

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie  
der  
Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier)

## **Charakterisierung des I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes in monozytären Zellen**

**Nikolaus Jilg**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. K. Brand
2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 13.09.06 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 21.03.07 angenommen.

Meinen Eltern  
gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	4
<b>1. Einleitung</b> .....	8
1.1 Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B/Rel-Familie und I $\kappa$ B-Inhibitorproteine .....	8
1.2 Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Systems .....	9
1.3 Regulation von NF- $\kappa$ B durch den IKK-Komplex .....	10
1.4 Rolle von NF- $\kappa$ B bei akut und chronisch entzündlichen Prozessen .....	13
1.5 Fragestellung .....	16
<b>2. Material und Methodik</b> .....	17
2.1 Material .....	17
2.1.1 Antikörper .....	17
2.1.2 Reagenzien .....	18
2.2 Methodik .....	18
2.2.1 Zellkultur .....	18
2.2.2 Endotoxin-Test .....	19
2.2.3 Zytotoxizitätstest (WST-Test) .....	19
2.2.4 Isolierung zytosolischer und nukleärer Extrakte .....	19
2.2.5 Gelretardierungsassay .....	20
2.2.6 Western Blot-Analyse .....	21
2.2.7 Immunpräzipitation und Assoziationsassay .....	22
2.2.8 Kinaseassay .....	22
2.2.9 Immundepletion .....	23
<b>3. Ergebnisse</b> .....	24
3.1 Testung von IKK- $\alpha$ - und IKK- $\beta$ -Antikörpern .....	24
3.1.1 Western Blot-Analyse .....	24
3.1.2 Immunpräzipitation .....	27
3.2 Effekt verschiedener Stimuli auf das NF- $\kappa$ B-System .....	27
3.2.1 Inkubation mit LPS .....	28
3.2.2 Aktivierung des IKK-Komplexes .....	29

3.2.3	Proteolyse von I $\kappa$ B .....	31
3.3	IKK- $\beta/\gamma$ -Komplexe in monozytären Zellen .....	34
3.3.1	Identifizierung von IKK- $\beta/\gamma$ -Komplexen .....	34
3.3.2	Aktivierung von IKK- $\beta/\gamma$ -Komplexen durch LPS .....	36
3.4	Charakterisierung NIK-enthaltender Komplexe .....	36
3.4.1	Nachweis von NIK im IKK-Komplex .....	36
3.4.2	Aktivierung von NIK-enthaltenden IKK-Komplexen .....	37
3.5	Suche nach neuen Stimuli für den IKK-Komplex .....	39
3.5.1	Translokation von NF- $\kappa$ B nach Inkubation mit Hsp60 .....	39
3.5.2	Effekt von Hsp60 auf den IKK-Komplex .....	39
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>41</b>
4.1	Differentielle Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Systems nach Stimulation mit LPS, TNF und PMA .....	41
4.2	Nachweis aktivierbarer IKK-Subkomplexe .....	44
4.3	Nachweis von aktivierbaren NIK-enthaltende IKK-Komplexen .....	45
4.4	Chlamydiales Hsp60 als Beispiel für neue Stimuli des IKK-Komplexes und seine potentielle Rolle als Pathogen .....	47
4.5	Schlußbemerkung zur Bedeutung von IKK-Subkomplexen .....	49
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>51</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b>Publikationen</b> .....	<b>76</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>77</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Ac-	Acetyl-
Act1	NF-κB-Aktivator 1
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid
Ak	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
Ala	Alanin
Anti-	Antikörper gegen
ARD	ankyrin repeat domain
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
<i>C. pneumoniae</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
CD	cluster of differentiation
Cdc37	cell division control 37
CHX	Cycloheximid
Ci	Curie
CIKS	connection to IKK and SAPK/JNK
Cl	Chlorid
cpm	counts per minute
Da	Dalton
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DD	Dimerisierungsdomäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

---

ERK	extracellular signal-regulated kinase
Fc	kristallines Fragment
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
Glu	Glutaminsäure
H	Wasserstoff
h	Stunde
HLH	Helix-Loop-Helix
Hsp60, Hsp90	Hitzeschockprotein 60 bzw. 90
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
Ig	Immunglobulin
Ig $\kappa$	Immunglobulin $\kappa$ – leichte Kette
IKAP	IKK-complex-associated protein
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IKKs	IKK-Kinasen
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
IP	Immunpräzipitation
I $\kappa$ B	Inhibitor- $\kappa$ B
JNK	c-Jun N-terminale kinase
K	Kalium
k	kilo
KD	Kinasedomäne
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
LZ	Leucin-Zipper
M	molar
$\mu$	Mikro
mAk	monoklonaler Antikörper
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MEKK-1	mitogen-activated protein kinase/ERK kinase-1
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minute

---

ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
N	Stickstoff
Na	Natrium
NAK	NF- $\kappa$ B-aktivierende Kinase
NES	nuclear export sequence
NF- $\kappa$ B	Nuklearfaktor $\kappa$ B
ng	Nanogramm
NIK	NF- $\kappa$ B-induzierende Kinase
NLS	nuclear localisation site
nm	Nanometer
NRD	NF- $\kappa$ B/Rel/dorsal
O	Sauerstoff
OD	optische Dichte
oxLDL	oxidiertes Low-Density-Lipoprotein
P	Phosphor
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBST	phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween
pg	Pikogramm
PMA	Phorbolmyristataacetat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
pNA	p-Nitroanilin
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RT	Raumtemperatur
SAPK	stress-activated protein kinase
SRD	signal receiving domaine
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Ser	Serin
Sp-1	Transkriptionsfaktor Sp-1
Suppl	Supplement
TBE	Tris-Borat-EDTA

---

TF	tissue factor
TLR-2/-4	Toll-like receptor-2/-4
TN	Tris und Natriumchlorid
TNF	Tumornekrosefaktor
TNT	Tris, Natriumchlorid und Triton X-100
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Einheit
UV	ultraviolett
V	Vanadium
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
WST	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat



## 1. Einleitung

### 1.1 Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B/Rel-Familie und I $\kappa$ B-Inhibitorproteine

Transkriptionsfaktoren der Nuklearfaktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)/Rel-Familie sind zentral an der Regulation zahlreicher Gene bei entzündlichen und immunologischen Prozessen beteiligt und spielen außerdem bei Proliferation, Differenzierung und Apoptose eine wichtige Rolle (9, 10, 25, 54, 72, 154, 157). Eine Dysregulation des NF- $\kappa$ B-Systems wird sowohl bei akut als auch chronisch entzündlichen Prozessen sowie bei malignen Erkrankungen diskutiert (11, 13, 15, 24, 55, 89, 120, 140, 154, 157).

#### NF- $\kappa$ B/Rel-Proteine

Der regulatorische NF- $\kappa$ B-Komplex besteht aus zwei Untereinheiten, die miteinander Homo- oder Heterodimere bilden. Der bisher am häufigsten identifizierte NF- $\kappa$ B-Komplex setzt sich aus den Untereinheiten p50 und p65 (RelA) zusammen. Diese können teilweise durch c-Rel, p52 oder RelB sowie die Vorläuferproteine p105 (p50) und p100 (p52) ersetzt sein (9, 10, 12, 57, 97, 135). Allen NF- $\kappa$ B/Rel-Proteinen gemeinsam ist eine sogenannte Rel-Homologie-Domäne (RHD, 300 Aminosäuren), deren Bestandteile für die Dimerisierung (Dimerisierungsdomäne, DD), DNA-Bindung (Helix-Loop-Helix (HLH)-Motiv) und nukleäre Translokation („nuclear localization sequence“, NLS) verantwortlich sind (97, 119, 135). Zur Komplexformation mit den inhibitorischen I $\kappa$ B-Proteinen tragen die NLS sowie zusätzlich eine C-terminal zur NLS gelegene Region der RHD bei (119). Darüber hinaus verfügen Untereinheiten wie z.B. p65 über einen N-terminalen Anteil in ihrer RHD, die sogenannte NF- $\kappa$ B/Rel/dorsal (NRD)-Domäne, die ebenfalls für die Interaktion mit den I $\kappa$ B-Proteinen verantwortlich ist (10, 119).

## I $\kappa$ B-Proteine

Im Zytosol unstimulierter Zellen wird der dimere NF- $\kappa$ B-Komplex durch Bindung an verschiedene I $\kappa$ B-Inhibitorproteine, z.B. I $\kappa$ B- $\alpha$ , - $\beta$  oder - $\epsilon$ , neutralisiert (9, 142, 143, 148). Daneben können die NF- $\kappa$ B-Vorstufenproteine p105 (I $\kappa$ B- $\gamma$ ) und p100 (I $\kappa$ B- $\delta$ ) ebenfalls inhibitorische Funktionen übernehmen (10, 97, 135). Allen Inhibitoren gemeinsam ist ein Abschnitt mit mehreren Ankyrin-Motiven (ARD, „ankyrin repeat domain“), der entscheidend für die Bindung des NF- $\kappa$ B-Dimers und die damit verbundene Maskierung der NLS ist (12, 97, 119). Die Vorläuferproteine p105 und p100 verfügen sowohl über die für NF- $\kappa$ B-Proteine typische RHD als auch eine C-terminale ARD; dies spiegelt die beiden Funktionen dieser Proteine wider.

## **1.2 Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Systems**

Mehr als 150 verschiedene Stimuli und Bedingungen führen zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B (9, 12, 112). Hierzu zählen proinflammatorische Zytokine (einschließlich Tumornekrosefaktor, TNF; Interleukin-1, IL-1), Bakterien und bakterielle Produkte, Viren und virale Produkte sowie Wachstumsfaktoren. Desweiteren führen verschiedene Formen von Streß zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung, so z.B. physikalische (ultraviolette Strahlen), oxidative (oxidiertes Low Density-Lipoprotein, oxLDL) oder umweltbedingte (Schwermetalle, Zigarettenrauch) Stressfaktoren (10, 12, 23, 57, 112, 135, 159). Etablierte Aktivatoren des NF- $\kappa$ B-Systems für experimentelle Ansätze sind unter anderem das Endotoxin Gram-negativer Bakterien (Lipopolysaccharid, LPS), Tumornekrosefaktor (TNF) und Phorbolster (PMA).

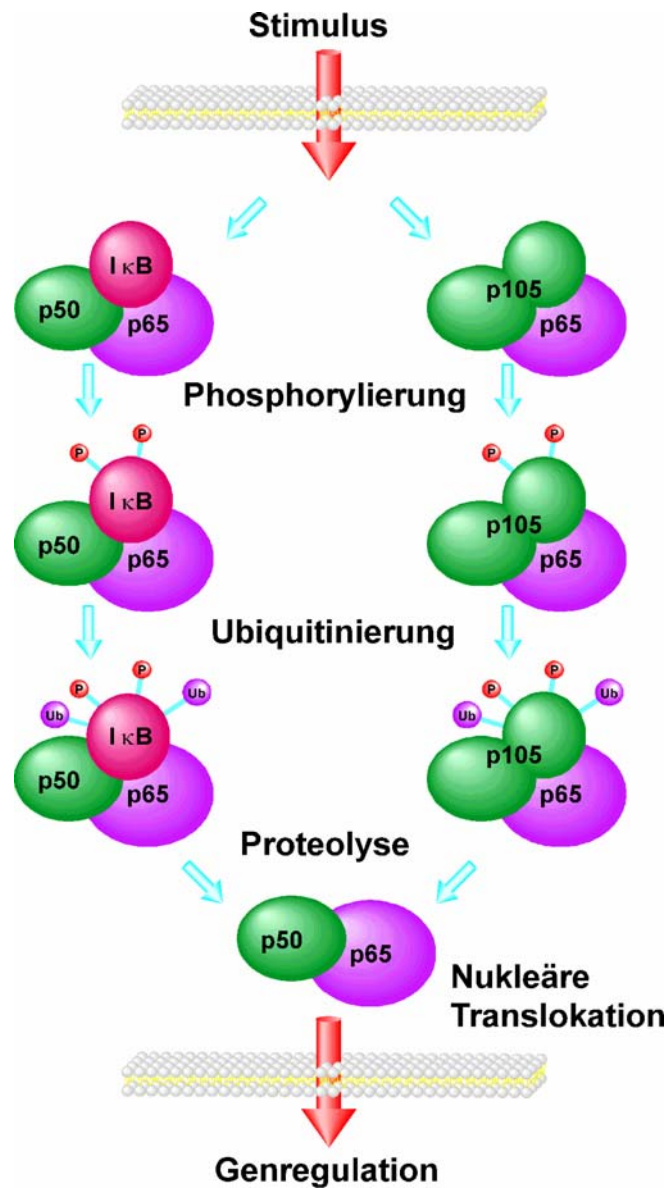
Eine Stimulation der Zelle induziert zunächst die Phosphorylierung der inhibitorischen I $\kappa$ B-Proteine (einschließlich p105 und p100) durch den IKK (I $\kappa$ B-Kinase)-Komplex an spezifischen Serinresten sowie die anschließende Ubiquitinmarkierung an spezifischen Lysinresten (Abb. 1) (71, 142, vgl. auch 1.3). Der IKK-Komplex phosphoryliert die I $\kappa$ B-Proteine an zwei spezifischen N-terminalen Serinresten, die Bestandteil der sogenannten „signal receiving domain“ (SRD) sind: bei I $\kappa$ B- $\alpha$  handelt es sich um die Stellen Ser-32/Ser-36, bei I $\kappa$ B- $\beta$  um Ser-19/Ser-23 und bei I $\kappa$ B- $\epsilon$  um Ser-18/Ser-22 (44, 148). Nun werden zwei spezifische Lysinreste ubiquitiniert, beispielsweise Lys-21/Lys-22 von I $\kappa$ B- $\alpha$  (34, 44, 131).

Es folgen die Proteasom-vermittelte Proteolyse der Inhibitorproteine und die Translokation des nun freigewordenen und damit aktivierten NF- $\kappa$ B-Dimers in den Zellkern, wo dieser Faktor an regulatorische  $\kappa$ B-Promoter- und Enhancer-Elemente bindet und in Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren die spezifische Expression zahlreicher Gene steuert (9, 10, 12, 71, 97).

Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B induziert die Expression von mehr als 150 Genen, die z.B. für Zytokine (TNF, IL-1, IL-6, IL-8), Chemokine (z.B. „monocyte chemotactic protein-1“, MCP-1), Zelladhäsionsmoleküle („intercellular adhesion molecule-1“, ICAM-1; „vascular cell adhesion molecule-1“, VCAM-1), Wachstumsfaktoren sowie für Proteine mit anti-apoptotischer Wirkung codieren (z.B. „cellular inhibitors of apoptosis“, cIAP-Proteine) (10, 12, 57, 72, 112). Darüber hinaus induziert NF- $\kappa$ B die Produktion von Proteinen, die ihrerseits NF- $\kappa$ B aktivieren, so z.B. TNF oder IL-1 (112). Das Inhibitorprotein I $\kappa$ B- $\alpha$  unterliegt ebenfalls der transkriptionellen Kontrolle durch NF- $\kappa$ B und erlaubt dadurch eine strenge Autoregulation des Systems.

### **1.3 Regulation von NF- $\kappa$ B durch den IKK-Komplex**

Für die Serin-Phosphorylierung der I $\kappa$ B-Proteine, den initialen Schritt der NF- $\kappa$ B-Aktivierung, werden die Kinasen IKK- $\alpha$  (85 kDa) und IKK- $\beta$  (87 kDa) verantwortlich gemacht, die vermutlich in hetero- oder homodimerischer Form als Bestandteil hochmolekularer Komplexe (ca. 300-900 kDa) im Zytosol auftreten (9, 66, 70, 130). Diese werden derzeit kollektiv als I $\kappa$ B-Kinase-(IKK-)Komplex bezeichnet, wobei der „klassische“ Komplex aus IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  sowie dem Adapterprotein IKK- $\gamma$  (50 und 52 kDa) besteht. Die beiden kinaseaktiven Moleküle IKK- $\alpha$  und IKK- $\beta$  weisen sehr ähnliche Primärstrukturen auf und verfügen über eine N-terminale Kinasedomäne (KD) sowie ein C-terminales HLH-Motiv, das die Aktivität der KD moduliert und für die Interaktion mit dem Adapterprotein IKK- $\gamma$  benötigt wird.



**Abbildung 1:** Aktivierungsschema von NF- $\kappa$ B. Eine Stimulierung der Zelle führt zur Phosphorylierung und Ubiquitinmarkierung von I $\kappa$ B sowie p105/100 und liefert damit das Signal für deren Proteolyse. Der aktivierte NF- $\kappa$ B-Komplex tritt in den Zellkern über, bindet an regulatorische  $\kappa$ B-Promotor- und Enhancer-Elemente verschiedener Gene und steuert dadurch deren Transkription.

Zwischen diesen beiden Regionen befindet sich eine Leucin-Zipper (LZ)- Struktur, die für die Bildung der Heterodimere aus IKK- $\alpha$  und IKK- $\beta$  erforderlich ist (45, 137, 152, 162) (Abb. 2).

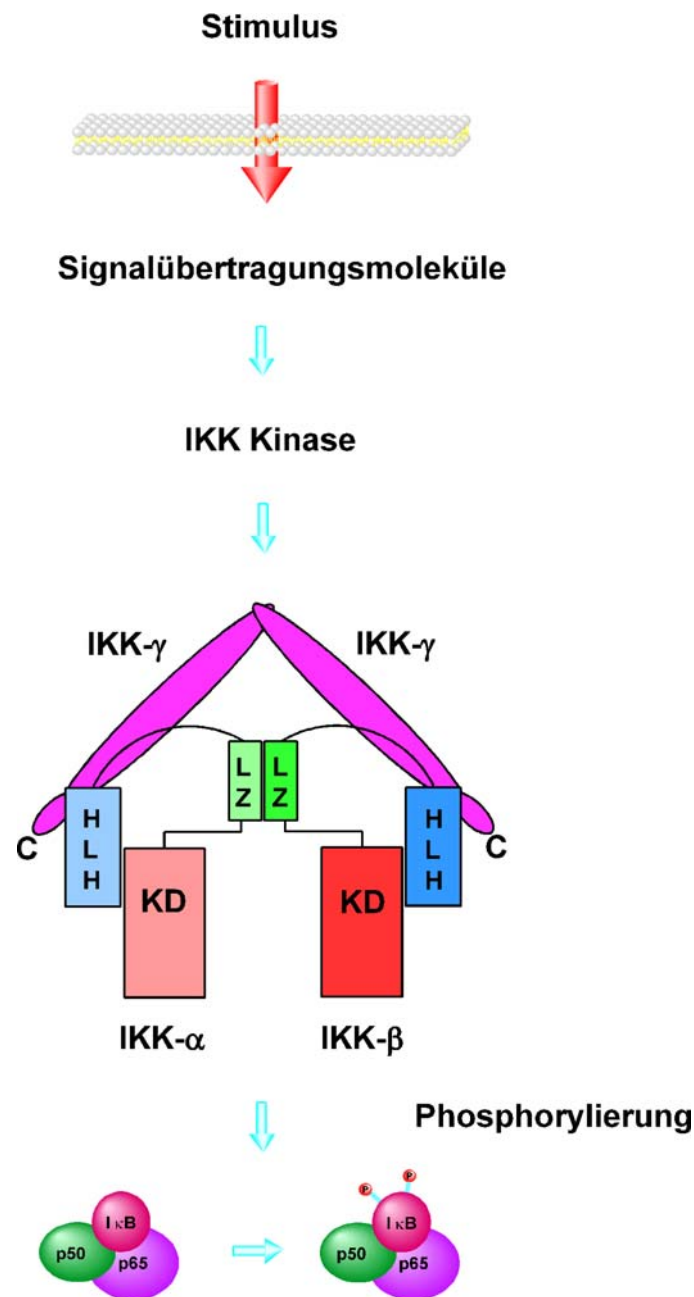
Verschiedene Studien, in denen allerdings nur ein begrenztes Repertoire proinflammatorischer Substanzen verwendet wurde, lassen eine essentielle Rolle von IKK- $\beta$  sowohl bei der Aktivierung als auch der anschließenden Inaktivierung des IKK-Komplexes vermuten (49, 71). Die Bedeutung von IKK- $\alpha$  ist bisher weniger klar definiert, eine Beteiligung an spezifischen Signalwegen z.B. bei der B-Zellreifung, verschiedenen proliferativen Prozessen oder Differenzierungsvorgängen der Haut wird angenommen (30, 65, 66, 133). Dem Adapterprotein IKK- $\gamma$  als weiterer Komponente des IKK-Komplexes werden regulatorische Funktionen zugeschrieben (53, 71, 124, 130).

