

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Technischen Universität München

**Charakterisierung von IKKbeta/IKKgamma-Subkomplexen in
monozytären Zellen**

Katharina Plenagl

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 06.09.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 21.03.2007 angenommen.

Gewidmet
meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	NF- κ B-System.....	1
1.1.1	NF- κ B/Rel-Transkriptionsfaktoren.....	1
1.1.2	I κ B-Inhibitorproteine	2
1.1.3	Aktivierung des NF- κ B-Systems	2
1.1.4	IKK-Komplex	3
1.1.4.1	Aufbau des IKK-Komplexes	3
1.1.4.2	Aktivierung des IKK-Komplexes	7
1.1.5	IKK-Subkomplexe	8
1.1.5.1	Weitere Bestandteile des IKK-Komplexes.....	8
1.1.5.2	IKK β /IKK γ -Subkomplexe.....	9
1.1.6	TNF, ein Aktivator des NF- κ B-Systems	10
1.2	Fragestellung	11
2	Material und Methodik	12
2.1	Material	12
2.1.1	Antikörper.....	12
2.1.2	Reagenzien.....	12
2.1.3	Plasmide	12
2.2	Methodik	13
2.2.1	Zellkultur	13
2.2.2	Endotoxin-Test.....	14
2.2.3	Zytotoxizitätstest (WST-Test)	14
2.2.4	Isolierung zytosolischer und nukleärer Extrakte	14
2.2.5	Transfektion und Überexpression	15
2.2.6	Western blot-Analyse	16
2.2.7	Immunpräzipitation und Assoziationsassay	16
2.2.8	Immunpräzipitation und Kinaseassay	17
2.2.9	Immundepletion	18
2.2.10	Statistische Auswertung	18

3	Ergebnisse	19
3.1	Nachweis von endogenen IKK β /IKK γ -Subkomplexen in monozytären Zellen	19
3.1.1	Isolierung von IKK β /IKK γ -Subkomplexen mittels Immundepletion.....	19
3.1.2	Densitometrische Analyse der Immundepletionsexperimente	20
3.2	Aktivierbarkeit von endogenen monozytären IKK β /IKK γ -Subkomplexen durch TNF	21
3.2.1	Stimulierbarkeit der IKK β /IKK γ -Subkomplexe durch TNF	21
3.2.2	Vergleichbare Aktivierung von IKK β /IKK γ -Subkomplexen und „klassischen“ IKK-Komplexen.....	22
3.3	NIK ist an der IKK β /IKK γ -Subkomplex-vermittelten Signalübertragung nicht beteiligt	23
3.3.1	Aktivierung der „klassischen“ IKK-Komplexe durch überexprimiertes NIK-Protein.....	24
3.3.2	IKK β /IKK γ -Subkomplexe werden durch Überexpression von NIK nicht aktiviert	24
3.4	Proteolysemuster von I κ B α in Wildtyp- und IKK α ^{-/-} -Fibroblasten.....	26
3.4.1	Verlangsamte Proteolyse von I κ B α in IKK α ^{-/-} -Fibroblasten.....	27
3.4.1.1	I κ B α -Degradierung in Abhängigkeit vom Vorhandensein von IKK α	27
3.4.1.2	Verzögerte I κ B α -Proteolyse in IKK α -Knock out-Fibroblasten.....	28
3.4.2	Analyse der I κ B α -Proteolyse	29
3.4.3	Verminderte I κ B α -Phosphorylierung in Abwesenheit von IKK α	29
3.5	Proteolyseverhalten von I κ B ϵ in Abwesenheit von IKK α	31
3.5.1	Dosiswirkungsbeziehung.....	31
3.5.1.1	I κ B ϵ -Degradierung bei steigender TNF-Dosis	31
3.5.1.2	Densitometrische Auswertung	32
3.5.2	Charakterisierung der I κ B ϵ -Proteolyse in Zeitverlaufsexperimenten.....	33
3.5.2.1	TNF-vermittelte I κ B ϵ -Degradierung in Abhängigkeit von IKK α	33
3.5.2.2	Densitometrische Analyse	34
4	Diskussion	35
4.1	Endogene IKK β /IKK γ -Subkomplexe <i>in vivo</i>	35
4.2	TNF-Aktivierung der IKK β /IKK γ -Subkomplexe	35
4.3	Keine Aktivierbarkeit der IKK β /IKK γ -Komplexe durch NIK.....	36

4.4	Verlangsamte Proteolyse von I κ B α	37
4.5	Keine Effekte auf die I κ B ϵ -Proteolyse	38
4.6	IKK α - ein „Turbo-Molekül“?	38
4.7	Therapeutische Ansatzpunkte.....	41
5	Zusammenfassung	42
6	Literaturverzeichnis	44
7	Anhang.....	52
7.1	Publikation.....	52
7.2	Kongressbeiträge	52
7.3	Abkürzungen	53
7.4	Danksagung	57

1 Einleitung

Der Transkriptionsfaktor Nuklearfaktor- κ B (NF- κ B) besitzt eine große pathophysiologische Relevanz bei der Regulation zahlreicher Gene. Bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen spielt er eine zentrale Rolle, wie etwa bei immunologischen Vorgängen, bei der Proliferation, Differenzierung oder Apoptose (3,4,21,34,35,49,108,110). Es ist anzunehmen, dass er sowohl bei der Entstehung und Aufrechterhaltung akuter und chronischer Entzündung als auch maligner Krankheiten beteiligt ist (5,6,10,12,20,36,94,108,110). Durch die genauere Untersuchung dieses regulatorischen Systems erhofft man sich neue Ansätze für die Diagnostik und Therapie vieler Erkrankungen zu finden.

1.1 NF- κ B-System

1.1.1 NF- κ B/Rel-Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren der NF- κ B/Rel-Familie bestehen aus zwei Untereinheiten, die miteinander Homo- oder Heterodimere bilden. Der bisher am häufigsten identifizierte dimere NF- κ B-Komplex ist aus den Untereinheiten p50 und p65 (RelA) aufgebaut (34). Weiterhin wurden als Untereinheiten c-Rel, p52 oder RelB, sowie die Vorläuferproteine p105 (p50) und p100 (p52) gefunden (3,4,6,34,38,67,92). All diesen Proteinen gemeinsam ist die sogenannte Rel-Homologie-Domäne (RHD, 300 Aminosäuren). Diese besteht aus einem Helix-Loop-Helix (HLH)-Motiv mit positiv geladenen Aminosäuren zur DNA-Bindung und einem sich anschließenden Bereich, der für die Dimerisierung (Dimerisierungsdomäne, DD) und die nukleäre Translokation („nuclear localization sequences“, NLS) (34,67,78,92) verantwortlich ist. Sowohl die NLS als auch die C-terminal zur NLS gelegene Region der RHD ermöglichen eine Bindung mit den inhibitorischen κ B-Proteinen (I κ B) (78). Zusätzlich verfügt z.B. p65 über einen N-terminalen Anteil in der RHD, die NF- κ B/Rel/dorsal (NRD)-Domäne, welche ebenfalls für die Wechselwirkung mit den I κ B-Proteinen verantwortlich ist (4,78).

1.1.2 I κ B-Inhibitorproteine

Der dimere NF- κ B-Komplex liegt im Zytoplasma der Zelle gebunden an Inhibitorproteine, I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ , vor und wird dadurch neutralisiert (3,34,35,101,102,106). Ebenso können aber auch die NF- κ B-Vorläuferproteine p105 (I κ B γ) und p100 (I κ B δ) inhibitorische Funktionen übernehmen (4,67,92). Die I κ B-Proteine besitzen drei bedeutende Regionen: eine N-terminale Signal-Empfänger-Domäne („signal receiving domain“, SRD), einen zentralen Bereich mit mehreren Ankyrin-Motiven („ankyrin repeat domain“, ARD) und C-terminal eine säurehaltige PEST („proline-, glutamic acid-, serine- and threonin-rich region“)-ähnliche Domäne (6,34,67,78). Die ARD ist für die Bindung an die NF- κ B-Dimere und die Maskierung der NLS verantwortlich. Über die PEST-Region wird Kontakt mit der N-terminalen Domäne von p65 aufgenommen (78). Die Vorläuferproteine p105 und p100 verfügen sowohl über die für die NF- κ B-Proteine typische RHD als auch eine C-terminale ARD, was wiederum deren beide gegensätzliche Funktionen zeigt (34).

1.1.3 Aktivierung des NF- κ B-Systems

Das NF- κ B-System kann durch mehr als 150 verschiedene Stimuli und Bedingungen aktiviert werden. Hierzu gehören Wachstumsfaktoren, proinflammatorische Zytokine wie etwa der Tumornekrosefaktor (TNF, TNF- α) oder Interleukin-1 (IL-1), Bakterien und bakterielle Produkte wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS) sowie Viren und virale Produkte. Ebenso können physikalische (ultraviolette Strahlen), oxidative (oxidiertes Low Density-Lipoprotein, oxLDL), oder umweltbedingte (Schwermetalle, Zigarettenrauch) Stressfaktoren eine Aktivierung von NF- κ B auslösen (4,6,11,19,34,38,74,92).

Eine Stimulierung der Zelle führt zunächst zu einer Phosphorylierung der I κ B-Proteine durch einen hochmolekularen Proteinkomplex, der gemeinhin als I κ B-Kinase (IKK)-Komplex bezeichnet wird. Dieser phosphoryliert die Inhibitorproteine an zwei spezifischen N-terminalen Serinresten in der SRD: I κ B α an Serin³²/Serin³⁶, I κ B β an Serin¹⁹/Serin²³ und I κ B ϵ an Serin¹⁸/Serin²² (29,106). Anschließend erfolgt eine ubiquitinabhängige Markierung an zwei spezifischen Lysinresten, z.B. bei I κ B α an Lysin²¹/Lysin²² (26,29,87). Dies initiiert den proteolytischen Abbau des Inhibitorproteins durch das 26S Proteasom, einem multikatalytischen Proteasekomplex (3,39,88,92,101,105). Die Degradierung des Inhibitors

setzt NF- κ B frei, das durch I κ B als inaktive Form im Zytosol gehalten wird; am häufigsten handelt es sich dabei um p50/p65 (RelA) (3,92,101). Dies erlaubt die Translokation des nun freien und somit aktivierten NF- κ B-Dimers in den Zellkern, wo dieser Transkriptionsfaktor an regulatorische κ B-Promotor- und Enhancer-Elemente bindet und dadurch die spezifische Expression verschiedener Gene kontrolliert (Abb. 1) (3,4,6,48,67). Neben diesem universellen Signalweg sind nur wenige Ausnahmen bekannt, wie etwa die Aktivierung von NF- κ B durch ultraviolette Strahlung. Obwohl diese von einem Abbau von I κ B abhängig zu sein scheint, wird I κ B N-terminal nicht phosphoryliert (16,56).

Durch die Aktivierung von NF- κ B kommt es zur Induktion von mehr als 150 Genen. Diese kodieren u.a. für Zytokine (TNF, IL-1, IL-6, IL-8), Chemokine wie u.a. MCP-1 („monocyte chemotactic protein-1“), Zelladhäsionsmoleküle, z.B. ICAM-1 („intercellular adhesion molecule-1“) oder VCAM-1 („vascular cell adhesion molecule-1“), Wachstumsfaktoren, Proteasen und prokoagulatorische Proteine, die mit Entzündung und Immunantwort, aber auch mit Proliferation und Apoptose einhergehen (101,108). Darüber hinaus induziert NF- κ B die Produktion von Proteinen, die ihrerseits NF- κ B aktivieren, wie etwa TNF oder IL-1 (74). I κ B α unterliegt ebenso der transkriptionellen Kontrolle von NF- κ B, wodurch das System eine strenge Autoregulation erfährt.

Die unterschiedlichen Signalwege, die zu einer Aktivierung der NF- κ B/Rel-Familie und folglich auch zu einer Expression der entsprechenden Zielgene führen, sind nur teilweise verstanden. Diese stellen möglicherweise attraktive Ansatzpunkte für spezifische therapeutische Möglichkeiten bei Inflammation oder Tumorerkrankungen dar (7,12,66,110).

1.1.4 IKK-Komplex

1.1.4.1 Aufbau des IKK-Komplexes

Der initiale Schritt der I κ B-Degradierung und somit der NF- κ B-Aktivierung ist die Phosphorylierung der Inhibitorproteine. Dies wird über den IKK-Komplex vermittelt, der somit einen entscheidenden Schritt bei der Regulation des NF- κ B/Rel-Systems darstellt (34,44). Der eigentliche Komplex besteht aus drei Untereinheiten: IKK α (IKK1; 85 kDa), IKK β (IKK2; 87 kDa) und IKK γ (auch bekannt unter dem Namen „NF- κ B essential

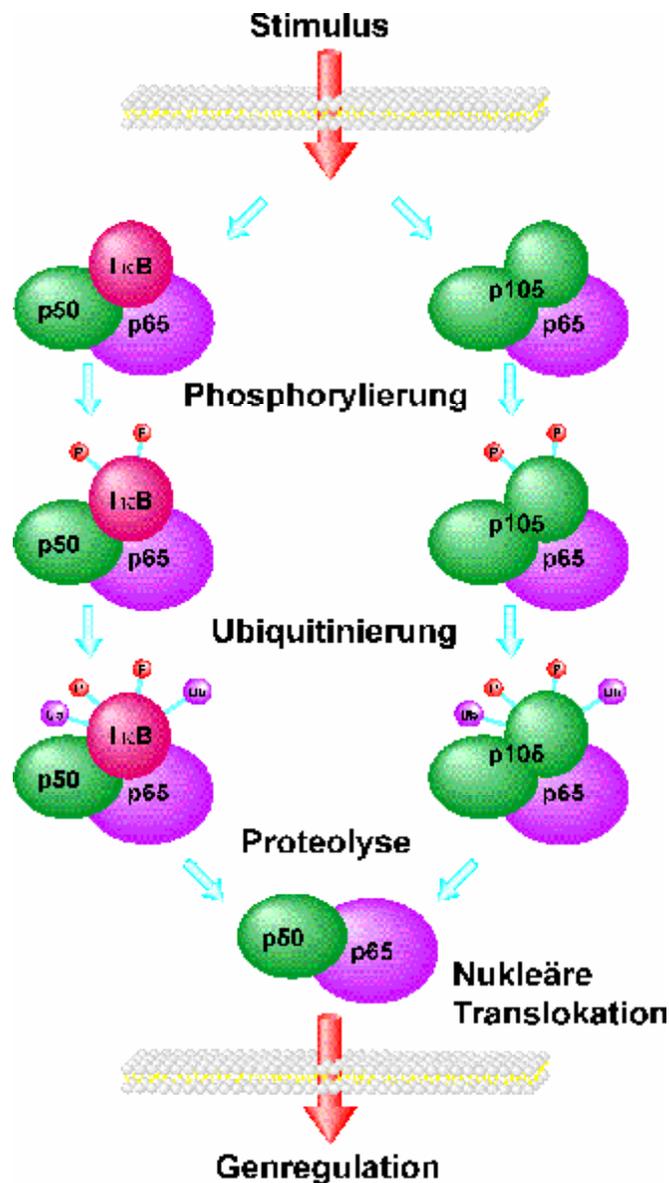


Abbildung 1: Aktivierungsschema von NF-κB. Eine Stimulierung der Zelle führt zur Phosphorylierung und Ubiquitinmarkierung von IκB sowie p105/p100 und liefert damit das Signal für deren Proteolyse. Der aktivierte NF-κB-Komplex wandert in den Zellkern und steuert dort durch Bindung an regulatorische κB-Promotor- und Enhancer-Elemente unterschiedlicher Gene deren Transkription.

modulator“, NEMO; „IKK-associated protein 1“, IKKAP1; 50 und 52 kDa) (Abb. 2) (30,68,69,83,86,107,112,116). IKK α und IKK β sind kinaseaktive Komponenten dieses Komplexes, während es sich bei IKK γ um ein Adapter- oder Gerüstprotein handelt, das für die Stabilisierung des IKK-Komplexes und/oder die Regulation der Kinaseaktivität zuständig ist (1,34,44,68,89,99,112).

