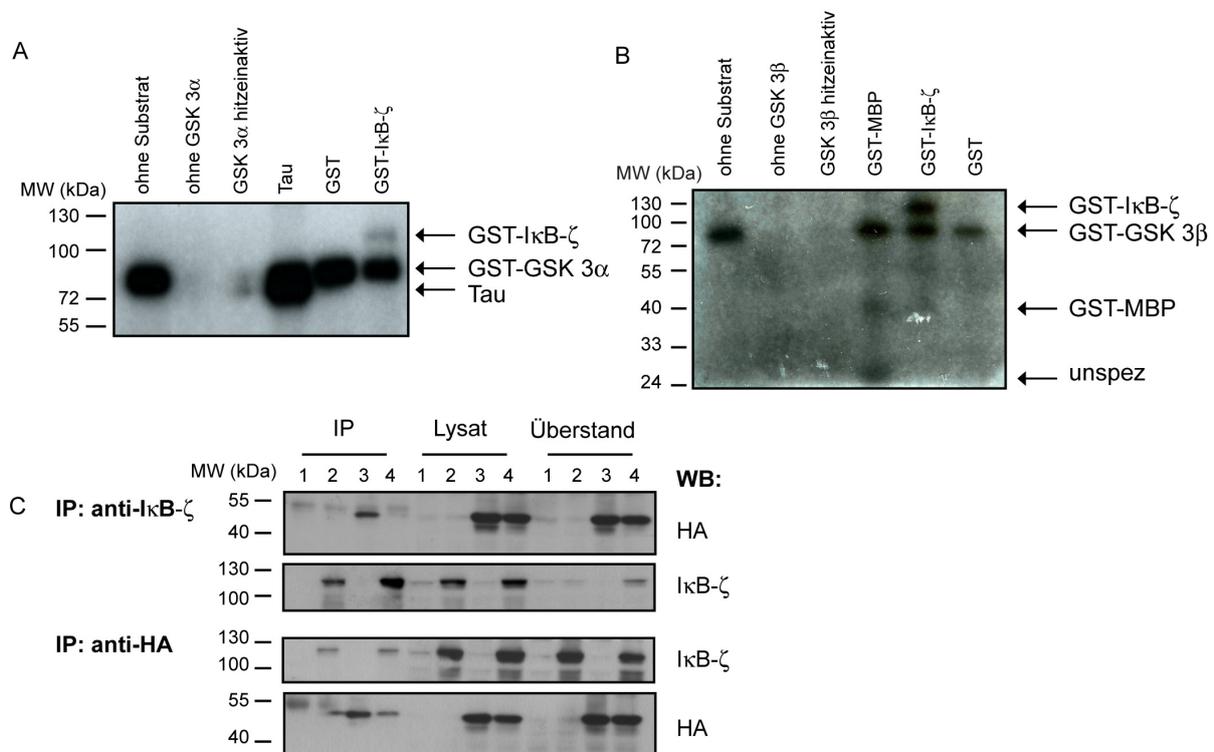


Abbildung 24. GSK 3 α und GSK 3 β phosphorylieren I κ B- ζ

In vitro Kinase-Analyse zum Nachweis einer Phosphorylierung von GST-I κ B- ζ durch (A) GSK 3 α und (B) GSK 3 β . Als markiertes Donor-Substrat diente [γ ³²-P]ATP, als Substrat GST-I κ B- ζ , als Positivkontrolle Tau (A) oder GST-MBP (B), als Negativkontrolle GST; weitere Negativkontrollen wie angegeben. (C) Co-Immunopräzipitation zum Nachweis von Interaktionen zwischen I κ B- ζ und GSK 3 β . HEK293-Zellen wurden zum Nachweis der Interaktion mit pEGFP-I κ B- ζ und GSK 3 β -HA (4) und als Kontrolle mit dem pEGFP-Leervektor (1), pEGFP-I κ B- ζ (2) oder GSK 3 β -HA (3) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Proteine entweder mit einem polyklonalen I κ B- ζ oder einem polyklonalen HA-Antikörper präzipitiert und im Western Blot analysiert. IP: Immunopräzipitation.

Erwartungsgemäß war in den Negativkontrollen der Kinase-Analysen kein Phosphorylierungssignal erkennbar.

Da GSK 3 β zu einer starken Phosphorylierung des I κ B- ζ -Proteins befähigt war, sollte in Co-Immunopräzipitationen nachgewiesen werden, ob dies auf eine direkte Interaktion der beiden Proteine zurückzuführen ist. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit dem GFP-I κ B- ζ - oder Leervektor sowie einem HA-getaggtten GSK 3 β -Plasmid transfiziert, I κ B- ζ wurde nach Lyse der Zellen durch einen polyklonalen I κ B- ζ -Antikörper, GSK 3 β durch einen polyklonalen HA-Antikörper präzipitiert. In Western Blot-Analysen konnte keine direkte Interaktion zwischen I κ B- ζ und GSK 3 β in den Präzipitaten nachgewiesen werden (Abb. 24C).

GSK 3 β ist folglich in der Lage, die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ zu regulieren und I κ B- ζ auch zu phosphorylieren, diese Mechanismen beruhen allerdings wahrscheinlich nicht auf einer direkten Interaktion dieser beiden Proteine.

3.5.7 MEK1/2, GSK 3- und PI3K-Inhibitoren haben einen unterschiedlichen Einfluss auf den I κ B- ζ N-Terminus

Um zu ermitteln, ob die I κ B- ζ -Phosphorylierungsstellen in der Transaktivierungsvermittelnden Domäne liegen, wurde der Einfluss der MEK1/2, GSK 3- und PI3K-Inhibitoren auf den I κ B- ζ N-Terminus in der Luciferase-Reportergen-Analyse untersucht. HEK293-Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit dem I κ B- ζ -N-Terminus oder dem Leervektor sowie den

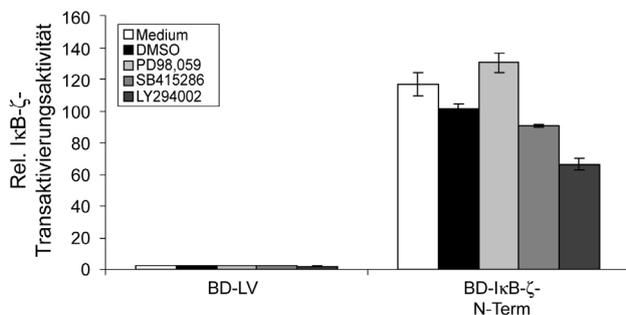


Abbildung 25. Kinaseinhibitoren beeinflussen die N-terminale Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ

Zum Nachweis des Einflusses der Proteinkinasen ERK-, GSK 3- oder PI3K auf den I κ B- ζ -N-Terminus wurde eine Luciferase-Reportergen-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden HEK293-Zellen entweder mit dem BD-Leervektor oder BD-I κ B- ζ -N-Terminus sowie einem *firefly*- und einem *Renilla*-Luciferase-Konstrukt kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen entweder mit 50 μ M PD98,059, 30 μ M SB415286 oder 50 μ M LY294002 8 h behandelt und daraufhin geerntet.

Luciferase-Konstrukten entweder mit 50 μ M PD98,059, 30 μ M SB415286 oder 50 μ M LY294002 für 8 h behandelt und der Einfluss auf die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ bestimmt. Hierbei stellte sich heraus, dass der GSK 3-Inhibitor SB415286 sowie der PI3 Kinase-Inhibitor LY294002 die Transaktivierungsaktivität des I κ B- ζ -N-Terminus erniedrigten, wohingegen der MEK1/2 Inhibitor PD98,059 die Transaktivierungsaktivität im Gegensatz zum I κ B- ζ -Gesamtmolekül leicht erhöhte (Abb. 25). Dies weist darauf hin, dass die Konformation des I κ B- ζ Gesamtproteins notwendig sein könnte, damit ERK die Transaktivierung von I κ B- ζ beeinflussen kann. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass eine

Lokalisation der Phosphorylierungsstellen im N-Terminus des Moleküls sehr wahrscheinlich ist.

3.5.8 Herstellung von I κ B- ζ -Mutanten mit defizienten Phosphorylierungsstellen

Mit dem Programm Motif Scan (<http://scansite.mit.edu>) lassen sich potentielle Phosphorylierungsstellen in der eingegebenen Proteinsequenz analysieren. Hierbei werden die für die unterschiedlichen Kinasen typischen Phosphorylierungsmotive überprüft und Phosphorylierungsstellen mit hoher, mittlerer oder geringer Stringenz angegeben. Für die Sequenz von I κ B- ζ ergab sich mit Hilfe dieses Programmes eine Vielzahl von Phosphorylierungsstellen mit geringer oder mittlerer Stringenz, mit hoher Stringenz waren allerdings nur noch fünf Phosphorylierungsstellen angegeben, die interessanterweise mit einer Ausnahme durch ERK1 und GSK 3 vermittelt werden: Threonin 89, Threonin 93 und Serin 219 für die GSK 3, Threonin 89, Serin 211 und Serin 219 für ERK1 sowie Serin 490 für die PKCmut (Abb. 26A). Für ERK1 wurden noch zwei D-Domänen (*docking domain*) am Leucin 71 und Leucin 517 gefunden, die spezifisch für die Bindung von ERKinasen an ihre Substrate sind (Shaul und Seger, 2007) und eine ERK1 Bindungsstelle am Prolin 216. Diese Analyse untermauert die Ergebnisse des Transaktivierungstests, dass die Phosphorylierungsstellen von I κ B- ζ im N-Terminus des Moleküls lokalisiert sind.

Es wurden Mutanten von I κ B- ζ mittels ortsgerichteter Mutagenese hergestellt, die jeweils eine Mutation enthielten, in denen das entsprechende Serin oder Threonin gegen Alanin ausgetauscht war, wodurch die Phosphorylierung der Aminosäuren verhindert wurde. Wildtyp und mutierte Konstrukte wurden in einen pET28a Vektor kloniert, mit dem das entsprechende I κ B- ζ Protein mit einem His-Anhang in dem *E.coli*-Stamm *BL21* überexprimiert und anschließend über eine NiNTA-Säule aufgereinigt werden konnte: His-I κ B- ζ Wildtyp (His-I κ B- ζ , Abb. 26B), His-I κ B- ζ T89-A, das eine Mutation von Threonin 89 aufwies (Abb. 26C), His-I κ B- ζ T93-A mit einer Mutation von Threonin 93 (Abb. 26D), His-I κ B- ζ S211-A mit einer Mutation von Serin 211 (Abb. 26E) und His-I κ B- ζ S219-A mit einer Mutation von Serin 219 (Abb. 26F). Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde in einem Proteinnachweis nach Bradford bestimmt. Elutionsfraktionen, die eine hohe Proteinkonzentration aufwiesen, wurden auf ein SDS-Page-Gel aufgetragen und mittels Coomassie-Färbung detektiert (Abb. 26B-F). Fraktionen, die His-I κ B- ζ -Proteine enthielten, wurden zusammengegeben und über eine Säule aufkonzentriert und umgepuffert. In einer Western Blot-Analyse wurde nachgewiesen, dass jede Mutante erfolgreich aufgereinigt werden konnte (Abb. 26G).

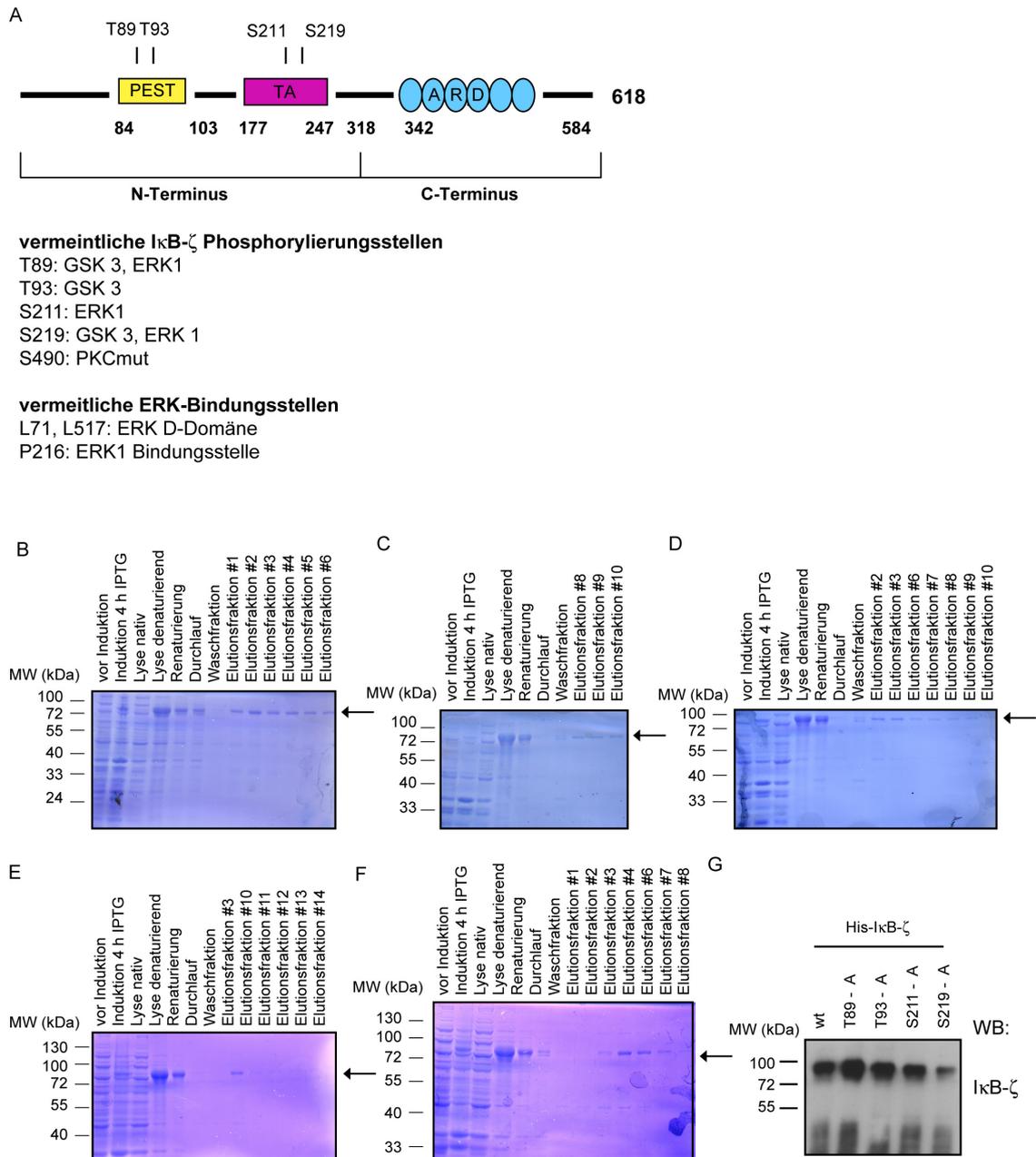


Abbildung 26. Aufreinigung von His-IκB-ζ-Wildtyp- und -phosphorylierungsdefizienten Konstrukten

A. Schematische Darstellung von IκB-ζ, angegeben sind vom Programm Motif Scan vorhergesagte Phosphorylierungs- und ERK-Bindungsstellen. **B-F.** Coomassie-Färbungen von SDS-Page-Gelen. Aufgetragen sind die unterschiedlichen Fraktionen der NiNTA-Aufreinigung wie angegeben. **B.** His-IκB-ζ wt, **C.** His-IκB-ζ T89-A, **D.** His-IκB-ζ T93-A, **E.** His-IκB-ζ S211-A, **F.** His-IκB-ζ S219-A. Pfeile markieren die Position der unterschiedlichen His-IκB-ζ-Konstrukte.