Unklar ist die Ursache für das relative hohe und variable Molekulargewicht der bisher gefundenen IKK-Komplexe. Es könnte durch Polymerisierung der genannten Bestandteile, die Anwesenheit zusätzlicher Komponenten in spezifischen IKK-Subkomplexen, spezielle strukturelle Eigenschaften oder die transiente Interaktion mit weiteren Proteinen erklärt werden (66, 71, 130). So wurden eine Reihe von assoziierten Kinase/Adapterproteinen entdeckt, z.B. NIK (NF- $\kappa$ B-induzierende Kinase) (87, 152, 155), Act1 (NF- $\kappa$ B-Aktivator 1) (85) und CIKS ("connection to IKK and SAPK/JNK") (83), die als Bestandteil spezifischer IKK-Subkomplexe postuliert werden. Eine kürzlich publizierte Studie identifizierte Cdc37 („cell division control 37“) und Hsp90 (Hitzeschockprotein 90) zusätzlich zu IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  und IKK- $\gamma$  als Komponenten eines ca. 900 kDa großen Heteromers, das durch direkte Interaktion von Cdc37 mit Hsp90 und den Kinasedomänen von IKK- $\alpha$  und IKK- $\beta$  zustande kommt (33).

Unzureichend aufgeklärt sind ebenfalls die Anbindungen des IKK-Komplexes an oberhalb lokalisierte Signalwege (53, 66, 71). Ein für diese Verknüpfungen möglicherweise wichtiges Molekül ist IKK- $\gamma$ , da unterschiedliche Stimuli zumindest unter bestimmten Bedingungen verschiedene Subregionen dieses Moleküls für die Aktivierung des IKK-Komplexes benötigen (71, 96, 130). Darüber hinaus werden auch spezifische IKK-Kinasen (IKKKs) postuliert, die in der Lage sind, die I $\kappa$ B-Kinasen zu phosphorylieren und damit zu aktivieren (66). Als potentielle Kandidaten seien wiederum NIK sowie Akt (Proteinkinase B), PKC (Proteinkinase C)-Isoformen, NAK (NF- $\kappa$ B-aktivierende Kinase) und MEKK-1 ("mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1") genannt (71, 87, 110, 144). Die Identifizierung eines Phorbol-ester-induzierbaren I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes, der IKK- $\epsilon$  enthält (118), sowie Experimente mit UV-Licht (17) legen die Existenz zusätzlicher, möglicherweise gewebespezifischer I $\kappa$ B-Kinasen neben dem "klassischen" IKK-Komplex (IKK- $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ ) nahe. In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Komplexe ohne IKK- $\alpha$  oder IKK- $\beta$  vorkommen und aktivierbar sind (84, 99, 101, 141). Vorstellbar sind hierbei Homodimere aus IKK- $\alpha$  oder IKK- $\beta$ , die eventuell auch IKK- $\gamma$  enthalten, und spezifische Funktionen in der Zelle übernehmen. Die Bedeutung dieser Signalwege für die IKK-Aktivierung ist nach wie vor unklar und umstritten.

#### **1.4 Rolle von NF- $\kappa$ B bei akut und chronisch entzündlichen Prozessen**

Seit einigen Jahren wird zunehmend erkannt, dass der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B eine wichtige Rolle bei akut entzündlichen Prozessen, beispielsweise der Sepsis, spielt (9, 18, 24, 25, 37, 38, 89). Die bei dieser systemischen Immunantwort beobachteten Vorgänge lassen sich durch Gram-positive oder Gram-negative Mikroorganismen sowie Pilze auslösen (47, 116). In Studien mit Sepsis-Patienten konnte eine erhöhte NF- $\kappa$ B-Aktivität in mononukleären Zellen des peripheren Blutes gezeigt und in Zusammenhang mit der Mortalität dieser Patienten gebracht werden (20, 117, 151). Eine entscheidende Rolle bei Gram-negativen Infektionen spielt das Glykolipid LPS, das sich in der äußeren Membran von Bakterien wie *Escherichia coli* (*E. coli*) findet (47, 116). Eine starke Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Systems durch LPS konnte gezeigt werden (103, 135). LPS bindet im Plasma an das sogenannte LPS-bindende Protein (LBP) und wird zum CD14 Rezeptor der Zellmembran transportiert.



**Abbildung 2:** Die zentrale Rolle des IKK-Komplexes im NF- $\kappa$ B-Signalweg. Der Komplex besteht aus den Untereinheiten IKK- $\alpha$  und IKK- $\beta$ , die über eine Helix-Loop-Helix (HLH)-Domäne, eine Leucin-Zipper (LZ)-Struktur sowie eine Kinasedomäne (KD) verfügen und für die Phosphorylierung der I $\kappa$ B-Proteine verantwortlich sind. Eine weitere Komponente des Komplexes ist das Adapterprotein IKK- $\gamma$ , welches die beiden kinaseaktiven Moleküle IKK- $\alpha$  und IKK- $\beta$  über seine C-terminale Region bindet. Nach Stimulation kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung dieses Komplexes durch IKK-Kinasen, die ihrerseits durch oberhalb liegende Signalübertragungsmoleküle aktiviert werden.

Dort tritt es in Interaktion mit TLR4 („toll-like receptor 4“) (19, 58, 132, 145, 153). Dies führt zur Aktivierung des NF-κB-Systems und induziert die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF oder IL-1 sowie prokoagulatorischer Proteine (TF) (58, 139, 145). Diese Zytokine werden als die zentralen Vermittler bei der Entzündungsreaktion beschrieben, und hohe Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine lassen sich im frühen Stadium der Sepsis, während des sogenannten Hyperinflammationssyndroms, nachweisen (6, 50, 129).

In der Folge kann die Aktivierung verschiedener Immunreaktionen zum septischen Schock führen, der eine klinisch wichtige Komplikation sowie eine häufige Todesursache auf Intensivstationen darstellt. Der septische Schock ist durch Fieber, Verbrauchskoagulopathie, Kachexie oder Multiorganversagen gekennzeichnet (116). Zur Zeit versteht man nur teilweise über welche spezifischen Signalwege die Stimulation mit LPS bzw. TNF zur Translokation von NF-κB führt.

Auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen ist das NF-κB-System entscheidend beteiligt: So konnte aktiviertes NF-κB *in vivo* in arteriosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden, und zwar in Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und T-Lymphozyten (22, 24, 25, 37). Seit einigen Jahren ist die Infektion mit dem intrazellulären Bakterium *C. pneumoniae* in der Diskussion als möglicher Risikofaktor einer Arteriosklerose (4, 16, 28, 67, 79, 93, 109, 126, 134, 146). *C. pneumoniae* aktiviert NF-κB *in vitro* (7, 41, 46, 52, 82, 102). Der zugrundeliegende Pathomechanismus ist dabei noch weitgehend unklar. Als möglicherweise für die Aktivierung verantwortlich gelten hierbei chlamydiales LPS und das Hitzeschockprotein Hsp60 (26, 69, 78, 80).



## 1.5 Fragestellung

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Regulation des NF- $\kappa$ B-Systems auf der Ebene des IKK-Komplexes in monozytären Zellen besser zu verstehen.

- Zuerst war es nötig, innerhalb des umfangreichen Angebots an Antikörpern gegen IKK- $\alpha$  und IKK- $\beta$  diejenigen zu identifizieren, die für Western Blot-Analyse bzw. Immunpräzipitation eingesetzt werden können.
- Als nächstes sollte die Aktivierung des IKK-Komplexes durch die Stimuli LPS, TNF und PMA in monozytären Zellen dargestellt werden.
- Es stellte sich die Frage, ob sich auch Unterschiede im Proteolysemuster der Inhibitorproteine I $\kappa$ B- $\alpha$  und I $\kappa$ B- $\epsilon$  nach Inkubation mit LPS, TNF und PMA zeigen lassen.
- In weiteren Versuchen war von Interesse, ob neben dem „klassischen“ IKK-Komplex bestehend aus IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  und IKK- $\gamma$  auch anders zusammengesetzte Subkomplexe existieren und ob diese Subkomplexe aktivierbar sind.
- Hierauf sollte untersucht werden, ob NIK-enthaltende Komplexe in monozytären Zellen existieren und stimulierbar sind.
- Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde getestet, ob unterschiedliche Moleküle das NF- $\kappa$ B-System stimulieren können, unter anderem auch chlamydiales Hitzeschockprotein Hsp60. Dabei war von Interesse, ob Hsp60 das NF- $\kappa$ B-System aktiviert und ob ein Effekt auf den IKK-Komplex darstellbar ist

Ein besseres Verständnis der Funktion des IKK-Komplexes bei entzündlichen Erkrankungen bietet Ansatzpunkte für therapeutische und diagnostische Strategien.

## 2. Material und Methodik

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper

In der vorliegenden Studie wurden Antikörper (Ak) gegen folgende Antigene verwendet:

IKK- $\alpha$	monoklonaler Maus-Ak (mAk), Subtyp IgG1 (Alexis Biochemicals, Grünberg) mAk, Subtyp IgG2b (BD Biosciences, Heidelberg) polyklonaler Ak (pAk), erzeugt im Kaninchen, gegen die Aminosäuren 475-745 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) mAk, Subtyp IgG2b (Santa Cruz Biotechnology) mAk, Subtyp IgG1 (Biomol, Hamburg)
IKK- $\beta$	mAk, Subtyp IgG1 (BioCarta Europe, Hamburg) mAk, Subtyp IgG1 (Biosource, Ratingen) mAk, Subtyp IgG1, gegen die Aminosäuren 629-735 (BD Biosciences) pAk, erzeugt im Kaninchen, gegen die Aminosäuren 662-680 (QED Bioscience, San Diego, USA) mAk, Subtyp IgG1 (Biomol) mAk, Subtyp IgG1 (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden/Ts.)
IKK- $\gamma$	pAk, erzeugt im Kaninchen (Santa Cruz Biotechnology)
I $\kappa$ B- $\alpha$	pAk, erzeugt im Kaninchen, gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
I $\kappa$ B- $\varepsilon$	pAk, erzeugt im Kaninchen (Santa Cruz Biotechnology)
Sekundäre Ak	Peroxidase-konjugierter, polyklonaler Ziege-Ak gegen Kaninchen-IgG oder Peroxidase-konjugierter, monoklonaler Ziege-Ak gegen Maus-IgG (Dianova, Hamburg)

### 2.1.2 Reagenzien

Tumornekrosefaktor (TNF) sowie Lipopolysaccharid (LPS, *E. coli* 0111:B4) wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen, Protein A-Agarose von Roche Diagnostics (Mannheim) und Protein G-Agarose von Devitron (Castrop-Rauxel). Aufgereinigtes Hsp60 von *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) wurde von Frau Dr. Clarissa da Costa (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Miethke, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München) zur Verfügung gestellt. Alle weiteren eingesetzten Reagenzien stammten von den Firmen E. Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma und entsprachen der "Qualität zur Synthese".

## 2.2 Methodik

### 2.2.1 Zellkultur

Für die Experimente wurden monozytäre THP-1-Zellen (DSMZ, Braunschweig) verwendet, die in RPMI 1640 (Glutamax-1, very low endotoxin, Seromed, Berlin) in der Anwesenheit von 7,5% fötalem Kälberserum (FKS, Myoclone super plus, low endotoxine, Bio Whittaker, Walkersville, USA), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Life Technologies, Eggenstein) bis zu einer Dichte von  $5 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  kultiviert wurden. Der Endotoxingehalt des Mediums und aller Bestandteile lag unter 10 pg/ml. Für die jeweiligen Experimente wurden die Zellen in einer Dichte von  $3 \times 10^6$  Zellen pro 3 ml in 6-Well-Kulturplatten (Nunc, Eggenstein) ausgesät.

### 2.2.2 Endotoxin-Test

Alle eingesetzten Medien und Reagenzien wurden vor Beginn der Experimente auf ihren Gehalt an Endotoxinen überprüft. Mit dem quantitativen, chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat Assay (Bio Whittaker, Verviers, Belgien) wurde die Endotoxin-abhängige

Spaltung des Substrats Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA bei 405 nm bestimmt. Es fanden ausschließlich Substanzen Verwendung, deren Endotoxin-Konzentration weniger als 10 pg/ml betrug.

### 2.2.3 Zytotoxizitätstest (WST-Test)

Die Viabilität der Zellen wurde im kolorimetrischen WST-1-Test (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) überprüft. Nach Präinkubation von  $1,5 \times 10^5$  (THP-1) bzw.  $6 \times 10^6$  (primäre Monozyten) Zellen pro 150  $\mu$ l Medium in Mikrotiterplatten (Nunc) mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Substanzen wurde das Tetrazolium-Salz 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat (WST-1) zugegeben. Die Spaltung von WST-1 zu Formazan durch Dehydrogenasen intakter Zellen wurde bei 405 nm photometrisch gemessen. Über die erhaltene optische Dichte (OD) ließ sich die Stoffwechselaktivität der Zellen quantitativ ermitteln. Es wurden 6-fach-Bestimmungen durchgeführt. Darüber hinaus wurde routinemäßig die Morphologie der Zellen beurteilt und das Verhältnis lebender zu toter Zellen mittels Trypanblau-Färbung bestimmt.

### 2.2.4 Isolierung zytosolischer und nukleärer Extrakte

Die zellulären Extrakte wurden nach einem in der Literatur beschriebenen und leicht modifizierten Verfahren isoliert (92, 111). Dazu wurden THP-1-Zellen ( $3 \times 10^6$ ) bzw. primäre humane Monozyten ( $1 - 5 \times 10^7$ ) abzentrifugiert (200 x g, 7 min, 4°C) und einmal in PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden nach erneuter Zentrifugation (2.000 x g, 2 min, 4°C) in Puffer A (0,1% Nonidet P-40; 10 mM Hepes, pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM Dithiothreitol (DTT); 300 mM Saccharose; je 0,75  $\mu$ g/ml Pepstatin, Antipain, Chymostatin, Aprotinin und Leupeptin sowie 0,5 mM PMSF) resuspendiert und 5 min inkubiert, um die äußere Zellmembran aufzubrechen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15.800 x g, 30 sec, RT) wurde der Überstand mit der zytosolischen Fraktion von den noch intakten Zellkernen abgenommen und bei -80°C gelagert. Um eine Kontamination der nukleären Extrakte durch zytosolische Proteine zu vermeiden, wurden die Kerne einmal in Puffer A gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit der oben

erhaltenen zytosolischen Fraktion vereint und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Pellets wurden daraufhin in Puffer B (20 mM Hepes, pH 7,9; 100 mM KCl; 100 mM NaCl; 20% Glycerin, 0,5 mM DTT; Proteaseinhibitoren wie in Puffer A) aufgenommen und die Kernmembranen mit Hilfe eines Ultraschalldesintegrators zerstört. Durch Zentrifugation (15.800 x g, 30 sec, RT) ließen sich die Membranfragmente abtrennen. Die nukleären Proteine wurden ebenfalls bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die Proteinkonzentrationen der zytosolischen und nukleären Extrakte wurden mit Hilfe des Bradford-Assays (Biorad, München) bestimmt (Biorad MM). Als Meßgröße diente hierbei die Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blau G 250 von 465 nm zu 595 nm durch Proteinbindung.

### 2.2.5 Gelretardierungsassay

Nukleäre Extrakte wurden mittels Gelretardierungsassay auf die Anwesenheit DNA-bindender Transkriptionsfaktoren untersucht. Hierfür kamen doppelsträngige Oligonukleotide mit Erkennungssequenzen für die jeweiligen Transkriptionsfaktoren zum Einsatz. Als NF- $\kappa$ B-Konsensussequenz diente ein Oligonukleotid mit dem prototypischen I $\kappa$ B-Motiv (5'-CAGAGGGGACTTTCCGAGA-3'). Dieses wurde in Anwesenheit der erforderlichen Nukleotide durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (Roche Diagnostics) mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (> 3000 Ci/mmol) (Perkin Elmer Life Sciences, Zaventem, Belgien) markiert. Als Kontrolle für Qualität und gleichmäßige Proteinladung wurde parallel ein Oligonukleotid mit der Erkennungssequenz für den konstitutiv aktivierten Transkriptionsfaktor Sp-1 (5'-ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3', Promega) verwendet, das mittels T4-Polynukleotidkinase (Promega) mit [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (>5000Ci/mmol) (Perkin Elmer Life Sciences) markiert wurde. Nicht gebundene Nukleotide konnten mittels Sephadex G50- (Klenow-markierte Oligonukleotide) bzw. G25- Säulen (Nukleotide markiert mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase) (Roche Diagnostics) abgetrennt werden. Gleiche Proteinmengen nukleärer Extrakte (2 - 4  $\mu\text{g}$ ) wurden in dem entsprechenden Bindepuffer (NF- $\kappa$ B- und Sp-1-Oligonukleotid: 20 mM Hepes, pH 7.9; 50 mM KCl; 1 mg/ml BSA; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,1% Nonidet P-40; 5% Glycerin; 50 ng Poly[d(I-C)]/ $\mu\text{l}$  von Roche Diagnostics bzw. IL-8-Oligonukleotide: 12 mM Hepes pH 7,9; 4 mM Tris pH 7,9; 60 mM KCl; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ;

0,6 mM EDTA; 5mM DTT; 12% Glycerin; 50 ng Poly[d(I-C)]/µl) aufgenommen und 30 min mit dem jeweiligen radioaktiv markierten Oligonukleotid (10 ng,  $10^5$  cpm) inkubiert (138). Nach Zugabe des Ladepuffers (0,25 x TBE-Puffer [10 x TBE: 890 mM Tris; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA pH 8,0]; 40% Glycerin; 0,2% Bromphenolblau) erfolgte anschließend die Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese in einem 4 bzw. 6% Polyacrylamidgel in 0,25 x TBE-Puffer. Als positive Kontrollen dienten routinemäßig Extrakte LPS-stimulierter THP-1-Zellen. Zudem wurden die Extrakte im Überschuß mit unmarkiertem Oligonukleotid als spezifischem Kompetitor inkubiert und aufgetrennt. Die quantitative Auswertung der getrockneten Gele erfolgte mittels Autoradiographie (Perkin Elmer Life Sciences) und Densitometrie.