Die I κ B-Kinasen IKK α und IKK β weisen eine sehr ähnliche Primärstruktur mit einer etwa 52 %-igen Identität auf. Zudem verfügen sie über eine N-terminale Serin-Threonin-Kinasedomäne (KD) und ein C-terminales HLH-Motiv, das die Aktivität der KD reguliert und für die Interaktion mit dem regulatorischen Adapter IKK γ erforderlich ist. Zwischen diesen beiden Regionen liegt eine Leucin-Zipper (LZ)-ähnliche amphipathische α -Helix, welche für die Formierung der Heterodimere aus IKK α und IKK β benötigt wird (29,93,107,116). Während die wichtigste Aufgabe von IKK β die Phosphorylierung der I κ B-Proteine im Zytosol ist, wird IKK α ebenso im Nucleus gefunden. Dort bindet IKK α an Promotorregionen von NF- κ B-regulierten Genen, phosphoryliert Histon H3 an Serin 10 und nimmt somit an der Regulierung der Genexpression teil (2,111). Neben der großen Ähnlichkeiten von IKK α und IKK β im IKK-Komplex können beide Kinasen jedoch auch sehr unterschiedliche Funktionen übernehmen (89).

Das Adapterprotein IKK γ besteht aus drei α -helikalen Strukturen, welche ein LZ-Motiv beinhalten, das als Bindungsstelle für I κ B-Kinasen agieren kann (68,86,112). Es wurde gezeigt, dass rekombinantes IKK γ direkt mit rekombinantem IKK β , nicht jedoch mit IKK α interagiert (48) und dass IKK γ die Interaktion von IKK β mit I κ B α ermöglicht (110). Bisher konnte jedoch nicht sicher nachgewiesen werden, ob IKK γ *in vivo* nicht auch an IKK α binden kann (38). IKK γ liegt im IKK-Komplex als Di-, Tri- oder Tetramer vor. Dabei wird postuliert, dass die Anzahl an enthaltenem IKK γ -Protein für den Aktivierungszustand des IKK-Komplexes verantwortlich ist (1,99). Zudem konnte gezeigt werden, dass auch die ubiquitinabhängige Modifikation von IKK γ die Aktivierung des IKK-Komplexes reguliert (98). In Fibroblasten von IKK γ ^{-/-}-Mäusen kann weder der IKK-Komplex noch NF- κ B nach TNF-, LPS- oder IL-1-Stimulierung aktiviert werden (112). Sowohl diese als auch weitere Experimente beweisen, dass IKK γ für die NF- κ B-Aktivierung essentiell ist, und dass insbesondere der C-Terminus dieses Moleküls für die Rekrutierung von oberhalb gelegenen Aktivatoren ausschlaggebend ist (14,47,80,86).

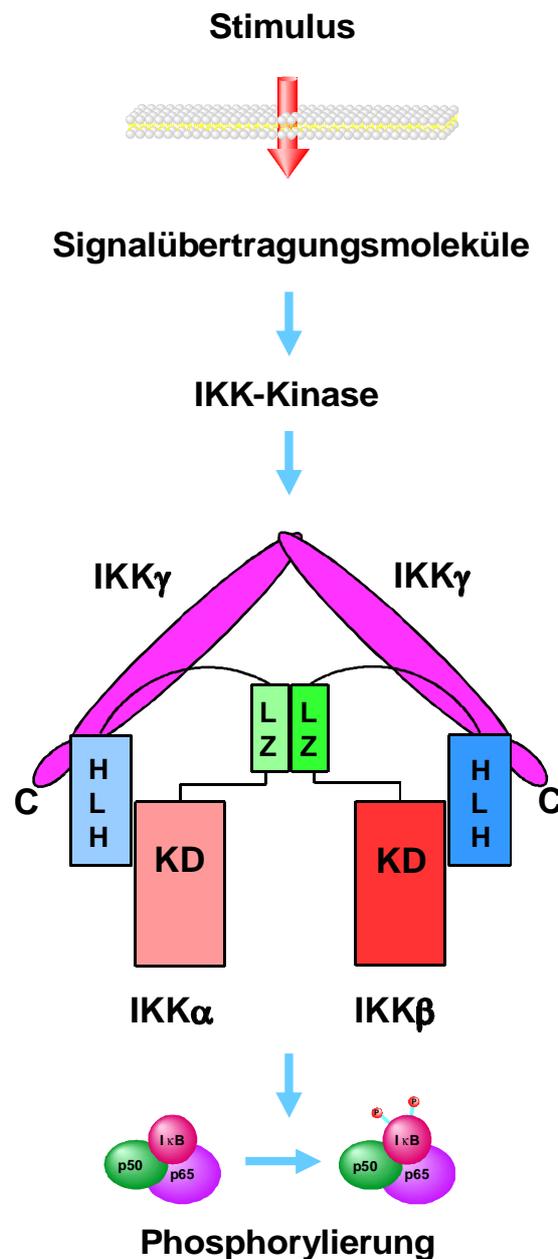


Abbildung 2: Die zentrale Rolle des IKK-Komplexes im NF- κ B-Signalweg. Der IKK-Komplex besteht aus den kinaseaktiven Untereinheiten IKK α und IKK β , die über eine Helix-Loop-Helix (HLH)-Domäne, eine Leucin-Zipper (LZ)-Struktur, sowie eine Kinasedomäne (KD) verfügen. Diese sind für die Phosphorylierung der I κ B-Proteine verantwortlich. Eine weitere Komponente des Komplexes ist das Adapterprotein IKK γ , welches IKK α und IKK β 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.

Die Aktivierung des IKK-Komplexes hängt von der Phosphorylierung der IKK α - und IKK β -Untereinheiten an Serin¹⁷⁶/Serin¹⁸⁰ bzw. Serin¹⁷⁷/Serin¹⁸¹ im Aktivierungs-Loop der Kinasedomäne durch sogenannte IKK-Kinasen ab (46,69). Diverse Experimente zeigen, dass die Phosphorylierung von IKK β ausreicht, um den IKK-Komplex nach Stimulierung mit proinflammatorischen Zytokinen zu aktivieren (27,46). Für die Erklärung der Regulation der IKK-Aktivität wird ein dreistufiges Modell postuliert: Der inaktive Komplex ist an der katalytischen Untereinheit nicht phosphoryliert. Infolge einer Stimulierung der Zelle werden IKK-Kinasen aktiviert und über die IKK γ -Untereinheit an den IKK-Komplex rekrutiert. Dies führt zu einer Phosphorylierung und folglich Aktivierung von IKK β , das wiederum durch intramolekulare Autophosphorylierung sowohl die IKK α -Untereinheit, als auch IKK γ phosphoryliert. Der aktivierte Komplex phosphoryliert I κ B, während IKK β C-terminal autophosphoryliert und herunterreguliert wird, um einer zu langen Aktivierung von NF- κ B vorzubeugen (27,33,47,81,91,115).

Weiterhin wurde ein Phorbol-ester-induzierbarer I κ B-Kinase-Komplex identifiziert, der IKK ϵ enthält (77). Sowohl dieser, als auch Experimente mit UV-Licht (16), lassen die Existenz zusätzlicher, möglicherweise gewebespezifischer I κ B-Kinasen, neben dem „klassischen“ IKK-Komplex bestehend aus IKK α , IKK β und IKK γ , vermuten. Nach wie vor weiß man jedoch zu wenig über diese Signalwege, weshalb deren Bedeutung für die IKK-Aktivierung umstritten ist.

1.1.4.2 Aktivierung des IKK-Komplexes

Dem IKK-Komplex vorgeschaltete Signalwege sind nur wenig detailliert untersucht. Die Signalübertragung erfolgt durch sogenannte IKK-Kinasen, die den IKK-Komplex als Antwort auf verschiedene Stimuli aktivieren. Es wurde gezeigt, dass NIK (NF- κ B-induzierende Kinase) *in vitro* nach TNF-Stimulierung bevorzugt IKK α und nur zu einem geringen Grad IKK β phosphoryliert (63,65). NIK interagiert mit IKK α über dessen C-terminale Region. Dies scheint für die Rolle von NIK bei der NF- κ B-Signalübertragung notwendig zu sein (62,83,107,109). Experimente mit Zellen aus NIK^{-/-}-Mäusen geben Hinweise darauf, dass NIK nicht in die IKK-Aktivierung nach Stimulierung mit TNF oder IL-1 involviert ist (48). Ferner ergaben Studien, dass NIK eine zentrale Aufgabe z.B. bei der Prozessierung von p100 hat und von der katalytischen Aktivität des im Signalweg unterhalb liegenden IKK α reguliert

wird (32,95,107). Ebenso wird die Existenz von weiteren Kinasen angenommen, die den IKK-Komplex phosphorylieren und somit aktivieren. Ein Beispiel hierfür ist MEKK-1 („mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1“), das *in vitro* bevorzugt IKK β und in einem geringeren Maße auch IKK α phosphoryliert (27,54,72). Jedoch zeigen Studien mit Monozyten/Makrophagen und Fibroblasten von MEKK-1-defizienten Mäusen keinen messbaren Defekt in der Aktivierung von NF- κ B nach TNF- oder IL-1-Stimulierung (113). Weiterhin aktiviert NAK (NF- κ B-aktivierende Kinase) als eine andere IKK-bezogene Kinase nach Stimulierung durch Phorbol ester oder Wachstumsfaktoren den IKK-Komplex durch direkte Phosphorylierung der IKK β Untereinheit (103). Zudem werden noch Akt (Proteinkinase B) sowie verschiedene PKC (Proteinkinase C)-Isoformen als IKK-Kinasen diskutiert (48).

1.1.5 IKK-Subkomplexe

1.1.5.1 Weitere Bestandteile des IKK-Komplexes

Frühere Studien weisen darauf hin, dass IKK ein großer Komplex mit variierender Größe zwischen 700 und 900 kDa ist. Das relativ hohe und variable Molekulargewicht der bisher gefundenen IKK-Komplexe könnte auf die Anwesenheit zusätzlicher Komponenten neben IKK α , IKK β und IKK γ zurückgeführt werden. Einige Studien konnten Cdc 37 („cell division control 37“), Hsp 90 (Hitzeschockprotein 90) und Hsp 27, und kürzlich auch ELKS (benannt nach den sehr häufig vorkommenden Aminosäuren Glutaminsäure (E), Leucin (L), Lysin (K) und Serin (S)) als weitere Komponenten des durch TNF-induzierbaren IKK-Komplexes identifizieren (24,31,76). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass Hsp 70 mit der IKK γ -Untereinheit eine supramolekulare Struktur bilden kann (1). Als weitere Ursache für das unterschiedliche Molekulargewicht wäre eine Polymerisierung der oben genannten Bestandteile möglich (34,69,90,107). Zudem wird diskutiert, dass verschiedene Kinasen oder Adapterproteine mit dem eigentlichen IKK-Komplex assoziieren (34,43). So wurde eine Reihe assoziierter Proteine identifiziert wie etwa die bereits oben beschriebene Kinase NIK (62,107,109), Act-1 (NF- κ B-Aktivator 1) (60) und CIKS („connection to IKK and SAPK/JNK“) (55), die als Komponenten spezifischer IKK-Subkomplexe postuliert werden.

1.1.5.2 IKKb/IKKg-Subkomplexe

Zu Beginn der vorliegenden Studie war nicht bekannt, ob neben der „klassischen“ IKK α /IKK β /IKK γ -Konfiguration *in vivo* auch Komplexe existieren, die nur aus IKK β und IKK γ (ohne IKK α) zusammengebaut sind (68). Sowohl IKK α als auch IKK β können rekombinant Homo- und Heterodimere bilden, was die Vermutung nahe legt, dass ähnliche IKK-Komplexe auch *in vivo* existieren (116). Des Weiteren hat die komplette rekombinante Rekonstitution der IKK-Proteine in Hefe gezeigt, dass der IKK-Komplex aus $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ aber auch $\beta 2\gamma 2$ bestehen könnte (70). Für die Ausbildung eines kinaseaktiven Komplexes ist in jedem Fall jedoch die Dimerisierung zweier kinaseaktiver Untereinheiten notwendig (114,116).

Anhand von Studien mit IKK α - und/oder IKK β -Knock out-Mäusen wurde bereits untersucht, ob diese an sich sehr ähnliche Kinasen unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Wie erwartet konnten IKK α /IKK β Doppel-Knock out-Mäuse nicht mehr auf verschiedene Stimuli für NF- κ B reagieren (57). Außerdem verifizierten Experimente in IKK β ^{-/-}-Zellen, dass dieses Molekül für die Aktivierung des IKK-Komplexes durch unterschiedliche proinflammatorische Stimuli und die weitere Phosphorylierung von I κ B essentiell ist (59,61,73,97). Interessanterweise kann der IKK-Komplex in genetischen Experimenten mit IKK α ^{-/-}-Mäusen aktiviert werden. Dementsprechend ist die DNA-Bindung von NF- κ B als Antwort auf proinflammatorische Stimuli induzierbar. Es ist naheliegend, dass in diesem Fall artifizielle (da IKK α fehlt) aber dennoch funktionelle IKK β /IKK γ -Komplexe gebildet werden (41,42,57,96). Die Bedeutung von IKK α wird in einer Beteiligung an spezifischen Signalwegen, wie etwa verschiedenen proliferativen Prozessen oder Differenzierungsvorgängen, vermutet (41-43,47,57,96,115). Zusätzlich ist mittlerweile bekannt, dass IKK α für die IKK-Aktivierung durch ein alternatives Set an Signalen, welche von IKK β unabhängig ist, essentiell ist (34,90). So wurde bewiesen, dass IKK α für die B-Zell-Reifung, die Bildung von sekundären lymphoiden Organen, die erhöhte Expression von bestimmten NF- κ B-Zielgenen sowie die Prozessierung des p52-Vorläufers p100 nötig ist (90).