G. Western Blot-Analyse zur Kontrolle der aufgereinigten His-IκB-ζ Proteine. ARD: Ankyrinwiederholungs-Domäne; PEST: Prolin (P)-, Glutamat (E)-, Serin (S)- und Threonin (T)-reiche Domäne; TA: Bereich mit hoher Transaktivierungsaktivität.

3.5.9 Der Alanin-Aminosäure-Austausch an T93 und S219 verhindert die Phosphorylierung von I κ B- ζ durch ERK1 und ERK2, aber nicht durch GSK 3 β

Zur genaueren Charakterisierung der I κ B- ζ -Phosphorylierungsstellen, wurden die aufgereinigten His-I κ B- ζ Konstrukte in *in vitro* Kinase-Analysen eingesetzt. Überraschenderweise war die GSK 3 β hierbei in der Lage, nicht nur His-I κ B- ζ , sondern auch

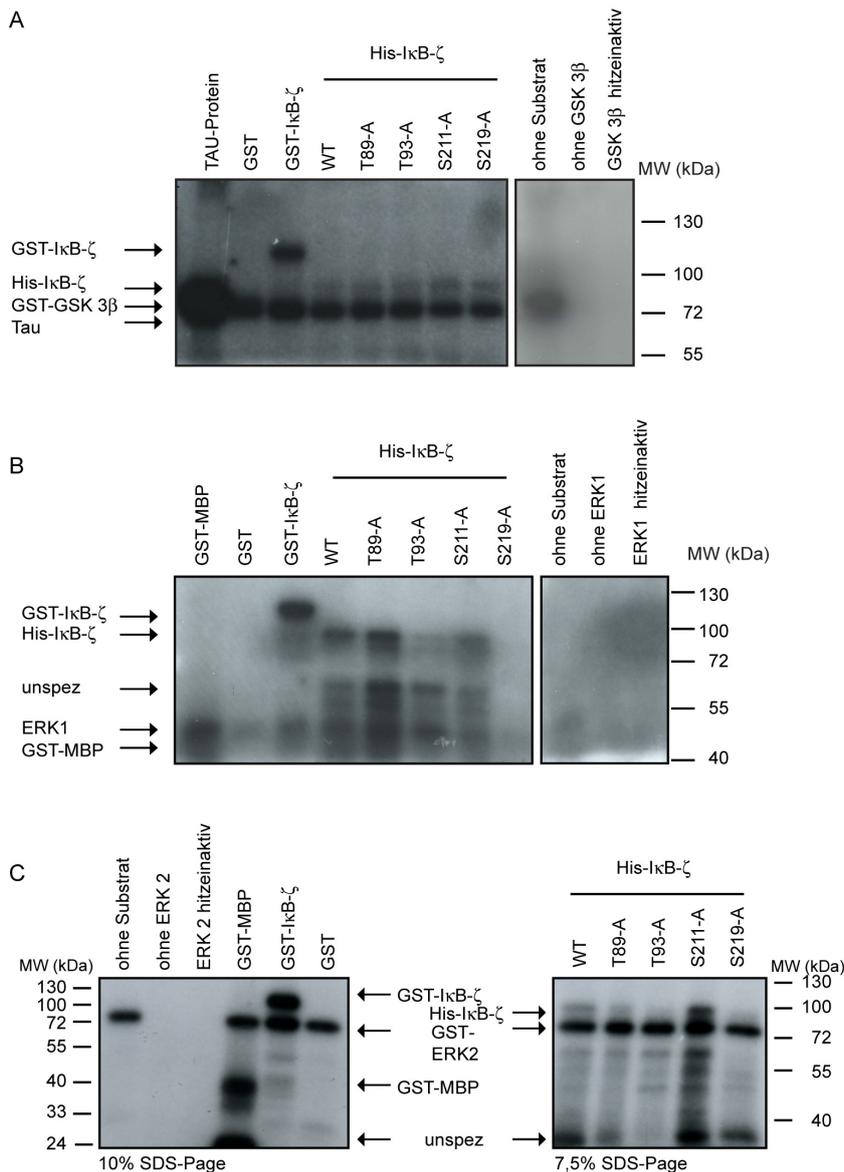


Abbildung 27. ERK1 und ERK2, aber nicht GSK 3 β phosphorylieren I κ B- ζ spezifisch an Threonin 93 und Serin 219

In vitro-Kinase-Analysen zur Detektion von Phosphorylierungsstellen im I κ B- ζ -Protein. Als Substrate wurden die aufgeführten phosphorylierungsdefizienten His-I κ B- ζ -Mutanten, die Wildtyp -His- (His-I κ B- ζ) sowie GST-I κ B- ζ (GST-I κ B- ζ)-Konstrukte und als Kontrolle das GST-Protein verwendet. Als Kinasen dienten **(A)** GSK 3 β mit dem TAU-Protein, **(B)** ERK1 oder **(C)** ERK2 mit GST-MBP als Positivkontrolle. Die verwendeten His-I κ B- ζ -Konstrukte besitzen einen Alanin-AS-Austausch an vorhergesagten Phosphorylierungsstellen wie angegeben, so dass eine Phosphorylierung an diesen AS nicht mehr möglich ist.

die His-I κ B- ζ -Proteine mit Mutation an T89, T93, S211 und S219 zu phosphorylieren. Eine starke Phosphorylierung des Tau-Proteins und von GST-I κ B- ζ bestätigte die Effizienz der Kinase-Analyse. GSK 3 β zeigte auch hier eine intensive Autophosphorylierung. Die Negativkontrollen wiesen keine Phosphorylierung auf (Abb. 27A). Entgegen der vorhergesagten Phosphorylierungsstellen scheint keine der untersuchten

Phosphorylierungsstellen alleine spezifisch für die GSK 3 β zu sein. Stattdessen müssen sich im I κ B- ζ -Protein andere Phosphorylierungsstellen für diese Kinase befinden.

In mit ERK1 oder ERK2 durchgeführten Kinase-Analysen wurden ebenfalls die Positivkontrollen GST-MBP und GST-I κ B- ζ phosphoryliert, die Negativkontrollen zeigten erwartungsgemäß keine Phosphorylierung. His-I κ B- ζ und die His-I κ B- ζ -Proteine mit Mutation an T89 und S211 wurden sowohl durch ERK1 als auch durch ERK2 sehr effizient phosphoryliert. Im Gegensatz zu GSK 3 β wurden His-I κ B- ζ -Proteine mit Mutation an T93 und S219 nur noch schwach phosphoryliert (Abb. 27B,C). T93 und S219 können daher als ERK-Phosphorylierungsstellen angesehen werden.

4. Einfluss von Kinasen auf die I κ B- ζ abhängige Aktivierung von NF- κ B-Zielgenen

4.1 Eine Inhibition von ERK, GSK 3 oder PI3K beeinflusst insbesondere die I κ B- ζ abhängige Aktivierung von GM-CSF

Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass ERK, GSK 3 und sehr wahrscheinlich auch PI3K die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ regulieren. Um Aufschluss darüber zu erlangen, ob diese Kinasen auch tatsächlich für die Aktivierung von I κ B- ζ - abhängigen NF- κ B-Zielgenen von Bedeutung sind, wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden HT1080 Zellen mit dem I κ B- ζ -Plasmid oder dem entsprechenden Leervektor sowie siRNA-Molekülen, die gegen die Gene PI3CA (p110 α), PI3CB (p110 β), MAPK3 (ERK1), MAPK1 (ERK2) und GSK3B (GSK3 β) gerichtet waren oder der Negativkontroll (neg. Kon.) siRNA transfiziert und für 72 h inkubiert. In der Tat, nach Verminderung der Expression der PI3K p110 α und p110 β konnte eine deutliche Erniedrigung der I κ B- ζ -induzierten GM-CSF-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Auch ERK2 und GSK 3 reduzierten die durch I κ B- ζ vermittelte GM-CSF-Aktivierung drastisch. Ein Knock-down von ERK1 hingegen hatte keinen Effekt auf die GM-CSF-Aktivierung durch I κ B- ζ (Abb. 28A). In den Expressionskontrollen sieht man eine deutliche Verminderung der Kinase-Expression nach siRNA-Transfektion. Lediglich die Expressionskontrolle für die p110 α Untereinheit der PI3 Kinase ist nicht ganz eindeutig, da auch eine Reduktion der p110 β Untereinheit im Western Blot mit dem PI3K p110 α -Antikörper detektiert wurde. (Abb. 28B).

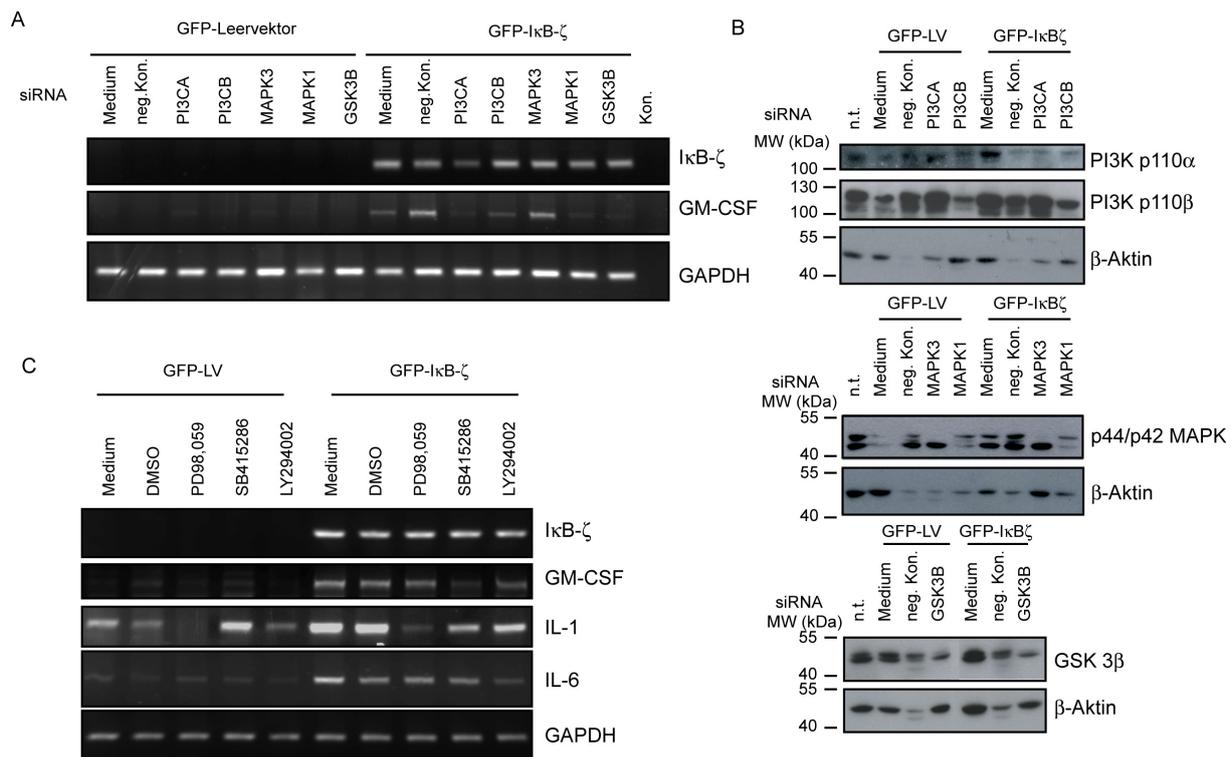


Abbildung 28. Eine Inhibition von ERK, GSK 3 oder PI3K beeinflusst die IκB-ζ-abhängige Aktivierung von NF-κB-Zielgenen

HT1080-Zellen wurden mit dem pEGFP-IκB-ζ- oder Leervektor (GFP-LV) sowie 42 nM PI3CA-, PI3CB-, MAPK3- (ERK1), MAPK1- (ERK2), Kontroll- (neg. Kon.) siRNA oder 72 nM GSK3B-siRNA kotransfiziert. Nach 72 h wurde die RNA isoliert und **(A)** die GM-CSF-mRNA-Expression mittels RT-PCR und **(B)** der siRNA-Knockdown in Western Blot-Analysen überprüft. **(C)** HT1080-Zellen wurden entweder mit dem pEGFP-IκB-ζ- oder Leervektor transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 8 h mit DMSO, 50 μM PD98,059, 30 μM SB415286 oder 50 μM LY294002 behandelt und die mRNA-Expression der aufgeführten IκB-ζ-Zielgene mittels RT-PCR-Analysen nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente die GAPDH mRNA-Expression. n.t.: nicht transfiziert, Kon: RT ohne Template.

Dieses Ergebnis konnte durch die Verwendung der Kinase-Inhibitoren PD98,059, SB415286 und LY294002 bestätigt werden. HT1080-Zellen wurden mit dem GFP-IκB-ζ- oder GFP-Leervektor für 24 h transfiziert und anschließend für 8 h mit den Kinase-Inhibitoren behandelt. Nach Inhibition von MEK1 und MEK2, GSK 3 und auch PI3K war die durch IκB-ζ induzierte GM-CSF-Expression stark beeinträchtigt oder sogar komplett unterdrückt. Auf zwei weitere IκB-ζ-Zielgene, IL-6 und IL-1, hatten die Kinase-Inhibitoren unterschiedliche Effekte. Die IκB-ζ-induzierte Aktivierung von IL-6 wurde insbesondere durch den PI3Kinase-Inhibitor LY294002, die Aktivierung von IL-1 durch den MEK1/2-Inhibitor PD98,059 unterdrückt, wobei mit diesem Inhibitor auch ein deutlicher Effekt bereits in der Leervektorkontrolle erkennbar war. Aber auch die Inhibitoren LY294002 und SB415286 reduzierten die IL-1-Aktivierung durch IκB-ζ.

Zusammengefasst weisen diese Daten darauf hin, dass die IκB-ζ-vermittelte Aktivierung von GM-CSF und IL-1 wahrscheinlich über ERK2, GSK 3 sowie den PI3K-

Signalweg vermittelt wird, wohingegen die Aktivierung von IL-6 insbesondere über den PI3K-Signalweg kontrolliert wird (Abb. 28C).