### 2.2.6 Western Blot-Analyse

Zytosolische Extrakte wurden mittels Western Blot-Analyse untersucht. Nach Zugabe von SDS-Probenpuffer (20,8 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1,27% SDS; 4% Glycerin; 1,25% Mercaptoethanol; 330 µM EDTA; 0,2% Bromphenolblau) wurden 5 - 10 µg der jeweiligen Proteinextrakte 5 min bei 95°C denaturiert. Die anschließende Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 12% Polyacrylamid-Fertiggel (Novex™ Pre-Cast Gel, Invitrogen, Groningen, Niederlande). Zur Feststellung der Proteingrößen wurden gleichzeitig vorgefärbte Molekulargewichtsstandards (Rainbow, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg; Low Range, Biorad) aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Gele in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 0,2 M Glycin) 15 min äquilibriert und die Proteine im Wet Blot-Verfahren auf eine ebenfalls äquilibrierte Nitrocellulosemembran (PALL Gelman Sciences, Dreieich) transferiert. Die gewaschenen Membranen wurden mit Ponceau S (Sigma) gefärbt, um eine gleichmäßige Übertragung der Proteine aus den Gelen zu dokumentieren. Die Färbelösungen wurden nach 10 min abgespült und die Membranen durch einstündige Inkubation mit 5% Magermilchpulver in PBST (PBS + 0,05% Tween 20) abgesättigt, um unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden. Die Membranen wurden anschließend mit den entsprechenden primären Antikörpern (siehe 2.1.1 Antikörper; Verdünnung je nach Antikörper: 1:200 bis 1:2.000, jeweils in PBST + 1% Milchpulver) für 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C behandelt. Nach Waschen mit PBST + 1% Milchpulver (3 x 10 min) erfolgte die Inkubation (1 h, RT) mit dem entsprechenden sekundären, Peroxidase-konjugierten

Antikörper (siehe 4.1.1 Antikörper; Verdünnungen in PBST + 1% Milchpulver wie folgt: Anti-Kaninchen 1:20.000; Anti-Maus: 1:7.500). Im Anschluß an weitere Waschschritte mit PBST (1 x 15 min, 4 x 5 min) wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe auf den Membranen mit Hilfe des ECL-Verfahrens auf Röntgenfilmen (beides von Perkin Elmer Life Sciences) sichtbar gemacht und zum Teil mittels Densitometrie ausgewertet bzw. direkt gescannt.

### 2.2.7 Immunpräzipitation und Assoziationsassay

Zytosolische und nukleäre Extrakte wurden einer Immunpräzipitation (IP) in TN-Puffer (200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5% BSA; 1 mM DTT; 0,5  $\mu$ M 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid (AEBSF) sowie jeweils 0,75  $\mu$ g/ml Leupeptin, Antipain, Aprotinin, Pepstatin A und Chymostatin) unterzogen. Die Fällung (2 h, 4°C oder über Nacht bei 4°C) erfolgte mit 1  $\mu$ g (2  $\mu$ g) des jeweiligen Antikörpers und 35  $\mu$ l (70  $\mu$ l) 6% Protein A- bzw. Protein G-Agarose. Protein A und Protein G sind kovalent an die Agarose gebunden und besitzen eine hohe Affinität zu den Fc-Fragmenten von Immunglobulinen. Mit Ausnahme von Maus-Antikörpern des Subtyps IgG1, für die Protein G-gekoppelte Agarose zum Einsatz kam, wurde Protein A-Agarose verwendet. Nach fünfmaligem Waschen mit TN-Puffer (ohne Zusatz von BSA) und Zugabe von SDS-Probenpuffer (+ 10% Glycerin) wurden die Proteine im Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe 2.2.6 Western Blot), und bestehende Assoziationen in Form von Antigen-Antikörper-Komplexen mittels Western Blot-Analyse detektiert. Für Versuche, in denen die Frage nach hydrophoben Wechselwirkungen beantwortet werden sollte, wurde der Puffer gegebenenfalls mit 1% Triton X-100 versetzt (TNT-Puffer).

### 2.2.8 Kinaseassay

Zytosolische Extrakte wurden einer IP in TNT-Puffer (TN-Puffer + 1% Triton X-100) unterzogen. Die Präzipitation (2 h, 4°C) erfolgte mit 1  $\mu$ g eines Anti-Kinase-Antikörpers (siehe 2.1.1 Antikörper) und 35  $\mu$ l 6% Protein A- bzw. Protein G-Agarose. Nach dreimaligem Waschen mit TNT-Puffer (ohne Zusatz von BSA) und drei weiteren Waschschritten mit Kinasepuffer (20 mM Hepes, pH 8,0; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 100  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 20 mM  $\beta$ -Glycerophosphat; 50 mM NaCl; 2 mM DTT; 0,5  $\mu$ M AEBSF; und jeweils 0,75  $\mu$ g/ml Leupeptin, Antipain, Aprotinin, Pepstatin A und Chymostatin) wurden die Kinaseaktivität der

präzipitierten Proteine im Kinaseassay untersucht. Die Kinasereaktion (30 min, 37°C) wurde in Anwesenheit von [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (5  $\mu$ Ci) (Perkin Elmer Life Sciences) und 500 ng GST-I $\kappa$ B- $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology) als Substrat durchgeführt und die Proteine anschließend im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und zur Bestimmung der Kinaseaktivität mittels Autoradiographie ausgewertet.

### **2.2.9 Immundepletion**

Zur Depletion von IKK- $\alpha$  aus zytosolischen Extrakten wurden diese je zweimal bei 4°C mit 20  $\mu$ g Anti-IKK- $\alpha$ , die an 500  $\mu$ l 6% Protein A-Agarose gekoppelt waren, präzipitiert: Nach der ersten Präzipitation, die über Nacht erfolgte, wurden die Ansätze zentrifugiert, und die Überstände in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Diese enthielten wiederum 20  $\mu$ g an 500  $\mu$ l 6% Protein A-Agarose gekoppeltes Anti-IKK- $\alpha$ . Nach erneuter Präzipitation für 2 h und anschließender Zentrifugation wurde der von IKK- $\alpha$ -Komplexen "gereinigte" Überstand in einem Kinaseassay (vgl. 2.2.8) weiter analysiert.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Testung von IKK- $\alpha$ - und IKK- $\beta$ -Antikörpern

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zunächst innerhalb einer Reihe von kommerziell erhältlichen Antikörpern, die spezifisch für IKK- $\alpha$  bzw. IKK- $\beta$  sind, diejenigen bestimmt werden, die sich am besten für die Western Blot-Analyse bzw. die Technik der Immunpräzipitation eignen (vgl. 2.1 und 2.2).

##### 3.1.1 Western Blot-Analyse

Zytosolische Extrakte unbehandelter THP-1-Zellen wurden auf Polyacrylamidgele aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulosemembranen überführt. Die Membranen wurden jeweils mit einem von sechs verschiedenen IKK- $\beta$ -Antikörpern bzw. einem von fünf IKK- $\alpha$ -Antikörpern in den von den Herstellern empfohlenen Konzentrationen 1 h lang inkubiert und mit entsprechenden, Meerrettich-Peroxidase-markierten, sekundären Antikörpern behandelt (Anti-Maus bzw. Anti-Kaninchen) (Tab. 1).

Als am besten zur Detektion von IKK- $\alpha$  einsetzbar erwies sich ein Antikörper der Firma Santa Cruz (M-280) (Tab. 2). Zum Nachweis von IKK- $\beta$  eignet sich vor allem der polyklonale Antikörper von QED. Zudem sind jeweils Alternativen aufgeführt. Einige Antikörper erschienen ungeeignet für die Western Blot-Analyse, da nach Behandlung mit ihnen entweder kein, oder erst nach maximaler Belichtungszeit ein sehr schwaches Signal nachweisbar war.

**Tabelle 1:** Testung von Antikörpern (Ak) für die Western Blot-Analyse (WB) und die Immunpräzipitation (IP) (Legende siehe S.26)

Verwendeter Antikörper	WB	IP
<b>IMGENEX IKK-<math>\beta</math></b> , mAk IgG1, cat# IMG-159, Lot# 22099-02	+	-
<b>BIOSOURCE IKK-<math>\beta</math></b> , mAk IgG1, part: AHO 0362, Lot: 13548-01S	-	-
<b>TRANSDUCTION LABORATORIES IKK-<math>\beta</math></b> , mAk IgG1, cat# I 87320/ Lot1	+	+
<b>QED IKK-<math>\beta</math></b> , pAk (Kaninchen), cat# 2121, Lot# 9902	++	++
<b>UPSTATE IKK-<math>\beta</math></b> , mAk IgG1, cat# 05-535, Lot# 22733	-	-
<b>ONCOGENE IKK-<math>\beta</math> (Ab-1)</b> , mAk IgG1, cat# OP134, Lot# D13483-2	-	+
<b>ALEXIS IKK-<math>\alpha</math></b> , mAk IgG1, Lot L07937/a	-	-
<b>PHARMINGEN IKK-<math>\alpha</math></b> , mAk IgG2b, cat.No: 556532, Lot: M 071283	+	++
<b>SANTA CRUZ IKK-<math>\alpha</math> (M-280)</b> , pAk (Kaninchen), cat# sc-7182, Lot# F210	+	+
<b>SANTA CRUZ IKK-<math>\alpha</math> (B-8)</b> , mAk IgG2b, cat# sc-7606, Lot# G140	-	-
<b>UPSTATE IKK-<math>\alpha</math></b> , mAk IgG1, cat# 05-536, Lot# 21301	+	-

**Tabelle 1** (S. 25). Die aufgeführten Antikörper wurden für die Western Blot-Analyse (WB) und die Immunpräzipitation (IP) getestet. Es wurden zytosolische Extrakte unbehandelter THP-1-Zellen verwendet. Für die IP wurden zytosolische Extrakte mit dem jeweils zu testenden Antikörper, der zuvor an Agarose gekoppelt worden war, gefällt, und das Präzipitat elektrophoretisch aufgetrennt. Hierauf wurde analog zur Western Blot-Analyse weiterverfahren, wobei zur Detektion von IKK- $\alpha$  und IKK- $\beta$  nach IP diejenigen Antikörper verwendet wurden, die bei der Western Blot-Analyse am besten abgeschnitten hatten. Bei der Auswertung wurden jeweils die IKK- $\alpha$ - und IKK- $\beta$ -spezifischen Antikörper getrennt für WB und IP beurteilt. Dabei bedeutet:

- keine spezifische bzw. nur extrem schwache Bande detektierbar, ungeeignet
- + spezifische Bande
- ++ sehr deutliche spezifische Bande

**Tabelle 2:** Für die Western Blot-Analyse geeignete IKK- $\alpha$ - und IKK- $\beta$ -Antikörper

Zu detektierendes Antigen	1. Wahl	Alternativ
<b>IKK-<math>\alpha</math></b>	<b>SANTA CRUZ IKK-<math>\alpha</math> (M-280)</b> , pAk (Kaninchen), cat# sc-7182, Lot# F210	<b>PHARMINGEN IKK-<math>\alpha</math></b> , mAk IgG2b, cat.No: 556532, Lot: M 071283; <b>UPSTATE IKK-<math>\alpha</math></b> , mAk IgG1, cat# 05-536, Lot# 21301
<b>IKK-<math>\beta</math></b>	<b>QED IKK-<math>\beta</math></b> , pAk (Kaninchen), cat# 2121, Lot# 9902	<b>IMGENEX IKK-<math>\beta</math></b> , mAk IgG1, cat# IMG-159, Lot# 22099-02; <b>TRANSDUCTION LABORATORIES IKK-<math>\beta</math></b> , mAk IgG1, cat# I 87320/ Lot1

### 3.1.2 Immunpräzipitation

Die zytosolischen Extrakte unbehandelter THP-1-Zellen wurden mit den zu testenden Antikörpern, die an Agarose gekoppelt worden waren, inkubiert und das Präzipitat mittels der Western Blot-Analyse untersucht. Die Membranen wurden jeweils mit dem Antikörper der Wahl behandelt (Tab. 1, vgl. auch Tab. 2). Für die IP sind nach den vorliegenden Ergebnissen die Antikörper der Firmen Santa Cruz (IKK- $\alpha$ , M-280) und QED (IKK- $\beta$ ) am besten geeignet (Tab. 3). Außerdem sind die jeweils nächstbesten Alternativen angegeben.

**Tabelle 3:** Für die Immunpräzipitation geeignete IKK- $\alpha$ - und IKK- $\beta$ -Antikörper

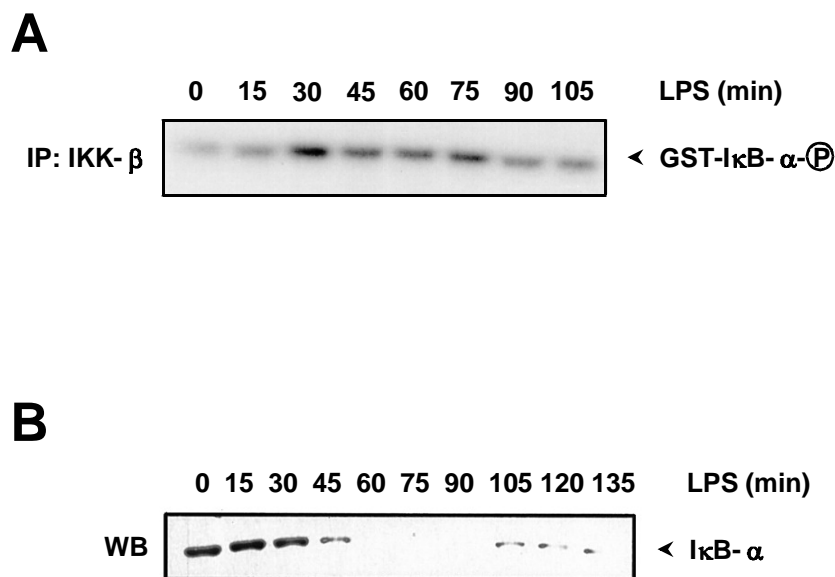
Zu präzipitierendes Antigen	1. Wahl	Alternativ
<b>IKK-<math>\alpha</math></b>	<b>SANTA CRUZ IKK-<math>\alpha</math> (M-280)</b> , pAk (Kaninchen), cat# sc-7182, Lot# F210	<b>PHARMINGEN IKK-<math>\alpha</math></b> , mAk IgG2b, cat.No: 556532, Lot: M 071283
<b>IKK-<math>\beta</math></b>	<b>QED IKK-<math>\beta</math></b> , pAk (Kaninchen), cat# 2121, Lot# 9902	<b>ONCOGENE IKK-<math>\beta</math> (Ab-1)</b> , mAk IgG1, cat# OP134, Lot# D13483-2

### 3.2 Effekt verschiedener Stimuli auf das NF- $\kappa$ B-System

In den im folgenden beschriebenen Experimenten wurde der Einfluss der Stimuli LPS, TNF und PMA auf endogene IKK-Komplexe und die Proteolyse von I $\kappa$ B-Proteinen in monozytären Zellen untersucht. Dabei kamen die oben getesteten Antikörper zum Einsatz.

### 3.2.1. Inkubation mit LPS

In initialen Experimenten wurden THP-1-Zellen mit LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert, und die Aktivität des IKK-Komplexes in den erhaltenen zytosolischen Extrakten mittels Kinaseassay untersucht. Die Stimulation mit LPS führte zu einer wesentlichen Zunahme der IKK-Aktivität mit einem ersten Gipfel bei 30 min (Abb. 3A, siehe auch Abb. 5A). Die Werte nach 45 und 60 min waren wiederum niedriger, aber gegenüber dem Ausgangswert immer noch erhöht. Interessanterweise trat nach 75 min ein zweiter Gipfel in der Aktivitätskurve auf. Danach wurde ein deutlicher Abfall der Aktivität beobachtet. Außerdem wurde in den zytosolischen Extrakten mit Hilfe der Western Blot-Analyse die Konzentration von I $\kappa$ B- $\alpha$  bestimmt (Abb. 3B). Nach LPS-Stimulation nahm der Gehalt an I $\kappa$ B- $\alpha$  innerhalb von 60 min ab. Zum Zeitpunkt 60 min war keine Bande in entsprechender Höhe mehr zu sehen. Nach 105 min war wieder ein I $\kappa$ B-Signal nachweisbar.



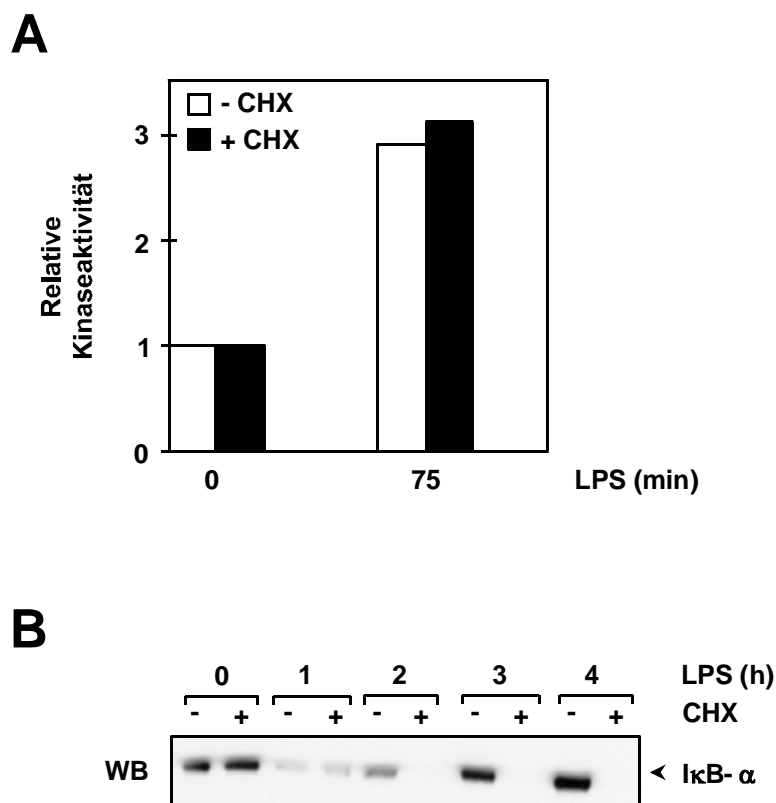
**Abbildung 3:** LPS bewirkt eine Aktivierung endogener monozytärer IKK-Komplexe und führt zur Proteolyse von I $\kappa$ B- $\alpha$ . THP-1-Zellen wurden mit LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) über die angegebenen Zeiträume behandelt. (A) Die zytosolischen Extrakte wurden in eine IP mit Antikörper gegen IKK- $\beta$  eingesetzt, und das Präzipitat mit Hilfe eines Kinaseassay analysiert. (B) In den zytosolischen Extrakte wurde mittels Western Blot-Analyse die Konzentration von I $\kappa$ B- $\alpha$  bestimmt.