1.1.6 TNF, ein Aktivator des NF- κ B-Systems

Neben zahlreichen Zelltypen produzieren auch einige Tumoren das Zytokin TNF, ein Mediator bei immunologischen, entzündlichen und malignen Prozessen (9,11,13,18,52,75,104). TNF übernimmt in der Zelle wichtige Aufgaben, wie etwa bei der Proliferation, Differenzierung und Apoptose (11,75). Eine Dysregulation der TNF-Expression oder der TNF-Signalübertragung scheint an der Pathologie vieler chronischer Krankheiten, wie z.B. Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis, multiple Sklerose und Alzheimer-Erkrankung, mitverantwortlich zu sein (11,17,18,75). Eine erhöhte systemische Produktion von TNF geht mit Sepsis und septischem Schock, Fieber, Akute-Phase-Reaktionen sowie Prozessen, die zur Kachexie führen, einher (11,13,75,104). TNF kann auf Tumorzellen sowohl zytotoxisch als auch wachstumsstimulierend wirken (8,9,100). Bei einigen malignen Prozessen, wie etwa dem Mamma-, Blasen-, Prostata- und Colon-Karzinom sowie Lymphomen und Leukämien, wird ebenfalls eine erhöhte Produktion dieses Zytokins gefunden, was wiederum mit einer schlechten Prognose verbunden ist (8,9). Die Entwicklung von TNF-Hemmstoffen scheint daher ein erfolgversprechender Therapieansatz zu sein. Derzeit sind bereits zwei Präparate bei Morbus Crohn und rheumatoider Arthritis zugelassen: Infliximab, ein chimärer monoklonaler TNF-Antikörper und Etanercept, ein lösliches dimeres Fusionsprotein, das zwei Ligandenbindungsstellen des TNF-Rezeptors II (TNFR_{II}) besitzt (15,45).

Der TNF-Signalweg, welcher zur Aktivierung des IKK-Komplexes führt, ist relativ gut untersucht. TNF kann an zwei verschiedene Rezeptoren, nämlich TNFR_I (p55) und TNFR_{II} (p75), binden und dadurch seine Wirkung induzieren. Zum einen führt dies zu einer Aktivierung der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 (10,11), zum anderen werden durch Aktivierung der Caspasen-Kaskade verschiedene apoptoseassoziierte Prozesse ausgelöst (11,23,49). Nach der Bindung von TNF an TNFR_I oder II folgt die Trimerisierung des jeweiligen Rezeptors und die Anlagerung spezifischer Signalproteine an dessen zytoplasmatischen Anteil. Die TNFR_I-vermittelte Aktivierung führt zur Bildung eines Multiprotein-Signalkomplexes. Zuerst bindet TRADD („TNFR_I-associated death domain protein“), ein Verknüpfungsglied für mindestens drei weitere Adapterproteine (RIP1, „receptor-interacting protein 1“; FADD, „Fas-associated death domain protein“; TRAF2, „TRFR-associated factor 2“) (11,25,117). Eine Bindung von TNF an TNFR_{II} führt zu der direkten Anlagerung von TRAF2, das wiederum TRAF1 bindet (84,85). TRAF2 führt zur Anlagerung von IKK β an den Rezeptorkomplex und die IKK-Aktivierung erfolgt durch eine

nicht-enzymatische Interaktion zwischen RIP und IKK γ . Dies bewirkt die Phosphorylierung und im Weiteren die Degradierung der NF- κ B-Inhibitorproteine I κ B und somit die Aktivierung von NF- κ B (25,28,34,117).

1.2 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von IKK-Subkomplexen bei der TNF-induzierten Signalübertragung näher zu charakterisieren.

- Hierfür wurden initial Experimente durchgeführt, die zeigten, dass es im Zytosol monozytärer Zellen endogene IKK-Subkomplexe gibt, die neben dem Adaptor IKK γ nur IKK β , jedoch nicht IKK α , als kinaseaktive Untereinheit enthalten.
- Anschließend wurden die Signalwege, die mit diesen IKK-Subkomplexen in Verbindung stehen, weiter untersucht: Als erstes wurde eine Aktivierbarkeit dieser möglichen IKK-Subkomplexe durch TNF geprüft. Eine Beteiligung dieser IKK-Subkomplexe an der NIK-vermittelten Signalkaskade wurde in einem weiteren Schritt untersucht. Weiterhin folgten Untersuchungen zum Proteolysemuster der inhibitorischen I κ B-Proteine I κ B α und I κ B ϵ in Abhängigkeit von dem Vorhandensein von IKK α .

Die vorliegende Arbeit soll dabei helfen, den molekularen Wirkungsmechanismus des NF- κ B-Systems nach Stimulierung mit TNF besser zu verstehen. Dies könnte einen wichtigen Beitrag für die Entwicklung neuer therapeutischer und diagnostischer Ansatzpunkte für entzündliche oder maligne Erkrankungen bieten.

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

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

IKK α	monoklonaler Maus-Ak (mAk), Subtyp IgG1 (Alexis Biochemicals, Grünberg) mAk, Subtyp IgG2b (BD Biosciences, Heidelberg)
IKK β	mAk, Subtyp IgG1 (BioCarta Europe, Hamburg)
IKK γ	polyklonaler Ak (pAk) (Santa Cruz Biotechnology) monoklonaler Maus-Ak (Pharmingen)
NIK	pAk gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
Aktin	pAk gegen C-Terminus (Sigma, Deisenhofen)
I κ B α	pAk gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
I κ B ϵ	pAk gegen C-Terminus (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) wurde von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Alle weiteren Reagenzien stammten von den Firmen E. Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma und entsprachen der „Qualität zur Synthese“.

2.1.3 Plasmide

In den Transfektionsstudien wurden Überexpressionsplasmide für verschiedene Proteine verwendet. Dabei kamen folgende Plasmide anderer Arbeitsgruppen zum Einsatz: IKK α und IKK β (beide Wildtyp (wt), mit Flag-Tag), NIK Wildtyp und mutierte Form (mut) (KK429-

430AA) (alle Tularik Inc., South San Francisco, USA) und IKK γ (NEMO) (Prof. Alain Israël, Institut Pasteur, Paris, Frankreich). Als Negativkontrolle diente ein RcCMV-Plasmid ohne Insert (Invitrogen, Groningen, Niederlande).

2.2 Methodik

2.2.1 Zellkultur

Für einen Teil der Untersuchungen wurden monozytäre THP-1-Zellen (DSMZ, Braunschweig) eingesetzt, die in RPMI 1640 (Biochrom, Berlin) unter Zusatz von 7,5 % fötalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin (alle Reagenzien von Biochrom) bis zu einer Dichte von 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml kultiviert wurden (37 °C, 5 % CO₂). Der Endotoxingehalt des Mediums und aller Bestandteile lag unter 10 pg/ml. Für die Experimente wurden die Zellen in einer Dichte von $2-3 \times 10^6$ Zellen in 6-Well-Kulturplatten (Nunc, Eggenstein) ausgesät.

Darüber hinaus wurden für die Überexpressionsstudien epitheliale HeLa-Zellen (DSMZ) eingesetzt, die in Dulbecco's MEM (Biochrom) mit 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin, sowie 100 μ g/ml Streptomycin bis zur Konfluenz kultiviert (37 °C, 5 % CO₂) und alle 2-3 Tage nach Ablösen mittels EDTA/Trypsin gesplittet wurden. Für die Experimente wurden die HeLa-Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten (Nunc) ausgesät; nach Erreichen einer lockeren Konfluenz wurde mit dem jeweiligen Versuch begonnen.

Untersuchungen zu den IKK α -Knock out-Mäusen fanden in embryonalen Fibroblasten („murine embryonic fibroblasts“, MEF) statt (von Prof. Michael Karin und Dr. Antonio Rossi, Universität von Kalifornien, San Diego, USA und Institut für Neurobiologie and molekulare Medizin, Rom, Italien). Die Wildtypzellen aber auch IKK $\alpha^{-/-}$ -MEFs wurden in DMEM high glucose Medium mit stabilem Glutamin (PromoCell, Heidelberg) unter Zusatz von 7 % FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin kultiviert (37 °C, 5 % CO₂) und alle 2-3 Tage nach Ablösen mittels EDTA/Trypsin gesplittet. Wie die HeLa-Zellen wurden auch die MEFs in 6-Well-Zellkulturplatten (Nunc) ausgesät und nach Erreichen einer lockeren Konfluenz weiter untersucht.

2.2.2 Endotoxin-Test

Vor Beginn der Experimente wurden alle eingesetzten Medien und Reagenzien routinemäßig auf ihren Endotoxingehalt überprüft. Mit dem quantitativen, chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat Assay (Bio Whittaker, Walkersville, MD, USA) wurde bei 405 nm die Endotoxin-abhängige Spaltung des Substrats Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA bestimmt. Verwendung fanden ausschließlich die Substanzen, deren Pyrogen-Konzentration weniger als 10 pg/ml betrug.

2.2.3 Zytotoxizitätstest (WST-Test)

Im kalorimetrischen WST-1-Test (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde die Viabilität der Zellen überprüft. Nach Präinkubation der Fibroblasten pro 150 µl Medium in Mikrotiterplatten (Nunc) mit den zu testenden Bedingungen wurde das Tetrazolium-Salz-4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat (WST-1) zugegeben. Bei 405 nm wurde die Spaltung von WST-1 zu Formazan durch Dehydrogenasen intakter Zellen photometrisch gemessen und über die erhaltene optische Dichte die Stoffwechselaktivität der Zellen quantitativ ermittelt. Bei den einzelnen Messungen wurden 6-fach-Bestimmungen durchgeführt. Routinemäßig wurde darüber hinaus die Morphologie der Zellen beurteilt und das Verhältnis lebender zu toten 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 (64). Dazu wurden monozytäre THP-1-Zellen (3×10^6) 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; 10mM HEPES, pH 7,9; 10mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,5mM Dithiothreitol (DTT); 300 mM Saccharose; je 0,75 µg/ml Pepstatin A, Antipain, Chymostatin, Aprotinin und Leupeptin sowie 0,5 mM PMSF) resuspendiert und 5 min inkubiert, um die äußeren Zellmembranen aufzubrechen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 000 x g, 30 sec, RT) wurde der Überstand mit der zytosolischen Fraktion von den noch intakten Zellkernen abgenommen und

auf Eis gelagert. Um eine Kontamination der nukleären Extrakte durch zytosolische Proteine zu vermeiden, wurden die Kerne einmal in Puffer A gewaschen und wiederum zentrifugiert. Um die Proteinausbeute zu verbessern, wurde der Überstand mit der oben erhaltenen zytosolischen Fraktion vereint und bei -80 °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 einem Ultraschalldesintegrator zerstört. Durch Zentrifugation (15 800 x g, 30 sec, RT) ließen sich die Membranfragmente abtrennen. Die nukleären Proteine wurden ebenfalls bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Um Proteine aus adhärenenten HeLa- bzw. MEF-Zellen zu isolieren, wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend abgeschabt. Im Anschluss daran wurden sie wie oben beschrieben weiterbehandelt.

Die Proteinkonzentrationen der zytosolischen und nukleären Extrakte wurden mit Hilfe des Bradford-Assays (Biorad, München) bestimmt. 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 Transfektion und Überexpression

Für die Überexpressionsstudien fanden die unter 2.1.3 beschriebenen Plasmide Verwendung. HeLa-Zellen bzw. IKK α ^{-/-} MEFs wurden mittels SuperFect Transfektionsreagenz nach einem Protokoll von Qiagen (Hilden) transient transfiziert. Hierfür wurden die Zellen nach einmaligem Waschen in PBS für 2 h mit einer Mischung aus DNA, SuperFect Transfektionsreagenz und Medium inkubiert. Die Zellen wurden anschließend unter den gewohnten Zellkulturbedingungen über Nacht kultiviert und daraufhin entsprechend den verschiedenen Versuchsbedingungen mit TNF stimuliert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums in PBS abgeschabt, zytosolische sowie nukleäre Extrakte (siehe 2.2.4) isoliert und mit Hilfe der Western blot-Analyse (siehe 2.2.7) die Menge der überexprimierten Proteine im Vergleich zur untransfizierten bzw. CMV-transfizierten Kontrolle bestimmt.

2.2.6 Western blot-Analyse

Zytosolische Extrakte wurden mittels Western blot-Analyse auf die Anwesenheit bestimmter Proteine untersucht. Nach Zugabe von SDS-Probenpuffer (20,8 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1,27 % SDS; 4 % Glycerin; 1,25 % Mercaptoethanol, 330 μ M EDTA; 0,2 % Bromphenolblau) wurden 5-10 μ g der jeweiligen Proteinextrakte 5 min bei 95 °C inkubiert. Die anschließende Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 12 %-igen Polyacrylamid-Fertigel (Novex Pre-Cast Gel, Invitrogen, Groningen, Niederlande). Zur Feststellung der Proteingrößen wurden vorgefärbte Molekulargewichtsstandards (Rainbow, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg; Low Range, Biorad; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung der Proteine wurden die Gele 15 min in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 0,2 M Glycin) 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. Nach 10 min wurden die Färbelösungen abgespült, das Proteilmuster fotografiert und die Membranen durch 1-stündige Inkubation in PBST (PBS + 0,05 % Tween 20) mit 5 % Magermilchpulver abgesättigt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Die Membranen wurden weiterhin mit den entsprechenden primären Antikörpern (siehe 2.1.1; 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. Daraufhin wurden die Membranen 3 x 10 min mit PBST + 1 % Milchpulver gewaschen, bevor sie für 1 h bei RT mit einem sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper (siehe 2.1.1; Verdünnungen in PBST + 1 % Milchpulver Anti-Kaninchen und Anti-Ziege je 1 : 20.000; Anti-Maus: 1 : 7.500) behandelt wurden. Im Anschluss an weitere Waschschrte mit PBST (1 x 15 min, 4 x 5 min, RT) wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe auf den Membranen mit Hilfe des ECL-Verfahrens auf Röntgenfilmen (beides von Perkin Elmer Life Sciences) sichtbar gemacht und mittels Densitometrie ausgewertet bzw. direkt gescannt.