4.2 Mutationen an T93 und S219 vermindern die NF- κ B Zielgenaktivierung durch I κ B- ζ

Weiterführend wurde der Frage nachgegangen, ob die ERK-vermittelte Aktivierung von I κ B- ζ -Zielgenen über die identifizierten ERK-Phosphorylierungsstellen T93 und S219 im I κ B- ζ -Protein ausgeführt wird. HT1080-Zellen wurden mit den entsprechenden GFP-I κ B- ζ -Konstrukten transfiziert und deren Einfluss auf die Expression von GM-CSF, IL-1 und IL-6 in RT-PCR-Analysen untersucht. Nach Mutation der Phosphorylierungsstellen T93 und S219 wurde GM-CSF nur noch sehr schwach aktiviert, für IL-1 zeigte sich nur ein marginaler Effekt. Eine schwache Verminderung der IL-6-Aktivierung zeigte sich auch nach Mutation von T93 (Abb. 29).

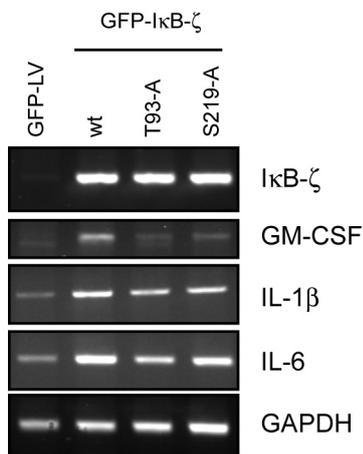


Abbildung 29. Die ERK-vermittelte Phosphorylierung an Threonin 93 und Serin 219 des I κ B- ζ -Proteins ist für dessen Zielgenexpression erforderlich.

HT1080-Zellen wurden mit dem GFP-Leervektor (LV), GFP-I κ B- ζ -Plasmid oder mit GFP-I κ B- ζ -Konstrukten mit Alanin-AS-Austausch an T93 oder S219 transfiziert. Nach 32 h wurden die Zellen geerntet und der Einfluss auf I κ B- ζ -Zielgene GM-CSF, IL-1 und IL-6 mittels RT-PCR untersucht. Als Ladekontrolle diente die GAPDH mRNA-Expression

Diese Daten zeigen, dass für die I κ B- ζ -induzierte mRNA-Expression von GM-CSF und IL-1 eine direkte Phosphorylierung von Threonin 93 oder Serin 219, von IL-6 eine Phosphorylierung von Threonin 93 des I κ B- ζ -Proteins durch ERKinasen erforderlich ist und dass die Aktivierung dieser Zielgene differentiell über diesen Mechanismus reguliert wird.

V. Diskussion

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt eine wichtige Rolle in der Regulation einer Vielzahl biologischer Prozesse. Seine Aktivität kann durch über 200 verschiedene Stimuli reguliert werden und er kann nach Stimulation über 200 Zielgene aktivieren. Um eine selektive und spezifische NF- κ B-Antwort zu erhalten, ist daher eine intensive Kontrolle der NF- κ B-Aktivität unerlässlich. Eine herausragende Bedeutung in der Regulation der NF- κ B-Antwort haben die I κ B-Proteine. In unstimulierten Zellen halten die klassischen I κ B-Proteine die NF- κ B-Proteine im Zytoplasma zurück. Erst nach Stimulation kommt es zur Phosphorylierung und proteasomalen Degradation der Inhibitorproteine, was zur Freisetzung von NF- κ B-Dimeren führt, die durch ihr NLS direkt in den Kern gelangen. Neben den zytoplasmatischen I κ B-Proteinen gewinnt eine weitere Gruppe von I κ B-Proteinen immer mehr an Bedeutung. Diese atypischen I κ B-Proteine werden induzierbar synthetisiert und sind im Zellkern lokalisiert. Bisher sind drei nukleäre Mitglieder dieser Proteinfamilie bekannt: Bcl-3, I κ B_{NS} sowie I κ B- ζ . Die nukleären I κ B-Proteine können die NF- κ B-Proteine zwar ebenfalls inhibieren, üben ihre Funktion jedoch eher über eine Regulation der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B aus. Am intensivsten erforscht ist der Mechanismus, über den Bcl-3 die transkriptionelle Aktivität von p50- und p52-Homo- und -Heterodimeren beeinflusst. Bcl-3 bildet nicht nur inhibitorische Komplexe mit dem p50-Homodimer, es ist auch in der Lage, die inhibitorischen p50- und p52-Dimere von der DNA zu entfernen oder mit ihnen transkriptionell aktive Komplexe zu bilden. Bcl-3 kann sowohl allein als auch über die Interaktion mit transkriptionellen Koaktivatoren oder Korepressoren die Aktivität von Zielgenen beeinflussen.

In unserer Arbeitsgruppe wurde das humane I κ B- ζ identifiziert, das mit den NF- κ B-Proteinen p50 und p65 interagieren und deren Bindung an die DNA inhibieren kann. Des Weiteren reduziert I κ B- ζ die NF- κ B-Promotoraktivität und ist sowohl mit der Histondeacetylase 5 als auch mit dem transkriptionellen Korepressor SMRT im Zellkern in MAD-Körperchen kolokalisiert. In einem Hefe-Zwei-Hybrid-Nachweis in unserem Labor konnte zudem gezeigt werden, dass I κ B- ζ selbst eine N-terminale Transaktivierungsaktivität besitzt und an der Aktivierung von Zytokinen beteiligt ist.

Ziel dieser Arbeit war es, einen tieferen Einblick zum Einen, in die Regulation von Zellzyklusprozessen durch I κ B- ζ , zum Anderen, in die Regulation der Expression und der Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ selbst zu erlangen.

1. Beteiligung von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ an der Regulation des Zellzyklus

Einflüsse von NF- κ B- und IKK-Proteinen auf die Regulation des Zellzyklus konnten schon in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen werden. IKK α , ein Protein, das auch in der Lage ist, sich zwischen Kern und Zytoplasma hin und her zu bewegen (Birbach et al., 2002), phosphoryliert die Aurora A-Kinase und greift damit aktiv in das Voranschreiten der Mitose ein (Prajapati et al., 2006). Auf der anderen Seite kann die IKK α aber auch über die Aktivierung des p53/RelB Komplexes, der die Transkription des S-Phase Kinase-assoziierten Proteins 2 (skp2) vermittelt, in die Progression der G1-/S-Phase eingreifen (Schneider et al., 2006). Zudem wird die Expression von Cyclin D1, einem wichtigen Regulator des G1-Kontrollpunktes, NF- κ B- und IKK α -abhängig reguliert (Hinz et al., 1999; Barre und Perkins, 2007). Über einen IKK-unabhängigen Signalweg greift NF- κ B in den G2/M-Übergang der Zelle ein oder wird aktiviert, nachdem die Zelle in der Mitose arretiert ist. Dies wird über einen ERK5-RSK2-abhängigen Mechanismus reguliert (Mistry et al., 2004; Cude et al., 2007). In einer mit humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) durchgeführten Micro-Array-Analyse war die Aktivität einiger am G2/M-Übergang des Zellzyklus und an der Mitose beteiligten Proteine nach $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Überexpression erniedrigt. In der vorliegenden Arbeit sollte dieser Befund konkretisiert werden. Für die Zellzyklusanalysen wurde zunächst die humane Fibrosarkomzelllinie HT1080 verwendet, eine Zelllinie, mit der schon im Vorfeld dieser Arbeit Effekte von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ auf die Aktivierung von NF- κ B-Zielgenen nachgewiesen wurden. Die Zellen wurden ebenso wie die HUVECs zur Überexpression von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ retroviral transduziert. In dieser Versuchsanordnung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen mit GFP und $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ transduzierten Zellen nachgewiesen werden. Allerdings stellte sich hierbei heraus, dass die Blockierung des Zellzyklus in der G2/M-Phase, die für die Untersuchung eines Einflusses auf den Zellzyklus unerlässlich ist, in dieser Zelllinie nicht in ausreichendem Maße verifizierbar war. Ein weiteres Problem stellte die retrovirale Transduktion mit darauf folgender Zellzyklus-Synchronisation dar. Die Zellen wurden zunächst über einen Zeitraum von 48 h transduziert und erst im Anschluss daran für 24 h synchronisiert. Die Behandlung von Zellen über einen Zeitraum von mindestens 72 h ergibt eine Gleichung mit vielen Variablen und Unbekannten und macht es schwierig, ein Versuchsmodell zu erstellen, in dem die Ergebnisse über mehrere Versuchsreihen vergleichbar bleiben. Des Weiteren stellt allein die retrovirale Transduktion der Zellen einen gewissen Stressfaktor für die Zellen dar.

In weiteren Versuchen wurde daher ein induzierbares System verwendet, in dem die Zellen parallel im Doppelthymidin-Block synchronisiert und die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Expression induziert werden konnte. HeLa Tet-On-Zellen, in denen die Expression von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ durch Zugabe von Doxzyklin induzierbar war, wurden generiert und der Einfluss von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ auf die Proteine Cyclin B1, phospho Histon H3 und Aurora B-Kinase in Western Blot- und

durchflusszytometrischen Analysen untersucht. Auch in dem induzierbaren System konnte die Überexpression von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ die Progression des Zellzyklus weder positiv noch negativ beeinflussen. In RT-PCR-Analysen wurde der Einfluss auf die mRNA-Expression von CDC25B und CDC25C untersucht, Gene, deren Expression in unserer Micro-Array-Analyse vermindert war. Aber auch hier zeigte sich kein Effekt. In diesem Versuchsansatz war es zudem problematisch, die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Expression zu detektieren, obwohl die polyklonalen Klone nach der Generierung $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ eindeutig induzierbar exprimierten. Eine Verifikation dieses negativen Ergebnisses war daher unerlässlich. Ein weiteres induzierbares System wurde generiert, in dem $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ mit einem N-terminalen GFP-Anhang exprimiert wurde. Hier konnte die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Expression mit einem gegen GFP gerichteten Antikörper eindeutig nachgewiesen werden. Jedoch konnte ebenfalls in diesem Versuchsansatz eine Beteiligung von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ auf die Progression des Zellzyklus oder direkt auf den Übergang von der G2-Phase in die Mitose mittels Western Blot-Analysen nicht nachgewiesen werden.

Man kann anhand dieser Ergebnisse eine Beteiligung von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ an der Regulation des Zellzyklus in der humanen Cervixkarzinomzelllinie HeLa Tet-On ausschließen. Im Gegensatz dazu wird die Expression von Genen, die für Proteine des Zellzyklus kodieren, durch $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Überexpression in HUVECs offensichtlich reguliert. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, dass die ermittelten Effekte eher marginal waren. Eventuell könnte ein Einfluss von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ auf den Zellzyklus auch von weiteren Zelltyp-spezifischen Proteinen abhängig sein und es sich hierbei möglicherweise um einen Zelltyp-spezifischen Effekt handeln, insbesondere da die Micro-Array-Analysen mit Primärzellen durchgeführt wurden.

2. Regulation der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Proteinexpression durch miRNAs

Die Aktivierung und Funktion eines nukleären Proteins muss genauestens und intensiv reguliert werden, um Fehlregulationen in der Genaktivierung zu verhindern. Für das nukleär lokalisierte Protein $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ konnte in einer Analyse der Sanger MiRNA target scan Datenbank (<http://microna.sanger.ac.uk/targets>; Version 2) die miR-124a als potentieller Regulator identifiziert werden, für die potentielle Bindungsstellen in der 3'UTR von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ existieren.

MiR-124a wurde in den untersuchten Tumorzelllinien verschiedenen Ursprungs nicht oder nur marginal exprimiert. Selbst in verschiedenen Glioblastomzelllinien konnte die Expression der miR-124a nicht nachgewiesen werden, obwohl diese maßgeblich die Proteinexpression im Gehirn beeinflusst und offenbar die Expression von 174 Zielgenen reguliert. Wird die miR-124a nicht in Zelllinien des Gehirns exprimiert, entspricht die Proteinexpression dieser Zelllinien der von Gehirnzellen (Lim et al., 2005). Im umgekehrten Fall führt die Verminderung der miR-124a-Expression durch eine antisense 2'OMe-RNA in

den primären Neuronen der Kortex zu einer Erhöhung von mRNAs, die normalerweise nicht in Neuronen exprimiert werden (Conaco et al., 2006). Die miRNA-124a greift in die Entwicklung des zentralen Nervensystems sowie des Neuralrohrs ein, wird allerdings nicht in Astrozyten exprimiert (Conaco et al., 2006; Cao et al., 2007). Neben den wichtigen Funktionen, die diese miRNA bei der Entwicklung des Gehirns ausübt, scheint die miR-124a auch eine Bedeutung für die Entstehung von Tumoren zu haben. Ihre Expression ist in vielen Tumorzelllinien basierend auf einer Hypermethylierung von CpG-Inseln erniedrigt, wohingegen sie in gesunden Zellen exprimiert wird. Eine verminderte miR-124a-Expression führt zu einer Aktivierung der CDK6 mit darauf folgender Phosphorylierung des Tumorsuppressorgens Rb (Lujambio et al., 2007). Eine Verminderung der miR-124a mit einer Erniedrigung der CDK6-Expression wurde auch in Tumorzellen des Medullablastoms und diese Ergebnisse bestätigend bei Patienten mit dieser Tumorerkrankung nachgewiesen (Pierson et al., 2008). Des Weiteren beeinflusst die miR-124a die Expression von Foxa2, ein Protein, das die Entwicklung der Bauchspeicheldrüse reguliert sowie am Glukosestoffwechsel und der Insulinsekretion beteiligt ist (Baroukh et al., 2007).

Basierend auf der epigenetischen Verminderung der miR-124a durch Hypermethylierung in vielen Tumorzelllinien war es wahrscheinlich, dass die miR-124a in den analysierten Tumorzelllinien des Gehirns nicht basal exprimiert wurde. Die Vermutung lag nahe, dass die Expression durch die Zugabe des Demethylierungsgenens 5-AzaCyd induziert werden konnte. Dies traf auch tatsächlich für die Zelllinien A172, BdBak^{+/+} und BeBak^{+/+} zu, doch konnte unter diesen Bedingungen die I κ B- ζ -Protein- und mRNA-Expression nicht mehr induziert werden. Interessanterweise führte jedoch eine Überexpression der miR-124a zu einer nahezu kompletten Inhibition der I κ B- ζ -Proteinexpression, während der mRNA-Expressionslevel kaum verändert wurde. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis zeigte eine genaue Analyse der Bindungsstelle der miR-124a in der I κ B- ζ 3'UTR, dass die miRNA für eine Degradation der I κ B- ζ -mRNA vollständig in der 3'UTR hätte binden müssen, die Bindungsstelle allerdings nur eine 7mer-m8- sowie zwei 3mer-Bindungssequenzen besitzt (Grimson et al., 2007), was jedoch optimal für eine Inhibition der Proteinexpression ist. Die Funktionalität der Bindungsstelle konnte in einer Luciferase-Reportergenanalyse bestätigt werden und darüber hinaus, dass die 7mer-m8 Bindungsstelle bereits ausreichend für die Regulation der I κ B- ζ -Proteinexpression ist, die beiden 3mer Regionen werden nicht benötigt. Die leicht verminderte Luciferase-Aktivität in Zellen, die mit der Negativkontroll-miRNA und dem I κ B- ζ -3'UTR WT-Konstrukt kotransfiziert wurden, ist höchstwahrscheinlich auf die endogene miR-124a-Expression in der für diese Analysen verwendeten HEK293-Zelllinie zurückzuführen.