Als nächstes sollte untersucht werden, inwiefern dieser IKK-Aktivitätsverlauf von einer Proteinneusynthese abhängig ist. Dazu wurden THP-1-Zellen für 1 h mit CHX (10 µg/ml) vorbehandelt und daraufhin für 75 min mit LPS stimuliert (1 µg/ml). Aus den Proben wurden zytosolische Extrakte gewonnen. In der sich nun anschließenden Immunpräzipitation wurde IKK-β gefällt; das Präzipitat wurde in einen Kinaseassay eingesetzt und die Ergebnisse densitometrisch ausgewertet. Es ließ sich keine signifikante Abnahme der IKK-Komplex-Aktivität durch die Vorbehandlung mit CHX feststellen (Abb. 4A). Dies deutet darauf hin, dass die LPS-induzierte Stimulation von IKK-Komplexen nicht auf die Neusynthese von Proteinen, die das NF-κB-System aktivieren, zurückzuführen war.

Zur Kontrolle der Effektivität von CHX wurden THP-1-Zellen sowohl mit CHX (10 µg/ml) eine Stunde lang vorbehandelt, als auch zum Teil unbehandelt belassen und dann mit LPS (1 µg/ml) stimuliert (Abb. 4B). Der IκB-α-Gehalt in den zytosolischen Extrakten wurde mit Hilfe der Western Blot-Analyse bestimmt. Demnach führte die LPS-Behandlung zum Abbau von IκB-α zum Zeitpunkt 60 min nach Stimulation. Nach zwei Stunden war das Inhibitorprotein in den CHX-freien Proben dann wieder vermehrt vorhanden. Die Vorbehandlung mit CHX dagegen verhinderte die Resynthese von IκB-α.

### 3.2.2 Aktivierung des IKK-Komplexes

Als nächstes sollte die Aktivierung des IKK-Komplexes durch die Stimuli LPS, TNF und PMA dargestellt und verglichen werden. Dazu wurden THP-1-Zellen mit LPS (1 µg/ml), TNF (2 ng/ml) oder PMA (50 ng/ml) über die jeweils in den Abbildungen genannten Zeiträume hinweg stimuliert. Zytosolische Extrakte der Proben wurden gewonnen und mittels Immunpräzipitationen mit Anti-IKK-β untersucht. Die Aktivierung der IKK-Komplexe wurde mit Hilfe von Kinaseassays bestimmt.



**Abbildung 4:** Die LPS-induzierte Aktivierung endogener IKK-Komplexe wurde durch Vorbehandlung mit Cycloheximid (CHX) nicht unterdrückt. (A) THP-1-Zellen wurden mit CHX (10  $\mu\text{g/ml}$ ) eine Stunde lang vorbehandelt (schwarze Balken) oder blieben während dieser Zeit unbehandelt (weiße Balken). Danach wurde für 75 min mit LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) stimuliert, und zytosolische Extrakte wurden gewonnen. Diese wurden mittels Kinaseassay ausgewertet, wobei die Fällung mit Anti-IKK- $\beta$  erfolgte. Das erhaltene Autoradiogramm wurde densitometrisch ausgewertet und die Aktivität zum Zeitpunkt 0 gleich 1 gesetzt. (B) Zur Kontrolle der Wirksamkeit von CHX wurden THP-1-Zellen mit CHX (10  $\mu\text{g/ml}$ ) eine Stunde lang vorbehandelt oder blieben während dieser Zeit unbehandelt und wurden danach mit LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) über die angegebenen Zeiträume hinweg inkubiert. Der Gehalt an I $\kappa$ B- $\alpha$  wurde in zytosolischen Extrakten mittels Western Blot-Analyse bestimmt.

Im Falle der Stimulation mit LPS nahm die Aktivität der gefällten Komplexe, wie bereits in Abb. 3A dargestellt, innerhalb von 30 min um mehr als 100% zu und zeigte nach 30 min ein erstes Maximum (Abb. 5A). Im weiteren Verlauf sank die Kinaseaktivität bis zum Zeitpunkt 60 min etwas ab und stieg dann wieder an bis zum zweiten Maximum bei 75 min. Im Gegensatz dazu erfolgte nach Inkubation von THP-1-Zellen mit TNF eine vergleichsweise rasche und deutliche Aktivierung von IKK-Komplexen mit einem Maximum innerhalb

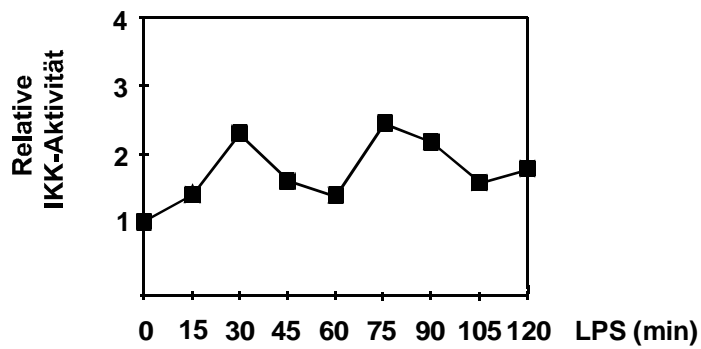
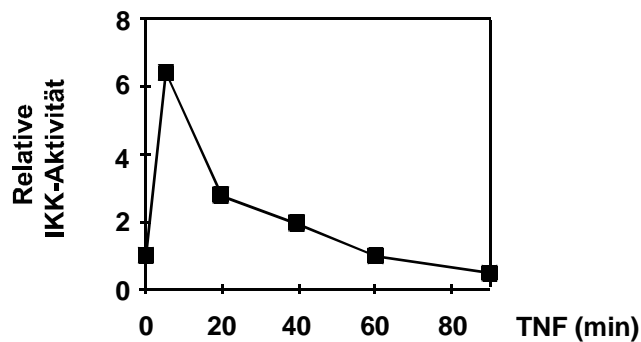
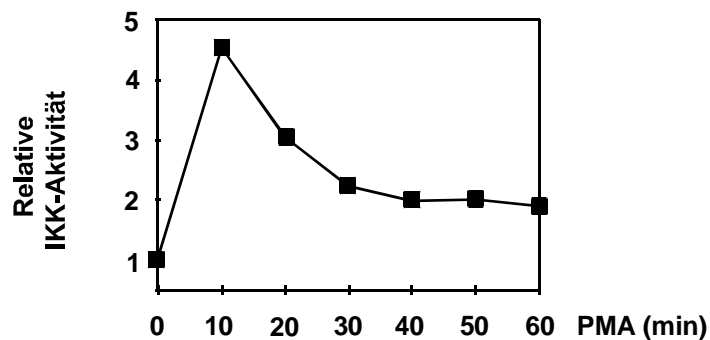
weniger Minuten (Abb. 5B). Danach sank die Aktivität ab und erreichte etwa nach 60 min wieder den Ausgangswert. Bei den PMA-stimulierten Proben zeigte sich nach 10 min eine signifikante Aktivierung des IKK-Komplexes, die nach diesem Zeitpunkt abnahm, aber länger als 60 min deutlich über dem Ausgangswert blieb. (Abb. 5C). Diese Experimente zeigen also unterschiedliche Aktivierungsprofile des IKK-Komplexes für die Stimuli LPS, TNF und PMA.

### 3.2.3 Proteolyse von I $\kappa$ B

Als nächstes sollten die Proteolysemuster der Inhibitorproteine I $\kappa$ B- $\alpha$  und I $\kappa$ B- $\epsilon$  nach Stimulation mit LPS, TNF und PMA dargestellt werden. Dazu wurden die THP-1-Zellen mit LPS (1  $\mu$ g/ml), TNF (2 ng/ml) oder PMA (50 ng/ml) über die in den Abbildungen genannten Zeiträume hinweg stimuliert. Mittels Western Blot-Analyse erfolgte eine Bestimmung des I $\kappa$ B- $\alpha$ - und I $\kappa$ B- $\epsilon$ -Gehalts in den zytosolischen Extrakten. In den LPS-Experimenten nahm das Signal von I $\kappa$ B- $\alpha$  entsprechend der ansteigenden IKK-Aktivität zwischen 15 und 60 min signifikant ab, blieb von 60 bis etwa 90 min auf niedrigem Niveau und stieg danach wieder an (Abb. 6A, vgl. Abb. 5A). Bemerkenswerterweise setzte eine deutliche Verminderung von I $\kappa$ B- $\epsilon$  erst wesentlich später ein, nämlich etwa bei 75 min, und erreichte ihr Minimum bei 90 min. Danach nahm die Konzentration von I $\kappa$ B- $\epsilon$  zu und hatte bei 120 min wieder den Ausgangswert erreicht. Es handelte sich also um eine vergleichsweise kurzzeitige Abnahme des Inhibitors I $\kappa$ B- $\epsilon$ .

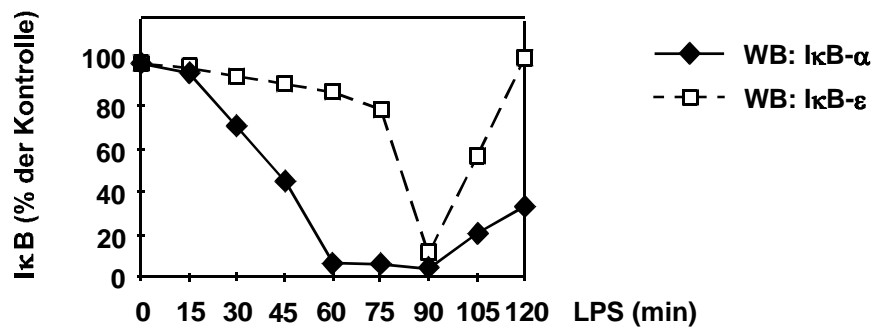
Im Gegensatz dazu hatte die Inkubation mit TNF eine rasche Proteolyse der beiden Inhibitorproteine I $\kappa$ B- $\alpha$  und I $\kappa$ B- $\epsilon$  zur Folge (Abb. 6B). I $\kappa$ B- $\alpha$  wurde dabei etwas schneller abgebaut, so dass bereits nach 5 min weniger als 10% der ursprünglichen Konzentration vorhanden waren. Bis etwa 40 min blieb die Konzentration auf niedrigem Niveau und stieg dann wieder langsam an, hatte nach 80 min den Ausgangswert aber noch nicht erreicht. Das Ergebnis entsprach dem Verlauf der IKK-Aktivierung (vgl. Abb. 5B). Der Konzentration von I $\kappa$ B- $\epsilon$  blieb nach der anfänglichen raschen Abnahme bis zum Zeitpunkt 60 min erniedrigt. Auch zwischen 60 und 90 min war nur eine langsame Zunahme des Wertes festzustellen.



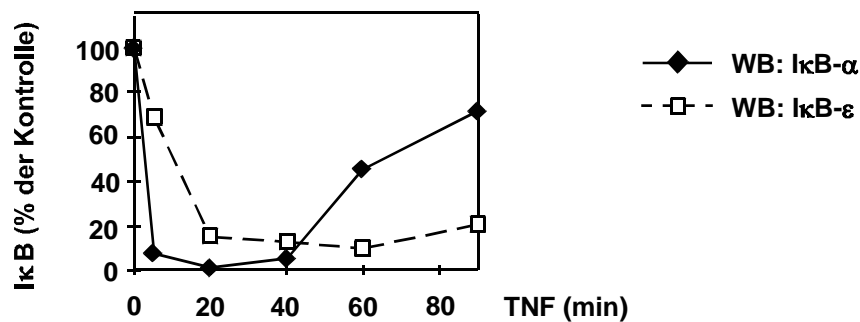
**A****B****C**

**Abbildung 5:** Aktivierung des IKK-Komplexes durch LPS (A), TNF (B) und PMA (C). THP-1-Zellen wurden über die angegebenen Zeiträume mit LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ), TNF (2  $\text{ng/ml}$ ) oder PMA (50  $\text{ng/ml}$ ) inkubiert. Die zytosolischen Extrakte wurden mit Anti-IKK- $\beta$  präzipitiert, das Präzipitat mittels Kinaseassay ausgewertet und die Aktivität zum Zeitpunkt 0 gleich 1 gesetzt. Jeweils ein repräsentativer Versuch ist dargestellt ( $n=3$ ).

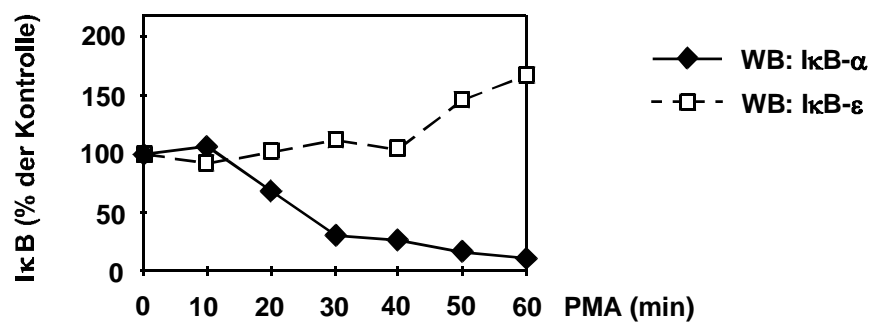
A



B



C



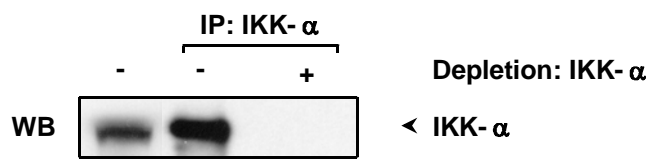
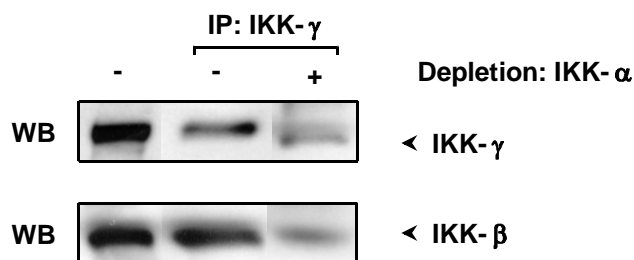
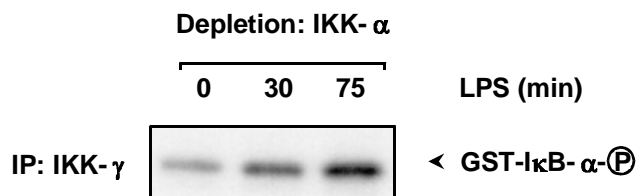
**Abbildung 6:** Proteolyse von IκB-α und IκB-ε nach Stimulation mit LPS (A), TNF (B) und PMA (C). THP-1-Zellen wurden über die angegebenen Zeiträume mit LPS (1 μg/ml), TNF (2 ng/ml) oder PMA (50 ng/ml) inkubiert. Mittels Western Blot-Analyse wurden IκB-α und IκB-ε in den zytosolischen Extrakten bestimmt. Ein repräsentativer Versuch ist jeweils dargestellt (n=3).

Bei Stimulation mit PMA begann die Konzentration von I $\kappa$ B- $\alpha$  nach etwa 10 min langsamer und in quantitativ geringerem Ausmaß als bei Stimulation mit LPS und TNF abzunehmen (Abb. 6C). Innerhalb von 60 min war kein Wiederanstieg der Konzentration von I $\kappa$ B- $\alpha$  festzustellen. Der Verlauf der Konzentrationskurve von I $\kappa$ B- $\alpha$  entsprach dem Aktivitätsverlauf des IKK-Komplexes nach Stimulation mit PMA (vgl. Abb. 5C). Bemerkenswerterweise war für I $\kappa$ B- $\varepsilon$  nach Inkubation mit PMA keine Proteolyse nachweisbar. In Übereinstimmung mit den Verläufen der IKK-Komplex-Aktivität ließ sich also ein differentielles Proteolysemuster für die Stimulation mit LPS, TNF und PMA darstellen.

### **3.3 IKK- $\beta$ / $\gamma$ -Komplexe in monozytären Zellen**

#### **3.3.1 Identifizierung von IKK- $\beta$ / $\gamma$ -Komplexen**

Als nächster Schritt sollte untersucht werden, ob endogene IKK- $\beta$ -haltige Subkomplexe ohne IKK- $\alpha$  tatsächlich in monozytären Zellen vorkommen. Dafür wurden zytosolische Extrakte monozytärer Zellen zweimal mit an Agarose gekoppeltem IKK- $\alpha$ -Antikörper inkubiert, um IKK- $\alpha$  durch Präzipitation entfernen. Zur Kontrolle dieser Immundepletion wurde im Überstand wiederum IKK- $\alpha$  gefällt. In der Western Blot-Analyse zeigte sich bei diesen Proben kein IKK- $\alpha$  mehr (Abb. 7A). In weiteren Versuchen wurde IKK- $\gamma$  in IKK- $\alpha$ -depletierten Extrakten gefällt und der Gehalt des Präzipitats an IKK- $\gamma$  und IKK- $\beta$  mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Neben den Anti-IKK- $\alpha$ - und Anti-IKK- $\gamma$ -Präzipitaten wurden zur Größenkontrolle der gefällten Proteine zytosolische Extrakte aufgetragen. Dabei war festzustellen, dass IKK- $\gamma$  in den IKK- $\alpha$ -depletierten Extrakten noch vorhanden war und in Verbindung mit IKK- $\beta$  auftrat (Abb. 6B). Hiermit konnte gezeigt werden, dass in monozytären Zellen endogene IKK- $\beta$ / $\gamma$ -Komplexe existieren, die kein IKK- $\alpha$  enthalten.