2.2.7 Immunpräzipitation und Assoziationsassay

Zytosolische bzw. nukleäre Extrakte sowohl von THP-1- als auch von HeLa-Zellen und MEFs wurden einer Immunpräzipitation (IP) in TN-Puffer (200 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl,

pH 7,5; 5 % BSA; 1 mM DTT; 0,5 μ M 4-(2-Aminoethyl)- benzolsulfonylfluorid (AEBSF) sowie jeweils 0,75 μ g/ml Leupeptin, Antipain, Aprotinin, Pepstatin A und Chymostatin) unterzogen. Die Fällung (2 h bei 4 °C) erfolgte mit 1 μ g des jeweiligen Antikörpers (siehe 2.1.1) und 35 μ l 6 %-iger Protein-A-Agarose. Für IPs mit murinen monoklonalen IgG₁ Antikörpern wurden 35 μ l 6 %-iger Protein-G-Agarose eingesetzt. Nach fünfmaligem waschen mit TN-Puffer (ohne Zusatz von BSA) und Zugabe von SDS-Probenpuffer (+ 10 % Glycerin) wurden die Proteine im Polyacrylamidgel aufgetrennt und die mit dem gefällten Antigen assoziierten Proteine mittels Antigen-Antikörper-Komplex detektiert (siehe 2.2.7). Um Assoziationen mit verschiedenen Proteinen nachweisen zu können, wurde der Antigen-Antikörper-Komplex durch Inkubation mit Re blot Plus-Reagenz (Chemicon, München) wieder aufgelöst (15 min, RT) und die Membran anschließend erneut mit PBST und 5 % Milchpulver geblockt (2 x 5 min, RT). Im Anschluss an diese Prozedur konnte eine erneute Inkubation mit einem anderen primären Antikörper stattfinden.

2.2.8 Immunpräzipitation und Kinaseassay

Zur Analyse der IKK-Aktivität verschiedener zytosolischer Extrakte wurde der Kinasekomplex einer IP in TNT-Puffer (TN-Puffer + 1 % Triton X-100) unterzogen. Die Präzipitation (2 h, 4 °C) erfolgte mit 1 μ g eines Anti-Kinase-Antikörpers (siehe 2.1.1) und 35 μ l 6 %-iger Protein-A-Agarose bzw. 6 %-iger Protein-G-Agarose für murine monoklonale IgG₁ Antikörper. Nach dreimaligem Waschen mit TNT-Puffer (ohne Zusatz von BSA) und drei weiteren Waschschritten mit Kinasepuffer (20 mM Hepes, pH 8,0; 10 mM MgCl₂; 100 μ M Na₃VO₄; 20 mM β -Glycerophosphat; 50 mM NaCl; 2 mM DTT; 0,5 μ M AEBSF; und jeweils 0,75 μ g/ml Leupeptin, Antipain, Aprotinin, Pepstatin A und Chymostatin) wurde die Kinaseaktivität der präzipitierten Proteine im Kinaseassay untersucht. Die Kinasereaktion (30 min, 30 °C) wurde in Anwesenheit von [γ -³²P]ATP (5 μ Ci) (Perkin Elmer Life Sciences) und 500 ng GST-I κ B α (Santa Cruz Biotechnology) als Substrat durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine im Polyacrylamidgel wurden die Proteine im Western blot-Verfahren auf Membranen transferiert (siehe 2.2.7). Anschließend konnten diese quantitativ mittels Autoradiographie (Perkin Elmer Life Sciences) und Densitometrie ausgewertet werden. Um die gleichmäßige Ladung aber auch verschiedene Assoziationen der präzipitierten Proteine zu untersuchen, wurden die Membranen anschließend mit Antikörpern gegen die gefällte Kinase und teilweise im Anschluss daran auch mit Antikörpern gegen zusätzliche Proteine inkubiert.

2.2.9 Immundepletion

Zur vollständigen Entfernung von IKK α aus zytosolischen Extrakten wurden diese für 1 h bei 4 °C mit 10 μ g IKK α -Antikörper, die an 500 μ l 6 % Protein A-Agarose gekoppelt waren, präzipitiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und die Überstände in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Diese enthielten 10 μ g an 500 μ l 6 % Protein A-Agarose gekoppelten IKK α -Antikörper. Dieses Vorgehen wurde insgesamt viermal wiederholt. Die daraufhin erhaltenen Überstände waren nun von IKK α gereinigt und die verbliebenen Komplexe konnten in einer fünften IP gefällt und mittels Assoziations- oder Kinaseassay weiter analysiert werden.

2.2.10 Statistische Auswertung

Microsoft Excel 2002 wurde zur statistischen Auswertung eingesetzt. Die Ergebnisse sind alle als Mittelwert \pm Mittlerer Fehler (MW \pm SEM) angegeben.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob im Zytosol monozytärer Zellen neben dem bereits bekannten IKK-Komplex, bestehend aus IKK α , IKK β und IKK γ , *in vivo* auch IKK-Subkomplexe mit einer anderen Proteinkonstellation und eventuell spezifischer Funktionalität existieren. So wären zusätzlich zu dem „klassischen“ IKK-Komplex, IKK-Subkomplexe denkbar, die neben dem Adaptor IKK γ nur IKK β als kinaseaktive Untereinheit, jedoch nicht IKK α , enthalten.

3.1 Nachweis von endogenen IKKb/IKKg-Subkomplexen in monozytären Zellen

3.1.1 Isolierung von IKKb/IKKg-Subkomplexen mittels Immundepletion

Die zunächst durchgeführten Experimente sollten die Anwesenheit von endogenen IKK-Subkomplexen im Zytosol monozytärer Zellen demonstrieren, die neben dem Adapterprotein IKK γ nur IKK β und kein IKK α als kinaseaktive Untereinheit enthalten. Zu diesem Zweck wurden THP-1-Zellen für 5 min in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von TNF (2 ng/ml) inkubiert und die zytosolischen Proteine isoliert. Freies IKK α oder IKK α -enthaltende Komplexe wurden durch eine Immundepletion mittels eines Antikörpers gegen das IKK α -Protein entfernt. Dieses Vorgehen wurde für jede Probe bis zu viermal wiederholt. Die verbleibenden IKK-Komplexe wurden dann unter Verwendung von anti-IKK γ präzipitiert und die Zusammensetzung der isolierten IKK-Komplexe mit Hilfe des Western blot-Verfahrens analysiert. Diese Experimente zeigten, dass nach der IKK α -Immundepletion kein IKK α mehr (assoziiert mit IKK γ) in den zellulären Extrakten zurück blieb (Abb. 3). Es konnte jedoch nach IKK α -Immundepletion in den IKK γ -immunpräzipitierten Proben eine signifikante Menge an IKK β und – wie erwartet – IKK γ mittels Western blot-Analyse im Präzipitat nachgewiesen werden (Abb. 3). Vergleichbare Ergebnisse wurden in Abwesenheit bzw. der Gegenwart von TNF beobachtet.

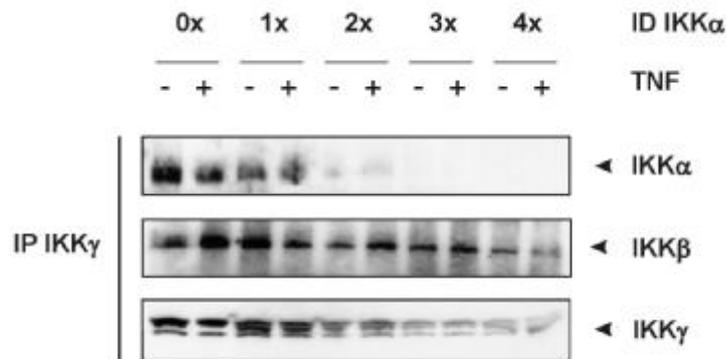


Abbildung 3: Isolierung von IKK β /IKK γ -Subkomplexen mittels Immundepletion. Zytosolische Extrakte von unstimulierten oder TNF-stimulierten (2 ng/ml, 5 min) THP-1-Zellen wurden einer schrittweisen IKK α -Immundepletion unterzogen (0 bis 4 Schritte mit einem spezifischen Antikörper gegen IKK α , der an Protein A-Agarose gebunden war) (ID IKK α). Anschließend wurde eine IP mit einem IKK γ -Antikörper durchgeführt (IP IKK γ) und mit Hilfe der Western blot-Analyse die Menge an restlichem IKK α -, IKK β - und IKK γ -Protein ermittelt.

3.1.2 Densitometrische Analyse der Immundepletionsexperimente

Eine densitometrische Auswertung dreier unabhängiger, wie bereits oben beschriebener Experimente zeigte, dass nach wiederholten Immunpräzipitationen mit dem IKK α -Antikörper das IKK α -Protein im verbliebenen Überstand nahezu nicht mehr detektierbar war (Abb. 4). Unter den gleichen Bedingungen wurde ein Rückgang von IKK β -Protein auf 46 % im Vergleich zu der nicht-immundepletierten Kontrolle beobachtet. Dies war in etwa vergleichbar mit dem Rückgang von IKK γ -Protein (31 %) nach vier Immundepletionsschritten (Abb. 4). Bei der Verwendung eines IKK β -Antikörpers anstelle von anti-IKK γ nach der IKK α -Immundepletion wurden vergleichbare Resultate erzielt (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass neben der bereits bekannten „klassischen“ IKK α /IKK β /IKK γ -Konformation des IKK-Komplexes *in vivo* in monozytären Zellen zusätzlich IKK-Komplexe existieren, die als Hauptbestandteile IKK β und IKK γ jedoch kein IKK α enthalten. Im Folgenden werden diese Komplexe als IKK β /IKK γ -Subkomplexe bezeichnet.

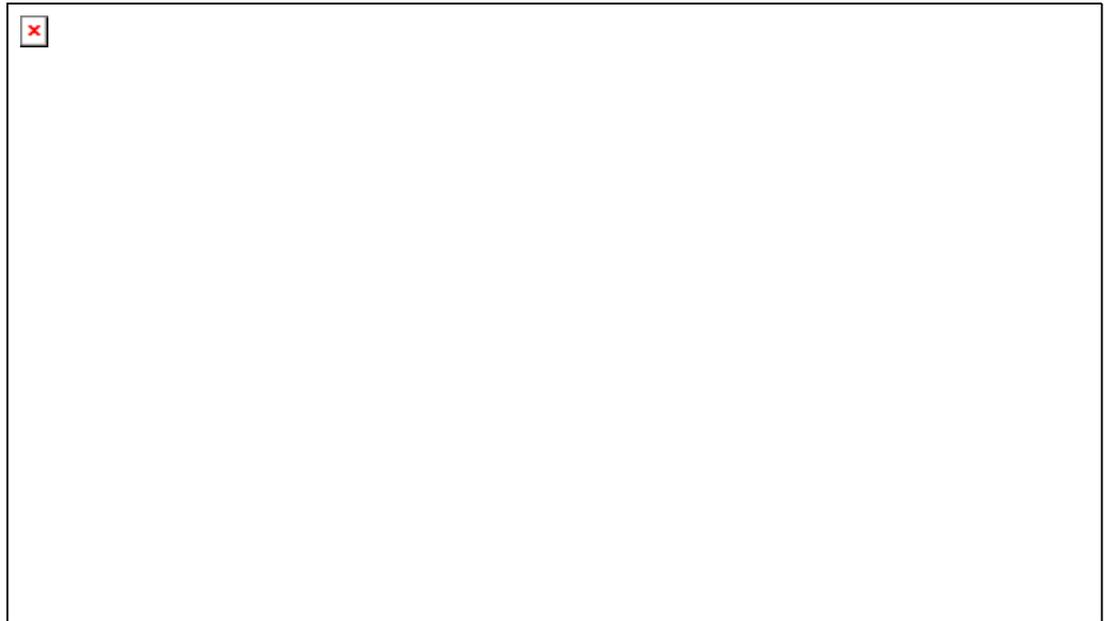


Abbildung 4: Densitometrische Analyse der Immundepletionsexperimente. Die Konzentrationen von IKK α , IKK β und IKK γ aus Experimenten wie in Abbildung 3 beschrieben wurden densitometrisch analysiert. Die Menge des entsprechenden Proteins in der unbehandelten Probe (0x ID) wurde als 100 % gewertet. Unabhängig voneinander wurden die Versuche dreimal wiederholt (MW \pm SEM).

3.2 Aktivierbarkeit von endogenen monozytären IKKb/IKKg-Subkomplexen durch TNF

3.2.1 Stimulierbarkeit der IKKb/IKKg-Subkomplexe durch TNF

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die endogenen IKK β /IKK γ -Subkomplexe eine Rolle bei der regulären NF- κ B-abhängigen Signalübertragung spielen und ob diese durch bekannte Stimuli für dieses System aktiviert werden können. Zu diesem Zweck wurden monozytäre THP-1-Zellen für 5 min mit TNF (2 ng/ml) stimuliert. Die zytosolischen Extrakte wurden wiederum einer IKK α -Immundepletion unterzogen, um IKK α bzw. IKK α -haltige Proteinkomplexe zu entfernen. Die IKK β /IKK γ -Subkomplex-enthaltenden Überstände wurden in eine Immunpräzipitation mit einem IKK γ -Antikörper eingesetzt und im Anschluss daran das Präzipitat mit den IKK β /IKK γ -Subkomplexen im Kinaseassay untersucht. Es zeigte sich eine verminderte IKK-Grundaktivität in unstimulierten IKK α -immundepletierten Proben verglichen mit unstimulierten Proben, die, um einen legitimen Vergleich der beiden ermöglichen zu können, ebenfalls einer Immundepletion zugeführt wurden, allerdings ohne

Zugabe eines Antikörpers gegen IKK α (Abb. 5). Die TNF-Exposition der Zellen führte zu einer signifikant erhöhten IKK-Aktivität in IKK α -immundepletiierten Proben im Vergleich zu immundepletiierten IKK-Komplexen aus unstimulierten Zellen. Hierbei war das Maximum allerdings niedriger, verglichen mit IKK-Komplexen aus nicht-immundepletiierten, mit TNF stimulierten zytosolischen Proben. Nach der Beurteilung der Kinaseaktivität wurden sowohl die vollständige Immundepletion der IKK α -Proteine als auch die verbleibende Menge der IKK β - und IKK γ -Proteine im Kinaseassay-Präzipitat mittels Western blot-Analyse kontrolliert (Abb. 5).

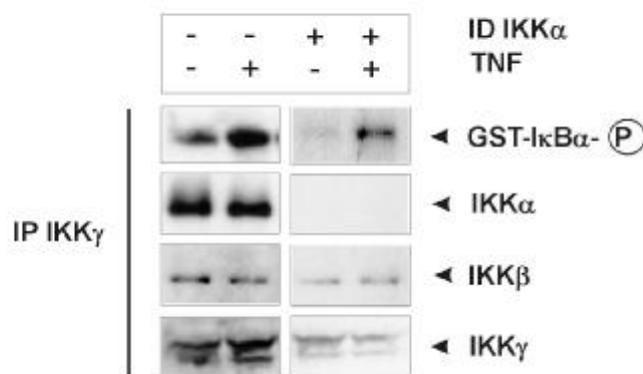


Abbildung 5: Stimulierbarkeit der IKK β /IKK γ -Subkomplexe durch TNF. THP-1-Zellen wurden mit und ohne TNF inkubiert (2 ng/ml, 5 min). IKK-Komplexe aus nicht-immundepletiierten oder immundepletiierten (ID IKK α) Proben wurden mit einem IKK γ -Antikörper gefällt. Nach Zugabe des Substrates GST-I κ B α wurde die Kinaseaktivität ermittelt. Im Anschluss daran wurden die Proteinmengen von IKK α , IKK β und IKK γ mittels eines Western blots bestimmt.