Die Regulation der I κ B- ζ -Proteinexpression durch die miR-124a konnte hiermit eindeutig nachgewiesen werden. Die miR-124a-Expression ist in vielen Tumorzelllinien

durch die Hypermethylierung von CpG-Inseln herunterreguliert und gilt somit als potentielle Tumorsuppressor miRNA (Lujambio und Esteller, 2007). Dies legt nahe, dass I κ B- ζ eventuell über eine Regulation von NF- κ B an der Entstehung von Tumoren beteiligt sein könnte und erhöht somit die Bedeutung dieses Ergebnisses. Auf der anderen Seite macht die Zahl der miR-124a-Zielgene viele Proteine zu potentiellen Oncogenen. Aus diesem Grund ist eine spezifische Regulation der Genexpression der durch die miR-124a beeinflussten Proteine, insbesondere von I κ B- ζ , auf weiteren Ebenen unerlässlich.

3. I κ B- ζ -Transaktivierung und deren Regulation

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass das humane I κ B- ζ dem murinen I κ B- ζ entsprechend eine N-terminale Transaktivierungsdomäne besitzt, deren Aktivität bereits im Gesamtprotein exprimiert wird. Im Gegensatz hierzu entwickelte sich die TA des murinen I κ B- ζ -Gesamtproteins nicht allein durch Überexpression des Proteins, sondern nur nach Koexpression der NF- κ B-Untereinheit p50, was zu der Schlussfolgerung führte, dass die Bindung der RHD der NF- κ B-Proteine an I κ B- ζ dessen Konformation ändert und zur Expression seiner TA führt. Wurde nur der N-Terminus des murinen I κ B- ζ transfiziert, dessen Transaktivierungsdomäne im Bereich der AS 329-402 lokalisiert ist, wurde die Transaktivierungsaktivität auch ohne Koexpression von p50 exprimiert. Eine Spleissvariante des humanen I κ B- ζ , I κ B- ζ (D), die eine Deletion im Bereich der AS 236-429 besitzt, zeigte zudem keine intrinsische Transaktivierungsaktivität (Motoyama et al., 2005). Für das humane I κ B- ζ , Transkriptvariante 3, konnte entsprechend dieser Ergebnisse eine besonders intensive Transaktivierungsaktivität im N-Terminus dieses Proteins detektiert werden, die sich im Bereich der AS 177-247 auf mehr als das 100fache des I κ B- ζ Gesamtproteins erhöhte. Dies lässt vermuten, dass Elemente im C-Terminus die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ direkt oder über eine Konformationsänderung inhibieren.

Wie für das murine I κ B- ζ wurde auch die intrinsische Transaktivierungsaktivität des humanen I κ B- ζ NF- κ B-abhängig reguliert (Motoyama et al., 2005). Eine Induktion von NF- κ B über den klassischen Signalweg mittels TNF- α erhöhte die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ . Diese NF- κ B abhängige Regulation der I κ B- ζ Transaktivierungsaktivität wurde in p50- und p65-defizienten MEFs, in denen die intrinsische I κ B- ζ TA stark erniedrigt war, bestätigt. Dies unterstützt weitere Ergebnisse unseres Labors, dass die Aktivierung von I κ B- ζ -Zielgenen ebenfalls NF- κ B-abhängig reguliert wird. Durch Analysen des Einflusses der einzelnen NF- κ B Untereinheiten konnten unterschiedliche Effekte auf die Regulation der I κ B- ζ Transaktivierungsaktivität nachgewiesen werden. Die NF- κ B Untereinheiten p50 und p52 erniedrigten die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ , ein Effekt, der sich auf das Fehlen einer TAD in p50- oder p52-Homodimeren zurückführen lässt. Des Weiteren können

Homodimere dieser beiden Untereinheiten eventuell zusammen mit I κ B- ζ inhibitorische Komplexe bilden oder durch Bindung an I κ B- ζ und Konformationsänderung des Proteins die TAD von I κ B- ζ maskieren, während die NF- κ B-Untereinheiten, die eine TAD besitzen, aktivierende Komplexe bilden. Hierbei war auffällig, dass lediglich die NF- κ B Untereinheiten p65 und c-Rel, Proteine mit zwei voneinander unabhängigen TADs, die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ erhöhten (Schmitz et al., 2004). Homodimere dieser NF- κ B-Untereinheiten binden zudem im Gegensatz zu anderen NF- κ B-Dimeren preferentiell an sogenannte nonamerische NF- κ B-Bindungsstellen, die CD28-RE (*response element*; Antwortelement) ähnlichen NF- κ B-Bindungsstellen (Natoli et al., 2005). Somit könnte I κ B- ζ zusammen mit diesen beiden NF- κ B-Untereinheiten die Aktivität an nonamerischen NF- κ B Bindungsstellen regulieren. RelB unterscheidet sich von den beiden anderen NF- κ B-Proteinen dadurch, dass es nur eine TAD besitzt und nur Heterodimere mit p100, p52 und p50 und keine Homodimere formt (Baeuerle und Henkel, 1994; Verma et al., 1995). Da RelB nicht in der Lage ist, die TA von I κ B- ζ zu beeinflussen, scheinen ihm wichtige Eigenschaften zu fehlen, die für die I κ B- ζ -Transaktivierung benötigt werden.

Die NF- κ B-Untereinheit p65 erhöht die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ durch Bindung über seine RHD an die ARD von I κ B- ζ und Expression seiner eigenen Transaktivierungsaktivität. Dies wurde in Experimenten, die mit dem p65-Protein und dem I κ B- ζ C-Terminus, der keine TAD besitzt, nachgewiesen. Auf der anderen Seite wurde die TA des I κ B- ζ N-Terminus durch Koexpression von p65 nicht erhöht, sondern stark inhibiert. Auch die Koexpression von p50 erniedrigte die Transaktivierungsaktivität des I κ B- ζ N-Terminus. Eventuell könnte eine schwache Interaktion, die auf Wechselwirkungen zwischen der RHD der NF- κ B-Untereinheiten mit dem I κ B- ζ N-Terminus basiert, verhindern, dass die TAD von I κ B- ζ mit der DNA in Verbindung tritt. Wird die Veränderung der I κ B- ζ Transaktivierungsaktivität auf Konformationsänderungen zurückgeführt, die durch die Bindung von NF- κ B an die ARD von I κ B- ζ entstehen, kann auch das Fehlen der ARD die Inhibition der Transaktivierungsaktivität des N-Terminus erklären. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Intensität der I κ B- ζ -Transaktivierungsaktivität durch NF- κ B beeinflusst wird. Sowohl in p50- und als auch in p65-defizienten Zellen, NF- κ B-Untereinheiten, die bekanntermaßen mit I κ B- ζ interagieren (Totzke et al., 2006), ist die I κ B- ζ -Transaktivierungsaktivität vermindert. Dies widerspricht in gewisser Weise den Ergebnissen, die durch eine p50-Überexpression in HEK293-Zellen erzielt wurden. Allerdings war in p50-defizienten MEFs nicht nur die Expression von p50 sondern auch die von p65 stark vermindert, so dass die Erniedrigung der I κ B- ζ -Transaktivierungsaktivität in p50-defizienten MEFs sich wahrscheinlich darauf zurückzuführen lässt, dass in dieser Zelllinie keine

aktivierenden p50/p65-Heterodimere und auch p65-Homodimere nur noch in verminderter Zahl gebildet werden können.

Im umgekehrten Fall konnte nicht nachgewiesen werden, dass I κ B- ζ die Genregulation von p50 oder p65 NF- κ B-Untereinheiten beeinflussen kann, obwohl I κ B- ζ in der Lage ist, die Promotoraktivität von NF- κ B zu unterbinden (Totzke et al., 2006). Die Verminderung der NF- κ B-Promotoraktivität wurde allerdings durch direkte Bindung der NF- κ B-Untereinheiten an κ B-Sequenzen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu beruht der hier angewandte experimentelle Ansatz auf einem GAL4 abhängigen Mechanismus, bei dem die NF- κ B-Untereinheiten nicht über ihre intrinsische RHD an κ B-Sequenzen binden, sondern mit einer GAL4-Bindedomäne fusioniert sind, die an die entsprechende Sequenz im Luciferase-Konstrukt bindet. Daher wird in diesem Ansatz NF- κ B unabhängig von I κ B- ζ an den Promotor gebunden. I κ B- ζ inhibiert somit die Promotoraktivität von NF- κ B über eine Inhibition der DNA-Bindung der NF- κ B-Proteine. Eine Intensivierung der p65-Transaktivierungsaktivität oder eine Regulation von p50 oder des p65 N-Terminus über die Transaktivierungsdomäne von I κ B- ζ konnte im Gegensatz zum murinen I κ B- ζ nicht detektiert werden (Motoyama et al., 2005). Da die Transaktivierungsaktivität von p65 in diesem System schon so intensiv ist, ist I κ B- ζ wahrscheinlich nicht in der Lage, diesen Effekt noch messbar zu erhöhen.

Für p53 ist ein Mechanismus beschrieben, über den p53 das NF- κ B p52-Dimer an p53-regulierte Promotoren rekrutiert, unabhängig von der DNA-Bindungsaktivität von p52. Hierdurch wird unter anderem die Expression des CDK-Inhibitors p21 unterbunden (Wietek und O'Neill, 2007). Dieser Mechanismus entspricht den hier beschriebenen Ergebnissen, dass durch gewisse NF- κ B-Untereinheiten die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ noch erhöht wird. Wie p53 könnte auch I κ B- ζ NF- κ B-Proteine an einen I κ B- ζ -regulierten Promotor bringen und so die I κ B- ζ -Zielgenaktivierung abhängig von NF- κ B regulieren. Auf der anderen Seite erinnern diese vielfältigen Regulationsmechanismen von I κ B- ζ an die Bcl-3-vermittelte Transaktivierung. Bcl-3 besitzt wie I κ B- ζ eine TAD und kann sowohl alleine als Koaktivator fungieren und nach Stimulation mit TNF- α NF- κ B-Zielgene aktivieren, als auch in Verbindung mit NF- κ B-Proteinen sowohl inhibitorische als auch aktivierende Komplexe bilden. Des Weiteren interagiert Bcl-3 sowohl mit transkriptionellen Koaktivatoren wie JAB1, Bard1 und Tip60 als auch mit Korepressoren wie HDAC1, -3, und -6. Der genaue Mechanismus der Bcl-3 vermittelten Genregulation ist bis heute noch nicht geklärt, wird aber zum Teil mit posttranslationalen Modifikationen in Verbindung gebracht (Viatour et al., 2004b).

Der Assoziation von Bcl-3 mit HDACs entsprechend, ist auch I κ B- ζ im Zellkern mit den Korepressoren HDAC5 und SMRT in MAD-Körperchen kolokalisiert (Totzke et al., 2006). In dieser Konformation ist I κ B- ζ in einen sogenannten Korepressor-Komplex integriert

(Jepsen und Rosenfeld, 2002; Calao et al., 2008), der höchstwahrscheinlich die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ unterbindet. Um den Mechanismus der NF- κ B-vermittelten Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ zu verstehen, wurde untersucht, ob NF- κ B und I κ B- ζ im Zellkern nach NF- κ B-Aktivierung kolokalisiert sind. Allerdings war die NF- κ B-Untereinheit p65 nach Aktivierung homogen im Zellkern verteilt, während I κ B- ζ weiterhin in den inhibitorischen MAD-Körperchen lokalisiert blieb. Es ist bekannt, dass eine Phosphorylierung von p65 zu einem Austausch des SMRT-Korepressors mit darauf folgender Translokation ins Zytoplasma gegen die Koaktivatoren CBP und p300 führt (Jepsen und Rosenfeld, 2002; Schmitz et al., 2004; Calao et al., 2008). Somit erscheint es wahrscheinlich, dass I κ B- ζ ebenfalls zunächst phosphoryliert werden muss, um in einen aktivierenden Transkriptionskomplex aufgenommen zu werden und seine transkriptionelle Aktivität zu entfalten.

Die Phosphorylierung ist ein wichtiger Mechanismus, über den sowohl I κ B- als auch NF- κ B-Proteine reguliert werden. Eine Untersuchung der I κ B- ζ -Proteinsequenz im Programm Motif Scan ergab, dass sich in der I κ B- ζ -Proteinsequenz eine Vielzahl von Phosphorylierungsstellen befinden, darunter allerdings nur fünf mit hoher Stringenz wovon zwei Threonin-Prolin- und zwei Serin-Phosphorylierungsstellen sind. Durch Immunopräzipitation konnte diese Vorhersage bestätigt werden, da I κ B- ζ sowohl an Threonin-Prolin-Stellen als auch an Serinen phosphoryliert wurde.

Sowohl IKK α als auch IKK β sind in der Lage, p65 an S536 zu phosphorylieren, was zu einer erhöhten Transaktivierungsaktivität von p65 führt. IKK α wird im Gegensatz zu IKK β auch im Zellkern gefunden, wo sie an NF- κ B-Genpromotoren rekrutiert wird. Dort phosphoryliert IKK α Histon H3 an Serin10, verändert dadurch die Zugänglichkeit der DNA und ist auf diese Weise an der Stimulation der Genexpression beteiligt (Schmitz et al., 2004). IKK α beeinflusst zudem über eine Phosphorylierung von SMRT die Derepression der NF- κ B-abhängigen Transaktivierung (Perkins, 2007). Diese nukleäre Funktion von IKK α macht sie zu einem potentiellen Kandidaten für die Phosphorylierung von I κ B- ζ . Allerdings konnte eine Phosphorylierung von I κ B- ζ weder durch IKK α , noch durch IKK β nachgewiesen werden.