**A****B****C**

**Abbildung 7:** (A)/(B) Darstellung von endogenen IKK- $\beta/\gamma$ -Komplexen. Zytosolische Extrakte unstimulierter THP-1-Zellen wurden einer Immundepletion mit IKK- $\alpha$ -Antikörper unterzogen, und die Überstände in Immunpräzipitationen (IP) mit Anti-IKK- $\alpha$  oder Anti-IKK- $\gamma$  eingesetzt. Als nächstes erfolgten Western Blot-Analysen (WB) mit Antikörpern gegen IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  oder IKK- $\gamma$ . Es wurden jeweils auch nicht weiterbehandelte zytosolische Extrakte und mit Anti-IKK- $\alpha$  oder Anti-IKK- $\gamma$  gefällte Immunpräzipitate eingesetzt. (C) Aktivierung von endogenen IKK- $\beta/\gamma$ -Komplexe durch LPS. THP-1-Zellen blieben unbehandelt oder wurden über die genannten Zeiträume mit LPS (1  $\mu$ g/ml) inkubiert. Die zytosolischen Extrakte wurden mit Anti-IKK- $\alpha$  depletiert und danach mit Anti-IKK- $\gamma$  inkubiert. Die Aktivität der gefällten IKK-Komplexe wurde mittels Kinaseassay ausgewertet.

### 3.3.2 Aktivierung von IKK- $\beta/\gamma$ -Komplexen durch LPS

Nachdem die Existenz von IKK- $\beta/\gamma$ -Komplexen gezeigt wurde, sollte nun bestimmt werden, ob diese durch LPS-Stimulation aktiviert werden können. THP-1-Zellen wurden hierzu mit LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 30 und 75 min behandelt. Die erhaltenen zytosolischen Extrakte wurden im Rahmen einer Immundepletion mit Anti-IKK- $\alpha$  inkubiert. Die im Überstand verbliebenen IKK-Komplexe wurden mit Anti-IKK- $\gamma$  gefällt und deren Aktivität in einem Kinaseassay untersucht. Nach Inkubation mit LPS für 30 bzw. 75 min fand sich eine deutlich erhöhte Aktivität verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (Abb. 7C). Dies zeigt, dass die entdeckten endogenen IKK- $\beta/\gamma$ -Komplexe aktivierbar sind.

### 3.4 Charakterisierung NIK-enthaltender Komplexe

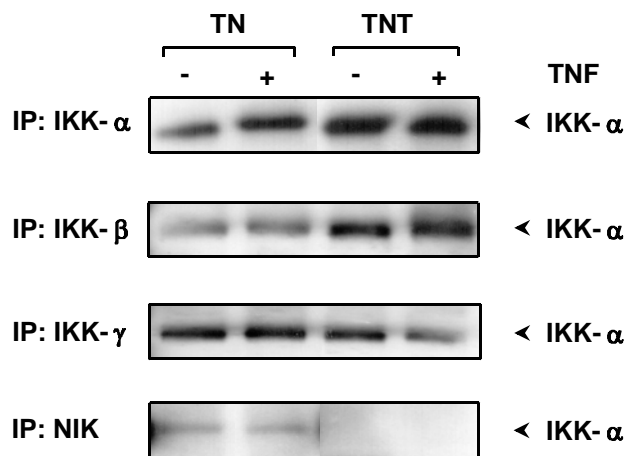
In der Literatur werden IKK-Komplexe beschrieben, die die NF- $\kappa\text{B}$ -induzierende Kinase (NIK) enthalten (87, 152, 155). Diesbezüglich war von Interesse ob NIK-enthaltende IKK-Komplexe in monozytären Zellen vorkommen. Desweiteren sollte untersucht werden, ob sich diese Komplexe durch bestimmte Stimuli aktivieren lassen.

#### 3.4.1 Nachweis von NIK im IKK-Komplex

Zunächst stellte sich die Frage, ob sich NIK überhaupt in IKK-Komplexen nachweisen läßt. In diesem Fall sollte außerdem die Art der Bindung zwischen dem IKK-Komplex und NIK bestimmt werden. Um die Vermutung, es könne sich um hydrophobe Bindungskräfte handeln, zu überprüfen, wurde bei einem Teil der Proben ein Puffer zugegeben, der nicht-ionisches Detergens (1% Triton X-100) enthielt.

Die THP-1-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit TNF (2  $\text{ng}/\text{ml}$ ) oder LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert. Hierauf wurden die erhaltenen zytosolischen Extrakte für Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , IKK- $\gamma$  oder NIK verwendet. Dies erfolgte jeweils in Puffer ohne Detergens (TN) und in Puffer mit 1% Triton (TNT). In Koimmunpräzipitationsstudien wurde das Präzipitat mit Hilfe der Western Blot-Analyse auf

seinen Gehalt an IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , IKK- $\gamma$  und NIK hin untersucht. In den Proben ohne Triton war NIK mit Hilfe der Western Blot-Analyse detektierbar (Abb. 8). Nach Zusatz von Triton ließ NIK sich hingegen nicht mehr nachweisen. Gleichartige Ergebnisse wurden nach Inkubation mit LPS erzielt: ohne Detergens war NIK nach der Behandlung vorhanden, nach Zugabe von Triton hingegen nicht mehr bestimmbar (Daten nicht gezeigt). In den Experimenten ließ sich außerdem zeigen, dass die Kinasen IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  und IKK- $\gamma$  im Gegensatz zu NIK auch nach Zusatz von Triton noch in den Proben vorhanden waren. Dies deutet darauf hin, dass NIK über hydrophobe Wechselwirkungen an den IKK-Komplex gebunden ist.



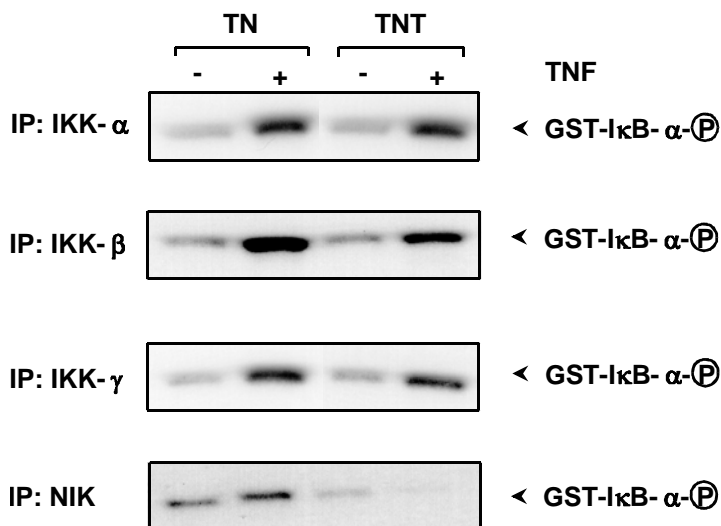
**Abbildung 8:** Nachweis von NIK im IKK-Komplex. THP-1-Zellen wurden mit TNF (2 ng/ml) stimuliert (+) oder blieben unbehandelt (-). Die zytosolischen Extrakte wurden für Immunpräzipitations-Reaktionen mit Antikörpern gegen IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , IKK- $\gamma$  oder NIK eingesetzt, wobei der Puffer entweder Detergens enthielt (1% Triton, TNT) oder frei von Detergens (TN) war. Der Gehalt an IKK- $\alpha$  im Präzipitat wurde mittels Western Blot-Analyse bestimmt.

### 3.4.2 Aktivierung von NIK-enthaltenden IKK-Komplexen

Nach Bestätigung der Existenz NIK-enthaltender IKK-Komplexe war von Interesse, ob diese auch stimulierbar sind. THP-1-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit TNF (2 ng/ml) oder LPS (1  $\mu$ g/ml) inkubiert. Hierauf wurden die erhaltenen zytosolischen Extrakte in

Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , IKK- $\gamma$  oder NIK eingesetzt. Dies erfolgte jeweils in Puffer ohne Detergens (TN) und in Puffer mit 1% Triton (TNT). Daraufhin wurden die gefällten Proteine in Kinaseassays auf ihre Fähigkeit zur Phosphorylierung von GST-I $\kappa$ B- $\alpha$  untersucht. Dabei waren in Detergens-freiem Puffer nach Fällungen mit Anti-IKK- $\alpha$ , Anti-IKK- $\beta$ , Anti-IKK- $\gamma$ , aber auch Anti-NIK, IKK-Komplexe durch TNF im Vergleich zur Negativkontrolle stimulierbar (Abb. 9). Somit waren die in monozytären Zellen nachgewiesenen, NIK-enthaltenden IKK-Komplexe aktivierbar.

Bei Zugabe von Detergens blieb die TNF-induzierte Kinaseaktivität in Fällungen mit Anti-IKK- $\alpha$ , Anti-IKK- $\beta$  oder Anti-IKK- $\gamma$  praktisch unverändert, d.h. die gefällten IKK-Komplexe waren aktivierbar (Abb. 9). Nach Fällungen von TNF-stimulierten Proben in Detergens-haltigem Puffer mit Anti-NIK hingegen ließ sich keine signifikante Phosphorylierung des Substrats GST-I $\kappa$ B- $\alpha$  feststellen. Gleiches ergab sich nach LPS-Stimulation (Daten nicht gezeigt). Dies steht in Übereinstimmung mit dem Ergebnis, dass NIK sich durch Detergentien vom IKK-Komplex trennen läßt (vgl. 3.4.1).



**Abbildung 9:** IKK-Komplexe, die IKK- $\alpha$ -, IKK- $\beta$ -, IKK- $\gamma$ - und NIK-enthalten, sind aktivierbar. THP-1-Zellen wurden mit TNF (2 ng/ml) stimuliert (+) oder blieben unbehandelt (-). Die zytosolischen Extrakte wurden für Immunpräzipitationen (IP) mit Antikörpern gegen IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , IKK- $\gamma$  oder NIK verwendet, wobei der Puffer Detergens enthielt (1% Triton, TNT) oder frei von Detergens war (TN). In Kinaseassays wurde die Aktivität der jeweiligen Komplexe getestet.

### 3.5 Suche nach neuen Stimuli für den IKK-Komplex

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Stimuli bezüglich ihrer Wirkung auf das NF- $\kappa$ B-System untersucht. Im folgenden sind die Ergebnisse der Versuche mit dem chlamydialen Hitzeschockprotein Hsp60 aufgeführt.

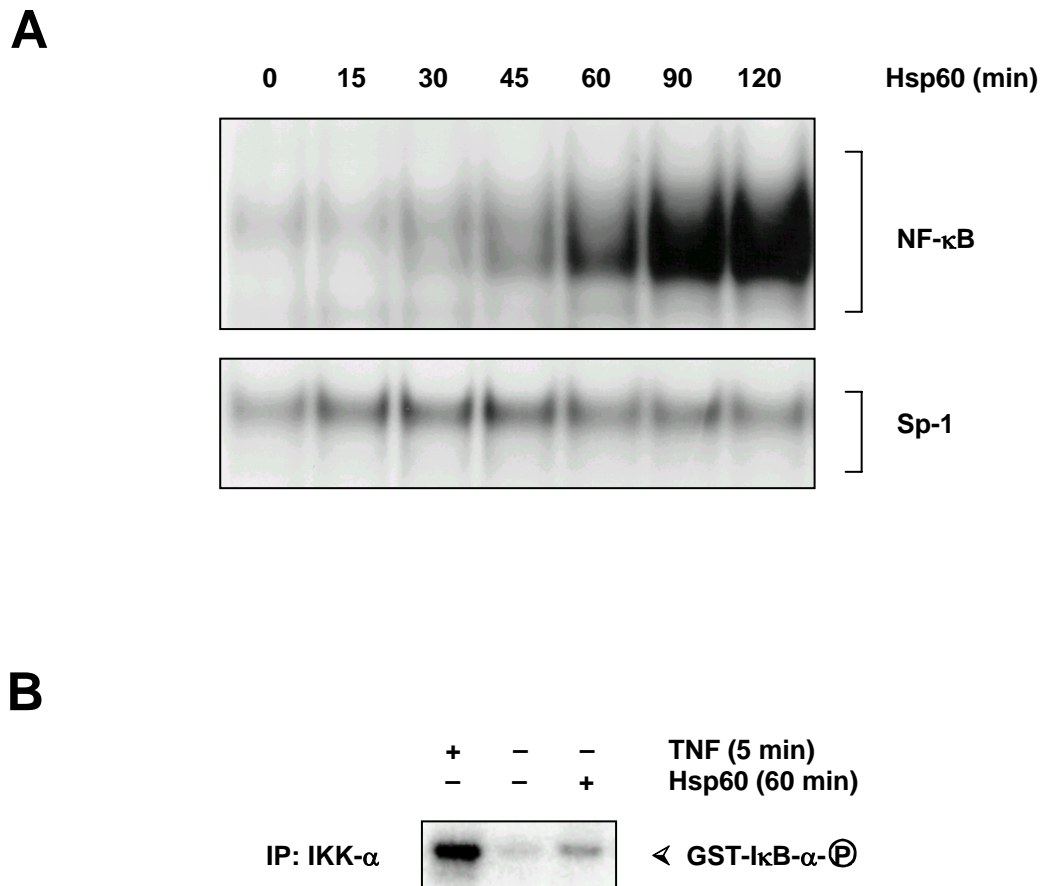
#### 3.5.1 Translokation von NF- $\kappa$ B nach Inkubation mit Hsp60

THP-1-Zellen wurden mit aufgereinigtem Hsp60 von *C. pneumoniae* (2  $\mu$ g/ml) über die angegebenen Zeiträume behandelt. Es wurden nukleäre Extrakte der Ansätze gewonnen und mittels Gelretardierungsassays untersucht. Dabei wurde jeweils ein Assay mit einem Oligonukleotid mit spezifischer Erkennungssequenz für NF- $\kappa$ B und für Sp-1 durchgeführt. In den Autoradiogrammen zeigte sich bis zur Stimulationsdauer von 120 min ein kontinuierlicher Anstieg an aktiviertem NF- $\kappa$ B (Abb. 10A). In allen Ansätzen blieb die Aktivität des konstitutiven und damit als Ladungskontrolle dienenden Transkriptionsfaktors Sp-1 unverändert. Dies zeigt, dass die Behandlung monozytärer Zellen mit chlamydialem Hsp60 zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt.

#### 3.5.2 Effekt von Hsp60 auf den IKK-Komplex

Der nun folgende Versuch sollte den Hsp60-Effekt auf der Ebene des IKK-Komplexes zeigen. Dazu wurden THP-1-Zellen 60 min lang mit chlamydialem Hsp60 (0,5  $\mu$ g/ml) inkubiert. Als Negativkontrollprobe diente ein unbehandelter Ansatz. Für die Positivkontrolle wurde 5 min mit TNF stimuliert. Die zytosolischen Extrakte der Proben wurden mit Anti-IKK- $\alpha$  behandelt. Hierauf wurde die Aktivität der IKK-Komplexe in den Präzipitaten mittels Kinaseassay bestimmt. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zeigte sich nach Hsp60-Behandlung eine deutlich erhöhte Aktivität der IKK-Komplexe (Abb. 10B). Dadurch konnte gezeigt werden, dass Hsp60 die IKK-Komplexe in monozytären Zellen aktiviert.





**Abbildung 10:** (A) Chlamydiales Hsp60 als Aktivator des NF-κB-Systems in monozytären Zellen. THP-1-Zellen wurden mit aufgereinigtem Hsp60 inkubiert. Für den Gelretardierungsassay wurden nukleäre Extrakte hergestellt und jeweils mit radioaktiv markierten DNA-Oligomeren für NF-κB und Sp-1 behandelt. (B) THP-1-Zellen wurden mit TNF (1,7 ng/ml) 5 min lang behandelt, blieben unbehandelt oder wurden für 60 min mit Hsp60 (0,5 µg/ml) inkubiert. Dann wurden zytosolische Extrakte hergestellt und mittels Kinaseassay untersucht, wobei zur Fällung Anti-IKK-α benutzt wurde.

## 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Regulation des NF- $\kappa$ B-Systems in monozytären Zellen mit Schwerpunkt auf der Charakterisierung endogener IKK-Komplexe (61, 66, 71). Der Effekt proinflammatorischer Mediatoren wie TNF, LPS, des Phorbolesters PMA sowie von chlamydialem Hsp60 auf die IKK-vermittelte Signalübertragung wurde genauer untersucht und außerdem Experimente durchgeführt, um die Zusammensetzung dieser Komplexe näher zu charakterisieren (1, 9, 49, 90, 103, 113, 121).

### 4.1 Differentielle Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Systems nach Stimulation mit LPS, TNF und PMA

Die Aktivierung des IKK-Komplexes induziert die Phosphorylierung und anschließende Proteolyse von I $\kappa$ B, dem Inhibitor von NF- $\kappa$ B (61, 71). Dieser Komplex stellt den ersten Schritt einer gemeinsamen Endstrecke für verschiedene Signalwege dar, die die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern zur Folge haben (66, 70, 71, 161). LPS und TNF gehören zu den potentesten Aktivatoren von NF- $\kappa$ B in monozytären Zellen (1, 9, 57, 90, 103, 113, 135). In den hier dargestellten Experimenten wurde gezeigt, dass die Stimulation monozytärer Zellen mit LPS, TNF und PMA zu einer differentiellen Aktivierung der endogenen IKK-Komplexe führt. Dabei zeigten sich in Abhängigkeit von den verwendeten Stimuli Unterschiede im Zeitverlauf der Aktivierung. Anhand von Experimenten mit Cycloheximid (CHX) konnte nachgewiesen werden, dass diese Aktivierung nach Stimulation mit LPS nicht von einer Proteinneusynthese abhängig ist. Bereits seit einigen Jahren ist bekannt, dass sich die Signalkaskaden für LPS und TNF, die zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen, grundlegend voneinander unterscheiden (1, 8, 77, 113). Auffällig ist hierbei der sehr frühe, dramatische Anstieg der IKK-Aktivität innerhalb von 5 Minuten nach Stimulation mit TNF. Diese frühe Aktivierung durch TNF ließ sich in HeLa-Zellen sowohl nach Isolation des gesamten IKK-Komplexes, als auch in IKK- $\alpha$ - und IKK- $\beta$ -Überexpressionsstudien zeigen (1, 45, 100, 162). Dies spricht für eine TNF-spezifische Regulation der NF- $\kappa$ B-Aktivierung, die - zumindest teilweise - oberhalb und/oder auf der Ebene des IKK-Komplexes stattfindet. In den hier beschriebenen Untersuchungen löste TNF einen schnellen, aber kurzdauernden Anstieg der

IKK-Aktivität mit einem Maximum nach 5 min aus. LPS hingegen führte zu einer langsam zunehmenden, aber vergleichsweise lange erhöhten IKK-Aktivität mit einem Maximum nach 30 min. Für Unterschiede im Signalmechanismus spricht auch die Beobachtung, dass nach Inkubation monozytärer Zellen mit Hydroxynonenal die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch LPS, IL-1 $\beta$  und PMA, jedoch nicht durch TNF, gehemmt wird (111).