3.2.2 Vergleichbare Aktivierung von IKK β /IKK γ -Subkomplexen und „klassischen“

IKK-Komplexen

Im Anschluss daran wurde die x-fache Induktion der Kinaseaktivität der IKK γ -immunpräzipitierten Komplexe von drei unabhängigen Experimenten densitometrisch ausgewertet. Hierbei ergaben sich nach TNF-Stimulierung sowohl in IKK α -immundepletiierten als auch in nicht-immundepletiierten Zellen eine vergleichbare Induktion der Kinaseaktivität (Abb. 6). Dies zeigte eine klare Aktivierbarkeit der IKK β /IKK γ -Subkomplexe durch TNF. Es sollte jedoch angemerkt werden, dass ein direkter Vergleich der x-fachen Induktionswerte unter Immundepletionsbedingungen nur eingeschränkt möglich ist.

Der Grund hierfür ist, dass die Kinaseaktivitäten der beiden unstimulierten Proben, mit oder ohne IKK α -Immundepletion, rechnerisch als gleichgesetzt und als Ausgangswert für die Berechnung der Zunahme der jeweiligen Kinaseaktivität genommen wurden. Es ergibt sich eine geringere eigentliche Kinaseaktivität der nicht-stimulierten, IKK α -immundepletierten Probe als die der nicht-immundepletierten Probe, da die IKK α -enthaltenden IKK-Komplexe entfernt wurden und nicht mehr für die Messung der Induzierbarkeit zur Verfügung stehen. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die IKK β /IKK γ -Subkomplexe in monozytären Zellen durch den klassischen Stimulus TNF aktiviert werden können und deshalb wahrscheinlich an der TNF-vermittelten NF- κ B-Aktivierung beteiligt sind.

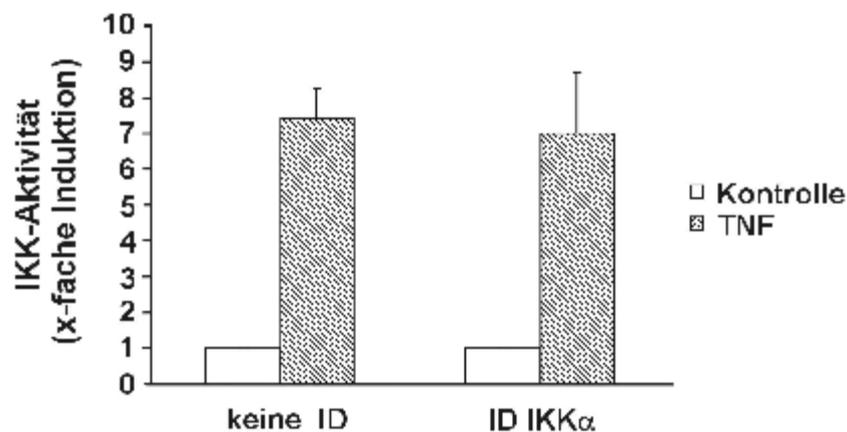


Abbildung 6: Vergleichbare Induktion der Kinaseaktivität von IKK β /IKK γ -Subkomplexen und „klassischen“ IKK-Komplexen. Die Kinaseaktivitäten von nicht-immundepletierten und immundepletierten (ID IKK α) Proben aus Experimenten wie in Abbildung 5 beschrieben wurden densitometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind als x-fache Induktion der unstimulierten Kontrolle dargestellt. Es wurden drei unabhängige Experimente in die Berechnung mit einbezogen (MW \pm SEM).

3.3 NIK ist an der IKK β /IKK γ -Subkomplex-vermittelten Signalübertragung nicht beteiligt

In der Literatur ist beschrieben, dass NIK abhängig von IKK α oder IKK α -enthaltenden Komplexen an speziellen Signalwegen wie etwa der p100-Prozessierung beteiligt ist (90). Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die IKK β /IKK γ -Subkomplexe ebenfalls in die durch NIK-vermittelte Signalkaskade involviert sind.

3.3.1 Aktivierung der „klassischen“ IKK-Komplexe durch überexprimiertes NIK-Protein

Um die Aktivierbarkeit des NF- κ B-Systems zu untersuchen wurde entweder die Wildtypform oder die mutierte Form von NIK-Protein in HeLa-Zellen überexprimiert. Als Kontrolle hierfür dienten Zellen, die mit dem CMV-Vektor alleine transfiziert wurden. Mittels Western blot-Analyse der zytosolischen Extrakte dieser Zellen konnte eine Überexpression sowohl der Wildtypform als auch der mutierten Form von NIK-Protein nachgewiesen werden (Abb. 7A). Die zytosolischen Extrakte dieser Zellen wurden unter Verwendung von Antikörpern gegen IKK α oder IKK γ einer Immunpräzipitation unterzogen. Anschließend wurde die durch Überexpression von NIK-Protein vermittelte IKK-Aktivität in den Präzipitaten mit Hilfe eines Kinaseassays bestimmt. In HeLa-Zellen, die die Wildtypform von NIK überexprimierten, ließ sich im Gegensatz zu solchen, bei denen die mutierte Form von NIK überexprimiert wurde, eine signifikant erhöhte Kinaseaktivität nachweisen. Die Zellen wiesen nach einer Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen IKK α einen höheren Absolutwert der IKK-Aktivität auf als nach einer IP mit anti-IKK γ (Abb. 7B). Diese Ergebnisse waren allein unter Überexpressionsbedingungen ohne zusätzliche Stimulierung der Zelle beobachtet worden. Sie zeigten, dass das NF- κ B-System in HeLa-Zellen durch Überexpression der Wildtypform von NIK, jedoch nicht durch eine mutierte Form von NIK, aktiviert werden konnte.

3.3.2 IKKb/IKKg-Subkomplexe werden durch Überexpression von NIK nicht aktiviert

Im Folgenden sollte die Rolle von IKK α bei der NIK-abhängigen Signalübertragung näher ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden in HeLa-Zellen, wie bereits oben beschrieben, die Wildtypform sowie die mutierte Form des NIK-Proteins überexprimiert. Als Kontrolle für die Überexpression diente ein Vektor mit dem CMV-Promotor, jedoch ohne Insert. Im Anschluss daran wurden die zytosolischen Proteine isoliert und eine IKK α -Immundepletion, wie schon im vorgehenden Abschnitt beschrieben, durchgeführt. Nach zwei bzw. vier Immundepletionsschritten wurden die verbliebenen Proteine in eine Immunpräzipitation mit einem IKK γ -Antikörper eingesetzt und die Kinaseaktivität in den Präzipitaten anschließend mittels Kinaseassay analysiert. Bemerkenswerterweise war die NIK-induzierte Kinaseaktivität

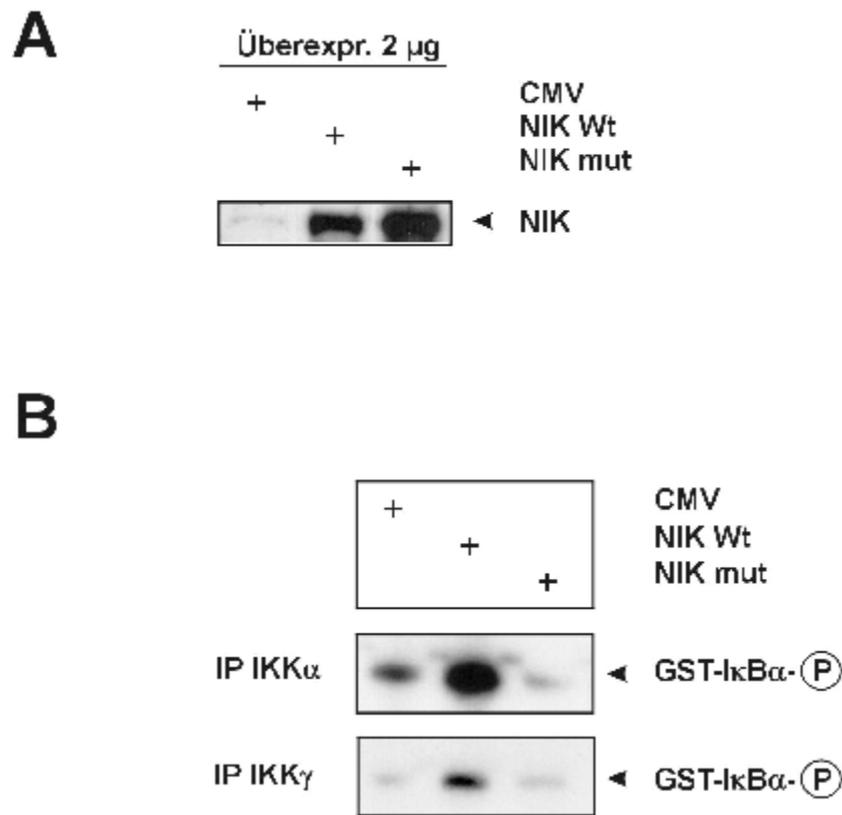


Abbildung 7: Aktivierung der „klassischen“ IKK-Komplexe durch überexprimiertes NIK-Protein. A) HeLa-Zellen wurden mit 2 µg eines Plasmids transfiziert, das entweder die Wildtyp (Wt) oder die mutierte Form (mut) von NIK kodierte. Als Kontrolle diente eine Transfektion mit dem CMV-Vektor allein. Mittels der Western blot-Analyse der zytosolischen Extrakte erfolgte eine Kontrolle der Überexpression. B) Der oben beschriebene Extrakt wurde unter Verwendung eines Antikörpers gegen IKK α oder IKK γ einer IP unterzogen. Anschließend wurde die Kinaseaktivität mit GST-IκB α als Substrat ermittelt.

nach zwei Immundepletionsschritten vermindert, nach vier Schritten war keine Phosphorylierung von IκB α mehr detektierbar (Abb. 8). Als Kontrolle für die Immundepletion wurden Western blot-Analysen durchgeführt, welche zeigten, dass IKK α nach vier Immundepletionsschritten komplett immundepletiert wurde, wohingegen die IKK β /IKK γ -Subkomplexe weiter detektierbar waren. Die dargestellten Ergebnisse wiesen darauf hin, dass der durch Überexpression der Wildtypform von NIK-Protein induzierte Signalweg nicht durch die IKK β /IKK γ -Subkomplexe vermittelt werden kann. Folglich wurde durch das Entfernen von IKK α bzw. IKK α -enthaltenden Komplexen die Induzierbarkeit von NIK verhindert. Dies könnte bedeuten, dass für die Aktivierung des NF- κ B-Systems durch Überexpression von NIK-Protein möglicherweise eine Abhängigkeit von IKK α besteht.

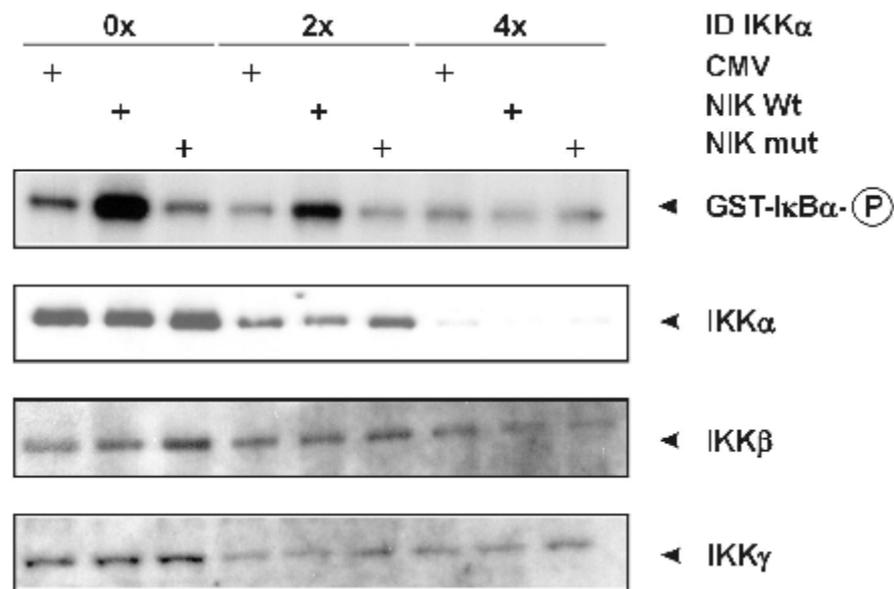


Abbildung 8: Keine Aktivierbarkeit der IKKb/IKKg-Subkomplexe durch Überexpression von NIK-Protein. Es wurden Zellen verwendet, die die Wildtypform oder die mutierte Form von NIK überexprimieren bzw. den CMV-Vektor als Kontrolle enthalten. Anschließend wurde die IKK-Aktivität dieser nicht-immundepletierten oder immundepletierten (ID) Zellen mit GST-IκBα als Substrat ermittelt. Die Menge an IKKα, IKKβ und IKKγ in diesem Präzipitat wurde daraufhin durch Western blot-Analyse bestimmt.

3.4 Proteolysemuster von IκBα in Wildtyp- und IKKα^{-/-}-Fibroblasten

Der folgende Teil der Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung von Signalwegen, die mit den IKKβ/IKKγ-Subkomplexen assoziiert sind. Es sollte die Frage geklärt werden, ob die Abwesenheit von IKKα das Proteolysemuster der inhibitorischen IκB-Proteine IκBα und IκBε beeinflusst. Für diese Experimente wurden Wildtyp-MEFs („murine embryonic fibroblasts“) (Zandi Chen 1998 Science) sowie IKKα-Knock out-Fibroblasten verwendet, bei denen das Gen für IKKα ausgeschaltet wurde. Zuerst wurden Experimente zum Proteolyseverhalten des inhibitorischen IκBα-Proteins in Abhängigkeit vom Vorhandensein von IKKα durchgeführt.

3.4.1 Verlangsamte Proteolyse von I κ B α in IKK α ^{-/-}-Fibroblasten

3.4.1.1 I κ B α -Degradierung in Abhängigkeit vom Vorhandensein von IKK α

In Experimenten zum Proteolyseverlauf von I κ B α wurden sowohl Wildtyp- als auch IKK α ^{-/-}-Fibroblasten mit TNF (2 ng/ml) in Zeitverlaufsexperimenten stimuliert. Mittels Western blot-Analyse wurde die Anwesenheit von IKK α und die Degradierung von I κ B α in Wildtypzellen mit der in IKK α -Knock out-Zellen verglichen. Die Behandlung der Western blot-Membranen mit einem Antikörper gegen Aktin als Kontrolle zeigte eine gleichmäßige Proteinladung (Filme der Zeitverlaufsexperimente nicht gezeigt). Wie erwartet induzierte TNF einen schnellen Abbau von I κ B α in Wildtypzellen (Abb. 9). Interessanterweise zeigte sich in den Western blot-Analysen, dass nach TNF-Stimulierung I κ B α in IKK α ^{-/-}-Fibroblasten langsamer abgebaut wurde als in Wildtypzellen. Dieser Effekt konnte durch die Retransfektion von IKK α (2 μ g eines IKK α -Überexpressionsplasmids) in die IKK α ^{-/-}-Zellen aufgehoben werden (Abb. 9).