Ein bedeutungsvoller Mechanismus der posttranslationalen Modifikation ist die Phosphorylierung, über den höchstwahrscheinlich die Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ gesteuert wird. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Kinaseinhibitoren verwendet und der Einfluss auf die I κ B- ζ TA untersucht. Versuche mit Staurosporin, H89 und H7, die unter anderem die Aktivität der PKA und PKC inhibieren, zeigten keine Veränderung in der TA von I κ B- ζ , obwohl diese beiden Kinasen dafür bekannt sind, die NF- κ B-Untereinheiten p50, p65 und c-Rel zu phosphorylieren und dadurch die DNA-Bindung und/oder die Transaktivierung

dieser Proteine zu beeinflussen (Viatour et al., 2005). Eine Beteiligung dieser Kinasen an der TA von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ konnte somit ausgeschlossen werden.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde eine Beteiligung von JNK1, 2 und 3 an der TA von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ untersucht. Die Familie der JNKinasen kann wie $\text{NF-}\kappa\text{B}$ über den TNF-Rezeptor aktiviert werden. Im Gegensatz zu $\text{NF-}\kappa\text{B}$ führt eine Aktivierung von JNK allerdings zum Zelltod entweder durch Apoptose oder durch Nekrose. JNK bildet somit einen Gegenspieler für das durch $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -vermittelte Überleben der Zelle (Papa et al., 2006). Eine Behandlung der Zellen mit den JNK-Inhibitoren SP600125 oder JNK-1 zeigte ebenfalls keinen Effekt auf die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -TA, eine Beteiligung von JNK kann daher ebenfalls ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Kandidat, der die Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ potentiell beeinflussen könnte, ist die PI3K. Diese Annahme beruht auf der Kenntnis, dass die TA der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Untereinheit c-Rel durch die PI3K direkt und die Transaktivierungsaktivität von p65 über den PI3K-Signalweg reguliert werden kann (Sizemore et al., 1999; Madrid et al., 2001; Viatour et al., 2005). An der Signaltransduktion der PI3K ist eine Reihe von Effektorkinasen beteiligt. Hierzu zählen unter anderem die Serin-Threonin-Kinasen PKB/AKT und die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1; *phosphoinositide-dependent kinase 1*). Diese beiden Kinasen gelangen durch Assoziation mit der Phosphatidylinositid-3,4,5- P_3 (PIP3) in direkte Nachbarschaft, AKT wird durch die PDK1 phosphoryliert und damit aktiviert. Die meisten durch AKT phosphorylierten Proteine werden durch Phosphorylierung inhibiert. Hierzu zählen unter anderem die GSK 3 sowie die $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinase (Cantley, 2002; Wymann et al., 2003).

Nach Inhibition der PI3K entweder durch den PI3 Kinase Inhibitor LY294002 oder Wortmannin ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die Transaktivierung von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$. Während LY294002 inhibierend wirkte, hatte Wortmannin keinen Einfluss auf die Transaktivierungsaktivität von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$. Der inhibitorische Effekt, der durch LY294002 vermittelt wurde, konnte zudem nicht durch Verwendung von gegen die katalytischen Untereinheiten $\text{p110}\alpha$ oder $\text{p110}\beta$ der PI3K gerichteten siRNAs bestätigt werden. Um diesen Widerspruch aufzuklären, sollte eine mögliche Beteiligung der Effektorkinase AKT an der Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ untersucht werden. Allerdings konnte ein Einfluss von AKT durch eine *in vitro* Kinase-Analyse ausgeschlossen werden.

Da LY294002 ebenfalls einen inhibitorischen Effekt auf die CK2 ausübt, wurde versucht, diesen durch den PI3K-Inhibitor LY294002 erzeugten Widerspruch über eine Funktion der CK an der Transaktivierung von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ zu erklären. Casein Kinasen sind Serin-Threonin-Kinasen und da auch $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ Serin- und Threonin-Prolin-Phosphorylierungsstellen besitzt, könnte die CK in die Transaktivierung von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ involviert sein. Zudem ist bereits

bekannt, dass eine Phosphorylierung von I κ B- α durch CK2 abhängig von der Phosphorylierungsstelle entweder zu einer Destabilisierung oder Degradation von I κ B- α sowie eine Phosphorylierung von p65 durch CK2 zu einer erhöhten Transaktivierungsaktivität führt. CK2 greift somit aktiv in den NF- κ B-Signalweg ein und auch CK1 ist für ihre Beteiligung an Membrantransport, Zellteilung und Apoptose bekannt (Knippschild et al., 2005; Viatour et al., 2005). Des Weiteren ergab die Suche nach I κ B- ζ -Phosphorylierungsstellen mit geringer Stringenz auch Hinweise auf eine Phosphorylierung durch die CK1 sowie die CK2 (<http://scansite.mit.edu>), daher könnte I κ B- ζ tatsächlich ein Ziel der CK sein. Die Verwendung sowohl des CK2-Inhibitors TBCA1 als auch des CK1 δ und ϵ Inhibitors IC261 veränderte die TA von I κ B- ζ jedoch nicht. In einer *in vitro* Kinase-Analyse mit der CK2 wurde I κ B- ζ ebenfalls nicht phosphoryliert. Die erniedrigte TA von I κ B- ζ durch Verwendung des PI3K-Inhibitors LY294002 ließ sich aufgrund dieser Ergebnisse nicht auf eine Aktivität der CK zurückführen.

Neben der Familie der JNKs wurden auch die zwei weiteren MAPKinase Familien der p38 Kinasen und der ERKinasen auf einen Einfluss an der TA von I κ B- ζ untersucht. Während die JNK-, p38- und ERK5-Signalwege eher durch Stress oder Wachstumsfaktoren aktiviert werden, wird der ERK Signalweg über Wachstumsfaktor-stimulierte Oberflächenrezeptoren aktiviert. Die Gruppe der MAPKinasen ist an einer Vielzahl von Erkrankungen wie chronischen Entzündungsprozessen oder Tumorerkrankungen beteiligt und kontrolliert eine Reihe zellulärer Abläufe, hierunter Proliferation, Differenzierung und Apoptose, die auch über NF- κ B-Proteine reguliert werden. Jede Gruppe der MAPK wird durch eine separate für die Gruppe spezifische Proteinkinasekaskade aktiviert. Die Aktivierung erfolgt als duale Phosphorylierung an zwei konservierten Threonin- und Tyrosinresten. Neben der Steuerung zytoplasmatischer Prozesse sind alle MAPKinasen auch an der Regulation der Transkription durch direkte Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren in ihrer TAD beteiligt, was zu einer Stimulation der Transkription führt. Da I κ B- ζ ein im Zellkern lokalisiertes Protein ist und in dieser Arbeit bereits eine intrinsische Transaktivierungsaktivität nachgewiesen werden konnte, könnten diese Kinasen als Regulatoren von I κ B- ζ fungieren.

Die p38 MAPKinasen sind im Zellkern an einer Reihe inflammatorischer Prozesse durch Regulation der Expression der Cyclooxygenase-2, TNF- α , sowie IL-1 β und IL-6, die ebenfalls durch I κ B- ζ reguliert werden, beteiligt. p38 α kann auch durch das TAK1-Bindeprotein (TAB1) MEK unabhängig aktiviert werden. TAB1 sorgt für eine Umverteilung von p38 α ins Zytoplasma, wo es wahrscheinlich an der TNF- α induzierten NF- κ B-Aktivierung beteiligt ist (Turjanski et al., 2007; Li und Lin, 2008). Obwohl diese Erkenntnisse p38 α zu einem potentiellen Regulator der I κ B- ζ -Transaktivierungsaktivität machen, deuteten

Untersuchungen mit dem p38 α Inhibitor SB203580 nicht auf eine Beteiligung dieser Kinase an der TA von I κ B- ζ hin.

Auch die ERKinasen konnten bereits als wichtige Regulatoren der NF- κ B Aktivität und der NF- κ B-abhängigen Genexpression identifiziert werden (Jiang et al., 2004). ERK1 und ERK2 sind überall in der Zelle verteilt und werden unter anderem durch Gerüstproteine zu ihren Zielkompartimenten in der Zelle geleitet. Nach Aktivierung gelangen sie in den Zellkern, wo sie Transkriptionsfaktoren und andere Proteine phosphorylieren und stabilisieren und dadurch die Genexpression beeinflussen. Zusammen mit Mitgliedern der RSK-Familie phosphorylieren sie wichtige transkriptionelle Regulatoren wie CREB und Histon H3 (Murphy und Blenis, 2006). ERK1/2 werden ausschließlich über die MAPKinase Kaskade durch MEK1/2 stimuliert, die durch die Aktivierung kleiner G-Proteine, wie Ras, initiiert wird (Shaul und Seger, 2007; Turjanski et al., 2007).

Eine Suche nach I κ B- ζ -Phosphorylierungsstellen ergab potentielle Phosphorylierungsstellen für ERK1 im I κ B- ζ -Molekül (<http://scansite.mit.edu>). Eine Beteiligung von ERK an der Regulation der NF- κ B-Aktivität und ihre Fähigkeit zur Regulation von Transkriptionsfaktoren im Zellkern deuten darauf hin, dass ERKs I κ B- ζ phosphorylieren könnten. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit eine Beteiligung von ERK1 und ERK2 an der Regulation der Transaktivierungsaktivität von I κ B- ζ durch Verwendung des MEK1-, 2- und 5-Inhibitors PD98,059, von gegen ERK1 und ERK2 gerichteten siRNAs sowie durch Überexpressionsexperimente nachgewiesen werden. Zudem phosphorylierten sowohl ERK1 als auch ERK2 I κ B- ζ in der *in vitro* Kinase-Analyse, was jedoch nicht auf eine direkte Interaktion der Proteine zurückzuführen war. Sowohl T93 als auch S219 wurden als Phosphorylierungsstellen für ERK1 und ERK2 bestätigt.

Da auch potentielle Phosphorylierungsstellen im I κ B- ζ -Protein für GSK vorausgesagt wurden, erfolgte eine Einbeziehung dieser Kinase in die Analysen. GSK 3 wurde zunächst als Regulator des Glukosestoffwechsels identifiziert. Heute sind eine Reihe weiterer Proteine bekannt, die durch GSK 3 phosphoryliert werden. Hierunter das Protein Tau, Mitglieder der Jun Familie sowie die NF- κ B-Untereinheit p65 und das I κ B-Protein Bcl-3. Die Phosphorylierung von p65 durch GSK 3 erfolgt in unstimulierten Zellen, was zu einer negativen Regulation der basalen p65-Aktivität führt (Buss et al., 2004). Eine Stimulation des NF- κ B-Signalweges inaktiviert GSK 3. Insbesondere die GSK 3 β -vermittelte Phosphorylierung des nukleären I κ B-Proteins Bcl-3, die zur proteasomalen Degradation des Proteins führt (Viatour et al., 2004a), macht I κ B- ζ zu einem interessanten Kandidaten für diese Kinase.

GSK 3 α wird durch Phosphorylierung am Serin 21 inaktiviert, GSK 3 β durch Phosphorylierung am Serin 9. Die GSK3 Erkennungssequenz im Zielprotein ist wie folgt

Ser/Thr-Xaa-Xaa-Xaa-pSer/pThr. Zur Bindung eines Substrates an die aktive GSK 3 muss in den meisten Fällen bereits ein Phosphat in einem Abstand von 4 AS zur Phosphorylierungsstelle vorhanden sein, eine Phosphorylierung, die durch eine vorher aktive Kinase vermittelt werden muss (Cohen und Frame, 2001; Frame und Cohen, 2001). I κ B- ζ besitzt zwei typische GSK 3-Phosphorylierungsstellen. Eine am Thr89/Thr93, eine zweite am Ser219. Nachdem hier eine Regulation der I κ B- ζ -Transaktivierungsaktivität nachgewiesen werden konnte, wurde auch die Beschaffenheit der potentiellen Phosphorylierungsstellen untersucht. In einer *in vitro* Kinase-Analyse wurde GST-I κ B- ζ sowohl durch GSK 3 α als auch GSK 3 β phosphoryliert, wobei der Effekt durch GSK 3 β wesentlich stärker war, was darauf hinweist, dass die Phosphorylierung von I κ B- ζ durch beide Kinasen differentiell reguliert ist. Allerdings konnte keine der potentiellen Phosphorylierungsstellen für GSK 3 β nachgewiesen werden. Eine direkte Interaktion der beiden Proteine konnte nicht gezeigt, allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, da das Substrat bereits vor Bindung an GSK 3 β einer ersten Phosphorylierung unterzogen sein muss. Da sowohl GSK 3 als auch ERK1/2 als I κ B- ζ Kinasen identifiziert wurden, könnten ERK1/2 durch die Phosphorylierung des T93 potentielle Kinasen sein, die das für eine Phosphorylierung durch die GSK 3 wichtige erste Phosphat auf I κ B- ζ übertragen, so dass GSK 3 anschließend T89 phosphorylieren könnte. Da mit dem GSK 3-Inhibitor und durch siRNA-Knock-down eindeutige Effekte sowohl auf die I κ B- ζ Transaktivierung als auch auf die Zielgenaktivierung nachgewiesen werden konnten, spielt GSK 3 auf jeden Fall eine wichtige Rolle in der Regulation der transkriptionellen Aktivität von I κ B- ζ .

4. Einfluss von Kinasen auf die I κ B- ζ abhängige Aktivierung von NF- κ B-Zielgenen

Neben GSK 3 sind auch die beiden weiteren identifizierten I κ B- ζ -Kinasen ERK1 und 2 essentiell für die Aktivierung von I κ B- ζ -Zielgenen. Die I κ B- ζ vermittelte Aktivierung von GM-CSF wird über ERK2, GSK 3 β und auch über den PI3Kinase-Signalweg deutlich beeinflusst, eine Aktivierung von IL-6 wird über den PI3K-Signalweg, von IL-1 β insbesondere durch ERK1/2 reguliert. Diese Daten belegen, dass die I κ B- ζ -induzierte Expression von NF- κ B-Zielgenen durch verschiedene Kinasen differentiell reguliert wird. Interessanterweise wurde GM-CSF zwar durch Inhibition von ERK2, allerdings nicht von ERK1 beeinflusst, obwohl beide Kinasen in der Lage waren, I κ B- ζ zu phosphorylieren. Somit kompensiert eventuell ERK2 die Funktion von ERK1, aber nicht umgekehrt. Im Zellmodell wurden des Weiteren eindeutige Funktionen der ERK-Phosphorylierungsstellen im I κ B- ζ -Protein nachgewiesen. Eine Mutation von Threonin 93 oder Serin 219 zeigte starke Effekte auf die I κ B- ζ vermittelte GM-CSF-Aktivierung, sowie schwächere auf die Aktivierung von IL-1 β , wohingegen die Aktivierung von IL-6 offenbar nur über Threonin 93 reguliert wird. Die

Phosphorylierung von I κ B- ζ ist somit wichtig für die TA von I κ B- ζ und darüber hinaus für die I κ B- ζ vermittelte Zielgenaktivierung. Interessanterweise haben die unterschiedlichen Signalwege auch verschiedene Effekte auf die Zielgenaktivierung. Dies verdeutlicht, wie wichtig I κ B- ζ für die Regulation der inflammatorischen Antwort des Körpers ist.

Zusammenfassend gibt diese Arbeit einen bedeutenden Einblick in die Regulation des nukleären I κ B-Proteins I κ B- ζ sowohl auf posttranskriptioneller als auch posttranslationaler Ebene sowie in den Mechanismus der durch I κ B- ζ vermittelten Zielgenaktivierung. Die Resultate dieser Arbeit demonstrieren eindeutig, dass I κ B- ζ einen entscheidenden Einfluss auf die inflammatorischen, jedoch nicht auf die proliferativen Prozesse der Zelle hat. Dies wird zum einen über NF- κ B, zum anderen über die Aktivität von ERK, GSK 3 sowie des PI3K-Signalweges in differentieller Weise reguliert. Somit ist I κ B- ζ ein Schlüsselprotein aus der Familie der I κ B-Proteine, das insbesondere aufgrund seiner nukleären Lokalisation als Aktivator NF- κ B-abhängiger Genexpression fungiert.