In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise darauf, dass die I $\kappa$ B-Proteine unterschiedliche Funktionen im NF- $\kappa$ B-System wahrnehmen und in verschiedenen Signalwegen eine Rolle spielen können (21, 53, 61, 133). In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteolyse der I $\kappa$ B-Proteine I $\kappa$ B- $\alpha$  und I $\kappa$ B- $\varepsilon$  nach Stimulation mit LPS, TNF und PMA untersucht. Jede der getesteten Substanzen rief ein spezifisches Proteolysemuster von I $\kappa$ B- $\alpha$  und I $\kappa$ B- $\varepsilon$  hervor. Die Kurvenverläufe der IKK-Komplex-Aktivität entsprachen dabei dem Abbau von I $\kappa$ B- $\alpha$ : der rasche Anstieg der IKK-Aktivität nach Inkubation mit TNF hatte einen ebenso raschen Abfall von I $\kappa$ B- $\alpha$  zur Folge, bei Inkubation mit LPS und PMA erfolgte die Proteolyse von I $\kappa$ B- $\alpha$  hingegen langsamer, entsprechend dem Aktivierungsmuster von IKK. Anders verhielt es sich jedoch bei I $\kappa$ B- $\varepsilon$ : Bei den mit TNF behandelten Zellen verlief die Kurve der I $\kappa$ B- $\varepsilon$ -Proteolyse noch weitgehend parallel zum Verlauf von I $\kappa$ B- $\alpha$ . Dagegen zeigte sich ein deutlicher Unterschied nach Stimulation mit LPS. Dabei hatte I $\kappa$ B- $\varepsilon$  nach 75 min nur geringfügig um ca. 20% abgenommen, während I $\kappa$ B- $\alpha$  in diesen Proben nach 60 min kaum mehr nachweisbar war. Im Gegensatz dazu hatte die Inkubation von THP-1-Zellen mit PMA sogar einen Anstieg von I $\kappa$ B- $\varepsilon$  zur Folge.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die Proteolyse von I $\kappa$ B- $\varepsilon$  untersucht: nach der Stimulation mit TNF zeigte sich ein vergleichsweise schneller Abbau von I $\kappa$ B- $\varepsilon$  mit einer niedrigen Konzentration des Proteins bis zum Beginn der Resynthese nach 75 min. Nach der Stimulation mit LPS hingegen trat ein relativ später Abbau von I $\kappa$ B- $\varepsilon$  mit einem Minimum nach 90 min, gefolgt von einer raschen Resynthese des Inhibitorproteins, auf. Bereits in der Erstbeschreibung von I $\kappa$ B- $\varepsilon$  weisen *Whiteside et al.* auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede von I $\kappa$ B- $\varepsilon$  zu den zuvor bekannten Inhibitorproteinen hin (148): Ähnlich wie I $\kappa$ B- $\beta$  wird I $\kappa$ B- $\varepsilon$  relativ langsam abgebaut. Allerdings wird die Expression des I $\kappa$ B- $\varepsilon$ -Gens - wie auch des I $\kappa$ B- $\alpha$ -Gens - durch NF- $\kappa$ B induziert, im Gegensatz zum Gen von I $\kappa$ B- $\beta$ , dessen Expression nicht durch NF- $\kappa$ B induziert wird (148). I $\kappa$ B- $\varepsilon$  scheint fast ausschließlich an p65-

Homodimere und c-Rel/p65-Heterodimere zu binden. Es wird eine wichtige Rolle von I $\kappa$ B- $\epsilon$  bei der selektiven Regulation dieser Komplexe angenommen (61, 75, 86, 136, 148).

Die gezeigten Daten deuten darauf hin, dass stimulusabhängige, differentielle Wege der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion existieren, die auf der Ebene der Inhibitorproteine reguliert werden könnten. Wie zu erwarten, wird entsprechend der erhöhten Aktivität des IKK-Komplexes I $\kappa$ B- $\alpha$  abgebaut. Die Proteolyse von I $\kappa$ B- $\epsilon$  ist, wie die Experimente zeigen konnten, im Gegensatz dazu von der Art des Stimulus abhängig und lässt sich also nicht auf eine reine Erhöhung der IKK-Aktivität zurückführen. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte die Existenz unterschiedlicher Formen des IKK-Komplexes sein, die über verschiedene Signalwege zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen, wie in einer Publikation aus unserer Arbeitsgruppe diskutiert wird (vgl. 4.2 u. (121)).

Inzwischen gilt I $\kappa$ B- $\alpha$  als das für den sogenannten „klassischen“ Signalweg der NF- $\kappa$ B-Aktivierung essentielle Inhibitorprotein (21, 61, 133). So wird das p65/p50-Heterodimer vor allem von I $\kappa$ B- $\alpha$  reguliert (61). I $\kappa$ B- $\alpha$  ist wichtiger Bestandteil eines autoregulatorischen Rückkoppelungsmechanismus zur Verhinderung einer überschießenden NF- $\kappa$ B-Aktivität (35, 149): NF- $\kappa$ B reguliert u.a. die Expression von I $\kappa$ B- $\alpha$ . Nukleäres, freies I $\kappa$ B- $\alpha$  kann NF- $\kappa$ B im Zellkern binden und dadurch inaktivieren. Der Komplex aus NF- $\kappa$ B und I $\kappa$ B- $\alpha$  wird dann über die NES (nuclear export sequence), die Bestandteil des I $\kappa$ B- $\alpha$ -Moleküls ist, aus dem Kern transportiert.

*Hoffmann et al.* demonstrierten in Untersuchungen an Knock-out-Zelllinien, dass I $\kappa$ B- $\beta$  und I $\kappa$ B- $\epsilon$  bei andauernder Stimulation der Zelle regulierende, „dämpfende“ Funktion auf das NF- $\kappa$ B-System haben, indem sie sowohl eine überschießende Aktivität durch die Proteolyse von I $\kappa$ B- $\alpha$ , als auch eine zu starke Abnahme der Aktivität aufgrund der Neusynthese von I $\kappa$ B- $\alpha$  verhindern (63). Die Ergebnisse konnten in weiteren Arbeiten bestätigt und das Modell von „Oszillationen bei der zellulären Signaltransduktion“ für das NF- $\kappa$ B-System etabliert werden (14, 75, 105, 106). Dies bezeichnet einen inzwischen für mehrere Signalkaskaden beschriebenen Vorgang, bei dem die Genregulation u.a. auch über die Signalintensität (Amplitude) gesteuert wird, die auf einen Stimulus hin rhythmisch zu- und wieder abnimmt (Periode) (106). Nach Anregung des Systems wird das NF- $\kappa$ B-Molekül demnach mehrfach

zwischen Zellkern und Zytosol transloziert, wobei es im raschen Wechsel aktiviert und inaktiviert wird, so dass es statt einer einmaligen zu einer oszillierenden Aktivierung der Zielgene kommt.

## 4.2 Nachweis aktivierbarer IKK-Subkomplexe

In Immunpräzipitations-Experimenten wurde dargelegt, dass, wie aus der Literatur bekannt, ein heterodimerer IKK-Komplex aus IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  und IKK- $\gamma$  in monozytären Zellen vorkommt, der sogenannte „klassische“ IKK-Komplex (49, 61, 71). In zunehmendem Maße wird jedoch die Existenz alternativer NF- $\kappa$ B-Signalwege diskutiert, in denen anders zusammengesetzte IKK-Komplexe eine Rolle spielen. Es wurde in mehreren Arbeiten nachgewiesen, dass sich experimentell auch homodimere IKK-Komplexe erzeugen lassen, die entweder nur IKK- $\alpha$  oder IKK- $\beta$  als Kinase-aktive Bestandteile enthalten (71, 84, 99, 101, 141, 152). In der vorliegenden Studie wird gezeigt, dass in monozytären Zellen Subkomplexe auftreten, die als Kinase-aktive Untereinheit IKK- $\beta$  aber kein IKK- $\alpha$  enthalten, und an IKK- $\gamma$  gebunden sind. *Mercurio et al.* konnten Komplexe mit IKK- $\beta$  als alleiniger Kinase-aktiver Untereinheit in HeLa-Zellen nachweisen, nicht jedoch in SLB-Zellen (99). Dabei wurde nicht untersucht, ob das Adapterprotein IKK- $\gamma$  Bestandteil dieser Komplexe war.

In der vorliegenden Arbeit wurden in monozytären Zellen endogene IKK-Komplexe *in vivo* beschrieben, die kein IKK- $\alpha$ , sondern nur IKK- $\beta$  als Kinase-aktives Molekül enthalten (121). Außerdem wurde gezeigt, dass das Stütz- und Regulatorprotein IKK- $\gamma$  Bestandteil dieser Komplexe ist. Die nachgewiesenen IKK- $\beta$ /IKK- $\gamma$ -Komplexe waren in den hier beschriebenen Experimenten durch Stimulation mit LPS aktivierbar. Weitere Untersuchungen zeigten auch eine Aktivierbarkeit dieser Komplexe durch TNF (121). Zusätzlich wurde anhand von Überexpressionsstudien dargestellt, dass sich in intakten Zellen exogene IKK- $\beta$ /IKK- $\gamma$ -Komplexe generieren lassen und dass diese artifiziellen Komplexe potentiell an der Signalweiterleitung beteiligt sind (121). In der Studie von *Mercurio et al.* löste die Stimulation mit TNF in HeLa-Zellen nur eine schwache Aktivierung der IKK- $\beta$ -Subkomplexe aus, wohingegen der Großteil der TNF-induzierten Kinaseaktivität an Komplexe gebunden

war, die mit Anti-IKK- $\alpha$  gefällt worden waren (99). Der hier beschriebene Nachweis von aktivierbaren IKK- $\beta$ - $\gamma$ -Subkomplexe trägt zu der Vermutung bei, dass IKK- $\beta$  für die LPS-Signalweiterleitung essentiell ist, wie in der Literatur beschrieben (43, 107, 158). Weitere Studien sind nötig, um zu zeigen, ob verschiedene Subtypen von IKK-Komplexen durch unterschiedliche Stimuli aktiviert werden. Es bleibt zu klären, ob diese Subkomplexe spezifische Funktionen innerhalb selektiver Signalwegen übernehmen, und ob sich daraus Erklärungsmodelle für pathologische Vorgänge ableiten lassen.

### 4.3 Nachweis von aktivierbaren NIK-enthaltenden IKK-Komplexen

Die Anbindung des IKK-Komplexes an oberhalb lokalisierte Signalwege ist zur Zeit nicht hinreichend bekannt (53, 66, 71). Ein für diese Verknüpfungen wahrscheinlich wichtiges Molekül ist IKK- $\gamma$ , da unterschiedliche Stimuli zumindest unter bestimmten Bedingungen verschiedene Subregionen dieses Moleküls für die Aktivierung des IKK-Komplexes benötigen (71, 97, 130). Darüber hinaus werden auch spezifische IKK-Kinasen (IKKKs) postuliert, die in der Lage sind, die  $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinasen zu phosphorylieren und damit zu aktivieren (66). Als potentielle Kandidaten gelten die NF- $\kappa\text{B}$ -induzierende Kinase (NIK), Akt (Proteinkinase B), PKC(Proteinkinase C)-Isoformen, NAK (NF- $\kappa\text{B}$ -aktivierende Kinase) und MEKK-1 („mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1“) (71, 87, 110, 144). Desweiteren wird das relativ hohe und variable Molekulargewicht der bisher gefundenen IKK-Komplexe von 700-900 kDa unterschiedlich gewertet (66, 71, 130, 161).

Eine mögliche Erklärung ist die Anwesenheit zusätzlicher Komponenten in den Komplexen. Vor einigen Jahren wurde beispielsweise dem damals entdeckten, 150 kDa schweren Protein IKAP (IKK-complex-associated protein) die Rolle eines zur Formation des IKK-Komplexes nötigen Bausteins zugeschrieben (36). In späteren Untersuchungen konnte dies jedoch widerlegt werden: so stellten *Krappmann et al.* 2000 dar, dass IKK- $\gamma$ , jedoch nicht IKAP, ein regulärer Bestandteil des IKK-Komplexes ist und ein Molekulargewicht des IKK-Komplexes von ca. 800 kDa durch einen trimeren Komplex aus IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  und IKK- $\gamma$  ohne weitere Bestandteile erklärt werden könnte (81). In diesem Zusammenhang sind weitere Publikationen zu nennen, in denen Cdc 37 („cell division control 37“), Hsp90

(Hitzeschockprotein 90) und Hsp27 sowie ELKS (benannt nach den Aminosäuren Glutaminsäure (E), Leucin (L), Lysin (K) und Serin (S)) als weitere Komponenten des durch TNF induzierbaren IKK-Komplexes identifiziert wurden (33, 48, 115). Außerdem wurde gezeigt, dass Hsp70 eine supramolekulare Struktur mit der IKK- $\gamma$ -Untereinheit des IKK-Komplexes bilden kann (2). Als weiteren Grund für das unterschiedliche Molekulargewicht ist eine Polymerisierung der oben genannten Bestandteile denkbar (53, 133, 152)

Der Kinase NIK wurde als einem der ersten Proteine neben IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  und IKK- $\gamma$  eine Funktion im IKK-Komplex zugeschrieben (94, 152). In hier dargestellten Koimmunoprecipitationsstudien wurde nachgewiesen, dass NIK in Verbindung mit IKK- $\beta$ , IKK- $\gamma$  und IKK- $\alpha$  auftritt. Nach der im nächsten Schritt folgenden Behandlung mit dem nichtionischen Detergens Triton X-100 waren IKK- $\beta$  und IKK- $\gamma$  noch bestimmbar, nicht jedoch NIK. Unter diesen Bedingungen ließen sich keine anderen Signalmoleküle wie Akt oder RIP im IKK-Komplex detektieren (Daten nicht gezeigt). Es muß angemerkt werden, dass in der überwiegenden Zahl der publizierten Immunpräzipitationsstudien detergenschaltige Puffer verwendet wurden (66, 71, 161). Offenbar scheint aber NIK - den gezeigten Experimenten zu Folge - über hydrophobe Wechselwirkungen an den IKK-Komplex gebunden, so dass diese Kinase in der Regel nicht als Bestandteil des IKK-Komplexes nachgewiesen werden konnte.

Möglicherweise liegt hierin der Grund, dass der Komplex aus den drei Untereinheiten IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  und IKK- $\gamma$  in der Literatur als der „klassische“ oder Kern-Komplex bezeichnet wird, und dass die Annahme einer Assoziation von NIK an den IKK-Komplex intensive Debatten auslösen konnte (66, 71, 161). Die gezeigten Versuche stellen dar, dass IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  und IKK- $\gamma$  auch nach Behandlung mit dem Detergens Triton X-100 im IKK-Komplex gebunden blieben. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Bindungen anderer Qualität sein müssen als die von NIK an den IKK-Komplex. Weiteren Untersuchungen zu Folge könnte es sich dabei um ionische Wechselwirkungen handeln (Daten nicht gezeigt).

Außerdem konnte in den beschriebenen Experimenten gezeigt werden, dass NIK-enthaltende Komplexe durch TNF stimulierbar sind. Möglicherweise ist NIK Bestandteil spezifischer Subkomplexe, die im Rahmen selektiver Signalwege aktiviert werden. Hierauf weisen

Studien hin, in denen NIK *in vitro* nach TNF-Stimulation bevorzugt IKK- $\alpha$  und zu einem geringeren Grad IKK- $\beta$  phosphoryliert (88, 94). NIK interagiert mit IKK- $\alpha$  über dessen C-terminale Region; diese Interaktion scheint für die Rolle von NIK bei der NF- $\kappa$ B-Signalübertragung notwendig zu sein (87, 123, 152, 155). Experimente mit Zellen aus NIK<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigen, dass NIK nicht in die IKK-Aktivierung nach Stimulation durch TNF oder IL-1 involviert ist (71). NIK scheint statt dessen eine wichtige Rolle bei der Lymphotoxin  $\beta$ -Rezeptor (LT $\beta$ R)-abhängigen Signalübertragung über den sogenannten „alternativen“ NF- $\kappa$ B-Signalweg zu spielen (42, 104, 114, 160). Der Annahme, dass NIK exklusiver Bestandteil der LT $\beta$ R-abhängigen Signalübertragung sei, widersprechen jedoch neuere Untersuchungen von *Ramakrishnan et al.*, die die Beteiligung von NIK sowohl am „alternativen“, als auch am „klassischen“ NF- $\kappa$ B-Signalübertragungsweg nach Inkubation mit einigen spezifischen Stimuli zeigen (122). Weitere Studien ergaben eine entscheidende Rolle für NIK bei der Prozessierung des Vorläuferproteins p100 und der Phosphorylierung von IKK- $\alpha$  im Rahmen des „alternativen“ Signalübertragungswegs (104, 133, 152).

#### **4.4 Chlamydiales Hsp60 als Beispiel für neue Stimuli des IKK-Komplexes und seine potentielle Rolle als Pathogen**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Hsp60 von *C. pneumoniae* das NF- $\kappa$ B-System in monozytären Zellen aktivieren kann: So bestätigte sich in Gelretardierungsassays die Vermutung, dass chlamydiales Hsp60 in monozytären Zellen die Aktivierung von NF- $\kappa$ B bewirkt. Mittels Kinaseassays konnte zudem eine Aktivierung von IKK-Komplexen bei den mit Hsp60 behandelten monozytären Zellen nachgewiesen werden.

In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise darauf, dass neben den klassischen Risikofaktoren Rauchen, Hypertonus, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie auch infektiöse Vorgänge an der Entstehung von Gefäßerkrankungen beteiligt sein könnten (40, 79, 91, 95, 98). In seroepidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass sich unter Patienten mit KHK oder vorausgegangenem Myokardinfarkt signifikant häufiger Träger von Antikörpern gegen *C. pneumoniae* fanden als in entsprechenden Kontrollgruppen (95, 127, 128). Zudem wurde nachgewiesen, dass *C. pneumoniae* einen potenten Aktivator des NF- $\kappa$ B-Systems *in*



*vitro* darstellt (7, 41, 46, 52, 82, 102). Neben dem chlamydialen LPS wurde als potentiell pathogener Bestandteil des Bakteriums das Hitzeschockprotein Hsp60 identifiziert (26, 69, 78, 80). Hitzeschockproteine werden konstitutiv in jeder Zelle exprimiert und sind essentiell für wichtige zelluläre Vorgänge, wie die Proteinfaltung und den Schutz von Proteinen vor der Denaturierung (147). Seit einiger Zeit sind sie jedoch auch als mögliche Pathogene in der Diskussion (76). Chlamydiales Hsp60 ist hochimmunogen und scheint Kreuzreaktivitäten mit dem menschlichen Hsp60 hervorzurufen, was dazu führte, dass die Atherosklerose etwas verfrüht bereits als „eine Autoimmunkrankheit infolge einer Immunreaktion gegen Hitzeschockprotein 60“ bezeichnet wurde (150). In den letzten Jahren mehren sich Hinweise, die dem chlamydialen Hsp60 eine Rolle bei der Pathogenese von Gefäßerkrankungen, vor allem der Arteriosklerose, zusprechen (39, 51, 68, 69, 80, 156). Im Mausmodell konnte durch die Infektion mit *C. pneumoniae* bei gesunden Tieren keine Atherosklerose ausgelöst werden, jedoch zeigte sich eine signifikante Progression bei bereits vorhandener Atherosklerose (27, 60, 64).