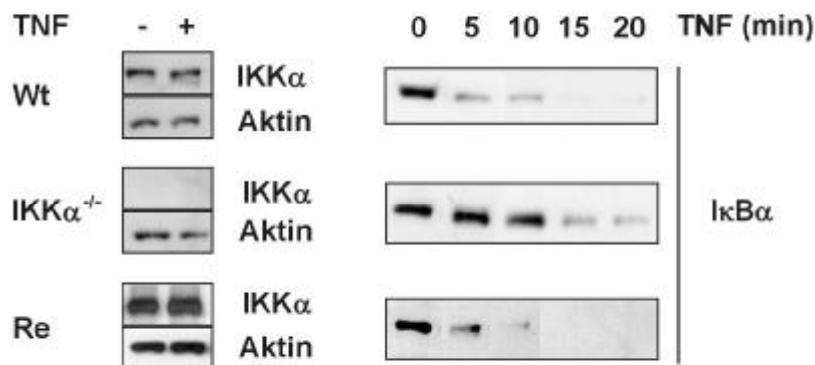


Abbildung 9: I κ B α -Degradierung in Abhängigkeit vom Vorhandensein von IKK α . Wildtypzellen, IKK α ^{-/-}-MEFs bzw. IKK α ^{-/-}-Fibroblasten, in die ein IKK α -Überexpressionsplasmid retransfiziert wurde (Re, Transfektion mit 2 μ g Plasmid DNA), wurden in Zeitverlaufsexperimenten mit dem Stimulus TNF (2 ng/ml) untersucht. Mittels Western blot-Analyse wurde das Vorhandensein von IKK α in diesen Zellen in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit (+) von TNF (5 min) geprüft. Als Ladungskontrolle wurde die Menge an Aktinprotein verwendet (linker Teil). Die Messung der Menge an I κ B α in den zytosolischen Extrakten erfolgte nach TNF-Stimulation anhand der Western blot-Analyse (rechter Teil).

3.4.1.2 Verzögerte I κ B α -Proteolyse in IKK α -Knock out-Fibroblasten

Im Anschluss daran wurden die Daten von drei unabhängigen Experimenten densitometrisch analysiert und die I κ B α -Proteinkonzentrationen auf die Aktinladung normiert. Diese Analyse zeigte, dass in Wildtypzellen ein signifikanter Abbau von I κ B α schon nach 5-minütiger TNF-Stimulation beobachtet werden konnte, eine maximale Degradierung wurde bereits nach 15 min gemessen (Abb. 10). Im Gegensatz dazu wurde in IKK α -Knock out-Fibroblasten ein schwacher, durch TNF-initiiertes Abbau von I κ B α erst nach 10 min detektiert. In diesem Fall wurde erst nach 20-minütiger Stimulierung ein Maximum erreicht. Bei Retransfektion von IKK α in die IKK α -Knock out-Zellen konnte eine signifikante I κ B α -Proteolyse schon nach 10-minütigem Kontakt mit TNF gemessen werden. Bereits nach 15 min war I κ B α nur noch minimal vorhanden (Abb. 10). Die Abwesenheit von IKK α in IKK α -Knock out-Fibroblasten führt somit wahrscheinlich zu einer verzögerten Degradierung von I κ B α . Dieser Effekt kann durch die Retransfektion von IKK α in die IKK α -Knock out-MEFs rückgängig gemacht werden.

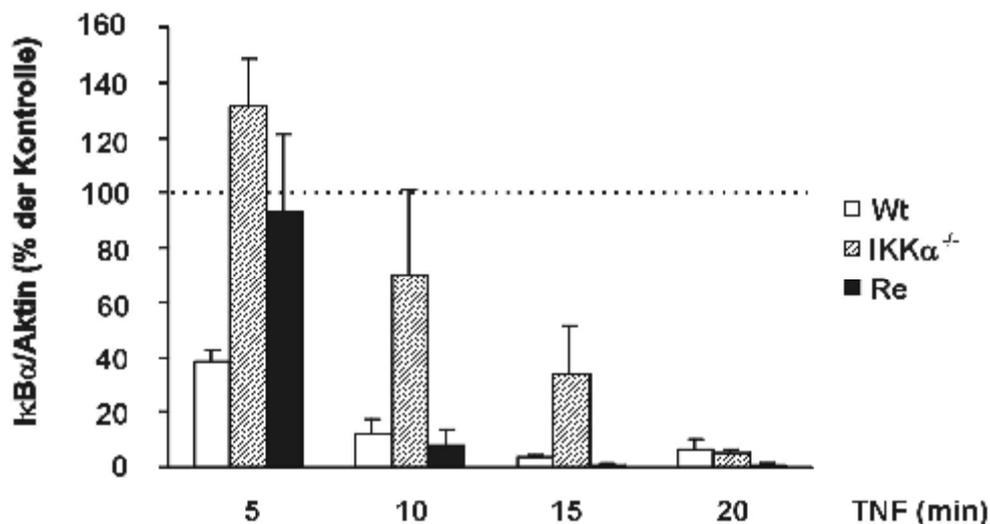


Abbildung 10: Verzögerte I κ B α -Proteolyse in IKK α -Knock out-Fibroblasten. Mittels Densitometrie wurde die Rate an I κ B α -Degradierung zwischen Wildtypfibroblasten und IKK α ⁻-Zellen (mit und ohne IKK α Überexpression, die als Re gekennzeichnet ist) verglichen. Bei der Berechnung der I κ B α /Aktin-Ratio wurde die Menge an Aktin als Ladungskontrolle verwendet. Hierbei wurde der Wert in unstimulierten Fibroblasten auf 100 % gesetzt. Es werden die Daten von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (MW \pm SEM).

3.4.2 Analyse der I κ B α -Proteolyse

In einem nächsten Schritt erfolgte die genauere Analyse des Proteinabbaus von I κ B α . Wildtyp- und IKK α -Knock out-Fibroblasten wurden hinsichtlich des Beginns der Proteolyse und des Ausmaßes des Proteinabbaus während der jeweils maximalen Degradierung gegenübergestellt. Diese Daten dreier unabhängiger Experimente wurden densitometrisch ausgewertet und miteinander verglichen.

Bei dieser weiteren Analyse der Proteolyseexperimente stellte sich heraus, dass in Wildtypfibroblasten schon nach 2,5-minütiger TNF-Simulierung ein signifikanter Abbau von I κ B α begann (Abb. 11). Im Gegensatz dazu konnte in IKK α -Knock out-Zellen erst nach 7-minütigem Kontakt mit TNF eine Proteolyse detektiert werden. Eine durch TNF initiierte maximale Degradierung von I κ B α konnte in den Wildtypzellen nach 22 min gemessen werden. In IKK α ^{-/-}-Fibroblasten wurde nach 24-minütiger Stimulierung das Maximum des Abbaus erreicht (Abb. 11). Nach Berechnung der Signifikanz anhand des T-Tests ergibt sich mit einem p-Wert von 0,04 eine signifikante Verschiebung des Proteolysebeginns in Knock out-Fibroblasten. Mit einem p-Wert von 0,78 handelt es sich hinsichtlich des Maximums der Proteolyse jedoch um keinen signifikanten Unterschied in Wildtyp- und Knock out-Zellen. Die Ergebnisse zeigten zudem, dass der Abbau von I κ B α zum jeweiligen Zeitpunkt der maximalen Proteolyse sowohl in Wildtyp- als auch in IKK α -Knock out-Fibroblasten zu einem gleichen Maß erfolgte. In beiden Zelltypen ging nach Stimulierung mit TNF die Proteinmenge von I κ B α bis auf 2,5 % des Ausgangswertes zurück (Abb. 11). Das Ausmaß des Abbaus von I κ B α ist somit, trotz später einsetzenden Proteolysebeginns von I κ B α in IKK α -Knock out-Zellen, während des Zeitpunkts der maximalen Degradierung gleich stark ausgeprägt.

3.4.3 Verminderte I κ B α -Phosphorylierung in Abwesenheit von IKK α

Die Phosphorylierung der I κ B-Proteine wie z.B. I κ B α ist der erste Schritt, der diese Proteine für die Proteolyse kennzeichnet. Um den Phosphorylierungsstatus von I κ B α im Folgenden zu untersuchen, wurde dieser in IKK α -Knock out-Zellen mit dem von Wildtypfibroblasten verglichen. Hierfür wurden diese Zellen für 5 bzw. 10 min mit TNF stimuliert und die zytosolischen Proteine isoliert. Anschließend wurde eine Western blot-Analyse unter

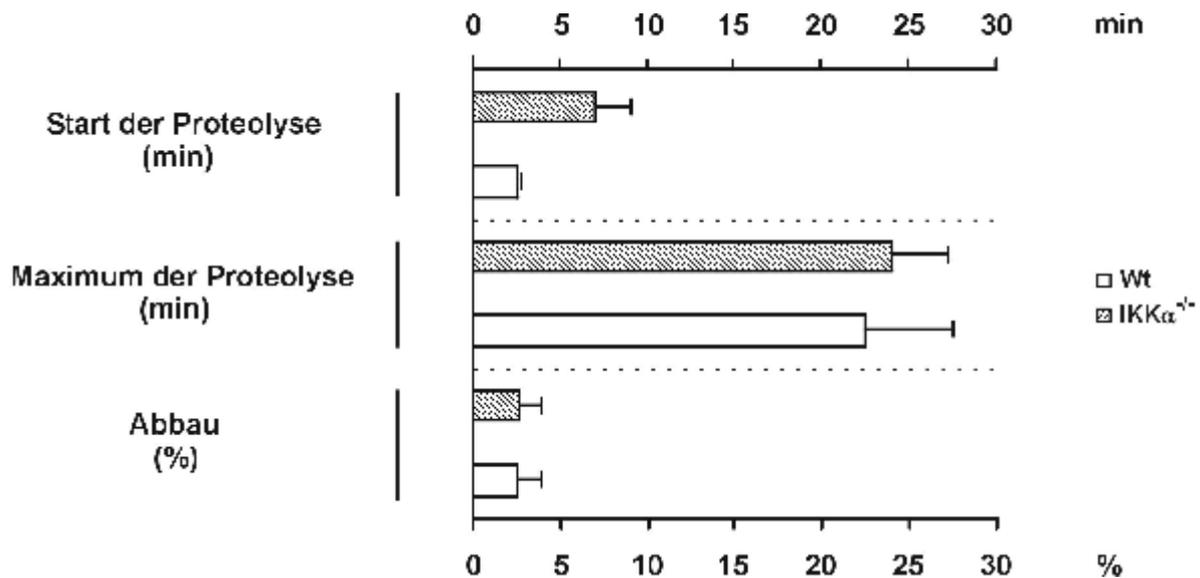


Abbildung 11: Analyse der I κ B α -Proteolyse. Die Densitometrie wurde eingesetzt, um in Experimenten wie in Abbildung 9 beschrieben, Wildtyp-MEFs und IKK $\alpha^{-/-}$ -Zellen bezüglich des Starts der Proteolyse von I κ B α miteinander zu vergleichen. Ebenso erfolgte sowohl ein Vergleich hinsichtlich des Zeitpunktes der jeweils maximalen Degradierung als auch des Ausmaßes des Proteinabbaus. Der Zeitpunkt, bei dem erstmalig ein Abbau von I κ B α im Vergleich zum Ausgangswert bei 0 min festgestellt werden konnte, wurde als Beginn der Proteolyse festgelegt. Als maximale Degradierung wurde der Zeitpunkt festgelegt, an dem das Ausmaß des Abbaus von I κ B α am größten war. Der Rückgang des Proteins wurde in Prozent gemessen, wobei die Menge des I κ B α -Proteins bei 0 min als 100 % gewertet wurde. Die Daten von drei unabhängigen Experimenten wurden nach Normalisierung gegen die Ladung in die Berechnung miteinbezogen (MW \pm SEM).

Verwendung eines phospho-spezifischen I κ B α -Antikörpers durchgeführt. Zur Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinladung wurden die Western blot-Membranen außerdem mit einem Antikörper gegen Aktin behandelt. Die Experimente zeigten eine signifikante TNF-induzierte Phosphorylierung von I κ B α sowohl in Wildtyp- als auch in IKK α -Knock out-Fibroblasten. Bei 5-minütiger TNF-Stimulation war die Phosphorylierung von I κ B α in IKK $\alpha^{-/-}$ -Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen jedoch deutlich vermindert (Abb. 12). Nach 10-minütigem Kontakt mit TNF wiederum war der Phosphorylierungsgrad von I κ B α in diesen beiden Zelltypen in etwa gleich. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die reduzierte Phosphorylierung von I κ B α in IKK α -Knock out-Fibroblasten der Grund für die verzögerte I κ B α -Proteolyse in diesen Zellen ist.

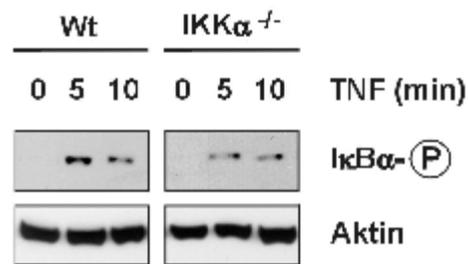


Abbildung 12: Verminderte IκBα-Phosphorylierung in Abwesenheit von IKKα. Wildtyp-MEFs und IKKα^{-/-}-Fibroblasten wurden für 0, 5 bzw. 10 min mit TNF (2 ng/ml) inkubiert und die zytosolischen Proteine gewonnen. Mittels der Western blot-Analyse und eines phospho-spezifischen IκBα-Antikörpers wurde der Phosphorylierungsstatus von IκBα bestimmt. Als Ladungskontrolle wurde die Menge an Aktinprotein verwendet.

3.5 Proteolyseverhalten von IκBε in Abwesenheit von IKKα

Nach den Versuchen zur Proteolyse von IκBα im vorhergehenden Abschnitt wurde in folgenden Experimenten der Abbau des IκBε-Proteins, einem weiteren NF-κB-Inhibitor, in Abhängigkeit vom Vorhandensein von IKKα näher charakterisiert. Nach Untersuchungen zur Dosiswirkung von TNF folgten ebenfalls Zeitverlaufsexperimente zur genaueren Erfassung der Degradierung von IκBε.