VI. Zusammenfassung

Der evolutionär konservierte Transkriptionsfaktor NF- κ B ist ein essentieller Regulator einer Vielzahl zellulärer Prozesse. Hierzu zählen die angeborene und erworbene Immunität, Entwicklung lymphatischer Organe, Entzündung, generalisierte Stressantwort, Zelladhäsion, Wachstumskontrolle und die Apoptose. Zum jetzigen Zeitpunkt sind für NF- κ B über 200 Aktivatoren und mehr als 200 Zielgene bekannt, daher ist eine intensive Kontrolle und Regulation der NF- κ B-Aktivität unerlässlich. Damit die Spezifität und Selektivität der NF- κ B-Antwort gewährleistet ist, verläuft sie über eine Vielzahl von Regulationsstufen.

Eine wichtige Funktion in der Regulation der NF- κ B-Proteine übernehmen die Mitglieder der I κ B-Proteinfamilie, die als Inhibitoren der NF- κ B-Proteine fungieren. Während die klassischen I κ B-Proteine (z.B. I κ B- α) die NF- κ B-Proteine als inaktive Komplexe im Zytoplasma der Zelle zurückhalten, werden die atypischen I κ B-Proteine wie Bcl-3 und I κ B- ζ , das kürzlich von uns identifiziert wurde, nicht konstitutiv, sondern induzierbar exprimiert und regulieren hauptsächlich die nukleäre NF- κ B-Aktivität. I κ B- ζ besitzt wie andere I κ B-Proteine sechs Ankyrinwiederholungssequenzen im C-Terminus, über die es mit den NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 interagiert und deren Bindung an die DNA inhibiert.

Um die nukleäre Funktion von I κ B- ζ weitergehend zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Dissertation sowohl seine Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion untersucht als auch regulatorische Mechanismen, die seine Expression und Aktivität kontrollieren, analysiert.

Obwohl eine Micro-Array-Analyse ergab, dass I κ B- ζ die Expression verschiedener regulatorischer Zellzyklusproteine inhibierte, lies sich kein Einfluss von I κ B- ζ auf die Zellzyklusprogression und insbesondere auf den Verlauf der Mitose nach Überexpression von I κ B- ζ in HeLa Zervixkarzinom-Zellen feststellen.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Expression von I κ B- ζ neben seiner Induzierbarkeit noch weiteren Regulationsmechanismen unterliegt. Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass I κ B- ζ durch die miR-124a posttranskriptionell reguliert wird. Hierbei ist die vorhergesagte miR-124a Bindungsstelle in der 3'UTR der I κ B- ζ mRNA für eine translationale Inhibition der I κ B- ζ -Expression, allerdings nicht für eine I κ B- ζ -mRNA Degradation verantwortlich. Dies beruht auf einer unvollständigen Bindung der miR-124a an die Bindungsstelle in der 3'UTR von I κ B- ζ , die eine typische 7mer-m8 Bindungssequenz enthält. Demzufolge könnte dieser Mechanismus auch Konsequenzen für die I κ B- ζ -vermittelte Regulation der NF- κ B-Aktivität haben.

Eine Regulation der I κ B- ζ -Proteinexpression gewinnt noch größere Bedeutung, da I κ B- ζ über seine N-terminale Transaktivierungsdomäne die intrazelluläre Signaltransduktion

als Aktivator der Genexpression deutlich beeinflussen kann. Die Transaktivierungsaktivität von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ kann zudem durch NF- κB beeinflusst werden. Eine Koexpression der NF- κB -Untereinheit p65 erhöhte die Transaktivierungsaktivität von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$, wohingegen eine Koexpression der NF- κB -Untereinheit p50 diese verminderte.

Im Weiteren wurde eindeutig gezeigt, dass die Transaktivierungsaktivität von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ zudem über posttranslationale Modifikation in Form von Phosphorylierungen reguliert wird. Mit dem Programm Motif Scan wurden verschiedene potentielle $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Phosphorylierungsstellen insbesondere Threonin-Prolin- und Serinphosphorylierungsstellen gefunden, deren Phosphorylierung tatsächlich nachgewiesen werden konnte. Eine Phosphorylierung durch $\text{IKK}\alpha$ und $\text{IKK}\beta$ sowie CK2 wurde zweifelsfrei ausgeschlossen. Dies konnte zumindest teilweise dadurch bestätigt werden, dass CK-Inhibitoren die Transaktivierungsaktivität von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ in keiner Weise beeinflussten. Andererseits konnte eine indirekte Beteiligung des Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Signalweges an der Transaktivierungsaktivität von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ nachgewiesen werden. Während der PI3K-Inhibitor LY294002 die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ Transaktivierungsaktivität deutlich verminderte, konnte dies mit Wortmannin, einem weiteren PI3K-Inhibitor oder mit einer spezifisch gegen die PI3K gerichteten siRNA nicht bestätigt werden. Des Weiteren wurde $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ auch nicht durch die PI3K-Effektorkinase AKT phosphoryliert.

Die Glykogensynthasekinasen GSK 3 α und GSK 3 β und auch die MAP Kinasen ERK1 und ERK2 wurden zweifelsfrei als $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ Kinasen identifiziert. Für ERK1 und ERK2 wurden darüber hinaus Threonin93 und Serin219 von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ als Phosphorylierungsstellen nachgewiesen. Interessanterweise werden die Phosphorylierungen nicht über eine direkte Interaktion von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ mit diesen Kinasen vermittelt. Die Transaktivierungsaktivität von $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ wurde interessanter Weise deutlich durch GSK 3 und ERK reguliert. Daher spielen Phosphorylierungen höchstwahrscheinlich eine bedeutende Rolle in diesem Prozess.

Im Weiteren erwiesen sich GSK3 und ERK als essentiell für die $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ vermittelte Aktivierung von NF- κB -Zielgenen. Sowohl durch pharmakologische Inhibition als auch durch siRNA-Suppression konnten die PI3K-Untereinheiten p110 α und p110 β , GSK 3 und ERK als Regulatoren der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ vermittelten Zytokinexpression identifiziert werden. ERK1 und ERK2 vermitteln diesen Effekt durch Phosphorylierung von T93 und S219 im $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -Protein, da dysfunktionale Mutationen dieser Aminosäuren einen Defekt in der $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ -vermittelten Aktivierung von NF- κB -Zielgenen zeigten.

Zusammenfassend gibt diese Arbeit einen Einblick in die Regulation des nukleären $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteins $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ auf posttranskriptioneller und posttranslationaler Ebene sowie in den Mechanismus der durch $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ vermittelten Zielgenaktivierung und zeigt deutlich, dass $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ einen entscheidenden Einfluss auf die inflammatorischen Prozesse der Zelle ausübt.

VI. Summary

NF- κ B is an evolutionary conserved transcription factor that regulates a variety of cellular processes including innate and adaptive immunity, lymphatic organ development, inflammation, stress responses, cell adhesion, growth control and apoptosis. To date, NF- κ B is activated by more than 200 stimuli and it controls more than 200 target genes. To ensure specificity and selectivity, NF- κ B activity has to be tightly controlled which is achieved through a variety of regulatory mechanisms.

Members of the I κ B protein family are such important regulators of NF- κ B proteins. While classical I κ Bs (i.e. I κ B α) that are constitutively expressed inhibit NF- κ B proteins by sequestering them as inactive complexes in the cytoplasm, atypical I κ Bs such as Bcl-3 and I κ B- ζ that was recently identified by us are inducible and mainly modulate NF- κ B activity in the nucleus. Like other members of this protein family, I κ B- ζ consists of 6 ankyrin repeats at the C-terminus and interacts with the p50 and p65 subunits of NF- κ B, thereby inhibiting their binding to DNA.

To better understand the nuclear function of I κ B- ζ , its role in intracellular signal transduction pathways as well as regulatory mechanisms that control its expression and activity were investigated in this doctoral thesis.

Although microarray analyses revealed that I κ B- ζ inhibited expression of several cell cycle regulatory proteins, an influence on G2/M transition and mitosis was not detectable following its overexpression in HeLa cervical carcinoma cells.

In search of mechanisms that control its expression, it was found that I κ B- ζ is posttranscriptionally regulated by miR-124a. The microRNA miR-124a binds to the predicted site in the 3'UTR of the I κ B- ζ mRNA, leading to the translational inhibition of the I κ B- ζ mRNA rather than its degradation. This is due to an imperfect match between the miR-124a and its binding site in the I κ B- ζ 3'UTR that contains a typical 7mer-m8 site. Therefore, this mechanism might have consequences for the I κ B- ζ -mediated regulation of NF- κ B activity.

Regulation of I κ B- ζ expression becomes even more important in view of the fact that this protein is able to function also as an activator of gene expression due to a N-terminally located transactivation domain. Importantly, the transactivation activity of I κ B- ζ can also be influenced by NF- κ B as it is increased following co-expression of the NF- κ B subunit p65, but reduced upon expression of the p50 subunit.

Moreover, the transactivation activity of I κ B- ζ is also regulated by posttranslational modifications, namely phosphorylations. Using the program Motif Scan, I κ B- ζ was shown to contain several putative phosphorylation sites, mainly serine and threonine residues that indeed were found to be phosphorylated. Thereby, the I κ B-kinases α and β as well as the

casein kinase-2 (CK2) are not involved in the I κ B- ζ phosphorylation. This was also confirmed, at least partially, by the use of CK inhibitors that had no effect on I κ B- ζ transactivation activity. On the other hand, studies revealed an indirect involvement of the phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K) signal transduction pathway in this process. Although the PI3K inhibitor LY294002 reduced I κ B- ζ transactivation activity, this effect was not observed with Wortmannin, another PI3 kinase inhibitor, or with PI3 kinase-specific siRNAs. In addition, the PI3K effector kinase AKT1 did also not phosphorylate I κ B- ζ .

On the other hand, the glycogen synthase kinases GSK 3 α and GSK 3 β , as well as the MAP kinases ERK1 and ERK2 were unambiguously identified as I κ B- ζ kinases. Moreover, the residues T93 and S219 of the I κ B- ζ protein were identified as phosphorylation sites for ERK1 and ERK2. Remarkably, the phosphorylations are not mediated through direct interactions between I κ B- ζ and these kinases. More importantly, the transactivation activity of I κ B- ζ was significantly modulated by GSK3 and ERK implying that phosphorylation plays a crucial role in this process.

Furthermore, GSK3 and ERK were found to be essential for I κ B- ζ -mediated NF- κ B target gene expression. Both, pharmacological inhibition and siRNA knockdown identified the PI3K subunits p110 α and p110 β as well as GSK3 and ERK as regulators of I κ B- ζ -mediated cytokine expression. Interestingly, ERK 1 and ERK2 mediated this effect through phosphorylation of T93 and S219 in the I κ B- ζ protein since dysfunctional mutations of these amino acids showed a defect in I κ B- ζ -mediated activation of NF- κ B target genes.

In summary, this thesis gives fundamental insights into the regulation of the nuclear I κ B protein I κ B- ζ at the posttranscriptional and posttranslational level as well as in the control of I κ B- ζ -mediated expression of NF- κ B target genes and shows clearly that I κ B- ζ is an important regulator of inflammatory processes in the cell.

VII. Literaturverzeichnis

- Arenzana-Seisdedos F., Turpin P., Rodriguez M., Thomas D., Hay R.T., Virelizier J.L. et al. (1997). Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* 110 (Pt 3): 369-378.
- Baeuerle P.A. (1998). IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control. *Cell* 95: 729-731.
- Baeuerle P.A. und Baltimore D. (1996). NF-kappa B: ten years after. *Cell* 87: 13-20.
- Baeuerle P.A. und Henkel T. (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12: 141-179.
- Baldwin A.S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14: 649-683.
- Barkett M. und Gilmore T.D. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6910-6924.
- Baroukh N., Ravier M.A., Loder M.K., Hill E.V., Bounacer A., Scharfmann R. et al. (2007). MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic beta-cell lines. *J Biol Chem* 282: 19575-19588.
- Barre B. und Perkins N.D. (2007). A cell cycle regulatory network controlling NF-kappaB subunit activity and function. *Embo J* 26: 4841-4855.
- Behrend L., Milne D.M., Stoter M., Deppert W., Campbell L.E., Meek D.W. et al. (2000). IC261, a specific inhibitor of the protein kinases casein kinase 1-delta and -epsilon, triggers the mitotic checkpoint and induces p53-dependent postmitotic effects. *Oncogene* 19: 5303-5313.
- Birbach A., Gold P., Binder B.R., Hofer E., de Martin R. und Schmid J.A. (2002). Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* 277: 10842-10851.
- Bours V., Franzoso G., Azarenko V., Park S., Kanno T., Brown K. et al. (1993). The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* 72: 729-739.
- Brown K., Gerstberger S., Carlson L., Franzoso G. und Siebenlist U. (1995). Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 267: 1485-1488.
- Burns K.A. und Martinon F. (2004). Inflammatory diseases: is ubiquitinated NEMO at the hub? *Curr Biol* 14: R1040-1042.
- Buss H., Dorrie A., Schmitz M.L., Frank R., Livingstone M., Resch K. et al. (2004). Phosphorylation of serine 468 by GSK-3beta negatively regulates basal p65 NF-kappaB activity. *J Biol Chem* 279: 49571-49574.
- Calao M., Burny A., Quivy V., Dekoninck A. und Van Lint C. (2008). A pervasive role of histone acetyltransferases and deacetylases in an NF-kappaB-signaling code. *Trends Biochem Sci* 33: 339-349.
- Cantley L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655-1657.
- Cao X., Pfaff S.L. und Gage F.H. (2007). A functional study of miR-124 in the developing neural tube. *Genes Dev* 21: 531-536.
- Carmody R.J., Ruan Q., Palmer S., Hilliard B. und Chen Y.H. (2007). Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF-kappaB p50 ubiquitination blockade. *Science* 317: 675-678.
- Chen F.E. und Ghosh G. (1999). Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* 18: 6845-6852.
- Chen Z.J. (2005). Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 7: 758-765.
- Chen Z.J., Bhoj V. und Seth R.B. (2006). Ubiquitin, TAK1 and IKK: is there a connection? *Cell Death Differ* 13: 687-692.
- Coghlan M.P., Culbert A.A., Cross D.A., Corcoran S.L., Yates J.W., Pearce N.J. et al. (2000). Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol* 7: 793-803.
- Cohen P. und Frame S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 769-776.