Kürzlich wurden einige große, randomisierte Studien zur Inzidenz des akuten Koronarsyndroms bei mit Antibiotika gegen *C. pneumoniae* behandelten Patienten durchgeführt: In der WIZARD-Studie („Weekly Intervention with Zithromax for Atherosclerosis and Its Related Disorders“) konnte bei über 7000 Patienten mit Myokardinfarkt in der Vorgeschichte und positivem *C.-pneumoniae*-Titer keine signifikante Risikoreduktion bezüglich eines kardialen Ereignisses in der über 12 Wochen mit Azithromycin behandelten Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe erreicht werden (108). In der AZACS-Studie („Azithromycin in Acute Coronary Syndrome“) war bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom eine Sekundärprophylaxe mit Azithromycin über vier Tage nicht erfolgreicher als Placebo (32). Zu ähnlichen Ergebnissen führten zwei weitere große Studien, die keinen Vorteil einer Langzeitbehandlung mit Azithromycin bzw. Gatifloxacin in der Sekundärprophylaxe bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom zeigen konnten (29, 56). Eine aktuelle Meta-Analyse, in die über 19.000 Patienten (u.a. aus den genannten Studien) eingeschlossen wurden, konnte ebenfalls keinen Vorteil einer gegen Chlamydien gerichteten antibiotischen Behandlung bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit nachweisen (4). Ob die antibiotische Therapie eine Rolle in der Primärprophylaxe der Atherosklerose spielen kann bzw. ob neuere, potentere Antibiotika oder andere Therapieregime eine Risikoreduktion bezüglich kardialer Ereignisse bewirken können, müssen zukünftige Studien zeigen (3).

Inwieweit die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Systems durch Hsp60 eine ursächliche Rolle bei der Entwicklung der Arteriosklerose spielt, ist derzeit unklar.

#### 4.5 Schlußbemerkung zur Bedeutung von IKK-Subkomplexen

Die präsentierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben dem „klassischen“ IKK-Komplex aus IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  und IKK- $\gamma$  anders geartete Subkomplexe in der Zelle existieren. Möglicherweise sind diese über unterschiedliche Signalwege aktivierbar und könnten so spezifische Funktionen übernehmen. Es wurden IKK- $\beta$ / $\gamma$ -Komplexe sowie NIK-enthaltende IKK-Komplexe in monozytären Zellen nachgewiesen. Die Existenz von IKK- $\beta$ / $\gamma$ -Komplexen neben den klassischen IKK-Komplexen eröffnet attraktive diagnostische und therapeutische Möglichkeiten: Beispielsweise könnte die bei Sepsis auftretende Hyperinflammation durch eine spezifische Blockade der klassischen (IKK- $\alpha$  enthaltenden) IKK-Komplexe reduziert werden, während über die weiterhin intakten IKK- $\beta$ / $\gamma$ -Komplexe basale Funktionen, wie die Steuerung der Immunantwort, aufrecht erhalten werden könnten (53). Alternativ könnten durch die Inhibierung von IKK- $\beta$  die postulierten spezifischen IKK- $\alpha$ -abhängigen (IKK- $\beta$ -unabhängigen) Signalübertragungswege weiterhin vermittelt werden (5, 53, 133).

Mit dem chimären Antikörper Infliximab, dem TNF-Rezeptor-Analogen Etanercept und dem rekombinanten humanen Antikörper Adalimumab gibt es bereits einige zugelassene Arzneimittel, die TNF binden und damit auch massiv in das NF- $\kappa$ B-System eingreifen (59, 74, 109, 125). In der Klinik werden die Substanzen mit großem Erfolg bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und bei rheumatoider Arthritis eingesetzt, der therapeutische Effekt wird aber mit einer allgemeinen Immunsuppression erkauft. Die Entdeckung unterschiedlicher Wege der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion könnte neue Ansätze zur Entwicklung „maßgeschneiderter“ Medikamente eröffnen. Es wurden bereits einige selektive IKK- $\beta$ -Inhibitoren entwickelt, die derzeit noch hinsichtlich ihrer klinischen Einsatzmöglichkeiten evaluiert werden (73). In der Regel handelt es sich um sogenannte „small molecules“, die die Enzymaktivität von IKK- $\beta$  hemmen. So inhibiert das  $\beta$ -Carbolin-Derivat PS-1145 die I $\kappa$ B-Phosphorylierung in HeLa-Zellen und die TNF- $\alpha$ -Produktion im Mausmodell nach Stimulation mit LPS (31). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden,

---

dass PS-1145 in menschlichen Plasmazytom-Zellen die NF- $\kappa$ B-Aktivierung und damit über einen G1-Arrest die Zellproliferation hemmen kann (62).

Das IKK-/NF- $\kappa$ B-System scheint eine Vielzahl therapeutischer Ansatzpunkte bei malignen sowie chronisch und akut entzündlichen Erkrankungen zu bieten. Die Entwicklung entsprechender Substanzen und das Wissen um deren Wirkmechanismen steht jedoch noch am Anfang. Das IKK-/NF- $\kappa$ B-System könnte, um mit *Karin et al.* zu sprechen, zu „einer Schatztruhe für die Entwicklung von Medikamenten“ werden (73).

## 5. Zusammenfassung

Übergeordnetes Ziel der Studien war es, die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B bei chronisch oder akut entzündlichen Prozessen wie z. B. Atherosklerose und Sepsis besser zu verstehen. Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Regulation des NF- $\kappa$ B-Systems in monozytären Zellen mit Schwerpunkt auf der Charakterisierung der endogenen IKK-Komplexe. Der Effekt der proinflammatorischen Mediatoren TNF und LPS sowie des Phorbolesters PMA auf diese Komplexe wurde genauer untersucht und Experimente zum Aufbau der Komplexe durchgeführt. Darüber hinaus war die Wirkung von chlamydialem Hsp60, das möglicherweise bei der Atherogenese eine Rolle spielt, auf das NF- $\kappa$ B-System Teil der Untersuchungen.

Zur Charakterisierung des IKK-Komplexes in monozytären Zellen wurden verschiedene potente Stimuli des NF- $\kappa$ B-Systems eingesetzt und die differentielle Aktivierung der endogenen IKK-Komplexe analysiert. THP-1-Zellen wurden mit LPS, einem Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien, inkubiert. Dies führte zu einer relativ langsamen Zunahme der IKK-Aktivität mit einem Maximum bei 30 min. Interessanterweise trat nach 75 min ein zweiter Gipfel in der Aktivitätskurve auf. Das Inhibitorprotein I $\kappa$ B- $\alpha$  wurde dabei über 60 min langsam abgebaut, war nach 60 min nicht mehr nachweisbar und trat nach 105 min wieder auf. Bemerkenswert ist der deutlich spätere Abbau von I $\kappa$ B- $\epsilon$ . Im Gegensatz dazu hatte die Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF einen erheblich rascheren Anstieg der IKK-Aktivität und einen ebenso raschen Abbau von I $\kappa$ B- $\alpha$  und I $\kappa$ B- $\epsilon$  zur Folge. In Versuchsansätzen mit dem Phorbolester PMA wurde der IKK-Komplex nach 10 min deutlich aktiviert gefolgt von der Proteolyse des Inhibitorproteins I $\kappa$ B- $\alpha$ . Interessanterweise war hierbei keine Proteolyse von I $\kappa$ B- $\epsilon$  detektierbar. Die Aktivierung des IKK-Komplexes unterschied sich also abhängig von der Art des Stimulus in ihrer Intensität und im Zeitverlauf.

In weiteren Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass in monozytären Zellen neben dem „klassischen“ IKK-Komplex aus IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  und IKK- $\gamma$  endogene Komplexe auftreten, die IKK- $\beta$  und IKK- $\gamma$ , aber nicht IKK- $\alpha$  enthalten. Diese waren durch LPS aktivierbar. Die Annahme mehrerer Signalwege, die über unterschiedliche IKK-Subkomplexe eine differentielle Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Systems ermöglichen, scheint demnach plausibel. Es

wurde gezeigt, dass die Kinase NIK als Bestandteil des IKK-Komplexes vorkommt und durch überwiegend hydrophobe Wechselwirkungen an den Komplex gebunden ist. NIK-enthaltende Komplexe waren durch TNF und LPS aktivierbar.

Darüber hinaus wurden Experimente zur Wirkung des Hsp60 von *Chlamydia pneumoniae* auf das NF- $\kappa$ B-System durchgeführt. Nach Behandlung monozytärer Zellen mit Hsp60 zeigte sich eine deutlich erhöhte Aktivität der IKK-Komplexe sowie ein Anstieg von aktiviertem NF- $\kappa$ B. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der Annahme, dass chlamydiales Hsp60 bei der Pathogenese der Atherosklerose eine Rolle spielen könnte.

Die vorgestellten Untersuchungen ermöglichen ein besseres Verständnis des Aufbaus und der Funktion des IKK-Komplexes. Die Existenz von funktionell aktiven Subkomplexen und die Möglichkeit, diese gezielt zu beeinflussen, könnte einen Angriffspunkt für selektive diagnostische und therapeutische Strategien darstellen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Aggarwal, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3 (2003) 745-756
2. Agou, F., Ye, F., Goffinont, S., Courtois, G., Yamaoka, S., Israel, A., Veron, M. NEMO trimerizes through its coiled-coil C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 17464-17475
3. Anderson, J. L. Infection, antibiotics, and atherothrombosis--end of the road or new beginnings? *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 1706-1709
4. Andraws, R., Berger, J. S., Brown, D. L. Effects of antibiotic therapy on outcomes of patients with coronary artery disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 293 (2005) 2641-2647
5. Anest, V., Hanson, J. L., Cogswell, P. C., Steinbrecher, K. A., Strahl, B. D., Baldwin, A. S. A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression. *Nature* 423 (2003) 659-663
6. Arnalich, F., Garcia-Palomero, E., Lopez, J., Jimenez, M., Madero, R., Renart, J., Vazquez, J. J., Montiel, C. Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. *Infect. Immun.* 68 (2000) 1942-1945
7. Baer, J. T., Du Laney, T. V., Wyrick, P. B., McCain, A. S., Fischer, T. A., Merricks, E. P., Baldwin, A. S., Nichols, T. C. Nuclear factor-kappaB activation in endothelium

- by *Chlamydia pneumoniae* without active infection. *J. Infect. Dis.* 188 (2003) 1094-1097
8. Baeuerle, P. A. Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF-kappaB puzzle? *Curr. Biol.* 8 (1998) R19-22
  9. Baeuerle, P. A., Baltimore, D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 87 (1996) 13-20
  10. Baeuerle, P. A., Henkel, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12 (1994) 141-179
  11. Baldwin, A. S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 241-246
  12. Baldwin, A. S. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14 (1996) 649-683
  13. Baldwin, A. S. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 3-6
  14. Barken, D., Wang, C. J., Kearns, J., Cheong, R., Hoffmann, A., Levchenko, A. Comment on "Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression". *Science* 308 (2005) 52; author reply 52
  15. Barnes, P. J., Karin, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 336 (1997) 1066-1071
  16. Belland, R. J., Ouellette, S. P., Gieffers, J., Byrne, G. I. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *Cell Microbiol* 6 (2004) 117-127

17. Bender, K., Göttlicher, M., Whiteside, S., Rahmsdorf, H. J., Herrlich, P. Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF-kappaB by UV. *EMBO J.* 17 (1998) 5170-5181
18. Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards, P. A., Watson, A. D., Lusis, A. J. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 91 (1995) 2488-2496
19. Beutler, B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr. Opin. Immunol.* 12 (2000) 20-26
20. Böhler, H., Qiu, F., Zimmermann, T., Zhang, Y., Jllmer, T., Männel, D., Böttiger, B. W., Stern, D. M., Waldherr, R., Saeger, H. D., Ziegler, R., Bierhaus, A., Martin, E., Nawroth, P. P. Role of NFkappaB in the mortality of sepsis. *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 972-985
21. Bonizzi, G., Karin, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25 (2004) 280-288
22. Bourcier, T., Sukhova, G., Libby, P. The nuclear factor kappa-B signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 15817-15824
23. Brand, K., Eisele, T., Kreusel, U., Page, M., Page, S., Haas, M., Gerling, A., Kaltschmidt, C., Neumann, F. J., Mackman, N., Baeuerle, P. A., Walli, A. K., Neumeier, D. Dysregulation of monocytic nuclear factor-kappa B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (1997) 1901-1909



24. Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Brandl, R., Knuechel, R., Page, M., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P. A., Neumeier, D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 1715-1722
25. Brand, K., Page, S., Walli, A. K., Neumeier, D., Baeuerle, P. A. Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis. *Exp. Physiol.* 82 (1997) 297-304
26. Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Karahashi, H., Michelsen, K. S., Equils, O., Morrison, S. G., Morrison, R. P., Arditi, M. Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J. Immunol.* 168 (2002) 1435-1440
27. Caligiuri, G., Rottenberg, M., Nicoletti, A., Wigzell, H., Hansson, G. K. Chlamydia pneumoniae infection does not induce or modify atherosclerosis in mice. *Circulation* 103 (2001) 2834-2838
28. Campbell, L. A., Kuo, C. C. Chlamydia pneumoniae pathogenesis. *J. Med. Microbiol.* 51 (2002) 623-625
29. Cannon, C. P., Braunwald, E., McCabe, C. H., Grayston, J. T., Muhlestein, B., Giugliano, R. P., Cairns, R., Skene, A. M. Antibiotic treatment of Chlamydia pneumoniae after acute coronary syndrome. *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 1646-1654
30. Cao, Y., Bonizzi, G., Seagroves, T. N., Greten, F. R., Johnson, R., Schmidt, E. V., Karin, M. IKKalpha provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell* 107 (2001) 763-775

31. Castro, A. C., Dang, L. C., Soucy, F., Grenier, L., Mazdiyasni, H., Hottelet, M., Parent, L., Pien, C., Palombella, V., Adams, J. Novel IKK inhibitors: beta-carbolines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 2419-2422
32. Cercek, B., Shah, P. K., Noc, M., Zahger, D., Zeymer, U., Matetzky, S., Maurer, G., Mahrer, P. Effect of short-term treatment with azithromycin on recurrent ischaemic events in patients with acute coronary syndrome in the Azithromycin in Acute Coronary Syndrome (AZACS) trial: a randomised controlled trial. *Lancet* 361 (2003) 809-813
33. Chen, G., Cao, P., Goeddel, D. V. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol. Cell* 9 (2002) 401-410
34. Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V. J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., Maniatis, T. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 9 (1995) 1586-1597
35. Cheng, J. D., Ryseck, R. P., Attar, R. M., Dambach, D., Bravo, R. Functional redundancy of the nuclear factor kappa B inhibitors I kappa B alpha and I kappa B beta. *J. Exp. Med.* 188 (1998) 1055-1062
36. Cohen, L., Henzel, W. J., Baeuerle, P. A. IKAP is a scaffold protein of the IkappaB kinase complex. *Nature* 395 (1998) 292-296
37. Collins, T. Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab. Invest.* 68 (1993) 499-508

38. Collins, T., Cybulsky, M. I. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 255-264
39. Curry, A. J., Portig, I., Goodall, J. C., Kirkpatrick, P. J., Gaston, J. S. T lymphocyte lines isolated from atheromatous plaque contain cells capable of responding to *Chlamydia* antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 121 (2000) 261-269
40. Danesh, J., Collins, R., Peto, R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* 350 (1997) 430-436
41. Dechend, R., Maass, M., Gieffers, J., Dietz, R., Scheidereit, C., Leutz, A., Gulba, D. *C. Chlamydia pneumoniae* infection of vascular smooth muscle and endothelial cells activates NF-kappaB and induces tissue factor and PAI-1 expression: a potential link to accelerated arteriosclerosis. *Circulation* 100 (1999) 1369-1373
42. Dejardin, E., Droin, N. M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z. W., Karin, M., Ware, C. F., Green, D. R. The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17 (2002) 525-535
43. Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., Karin, M. Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* 284 (1999) 309-313
44. DiDonato, J., Mercurio, F., Rosette, C., Wu-Li, J., Suyang, H., Ghosh, S., Karin, M. Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 1295-1304

45. DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., Karin, M. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388 (1997) 548-554
46. Donath, B., Fischer, C., Page, S., Prebeck, S., Jilg, N., Weber, M., da Costa, C., Neumeier, D., Miethke, T., Brand, K. Chlamydia pneumoniae activates IKK/I kappa B-mediated signaling, which is inhibited by 4-HNE and following primary exposure. *Atherosclerosis* 165 (2002) 79-88
47. Downey, J. S., Han, J. Cellular activation mechanisms in septic shock. *Front. Biosci.* 3 (1998) d468-476
48. Ducut Sigala, J. L., Bottero, V., Young, D. B., Shevchenko, A., Mercurio, F., Verma, I. M. Activation of transcription factor NF-kappaB requires ELKS, an IkappaB kinase regulatory subunit. *Science* 304 (2004) 1963-1967
49. Fischer, C., Page, S., Weber, M., Eisele, T., Neumeier, D., Brand, K. Differential effects of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor on monocytic IkappaB kinase signalsome activation and IkappaB proteolysis. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 24625-24632
50. Fraunberger, P., Walli, A. K., Seidel, D. Zytokinanalytik. Was ist machbar – was ist sinnvoll? *Internist* 42 (2001) 35-46
51. Gaston, J. S., Curry, A. J., Portig, I., Goodall, J. C., Kirkpatrick, P. J. Immune responses to Chlamydia antigens in atherosclerosis. *Herz* 25 (2000) 73-78

52. Gencay, M. M., Tamm, M., Glanville, A., Perruchoud, A. P., Roth, M. Chlamydia pneumoniae activates epithelial cell proliferation via NF-kappaB and the glucocorticoid receptor. *Infect. Immun.* 71 (2003) 5814-5822
53. Ghosh, S., Karin, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl (2002) S81-96
54. Ghosh, S., May, M. J., Kopp, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16 (1998) 225-260
55. Gilmore, T. D., Koedood, M., Piffat, K. A., White, D. W. Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. *Oncogene* 13 (1996) 1367-1378
56. Grayston, J. T., Kronmal, R. A., Jackson, L. A., Parisi, A. F., Muhlestein, J. B., Cohen, J. D., Rogers, W. J., Crouse, J. R., Borrowdale, S. L., Schron, E., Knirsch, C. Azithromycin for the secondary prevention of coronary events. *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 1637-1645
57. Grilli, M., Chiu, J. J., Lenardo, M. J. NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int. Rev. Cytol.* 143 (1993) 1-62
58. Guha, M., Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* 13 (2001) 85-94
59. Hanauer, S. B., Sandborn, W. J., Rutgeerts, P., Fedorak, R. N., Lukas, M., MacIntosh, D., Panaccione, R., Wolf, D., Pollack, P. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology* 130 (2006) 323-333; quiz 591