3.5.1 Dosiswirkungsbeziehung

3.5.1.1 IκBε-Degradierung bei steigender TNF-Dosis

Zur Ermittlung einer optimalen Stimulierung der Zellen wurden Dosiswirkungsexperimente durchgeführt. Hierbei wurden Wildtypfibroblasten sowie IKKα^{-/-}-MEFs mit unterschiedlichen TNF-Konzentrationen für 45 min stimuliert und zytosolische Extrakte isoliert. Anschließend wurde mittels Western blot-Analyse die Proteinmenge von IκBε bestimmt. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Ladung wurde ebenfalls die Menge von Aktin untersucht (Abb. 13). Die Experimente ließen bereits bei einer TNF-Konzentration von 2 ng/ml sowohl in Wildtyp- als auch in IKKα-Knock out-Zellen eine deutliche Degradierung von IκBε erkennen. Bei einer TNF-Konzentration von 10 ng/ml ließ sich eine geringe Zunahme der IκBε-Proteolyse

verglichen mit 2 ng/ml TNF nachweisen. Trotz weiterer Steigerung der TNF-Konzentrationen wurde jedoch ein Plateau erreicht und es konnte kein verstärkter Abbau von I κ B ϵ induziert werden.

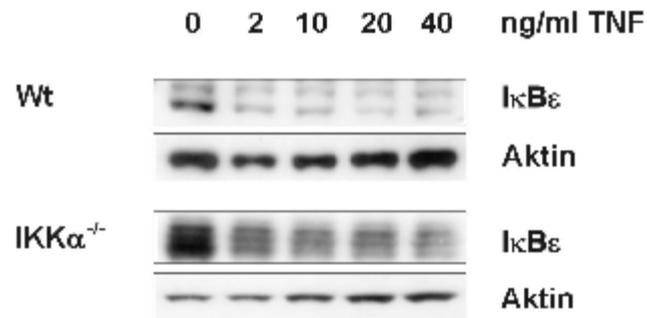


Abbildung 13: I κ B ϵ -Degradierung bei steigender TNF-Dosis. Wildtyp-MEFs und IKK α -Knock out-Fibroblasten wurden in Dosiswirkungsexperimenten für 45 min mit unterschiedlichen TNF-Konzentrationen (0, 2, 10, 20 bzw. 40 ng/ml) inkubiert. Daraufhin wurden zytosolische Extrakte isoliert und die Menge von I κ B ϵ in Western blot-Analysen untersucht. Aktin diente zur Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinladung.

3.5.1.2 Densitometrische Auswertung

Im Anschluss folgte eine densitometrische Analyse von drei unabhängigen Experimenten, wobei die I κ B ϵ -Menge auf die Aktinmenge normiert wurde. Die Daten zeigten, dass 2 ng/ml TNF ausreichen, um sowohl in Wildtyp- als auch in IKK α -Knock out-Fibroblasten eine Degradierung der I κ B ϵ -Proteinmenge von ca. 60 % des Ausgangslevels zu induzieren (Abb. 14). Eine Erhöhung der TNF-Menge auf 10 ng/ml steigerte den Abbau von I κ B ϵ auf 80 % des Ausgangswertes. Auch bei Zugabe von 20 bzw. 40 ng/ml TNF blieb der Proteolysegrad auf diesem Niveau, woraus zu schließen ist, dass bereits ein Plateau erreicht wurde. Vergleichbare Proteinmengen von I κ B ϵ wurden sowohl in Wildtypzellen als auch in IKK α -Knock out-MEFs gemessen (Abb. 14). Da bereits bei 2 ng/ml TNF eine deutliche Degradierung von I κ B ϵ zu verzeichnen war, und eine Erhöhung der TNF-Konzentration nur zu einer geringen Zunahme der I κ B ϵ -Proteolyse führte, wurde für die folgenden Degradierungsexperimente von I κ B ϵ eine TNF-Konzentration von 2 ng/ml verwendet.

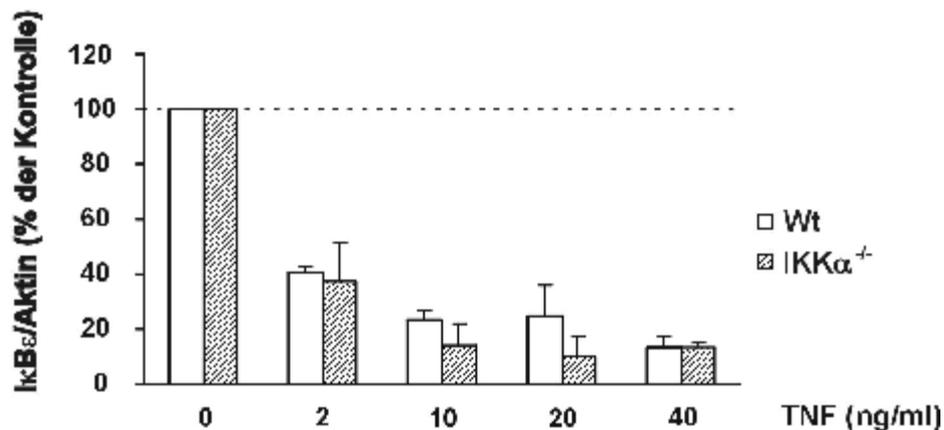


Abbildung 14: Densitometrische Auswertung. Drei unabhängige Experimente, wie in Abbildung 13 beschrieben durchgeführt, wurden mittels Densitometrie ausgewertet und gegen die Ladung normiert. Der Wert in unstimulierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt (MW \pm SEM).

3.5.2 Charakterisierung der I κ B ϵ -Proteolyse in Zeitverlaufsexperimenten

3.5.2.1 TNF-vermittelte I κ B ϵ -Degradierung in Abhängigkeit von IKK α

In einem nächsten Schritt sollte die Frage geklärt werden, in welcher Weise das Proteolyseverhalten des inhibitorischen Proteins I κ B ϵ durch die Abwesenheit von IKK α im Vergleich zu den Wildtypzellen beeinflusst wird. Um dies zu untersuchen, wurden Versuche zum I κ B ϵ -Proteolysemuster in Wildtyp- und IKK α -Knock out-Fibroblasten durchgeführt. Diese wurden in Zeitverlaufsexperimenten mit 2 ng/ml TNF stimuliert und die zytosolischen Proteine anschließend isoliert. Der Proteolysegrad von I κ B ϵ -Protein wurde mittels des Western blot-Verfahrens untersucht. Als Kontrolle für eine einheitliche Proteinladung diente die Menge von Aktin, das in diesem Versuch unverändert blieb (nicht gezeigte Daten). In beiden Zelltypen war nach 10-minütiger TNF-Stimulierung eine deutliche Degradierung von I κ B ϵ in der Western blot-Analyse zu beobachten. Die Proteolyse von I κ B ϵ scheint in Wildtypzellen sowie in IKK α ^{-/-}-Zellen identisch zu verlaufen (Abb. 15).

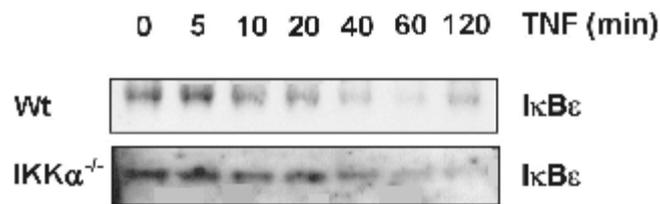


Abbildung 15: TNF-vermittelte IκBε-Degradierung in Abhängigkeit von IKKα. Wildtypfibroblasten und IKKα^{-/-}-Zellen wurden in Zeitverlaufsexperimenten mit TNF (2 ng/ml) untersucht. Durch Western blot-Analysen erfolgte die Messung der Menge an IκBε in den zytosolischen Extrakten. Die Behandlung der Western blot-Membranen mit einem Antikörper gegen Aktin als Kontrolle zeigte eine gleichmäßige Proteinladung (Filme nicht gezeigt).

3.5.2.2 Densitometrische Analyse

Die Proteinkonzentrationen von IκBε von drei unabhängigen Experimenten wurden nach einer densitometrischen Auswertung graphisch dargestellt und Aktin als Ladungskontrolle miteingerechnet. Sowohl in Wildtyp- als auch in IKKα-Knock out-Fibroblasten konnte ein Beginn der IκBε-Proteolyse nach 5- bis 10-minütiger TNF-Stimulierung ermittelt werden. Der maximale Abbau wurde in beiden Zelltypen nach 60 min beobachtet (Abb. 16). Das Proteolyseverhalten von IκBε scheint in IKKα^{-/-}-Zellen und in Wildtypfibroblasten vergleichbar zu sein.

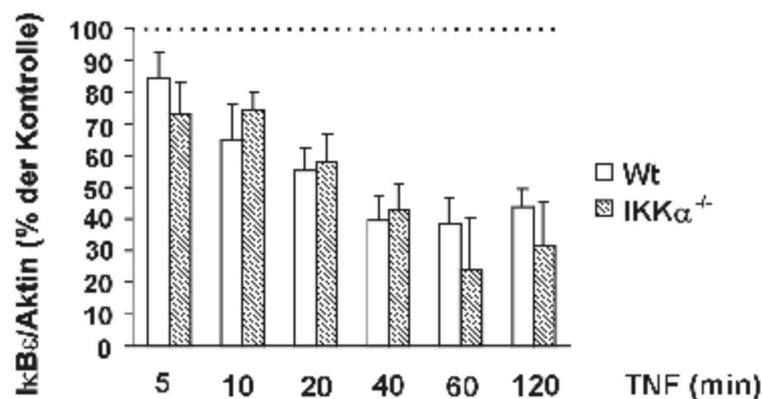


Abbildung 16: Densitometrische Analyse der IκBε-Degradierung. Das Proteolyseverhalten von IκBε aus Experimenten wie in Abbildung 15 beschrieben wurde nach Stimulation mit TNF (2 ng/ml) densitometrisch analysiert. Die IκBε-Mengen wurden unter Berücksichtigung der Intensität der Aktinbanden berechnet. Die Menge von IκBε bei 0 min wurde als 100 % gewertet. Es wurden drei unabhängige Experimente in die Berechnung miteinbezogen (MW±SEM).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden IKK β /IKK γ -Subkomplexe identifiziert und die damit assoziierten Signalwege näher charakterisiert.

4.1 Endogene IKK β /IKK γ -Subkomplexe *in vivo*

In der Literatur ist bekannt, dass der IKK-Komplex in der „klassischen“ Konformation, bestehend aus IKK α /IKK β /IKK γ , in den Zellen vorliegt. Verschiedene Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass IKK-Subkomplexe existieren, die ausschließlich IKK γ und IKK β , jedoch kein IKK α enthalten (68,116). Zu Beginn dieser Studie war jedoch ungeklärt, ob diese IKK-Subkomplexe auch *in vivo* vorliegen und welche Signalwege hiermit assoziiert sind. Die vorliegende Arbeit zeigt die Anwesenheit von endogenen IKK β /IKK γ -Subkomplexen *in vivo* im Zytosol monozytärer Zellen. Übereinstimmend mit diesen Daten wiesen bereits frühere Experimente in HeLa-Zellen darauf hin, dass neben den „klassischen“ IKK α -haltigen Komplexen heterogene IKK-Komplexe existieren. Diese IKK-Komplexe enthalten lediglich IKK β , jedoch kein IKK α als kinaseaktive Domäne (68). Dahingegen wurden in der SLB T-Zelllinie solche Subkomplexe nicht gefunden, was zelltypspezifische Unterschiede nahelegt (68). Es ist bekannt, dass rekombinante IKK α - und IKK β -Proteine Homo- und Heterodimere bilden können (116). Dies lässt vermuten, dass solche IKK-Komplexe tatsächlich *in vivo* existieren können. Die vollständige rekombinante Rekonstitution des IKK-Komplexes in Hefezellen zeigt, dass die stöchiometrische Zusammensetzung des IKK-Kernkomplexes entweder aus $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ oder – bemerkenswerterweise – aus $\beta 2\gamma 2$ besteht (70).

4.2 TNF-Aktivierung der IKK β /IKK γ -Subkomplexe

Die vorliegenden Daten dieser Arbeit zeigen weiterhin, dass die bereits beschriebenen IKK β /IKK γ -Subkomplexe in Monozyten durch TNF aktiviert werden können. Dies ist bekannterweise ein potenter Stimulus für NF- κ B (11,48). In den durchgeführten Experimenten wurde, nach einer IKK α -Immundepletion, eine signifikante, durch TNF induzierte Zunahme der Kinaseaktivität im IKK γ -Immunpräzipitat gemessen. Sowohl die

basale, als auch die induzierte IKK-Aktivität war in diesen Präzipitaten niedriger als in den nicht-depletierten Proben. Diese Ergebnisse stimmen mit vorausgegangenen Experimenten überein, welche demonstrieren, dass nach sequenzieller Immunpräzipitation mit einem IKK α -Antikörper und anschließender IKK β -Immunpräzipitation immer noch kinaseaktive Bestandteile im HeLa-Zellextrakt vorhanden sind (68). Die Menge von IKK β oder IKK γ Protein hat sich durch die TNF-Behandlung in dieser Studie nicht verändert. Dies deutet darauf hin, dass während dieser Stimulierung keine dynamische Umorganisation des IKK-Komplexes stattfindet.

In früheren Studien mit IKK $\alpha^{-/-}$ -Mäusen zeigten Fibroblasten dieser Tiere *in vitro* als Antwort auf die proinflammatorischen Stimuli TNF oder IL-1 im Kinaseassay eine signifikante IKK-Aktivierung, welche eine Phosphorylierung von I κ B α und I κ B β bewirkt (42,58,96). Der Kinaseassay erfolgte in diesem Fall nach Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen IKK β und IKK γ (41,42,58,96). Der oben beschriebene Effekt ist dabei vermutlich – da IKK α fehlt – auf die Gegenwart von endogenen, funktionellen IKK β /IKK γ -Subkomplexen zurückzuführen (58). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die endogenen IKK β /IKK γ -Subkomplexe in monozytären Zellen aktiv sind. Dies stimmt mit den Resultaten von Überexpressionsstudien überein, in denen monozytäre THP-1-Zellen mit dem Wildtyp oder der dominant negativ mutierten Form von IKK α transfiziert wurden (33,73). In diesen Experimenten war die TNF- oder LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung, sowie die κ B-abhängige Transkription nur teilweise beeinflusst, ebenso wie in Untersuchungen mit Fibroblasten von IKK $\alpha^{AA/AA}$ Knock in-Mäusen, bei denen die Serine in der Aktivierungsdomäne von IKK α durch Alanin ersetzt wurden (22). Im Gegensatz dazu ist eine dominant negative Mutante von IKK β wesentlich effektiver (33,73). Zusammengefasst weisen die durchgeführten Experimente der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass IKK β /IKK γ -Subkomplexe an der NF- κ B-assoziierten Signalübertragung teilnehmen.