- Compton S.J. und Jones C.G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151: 369-374.
- Conaco C., Otto S., Han J.J. und Mandel G. (2006). Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2422-2427.
- Cowland J.B., Muta T. und Borregaard N. (2006). IL-1beta-specific up-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin is controlled by IkappaB-zeta. *J Immunol* 176: 5559-5566.
- Cude K., Wang Y., Choi H.J., Hsuan S.L., Zhang H., Wang C.Y. et al. (2007). Regulation of the G2-M cell cycle progression by the ERK5-NFkappaB signaling pathway. *J Cell Biol* 177: 253-264.
- Das K.C., Lewis-Molock Y. und White C.W. (1995). Activation of NF-kappa B and elevation of MnSOD gene expression by thiol reducing agents in lung adenocarcinoma (A549) cells. *Am J Physiol* 269: L588-602.
- Dechend R., Hirano F., Lehmann K., Heissmeyer V., Ansieau S., Wulczyn F.G. et al. (1999). The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF-kappaB/Rel and nuclear co-regulators. *Oncogene* 18: 3316-3323.
- Dejardin E., Droin N.M., Delhase M., Haas E., Cao Y., Makris C. et al. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17: 525-535.
- Delhase M., Hayakawa M., Chen Y. und Karin M. (1999). Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* 284: 309-313.
- DiDonato J., Mercurio F., Rosette C., Wu-Li J., Suyang H., Ghosh S. et al. (1996). Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 16: 1295-1304.
- DiDonato J.A., Hayakawa M., Rothwarf D.M., Zandi E. und Karin M. (1997). A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388: 548-554.
- Dobrzanski P., Ryseck R.P. und Bravo R. (1995). Specific inhibition of RelB/p52 transcriptional activity by the C-terminal domain of p100. *Oncogene* 10: 1003-1007.
- Dower W.J., Miller J.F. und Ragsdale C.W. (1988). High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127-6145.
- Drew D., Shimada E., Huynh K., Bergqvist S., Talwar R., Karin M. et al. (2007). Inhibitor kappaB kinase beta binding by inhibitor kappaB kinase gamma. *Biochemistry* 46: 12482-12490.
- Ducut Sigala J.L., Bottero V., Young D.B., Shevchenko A., Mercurio F. und Verma I.M. (2004). Activation of transcription factor NF-kappaB requires ELKS, an IkappaB kinase regulatory subunit. *Science* 304: 1963-1967.
- Duyao M.P., Buckler A.J. und Sonenshein G.E. (1990). Interaction of an NF-kappa B-like factor with a site upstream of the c-myc promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4727-4731.
- Esquela-Kerscher A. und Slack F.J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 259-269.
- Fiorini E., Schmitz I., Marissen W.E., Osborn S.L., Touma M., Sasada T. et al. (2002). Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF-kappa B inhibitor. *Mol Cell* 9: 637-648.
- Fong A. und Sun S.C. (2002). Genetic evidence for the essential role of beta-transducin repeat-containing protein in the inducible processing of NF-kappa B2/p100. *J Biol Chem* 277: 22111-22114.
- Frame S. und Cohen P. (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359: 1-16.
- Franzoso G., Bours V., Azarenko V., Park S., Tomita-Yamaguchi M., Kanno T. et al. (1993). The oncoprotein Bcl-3 can facilitate NF-kappa B-mediated transactivation by removing inhibiting p50 homodimers from select kappa B sites. *Embo J* 12: 3893-3901.

- Fujita T., Nolan G.P., Liou H.C., Scott M.L. und Baltimore D. (1993). The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev* 7: 1354-1363.
- Geller D.A., Lowenstein C.J., Shapiro R.A., Nussler A.K., Di Silvio M., Wang S.C. et al. (1993). Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3491-3495.
- Ghosh S., May M.J. und Kopp E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-260.
- Gilmore T.D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25: 6680-6684.
- Gilmore T.D. (2008) www.nf-kb.org
- Grimson A., Farh K.K., Johnston W.K., Garrett-Engele P., Lim L.P. und Bartel D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27: 91-105.
- Gustin J.A., Korgaonkar C.K., Pincheira R., Li Q. und Donner D.B. (2006). Akt regulates basal and induced processing of NF-kappaB2 (p100) to p52. *J Biol Chem* 281: 16473-16481.
- Gustin J.A., Ozes O.N., Akca H., Pincheira R., Mayo L.D., Li Q. et al. (2004). Cell type-specific expression of the IkappaB kinases determines the significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF-kappa B activation. *J Biol Chem* 279: 1615-1620.
- Guttridge D.C., Albanese C., Reuther J.Y., Pestell R.G. und Baldwin A.S., Jr. (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 19: 5785-5799.
- Haruta H., Kato A. und Todokoro K. (2001). Isolation of a novel interleukin-1-inducible nuclear protein bearing ankyrin-repeat motifs. *J Biol Chem* 276: 12485-12488.
- Hatada E.N., Nieters A., Wulczyn F.G., Naumann M., Meyer R., Nucifora G. et al. (1992). The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2489-2493.
- Hayden M.S. und Ghosh S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18: 2195-2224.
- Hayden M.S. und Ghosh S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132: 344-362.
- Heusch M., Lin L., Geleziunas R. und Greene W.C. (1999). The generation of nfkb2 p52: mechanism and efficiency. *Oncogene* 18: 6201-6208.
- Hijioka K., Matsuo S., Eto-Kimura A., Takeshige K. und Muta T. (2007). Induction of the nuclear IkappaB protein IkappaB-zeta upon stimulation of B cell antigen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 476-480.
- Hinz M., Krappmann D., Eichten A., Heder A., Scheidereit C. und Strauss M. (1999). NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* 19: 2690-2698.
- Hirotsu T., Lee P.Y., Kuwata H., Yamamoto M., Matsumoto M., Kawase I. et al. (2005). The nuclear IkappaB protein IkappaBNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J Immunol* 174: 3650-3657.
- Hoberg J.E., Popko A.E., Ramsey C.S. und Mayo M.W. (2006). IkappaB kinase alpha-mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300. *Mol Cell Biol* 26: 457-471.
- Hoffmann A., Levchenko A., Scott M.L. und Baltimore D. (2002). The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 298: 1241-1245.
- Huang T.T., Wuerzberger-Davis S.M., Wu Z.H. und Miyamoto S. (2003). Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell* 115: 565-576.

- Huang Y., Ohtani K., Iwanaga R., Matsumura Y. und Nakamura M. (2001). Direct trans-activation of the human cyclin D2 gene by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I. *Oncogene* 20: 1094-1102.
- Inoue J., Kerr L.D., Kakizuka A. und Verma I.M. (1992). I kappa B gamma, a 70 kd protein identical to the C-terminal half of p110 NF-kappa B: a new member of the I kappa B family. *Cell* 68: 1109-1120.
- Iwanaga R., Ozono E., Fujisawa J., Ikeda M.A., Okamura N., Huang Y. et al. (2008). Activation of the cyclin D2 and cdk6 genes through NF-kappaB is critical for cell-cycle progression induced by HTLV-I Tax. *Oncogene*.
- Jepsen K. und Rosenfeld M.G. (2002). Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *J Cell Sci* 115: 689-698.
- Jiang B., Xu S., Hou X., Pimentel D.R., Brecher P. und Cohen R.A. (2004). Temporal control of NF-kappaB activation by ERK differentially regulates interleukin-1beta-induced gene expression. *J Biol Chem* 279: 1323-1329.
- Johnson G.L. und Lapadat R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-1912.
- Karin M. (1999). How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18: 6867-6874.
- Kayama H., Ramirez-Carrozzi V.R., Yamamoto M., Mizutani T., Kuwata H., Iba H. et al. (2008). Class-specific regulation of pro-inflammatory genes by MyD88 pathways and IkappaBzeta. *J Biol Chem* 283: 12468-12477.
- Kerr L.D., Duckett C.S., Wamsley P., Zhang Q., Chiao P., Nabel G. et al. (1992). The proto-oncogene bcl-3 encodes an I kappa B protein. *Genes Dev* 6: 2352-2363.
- Kim H.J., Hawke N. und Baldwin A.S. (2006). NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ* 13: 738-747.
- Kitamura H., Kanehira K., Okita K., Morimatsu M. und Saito M. (2000). MAIL, a novel nuclear I kappa B protein that potentiates LPS-induced IL-6 production. *FEBS Lett* 485: 53-56.
- Knippschild U., Gocht A., Wolff S., Huber N., Lohler J. und Stoter M. (2005). The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* 17: 675-689.
- Krappmann D. und Scheidereit C. (2005). A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways. *EMBO Rep* 6: 321-326.
- Kucharczak J., Simmons M.J., Fan Y. und Gelinas C. (2003). To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 22: 8961-8982.
- Kunsch C., Ruben S.M. und Rosen C.A. (1992). Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12: 4412-4421.
- Kushner D.B. und Ricciardi R.P. (1999). Reduced phosphorylation of p50 is responsible for diminished NF-kappaB binding to the major histocompatibility complex class I enhancer in adenovirus type 12-transformed cells. *Mol Cell Biol* 19: 2169-2179.
- Kuwata H., Matsumoto M., Atarashi K., Morishita H., Hirotsu T., Koga R. et al. (2006). IkappaBNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity* 24: 41-51.
- Lawrence T., Bebić M., Liu G.Y., Nizet V. und Karin M. (2005). IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* 434: 1138-1143.
- Lee R.C., Feinbaum R.L. und Ambros V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854.
- Lee S.H. und Hannink M. (2002). Characterization of the nuclear import and export functions of Ikappa B(epsilon). *J Biol Chem* 277: 23358-23366.
- Leung T.H., Hoffmann A. und Baltimore D. (2004). One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers. *Cell* 118: 453-464.

- Li C.C., Dai R.M., Chen E. und Longo D.L. (1994). Phosphorylation of NF- κ B1-p50 is involved in NF- κ B activation and stable DNA binding. *J Biol Chem* 269: 30089-30092.
- Li H. und Lin X. (2008). Positive and negative signaling components involved in TNF α -induced NF- κ B activation. *Cytokine* 41: 1-8.
- Li Q. und Verma I.M. (2002). NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2: 725-734.
- Li Z. und Nabel G.J. (1997). A new member of the I κ B protein family, I κ B epsilon, inhibits RelA (p65)-mediated NF- κ B transcription. *Mol Cell Biol* 17: 6184-6190.
- Lim L.P., Lau N.C., Garrett-Engle P., Grimson A., Schelter J.M., Castle J. et al. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433: 769-773.
- Lujambio A. und Esteller M. (2007). CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer. *Cell Cycle* 6: 1455-1459.
- Lujambio A., Ropero S., Ballestar E., Fraga M.F., Cerrato C., Setien F. et al. (2007). Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 67: 1424-1429.
- Madrid L.V., Mayo M.W., Reuther J.Y. und Baldwin A.S., Jr. (2001). Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF- κ B through utilization of the I κ B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem* 276: 18934-18940.
- Malek S., Chen Y., Huxford T. und Ghosh G. (2001). I κ B β , but not I κ B α , functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- κ B dimers by masking both NF- κ B nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem* 276: 45225-45235.
- Maniatis T. (1997). Catalysis by a multiprotein I κ B kinase complex. *Science* 278: 818-819.
- Matsuo S., Yamazaki S., Takeshige K. und Muta T. (2007). Crucial roles of binding sites for NF- κ B and C/EBPs in I κ B-zeta-mediated transcriptional activation. *Biochem J* 405: 605-615.
- May M.J., Marienfeld R.B. und Ghosh S. (2002). Characterization of the I κ B-kinase NEMO binding domain. *J Biol Chem* 277: 45992-46000.
- Mercurio F., Murray B.W., Shevchenko A., Bennett B.L., Young D.B., Li J.W. et al. (1999). I κ B kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. *Mol Cell Biol* 19: 1526-1538.
- Mercurio F., Zhu H., Murray B.W., Shevchenko A., Bennett B.L., Li J. et al. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science* 278: 860-866.
- Mistry P., Deacon K., Mistry S., Blank J. und Patel R. (2004). NF- κ B promotes survival during mitotic cell cycle arrest. *J Biol Chem* 279: 1482-1490.
- Mosialos G. und Gilmore T.D. (1993). v-Rel and c-Rel are differentially affected by mutations at a consensus protein kinase recognition sequence. *Oncogene* 8: 721-730.
- Motoyama M., Yamazaki S., Eto-Kimura A., Takeshige K. und Muta T. (2004). Positive and negative regulation of nuclear factor- κ B-mediated transcription by I κ B-zeta, an inducible nuclear protein. *J Biol Chem*.
- Motoyama M., Yamazaki S., Eto-Kimura A., Takeshige K. und Muta T. (2005). Positive and negative regulation of nuclear factor- κ B-mediated transcription by I κ B-zeta, an inducible nuclear protein. *J Biol Chem* 280: 7444-7451.
- Murphy L.O. und Blenis J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* 31: 268-275.
- Muta T. (2006). I κ B-zeta: an inducible regulator of nuclear factor- κ B. *Vitam Horm* 74: 301-316.
- Natoli G. und Chiocca S. (2008). Nuclear ubiquitin ligases, NF- κ B degradation, and the control of inflammation. *Sci Signal* 1: pe1.
- Natoli G., Sacconi S., Bosisio D. und Marazzi I. (2005). Interactions of NF- κ B with chromatin: the art of being at the right place at the right time. *Nat Immunol* 6: 439-445.