60. Hansson, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 1685-1695
61. Hayden, M. S., Ghosh, S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18 (2004) 2195-2224
62. Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., Adams, J., Anderson, K. C. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 16639-16647
63. Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M. L., Baltimore, D. The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 298 (2002) 1241-1245
64. Hu, H., Pierce, G. N., Zhong, G. The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 747-753
65. Hu, Y., Baud, V., Oga, T., Kim, K. I., Yoshida, K., Karin, M. IKKalpha controls formation of the epidermis independently of NF-kappaB. *Nature* 410 (2001) 710-714
66. Israel, A. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol.* 10 (2000) 129-133
67. Jahn, J., Dalhoff, K., Katus, H. A. Coronary artery disease: an inflammatory or infectious process. *Basic Res. Cardiol.* 95 Suppl 1 (2000) I59-64

68. Kalayoglu, M. V., Hoerneman, B., LaVerda, D., Morrison, S. G., Morrison, R. P., Byrne, G. I. Cellular oxidation of low-density lipoprotein by *Chlamydia pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 180 (1999) 780-790
69. Kalayoglu, M. V., Indrawati, Morrison, R. P., Morrison, S. G., Yuan, Y., Byrne, G. I. Chlamydial virulence determinants in atherogenesis: the role of chlamydial lipopolysaccharide and heat shock protein 60 in macrophage-lipoprotein interactions. *J. Infect. Dis.* 181 Suppl 3 (2000) S483-489
70. Karin, M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18 (1999) 6867-6874
71. Karin, M., Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18 (2000) 621-663
72. Karin, M., Lin, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3 (2002) 221-227
73. Karin, M., Yamamoto, Y., Wang, Q. M. The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 3 (2004) 17-26
74. Keane, J., Gershon, S., Wise, R. P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwieterman, W. D., Siegel, J. N., Braun, M. M. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N. Engl. J. Med.* 345 (2001) 1098-1104
75. Kearns, J. D., Basak, S., Werner, S. L., Huang, C. S., Hoffmann, A. I{kappa}B{varepsilon} provides negative feedback to control NF-{kappa}B

- oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression. *J. Cell Biol.* 173 (2006) 659-664
76. Kiessling, R., Gronberg, A., Ivanyi, J., Soderstrom, K., Ferm, M., Kleinau, S., Nilsson, E., Klareskog, L. Role of hsp60 during autoimmune and bacterial inflammation. *Immunol. Rev.* 121 (1991) 91-111
77. Kirschning, C. J., Wesche, H., Merrill Ayres, T., Rothe, M. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 188 (1998) 2091-2097
78. Kol, A., Bourcier, T., Lichtman, A. H., Libby, P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 571-577
79. Kol, A., Libby, P. The mechanisms by which infectious agents may contribute to atherosclerosis and its clinical manifestations. *Trends Cardiovasc. Med.* 8 (1998) 191-199
80. Kol, A., Lichtman, A. H., Finberg, R. W., Libby, P., Kurt-Jones, E. A. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J. Immunol.* 164 (2000) 13-17
81. Krappmann, D., Hatada, E. N., Tegethoff, S., Li, J., Klippel, A., Giese, K., Baeuerle, P. A., Scheidereit, C. The I kappa B kinase (IKK) complex is tripartite and contains IKK gamma but not IKAP as a regular component. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 29779-29787



82. Krüll, M., Klucken, A. C., Wuppermann, F. N., Fuhrmann, O., Magerl, C., Seybold, J., Hippenstiel, S., Hegemann, J. H., Jantos, C. A., Suttorp, N. Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J. Immunol.* 162 (1999) 4834-4841
83. Leonardi, A., Chariot, A., Claudio, E., Cunningham, K., Siebenlist, U. CIKS, a connection to I $\kappa$ B kinase and stress-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 10494-10499
84. Li, Q., Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K. F., Verma, I. M. Severe liver degeneration in mice lacking the I $\kappa$ B kinase 2 gene. *Science* 284 (1999) 321-325
85. Li, X., Commane, M., Nie, H., Hua, X., Chatterjee-Kishore, M., Wald, D., Haag, M., Stark, G. R. Act1, an NF- $\kappa$ B-activating protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 10489-10493
86. Li, Z., Nabel, G. J. A new member of the I $\kappa$ B protein family, I $\kappa$ B epsilon, inhibits RelA (p65)-mediated NF- $\kappa$ B transcription. *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 6184-6190
87. Lin, X., Mu, Y., Cunningham, E. T., Jr., Marcu, K. B., Geleziunas, R., Greene, W. C. Molecular determinants of NF- $\kappa$ B-inducing kinase action. *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998) 5899-5907
88. Ling, L., Cao, Z., Goeddel, D. V. NF- $\kappa$ B-inducing kinase activates IKK- $\alpha$  by phosphorylation of Ser-176. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 3792-3797

89. Liu, S. F., Malik, A. B. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290 (2006) L622-L645
90. Liu, Z. G. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res.* 15 (2005) 24-27
91. Lozinguez, O., Arnaud, E., Belec, L., Nicaud, V., Alhenc-Gelas, M., Fiessinger, J. N., Aiach, M., Emmerich, J. Demonstration of an association between Chlamydia pneumoniae infection and venous thromboembolic disease. *Thromb. Haemost.* 83 (2000) 887-891
92. Mackman, N., Brand, K., Edgington, T. S. Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites. *J. Exp. Med.* 174 (1991) 1517-1526
93. Mahony, J. B., Coombes, B. K. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: does the evidence support a causal or contributory role? *FEMS Microbiol. Lett.* 197 (2001) 1-9
94. Malinin, N. L., Boldin, M. P., Kovalenko, A. V., Wallach, D. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385 (1997) 540-544
95. Mattila, K. J., Valtonen, V. V., Nieminen, M. S., Asikainen, S. Role of infection as a risk factor for atherosclerosis, myocardial infarction, and stroke. *Clin. Infect. Dis.* 26 (1998) 719-734

96. May, M. J., D'Acquisto, F., Madge, L. A., Glockner, J., Pober, J. S., Ghosh, S.  
Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction  
of NEMO with the IkappaB kinase complex. *Science* 289 (2000) 1550-1554
97. May, M. J., Ghosh, S. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin.  
Cancer Biol.* 8 (1997) 63-73
98. Melnick, J. L., Adam, E., Debakey, M. E. Cytomegalovirus and atherosclerosis. *Eur.  
Heart J.* 14 Suppl K (1993) 30-38
99. Mercurio, F., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Young, D. B., Li, J. W.,  
Pascual, G., Motiwala, A., Zhu, H., Mann, M., Manning, A. M. IkappaB kinase  
(IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex.  
*Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 1526-1538
100. Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., Young,  
D. B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., Rao, A. IKK-1 and IKK-2: cytokine-  
activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 278 (1997)  
860-866
101. Miller, B. S., Zandi, E. Complete reconstitution of human IkappaB kinase (IKK)  
complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKKgamma on the  
complex activity in the absence of stimulation. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 36320-  
36326
102. Miller, S. A., Selzman, C. H., Shames, B. D., Barton, H. A., Johnson, S. M., Harken,  
A. H. Chlamydia pneumoniae activates nuclear factor kappaB and activator protein 1

- in human vascular smooth muscle and induces cellular proliferation. *J. Surg. Res.* 90 (2000) 76-81
103. Müller, J. M., Ziegler-Heitbrock, H. W., Baeuerle, P. A. Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology* 187 (1993) 233-256
104. Muller, J. R., Siebenlist, U. Lymphotoxin beta receptor induces sequential activation of distinct NF-kappa B factors via separate signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 12006-12012
105. Nelson, D. E., Ihekweaba, A. E., Elliott, M., Johnson, J. R., Gibney, C. A., Foreman, B. E., Nelson, G., See, V., Horton, C. A., Spiller, D. G., Edwards, S. W., McDowell, H. P., Unitt, J. F., Sullivan, E., Grimley, R., Benson, N., Broomhead, D., Kell, D. B., White, M. R. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science* 306 (2004) 704-708
106. Nelson, D. E., See, V., Nelson, G., White, M. R. Oscillations in transcription factor dynamics: a new way to control gene expression. *Biochem. Soc. Trans.* 32 (2004) 1090-1092
107. O'Connell, M. A., Bennett, B. L., Mercurio, F., Manning, A. M., Mackman, N. Role of IKK1 and IKK2 in lipopolysaccharide signaling in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 30410-30414
108. O'Connor, C. M., Dunne, M. W., Pfeffer, M. A., Muhlestein, J. B., Yao, L., Gupta, S., Benner, R. J., Fisher, M. R., Cook, T. D. Azithromycin for the secondary prevention of coronary heart disease events: the WIZARD study: a randomized controlled trial. *JAMA* 290 (2003) 1459-1466

109. Olsen, N. J., Stein, C. M. New drugs for rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 350 (2004) 2167-2179
110. Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., Donner, D. B. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401 (1999) 82-85
111. Page, S., Fischer, C., Baumgartner, B., Haas, M., Kreusel, U., Loidl, G., Hayn, M., Ziegler-Heitbrock, H. W., Neumeier, D., Brand, K. 4-Hydroxynonenal prevents NF-kappaB activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting IkappaB phosphorylation and subsequent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 11611-11618
112. Pahl, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18 (1999) 6853-6866
113. Palsson-McDermott, E. M., O'Neill, L. A. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113 (2004) 153-162
114. Park, G. Y., Wang, X., Hu, N., Pedchenko, T. V., Blackwell, T. S., Christman, J. W. NIK is involved in nucleosomal regulation by enhancing histone H3 phosphorylation by IKKalpha. *J. Biol. Chem.* (2006)
115. Park, K. J., Gaynor, R. B., Kwak, Y. T. Heat shock protein 27 association with the I kappa B kinase complex regulates tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappa B activation. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 35272-35278
116. Parrillo, J. E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N. Engl. J. Med.* 328 (1993) 1471-1477

117. Paterson, R. L., Galley, H. F., Dhillon, J. K., Webster, N. R. Increased nuclear factor kappa B activation in critically ill patients who die. *Crit. Care Med.* 28 (2000) 1047-1051
118. Peters, R. T., Liao, S. M., Maniatis, T. IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex. *Mol. Cell* 5 (2000) 513-522
119. Phelps, C. B., Sengchanthalangsy, L. L., Huxford, T., Ghosh, G. Mechanism of Ikappa B alpha binding to NF-kappa B dimers. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 29840-29846
120. Pikarsky, E., Ben-Neriah, Y. NF-kappaB inhibition: a double-edged sword in cancer? *Eur. J. Cancer* 42 (2006) 779-784
121. Quirling, M., Page, S., Jilg, N., Plenagl, K., Peus, D., Grubmuller, C., Weingartner, M., Fischer, C., Neumeier, D., Brand, K. Detection of IKKbeta-IKKgamma subcomplexes in monocytic cells and characterization of associated signaling. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 37452-37460
122. Ramakrishnan, P., Wang, W., Wallach, D. Receptor-specific signaling for both the alternative and the canonical NF-kappaB activation pathways by NF-kappaB-inducing kinase. *Immunity* 21 (2004) 477-489
123. Regnier, C. H., Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z., Rothe, M. Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 90 (1997) 373-383
124. Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G., Karin, M. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature* 395 (1998) 297-300

125. Rutgeerts, P., Van Assche, G., Vermeire, S. Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 126 (2004) 1593-1610
126. Saikku, P. Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis. *J. Intern. Med.* 247 (2000) 391-396
127. Saikku, P., Leinonen, M., Mattila, K., Ekman, M. R., Nieminen, M. S., Makela, P. H., Huttunen, J. K., Valtonen, V. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 2 (1988) 983-986
128. Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M. R., Manninen, V., Manttari, M., Frick, M. H., Huttunen, J. K. Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Ann. Intern. Med.* 116 (1992) 273-278
129. Salkowski, C. A., Detore, G., Franks, A., Falk, M. C., Vogel, S. N. Pulmonary and hepatic gene expression following cecal ligation and puncture: monophosphoryl lipid A prophylaxis attenuates sepsis-induced cytokine and chemokine expression and neutrophil infiltration. *Infect. Immun.* 66 (1998) 3569-3578
130. Scheidereit, C. Signal transduction. Docking I kappa B kinases. *Nature* 395 (1998) 225-226
131. Scherer, D. C., Brockman, J. A., Chen, Z., Maniatis, T., Ballard, D. W. Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 11259-11263

132. Schumann, R. R., Leong, S. R., Flaggs, G. W., Gray, P. W., Wright, S. D., Mathison, J. C., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249 (1990) 1429-1431
133. Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C., Karin, M. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293 (2001) 1495-1499
134. Shor, A., Kuo, C. C., Patton, D. L. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. *S. Afr. Med. J.* 82 (1992) 158-161
135. Siebenlist, U., Franzoso, G., Brown, K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10 (1994) 405-455
136. Simeonidis, S., Liang, S., Chen, G., Thanos, D. Cloning and functional characterization of mouse IkappaBepsilon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 14372-14377
137. Stancovski, I., Baltimore, D. NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed? *Cell* 91 (1997) 299-302
138. Stein, B., Baldwin, A. S. Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 7191-7198
139. Sweet, M. J., Hume, D. A. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 60 (1996) 8-26



140. Tak, P. P., Firestein, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 7-11
141. Takeda, K., Takeuchi, O., Tsujimura, T., Itami, S., Adachi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Yoshikawa, K., Terada, N., Akira, S. Limb and skin abnormalities in mice lacking IKKalpha. *Science* 284 (1999) 313-316
142. Thanos, D., Maniatis, T. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 80 (1995) 529-532
143. Thompson, J. E., Phillips, R. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Ghosh, S. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* 80 (1995) 573-582
144. Tojima, Y., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., Karin, M., Nakanishi, M. NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature* 404 (2000) 778-782
145. Ulevitch, R. J., Tobias, P. S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* 13 (1995) 437-457
146. Vink, A., Poppen, M., Schoneveld, A. H., Roholl, P. J., de Kleijn, D. P., Borst, C., Pasterkamp, G. Distribution of *Chlamydia pneumoniae* in the human arterial system and its relation to the local amount of atherosclerosis within the individual. *Circulation* 103 (2001) 1613-1617

147. Wallin, R. P., Lundqvist, A., More, S. H., von Bonin, A., Kiessling, R., Ljunggren, H. G. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol* 23 (2002) 130-135
148. Whiteside, S. T., Epinat, J. C., Rice, N. R., Israel, A. I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *EMBO J.* 16 (1997) 1413-1426
149. Whiteside, S. T., Israel, A. I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin. Cancer Biol.* 8 (1997) 75-82
150. Wick, G. Atherosclerosis--an autoimmune disease due to an immune reaction against heat-shock protein 60. *Herz* 25 (2000) 87-90
151. Williams, D. L., Ha, T., Li, C., Kalbfleisch, J. H., Ferguson, D. A. Early activation of hepatic NFkappaB and NF-IL6 in polymicrobial sepsis correlates with bacteremia, cytokine expression, and mortality. *Ann. Surg.* 230 (1999) 95-104
152. Woronicz, J. D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M., Goeddel, D. V. IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science* 278 (1997) 866-869
153. Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., Mathison, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249 (1990) 1431-1433

154. Wulczyn, F. G., Krappmann, D., Scheidereit, C. The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J. Mol. Med.* 74 (1996) 749-769
155. Xiao, G., Sun, S. C. Negative regulation of the nuclear factor kappa B-inducing kinase by a cis-acting domain. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 21081-21085
156. Xu, Q., Schett, G., Perschinka, H., Mayr, M., Egger, G., Oberhollenzer, F., Willeit, J., Kiechl, S., Wick, G. Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population. *Circulation* 102 (2000) 14-20
157. Yamamoto, Y., Gaynor, R. B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 135-142
158. Yang, F., Tang, E., Guan, K., Wang, C. Y. IKK beta plays an essential role in the phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 induced by lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 170 (2003) 5630-5635
159. Yang, S. R., Chida, A. S., Bauter, M. R., Shafiq, N., Seweryniak, K., Maggirwar, S. B., Kilty, I., Rahman, I. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF- $\kappa$ B and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291 (2006) L46-57
160. Yin, L., Wu, L., Wesche, H., Arthur, C. D., White, J. M., Goeddel, D. V., Schreiber, R. D. Defective lymphotoxin-beta receptor-induced NF-kappaB transcriptional activity in NIK-deficient mice. *Science* 291 (2001) 2162-2165

- 
161. Zandi, E., Karin, M. Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the IkappaB kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 4547-4551
162. Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., Karin, M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 91 (1997) 243-252

## 7. Publikationen

1. Bell S., Degitz K., Quirling M., Jilg N., Page S., Brand K. Involvement of NF-kappaB signalling in skin physiology and disease. *Cell Signal* 15 (2003) 1-7
2. Donath B., Fischer C., Page S., Jilg N., Weber M., da Costa C., Neumeier D., Miethke T., Brand K. *Chlamydia pneumoniae* activates IKK/I kappa B-mediated signaling, which is inhibited by 4-HNE and following primary exposure. *Atherosclerosis* 165 (2002) 79-88
3. Quirling M., Page S., Jilg N., Plenagl K., Peus D., Grubmüller C., Weingartner M., Fischer C., Neumeier D., Brand K. Detection of IKKbeta-IKKgamma subcomplexes in monocytic cells and characterization of associated signaling. *J Biol Chem* 279 (2004) 37452-37460

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität München in der molekularbiologischen Forschungsgruppe von Herrn Prof. Dr. K. Brand durchgeführt. Dem Direktor des Instituts, Herrn Prof. Dr. D. Neumeier sowie Herrn Prof. Dr. Brand möchte ich für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Brand für die interessante Themenstellung, die intensive wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertation sowie seine engagierte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Miethke und Frau Dr. Clarissa da Costa (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene) bedanke ich mich für die Bereitstellung von chlamydialem Hsp60.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Brand bedanken: Frau Dr. Martina Quirling gilt mein besonderer Dank für Unterstützung und Rat bei der Durchführung der Experimente sowie für die Durchsicht des vorliegenden Manuskripts. Ebenso danke ich Frau Dr. Claudia Fischer, Frau Dr. Sharon Page, Frau Dr. Marion Wagner, Frau Dr. Bernadette Donath, Frau Tamara Eisele, Frau Dr. Carmen Sydlik, Frau Dr. Caroline Nothdurfter, Herrn Dr. Bastian Baumgartner, Frau Christine Grubmüller, Frau Katharina Plenagl, Herrn Dr. Christian Hafner sowie Herrn Dr. Peter Heiß.

Meinen Eltern möchte ich für ihre außerordentliche Unterstützung danken.