- Naumann M., Wulczyn F.G. und Scheidereit C. (1993). The NF-kappa B precursor p105 and the proto-oncogene product Bcl-3 are I kappa B molecules and control nuclear translocation of NF-kappa B. *Embo J* 12: 213-222.
- Neumann M., Grieshammer T., Chuvpilo S., Kneitz B., Lohoff M., Schimpl A. et al. (1995). RelA/p65 is a molecular target for the immunosuppressive action of protein kinase A. *Embo J* 14: 1991-2004.
- Pahl H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6853-6866.
- Papa S., Bubici C., Zazzeroni F., Pham C.G., Kuntzen C., Knabb J.R. et al. (2006). The NF-kappaB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. *Cell Death Differ* 13: 712-729.
- Park S.G., Chung C., Kang H., Kim J.Y. und Jung G. (2006). Up-regulation of cyclin D1 by HBx is mediated by NF-kappaB2/BCL3 complex through kappaB site of cyclin D1 promoter. *J Biol Chem* 281: 31770-31777.
- Pasparakis M., Luedde T. und Schmidt-Supprian M. (2006). Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ* 13: 861-872.
- Perkins N.D. (2006). Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* 25: 6717-6730.
- Perkins N.D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 49-62.
- Pierson J., Hostager B., Fan R. und Vibhakar R. (2008). Regulation of cyclin dependent kinase 6 by microRNA 124 in medulloblastoma. *J Neurooncol* 90: 1-7.
- Prajapati S., Tu Z., Yamamoto Y. und Gaynor R.B. (2006). IKKalpha regulates the mitotic phase of the cell cycle by modulating Aurora A phosphorylation. *Cell Cycle* 5: 2371-2380.
- Rojo A.I., Salinas M., Martin D., Perona R. und Cuadrado A. (2004). Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kappaB. *J Neurosci* 24: 7324-7334.
- Rothwarf D.M., Zandi E., Natoli G. und Karin M. (1998). IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature* 395: 297-300.
- Ryo A., Suizu F., Yoshida Y., Perrem K., Liou Y.C., Wulf G. et al. (2003). Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell* 12: 1413-1426.
- Sachdev S., Hoffmann A. und Hannink M. (1998). Nuclear localization of IkappaB alpha is mediated by the second ankyrin repeat: the IkappaB alpha ankyrin repeats define a novel class of cis-acting nuclear import sequences. *Mol Cell Biol* 18: 2524-2534.
- Scheidereit C. (2006). IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 25: 6685-6705.
- Scherer D.C., Brockman J.A., Chen Z., Maniatis T. und Ballard D.W. (1995). Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11259-11263.
- Schmitz M.L. und Baeuerle P.A. (1991). The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *Embo J* 10: 3805-3817.
- Schmitz M.L., Mattioli I., Buss H. und Kracht M. (2004). NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *ChemBiochem* 5: 1348-1358.
- Schneider G., Saur D., Siveke J.T., Fritsch R., Greten F.R. und Schmid R.M. (2006). IKKalpha controls p52/RelB at the *skp2* gene promoter to regulate G1- to S-phase progression. *Embo J* 25: 3801-3812.
- Sells M.A., Li J. und Chernoff J. (1995). Delivery of protein into cells using polycationic liposomes. *Biotechniques* 19: 72-76, 78.
- Sen R. und Baltimore D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47: 921-928.
- Senftleben U., Cao Y., Xiao G., Greten F.R., Krahn G., Bonizzi G. et al. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293: 1495-1499.

- Shaul Y.D. und Seger R. (2007). The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1213-1226.
- Shiina T., Konno A., Oonuma T., Kitamura H., Imaoka K., Takeda N. et al. (2004). Targeted disruption of MAIL, a nuclear I κ B protein, leads to severe atopic dermatitis-like disease. *J Biol Chem* 279: 55493-55498.
- Shiina T., Morimatsu M., Kitamura H., Ito T., Kidou S., Matsubara K. et al. (2001). Genomic organization, chromosomal localization, and promoter analysis of the mouse Mail gene. *Immunogenetics* 53: 649-655.
- Simeonidis S., Liang S., Chen G. und Thanos D. (1997). Cloning and functional characterization of mouse I κ B ϵ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14372-14377.
- Sizemore N., Leung S. und Stark G.R. (1999). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF- κ B p65/RelA subunit. *Mol Cell Biol* 19: 4798-4805.
- Sturgill T.W. (2008). MAP kinase: it's been longer than fifteen minutes. *Biochem Biophys Res Commun* 371: 1-4.
- Taganov K.D., Boldin M.P., Chang K.J. und Baltimore D. (2006). NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12481-12486.
- Tam W.F., Lee L.H., Davis L. und Sen R. (2000). Cytoplasmic sequestration of rel proteins by I κ B α requires CRM1-dependent nuclear export. *Mol Cell Biol* 20: 2269-2284.
- Tili E., Michaille J.J., Cimino A., Costinean S., Dumitru C.D., Adair B. et al. (2007). Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol* 179: 5082-5089.
- Totzke G., Essmann F., Pohlmann S., Lindenblatt C., Janicke R.U. und Schulze-Osthoff K. (2006). A novel member of the I κ B family, human I κ B-zeta, inhibits transactivation of p65 and its DNA binding. *J Biol Chem* 281: 12645-12654.
- Toualbi-Abed K., Daniel F., Guller M.C., Legrand A., Mauriz J.L., Mauviel A. et al. (2008). Jun D cooperates with p65 to activate the proximal I κ B site of the cyclin D1 promoter: role of PI3K/PDK-1. *Carcinogenesis* 29: 536-543.
- Touma M., Antonini V., Kumar M., Osborn S.L., Bobenchik A.M., Keskin D.B. et al. (2007). Functional role for I κ B NBS in T cell cytokine regulation as revealed by targeted gene disruption. *J Immunol* 179: 1681-1692.
- Turjanski A.G., Vaque J.P. und Gutkind J.S. (2007). MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 26: 3240-3253.
- Vanhaesebroeck B., Leever S.J., Ahmadi K., Timms J., Katso R., Driscoll P.C. et al. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70: 535-602.
- Verma I.M., Stevenson J.K., Schwarz E.M., Van Antwerp D. und Miyamoto S. (1995). Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 9: 2723-2735.
- Viatour P., Dejardin E., Warnier M., Lair F., Claudio E., Bureau F. et al. (2004a). GSK3-mediated BCL-3 phosphorylation modulates its degradation and its oncogenicity. *Mol Cell* 16: 35-45.
- Viatour P., Merville M.P., Bours V. und Chariot A. (2004b). Protein phosphorylation as a key mechanism for the regulation of BCL-3 activity. *Cell Cycle* 3: 1498-1501.
- Viatour P., Merville M.P., Bours V. und Chariot A. (2005). Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* 30: 43-52.
- Vlahos C.J., Matter W.F., Hui K.Y. und Brown R.F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269: 5241-5248.

- Wang Z., Sicinski P., Weinberg R.A., Zhang Y. und Ravid K. (1996). Characterization of the mouse cyclin D3 gene: exon/intron organization and promoter activity. *Genomics* 35: 156-163.
- Whiteside S.T., Epinat J.C., Rice N.R. und Israel A. (1997). I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *Embo J* 16: 1413-1426.
- Wietek C. und O'Neill L.A. (2007). Diversity and regulation in the NF-kappaB system. *Trends Biochem Sci* 32: 311-319.
- Wightman B., Ha I. und Ruvkun G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855-862.
- Woronicz J.D., Gao X., Cao Z., Rothe M. und Goeddel D.V. (1997). IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science* 278: 866-869.
- Wu H. und Lozano G. (1994). NF-kappa B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J Biol Chem* 269: 20067-20074.
- Wu Z.H., Shi Y., Tibbetts R.S. und Miyamoto S. (2006). Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science* 311: 1141-1146.
- Wymann M.P., Bulgarelli-Leva G., Zvelebil M.J., Pirola L., Vanhaesebroeck B., Waterfield M.D. et al. (1996). Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol* 16: 1722-1733.
- Wymann M.P., Zvelebil M. und Laffargue M. (2003). Phosphoinositide 3-kinase signalling-- which way to target? *Trends Pharmacol Sci* 24: 366-376.
- Xiao G., Fong A. und Sun S.C. (2004). Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 279: 30099-30105.
- Xiao G., Harhaj E.W. und Sun S.C. (2001). NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* 7: 401-409.
- Yamamoto K., Arakawa T., Ueda N. und Yamamoto S. (1995). Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* 270: 31315-31320.
- Yamamoto M., Yamazaki S., Uematsu S., Sato S., Hemmi H., Hoshino K. et al. (2004). Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature* 430: 218-222.
- Yamaoka S., Courtois G., Bessia C., Whiteside S.T., Weil R., Agou F. et al. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93: 1231-1240.
- Yamazaki S., Muta T., Matsuo S. und Takeshige K. (2005). Stimulus-specific induction of a novel nuclear factor-kappaB regulator, IkappaB-zeta, via Toll/Interleukin-1 receptor is mediated by mRNA stabilization. *J Biol Chem* 280: 1678-1687.
- Yamazaki S., Muta T. und Takeshige K. (2001). A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. *J Biol Chem* 276: 27657-27662.
- Yaron A., Gonen H., Alkalay I., Hatzubai A., Jung S., Beyth S. et al. (1997). Inhibition of NF-kappa-B cellular function via specific targeting of the I-kappa-B-ubiquitin ligase. *Embo J* 16: 6486-6494.
- Yaron A., Hatzubai A., Davis M., Lavon I., Amit S., Manning A.M. et al. (1998). Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase. *Nature* 396: 590-594.
- Zabel U. und Baeuerle P.A. (1990). Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF-kappa B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* 61: 255-265.

- Zandi E., Chen Y. und Karin M. (1998). Direct phosphorylation of I κ B by IKK α and IKK β : discrimination between free and NF- κ B-bound substrate. *Science* 281: 1360-1363.
- Zandi E., Rothwarf D.M., Delhase M., Hayakawa M. und Karin M. (1997). The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell* 91: 243-252.
- Zhao Y. und Srivastava D. (2007). A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci* 32: 189-197.

VIII. Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3' Untranslatierte Region
5-AzaCyd	5-Aza-2'-Desoxycytidin
Abb.	Abbildung
ARD	Ankyrinwiederholungsdomäne (ankyrin repeat domain)
AS	Aminosäure
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor
BCA	Biochoninsäure (<i>biochoninic acid</i>)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>Bcl-2 like 1 long</i>
BSA	Rinderserum Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CDC25	Zellteilungszyklus Homolog 25
CDK6	Cyclin-abhängige Kinase 6
ChK	<i>checkpoint kinase</i>
CK	Casein Kinase
cm	Zentimeter
CSK	C-terminale SRC Kinase
CREB	cAMP Antwortelement-Bindeprotein (<i>cAMP response element-binding protein</i>)
DTT	Dithiotreithol
ELKS	Protein reich an Glutamat (E), Leucin (L), Lysin (K) und Serin (S)
ERG	Eppendorf Reaktionsgefäß
ERK	extrazellulär-regulierte Kinase
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
h	Stunde
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HTLV-1	humanes T-Zell Leukämie Virus Typ1
IF	Immunfluoreszenz
IGF-IR	<i>insulin-like growth factor-receptor</i>
IκB	Inhibitor von NF-κB

IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
K, Lys	Lysin
Kon	Kontrolle
LB	<i>Luria Broth</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LT- β -R	Lymphotoxin- β -Rezeptor
LV	Leervektor
MAD	Matrix-assoziierte Deacetylase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK, MEK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPKK Kinase
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MEF	murine embryonale Fibroblasten
min	Minute
miR, miRNA	microRNA
MLCK	Myosin-leichte Kette Kinase
MSK	Mitogen- und Stress-aktivierte Proteinkinase
NEMO/IKK γ	NF- κ B essential modifier
NES	nukleäres Exportsignal
NF- κ B	Nuklearfaktor-kappaB
NIK	NF- κ B induzierende Kinase
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (<i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>)
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB/AKT	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat

Rb	<i>Retinoblastoma</i> Protein
RHD	Rel-Homologie Domäne
RIP	Rezeptor-interagierende Proteine (<i>receptor interacting proteins</i>)
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RSK	ribosomale S6 Kinase
RT	Raumtemperatur
S, Ser	Serin
S6K	S6 Kinase
SCF/SRCF	Skp1-Cullin-Roc1/Rbx1/Hrt-1-F-Box
sec	Sekunde
siRNA	kleine interferierende RNA-Moleküle
Skp2	S-Phase Kinase assoziiertes Protein 2
SMRT	<i>silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor</i>
T, Thr	Threonin
Tab.	Tabelle
TA	Transaktivierung
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAK	TGF β -aktivierte Kinase
TBK	TANK bindende Kinase
TNF	Tumornekrose Faktor
Tpl2	Tumorprogressionsort-2 (<i>tumor progression locus</i>)
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
TRADD	TNF-Rezeptor assoziierte Todesdomäne (<i>TNF receptor-associated death domain</i>)
U	unit, Einheit
ÜNK	Übernachtkultur
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
Y, Tyr	Tyrosin

IX. Anhang

Lebenslauf

Charlotte Frauke Lindenblatt

- 05.07.1978 geboren in Düsseldorf
- 1984-1988 Besuch der St. Bonifatius Grundschule in Düsseldorf
- 1988-1997 Besuch des St. Ursula Gymnasiums in Düsseldorf
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- 1997-2000 Ausbildung zur Medizinisch-Technischen Laboratoriumsassistentin
Medizinische Einrichtungen der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Abschluss: Medizinisch-Technische Laboratoriumsassistentin
- 2000-2005 Studium der Biologie an der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Abschluss: Diplom-Biologin
Diplomarbeit am Institut für Molekulare Medizin der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
bei Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff
Thema: „Funktionelle Charakterisierung eines neuen NF- κ B-
Inhibitors“
- 2005-2009 Doktorarbeit am Institut für Molekulare Medizin der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
bei Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff
Thema: „Funktion und Regulation des neuen I κ B-Proteins I κ B- ζ “

Teile meiner wissenschaftlichen Arbeit wurden bereits bzw. werden gerade veröffentlicht. Im folgenden sind die Publikationen meiner wissenschaftlichen Laufbahn erfasst:

Lindenblatt, C., Schulze-Osthoff, K. and Totzke G. (2009). Transactivation of human I κ B- ζ is regulated by ERK. (in Vorbereitung)

Lindenblatt, C., Schulze-Osthoff, K. and Totzke G. (2008). Human I κ B- ζ -Protein is a target of microRNA-124a. *Oncogene* (in Vorbereitung)

Totzke G., Essmann, F., Pohlmann, S. Lindenblatt, C., Janicke, R.U., Schulze-Osthoff, K. (2006). A novel member of the I κ B family, human I κ B- ζ , inhibits transactivation of p65 and its DNA binding. *J Biol Chem* 281, 12645-54

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff für die interessante Aufgabenstellung, die Betreuung der Arbeit und die Möglichkeit, meine Promotion an seinem Institut anzufertigen.

Bei Herrn Prof. Dr. G. Groth bedanke ich mich für die Betreuung der Arbeit als Vertreter der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Gudrun Totzke für die intensive wissenschaftliche und experimentelle Betreuung und die stete Ansprechbarkeit bei allen Fragen während der gesamten Arbeit. Insbesondere möchte ich mich für ihre ständige Hilfsbereitschaft in allen Fragen bedanken und ihre aufbauenden Worte.

Bei Herrn PD Dr. Frank Essmann und Frau Dr. Ute Fischer möchte ich mich für stete Ansprechbarkeit und für immer sehr gute sowohl wissenschaftliche als auch private Ratschläge und Hilfestellungen bedanken.

Meinen Laborkollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen anregenden Gespräche. Insbesondere danke ich Nadine und Nicole für stets sehr lustige und unterhaltsame Labortage. Meinem Kollegen Dennis danke ich dafür, dass er mir immer bei diversen Computerfragen zur Seite stand.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Mit-Doktoranden Sibylle, Stephan und Katja für die gute Zusammenarbeit und gemeinsam durchlachte und durchlittene Stunden.

Ich danke dem gesamten Team des Institutes für Molekulare Medizin für stetige Hilfsbereitschaft und ein gutes Arbeitsklima.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre Unterstützung während des gesamten Studiums sowie dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bei meinen Freunden und meinem Bruder Roland bedanke ich mich für ihr Verständnis und ihre moralische Unterstützung, ganz besonders danke ich Matthias Rattenhuber vor allem für seine Unterstützung in der Endphase der Arbeit.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der hier vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 21.November 2008

Charlotte Lindenblatt