4.3 Keine Aktivierbarkeit der IKK β /IKK γ -Komplexe durch NIK

Es wurde bereits nachgewiesen, dass IKK α ein spezifisches Substrat für NIK ist und auf diese Weise aktiviertes IKK α an einer phosphorylierungsabhängigen Prozessierung von NF- κ B/p100 beteiligt ist (34,71,90). Darüber hinaus wurde vermutet, dass der „klassische“ IKK-

Komplex, bestehend aus IKK α , IKK β und IKK γ , nicht in diesen Signalweg involviert ist. Dieser scheint über einen anderen, IKK α -enthaltenden Komplex vermittelt zu werden (34). Deshalb wurde, um die Bedeutung von IKK β /IKK γ -Subkomplexen an diesem Signalübertragungsweg zu beurteilen, die Induzierbarkeit dieser Komplexe nach Immundepletion von IKK α getestet. Durch die Überexpression von NIK in HeLa-Zellen erfolgte eine Stimulierung der Zellen. Bemerkenswerterweise konnte nach einer IKK α -Immundepletion in den verbleibenden IKK β /IKK γ -Subkomplexen keine NIK-induzierte Kinaseaktivität gemessen werden. Dies lässt darauf schließen, dass diese IKK-Subkomplexe nicht an dem NIK-vermittelten Signalweg teilnehmen. Es soll auch erwähnt werden, dass diese Experimente als eine indirekte Kontrolle für das Immundepletionsprotokoll in der vorliegenden Arbeit gewertet werden können, da in diesem Fall durch die IKK α -Immundepletionsprozedur der aktivierte Anteil der IKK-Komplexe im Zytosol vollständig entfernt werden konnte.

4.4 Verlangsamte Proteolyse von I κ B α

Um den Signalweg in der Abwesenheit von IKK α näher zu charakterisieren, wurden murine IKK α ^{-/-}-Fibroblasten verwendet, in denen sich aufgrund des fehlenden IKK α -Proteins nur IKK β /IKK γ -Subkomplexe bilden können (114). Nach TNF-Stimulierung dieser murinen Zellen wurde in Zeitverlaufsexperimenten das Proteolysemuster der inhibitorischen I κ B-Proteine untersucht. Interessanterweise wurde I κ B α nach TNF-Behandlung in IKK α ^{-/-}-Zellen langsamer abgebaut als in Wildtypzellen. Dieser Effekt konnte durch die Retransfektion von IKK α in IKK α ^{-/-}-Zellen rückgängig gemacht werden. Dies weist darauf hin, dass die Anwesenheit von IKK α -Protein direkt den Abbau von I κ B α beeinflusst. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass die TNF-induzierte Phosphorylierung von I κ B α in Knock out-Zellen im Vergleich zu Wildtypfibroblasten vermindert ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Proteolyse von I κ B α in IKK α -Knock out-Zellen zumindest teilweise aufgrund einer verminderten IKK-Aktivität verzögert ist, und dass somit eine unterschiedliche Signalübertragungsdynamik zwischen IKK β /IKK γ -Subkomplexen und den IKK α -enthaltenden, klassischen Komplexen vorliegt. Diese Ergebnisse korrelieren mit der oben beschriebenen Beobachtung einer reduzierten Induzierbarkeit der IKK β /IKK γ -Subkomplexe im Vergleich zu den „klassischen“ IKK α -haltigen Komplexen in monozytären THP-1-Zellen.

Eine mögliche Bedeutung dieser differentiellen, mit den beiden IKK-Komplexformen assoziierten Signalkaskaden könnte sein, dass dadurch eine Feinregulation der NF- κ B-vermittelten Genexpression ermöglicht wird. Zudem kann die Aktivierung von NF- κ B auf diese Weise prolongiert werden. Weiterhin wäre es denkbar, dass bei der gleichzeitigen Aktivierung der Zelle durch mehrere Stimuli, bei denen der eine über das „klassische“ System und der andere über die IKK β /IKK γ -Subkomplexe vermittelt wird, über das Vorhandensein dieser unterschiedlichen Signalübertragungswege eine spezifische Regulation der Reaktion der Zelle ermöglicht wird.

4.5 Keine Effekte auf die I κ B ϵ -Proteolyse

Im Gegensatz zur Proteolyse von I κ B α beeinflusste die Abwesenheit von IKK α -Protein die Proteolyse von I κ B ϵ nicht, da ein vergleichbares Maß an Degradierung von I κ B ϵ sowohl in IKK α -Knock out-Zellen als auch in Wildtypfibroblasten detektiert werden konnte. Dies könnte bedeuten, dass die reduzierte, aber immer noch signifikante IKK-Aktivität in IKK α -Knock out-Zellen ausreicht, um die Proteolyse von I κ B ϵ (die bekanntermaßen langsamer von statten geht) zu vermitteln (101). I κ B ϵ stellt für die NF- κ B-vermittelte Signalübertragung einen eher langsamen Weg dar. Unterschiedlich zum Abbau von I κ B α wird dieser Inhibitor von NF- κ B bei einer länger anhaltenden Stimulierung der Zelle degradiert (106). Die IKK β /IKK γ -Subkomplex vermittelte Phosphorylierungsaktivität scheint in diesem Fall keinen Unterschied zur „klassischen“ Signalübertragung darzustellen. Genauso wie die NF- κ B-induzierte I κ B α -Transkription stellt auch die Expression von I κ B ϵ eine negative Rückkopplung für dieses System dar (51). Diese ist jedoch durch die beiden bekannten und oben genannten IKK-Komplexformen nicht beeinträchtigt.

4.6 IKK α - ein „Turbo-Molekül“?

Wie bereits erwähnt ist IKK α für die meisten proinflammatorischen Signalwege nicht erforderlich (41,42,58,73,96). Die Experimente dieser Arbeit weisen ebenfalls darauf hin, dass die IKK β /IKK γ -Subkomplexe ohne IKK α in einer intakten Zelle existieren und funktionell aktiv sind. Darüber hinaus konnten Studien zeigen, dass IKK α eine Rolle bei spezifischen Signalwegen und Differenzierungsprozessen, wie auch bei B-Zell-vermittelten

Antworten, spielt (22,41,42,58,73,79,96). Es stellt sich folglich die Frage, warum IKK α im klassischen IKK-Kernkomplex verblieben ist. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass IKK α im „klassischen“ Komplex einen „Turbo“-ähnlichen Effekt haben könnte, um gewisse Signalwege wie etwa die Proteolyse von I κ B α zu beschleunigen. Diese differentielle Signalübertragung bietet der Zelle zwei Vorteile: zum einen können bei einer Aktivierung lediglich der IKK β /IKK γ -Subkomplexe die „langsamen“ Eigenschaften dieser IKK-Signaltransduktion genutzt werden, um eine Verzögerung der NF- κ B-Aktivierung zu ermöglichen und so andere, z.B. proapoptotische Signalwege zu stärken. Zum anderen ist es denkbar, dass durch die Beteiligung beider Aktivierungskaskaden die NF- κ B-vermittelte Genexpression prolongiert wird. Durch den verzögerten Beginn der NF- κ B-Aktivierung bei der Signalübertragung über die IKK β /IKK γ -Subkomplexe kann somit eine zeitversetzte Bildung an aktivem NF- κ B erreicht werden.

Das in Abbildung 17 dargestellte Modell fasst die Unterschiede der Signalübertragung über die IKK β /IKK γ -Subkomplexe bzw. die „klassischen“ IKK α -haltigen Komplexe zusammen.

Der bereits genannte „Turbo“-ähnliche Effekt von IKK α könnte mehrere Ursachen haben. Eine Möglichkeit wäre, dass IKK α die Assoziation des Kernkomplexes mit verschiedenen weiteren Proteinen, wie etwa die in der Signalübertragungskaskade vorgeschalteten Kinasen oder Adapterproteine vermittelt, welche die Kinaseaktivität und somit die I κ B α -Phosphorylierung steigern (11,34). Alternativ könnte IKK α möglicherweise die IKK-Aktivität erhöhen, indem es selbst als vorgeschaltete Kinase dient, welche andere IKK-Moleküle phosphoryliert (11,34,53). Es wurde außerdem beobachtet, dass in Überexpressionsstudien (ohne exogenen Stimulus) die Proteolyse von endogenem I κ B α in Anwesenheit von exogenen IKK β /IKK γ -Subkomplexen geringer war als bei Vorliegen des (klassischen) rekonstituierten IKK α /IKK β /IKK γ -Komplexes. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine Trans-Autophosphorylierung zwischen den IKK-Molekülen stattfindet (27,82). Bei Abwesenheit von IKK α könnte gleichzeitig auch die konstitutiv stattfindende Signalübertragung beeinflusst sein (27,114). Zusammengefasst ist die Fähigkeit von IKK α , die IKK-Aktivität zu erhöhen, möglicherweise einer der Gründe, weshalb diese Kinase trotz ihrer zusätzlichen spezifischen Funktionen während der Evolution ein Teil des „klassischen“ IKK-Kernkomplexes geblieben ist.

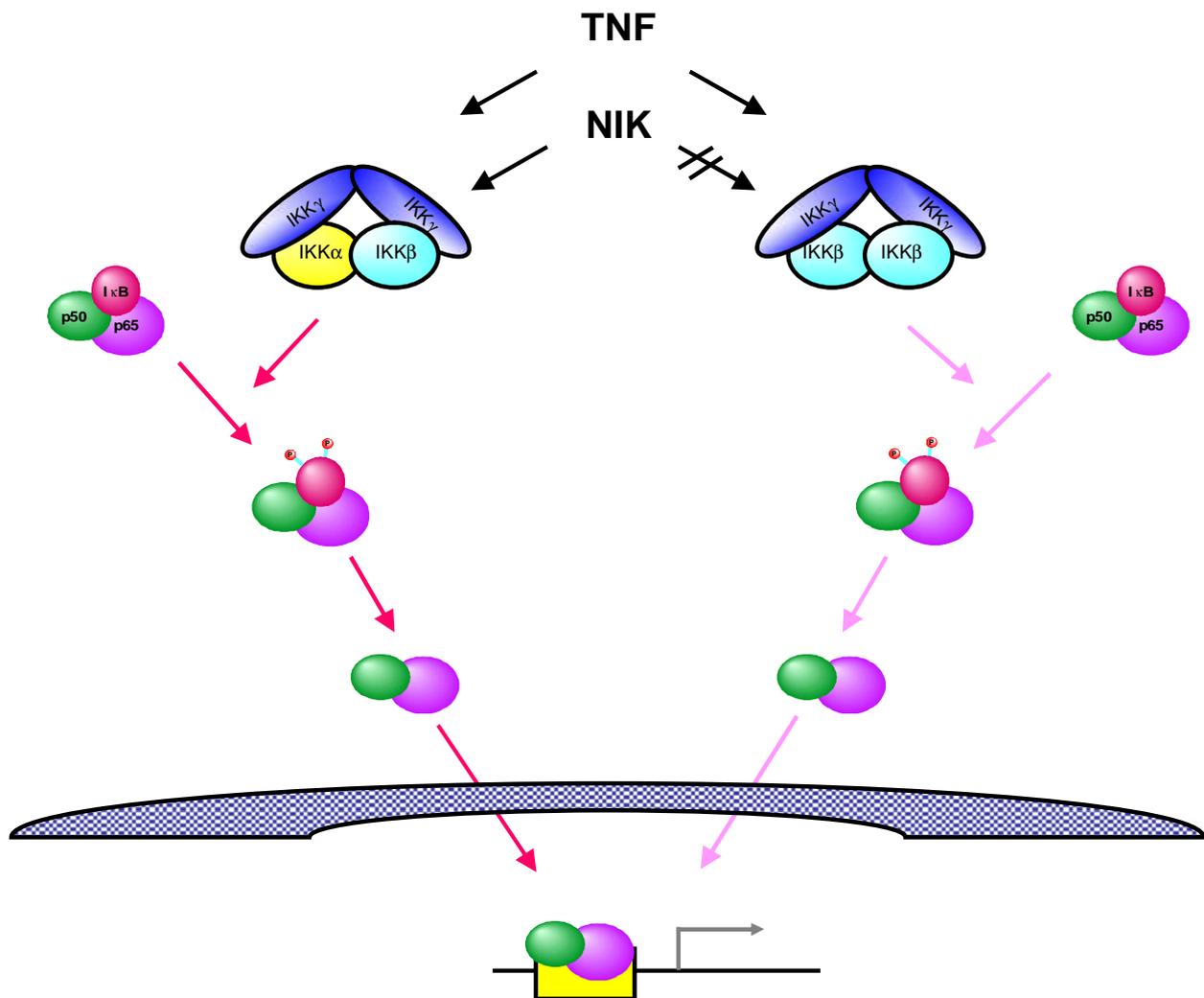


Abbildung 17: Differentielle Aspekte IKK-Komplex assoziierter Signalübertragung. Die „klassischen“ IKK α -haltigen IKK-Komplexe sind sowohl durch TNF als auch durch NIK aktivierbar (linke Seite). Eine Stimulierung induziert die Phosphorylierung von NF- κ B-gebundenem I κ B α und dessen Degradation durch das Proteasom. Das I κ B α -freie und damit aktive NF- κ B wandert in den Kern ein und kann durch Bindung an die DNA regulativ in die Transkription zahlreicher Gene eingreifen. Im Gegensatz zu diesem regulären Weg über die IKK α -haltigen IKK-Komplexe können die IKK β /IKK γ -Subkomplexe zwar über TNF, jedoch nicht über NIK induziert werden (rechte Seite). Die Phosphorylierung von I κ B α durch die IKK β /IKK γ -Subkomplexe ist im Vergleich zu den IKK α -haltigen IKK-Komplexen vermindert. Dies führt zu einer verzögerten Proteolyse des Inhibitors (helle Pfeile). Die Anwesenheit der IKK β /IKK γ -Subkomplexe prolongiert möglicherweise den Eintritt des aktiven NF- κ B-Proteins in den Kern sowie die Regulation der Gentranskription.

4.7 Therapeutische Ansatzpunkte

Das Vorhandensein von IKK β /IKK γ -Subkomplexen neben den „klassischen“ IKK α /IKK β /IKK γ -Komplexen könnte attraktive therapeutische Möglichkeiten bei der Behandlung von entzündlichen und Tumorerkrankungen darstellen (5,110). So könnte bei Sepsis die Hyperinflammation durch spezifische Blockade der IKK α -enthaltenden Komplexe vermindert werden. Dadurch würde die exzessive Aktivierung von NF- κ B reduziert werden. Die IKK β /IKK γ -Subkomplexe wären hierbei weiterhin aktiv und könnten wichtige Basisprozesse wie etwa eine minimale Antwortmöglichkeit bei der Regulation der Immunantwort vermitteln (34,40,108). So wäre eine Immunreaktion auf den dabei noch vorhandenen Stimulus gewährleistet. Dies stellt bei den bisher eingesetzten IKK-Inhibitoren ein Problem dar (37,50). Alternativ könnten bei der Blockade von IKK β die postulierten spezifischen IKK α -abhängigen Signalwege weiterhin vermittelt werden (2,34,44,90). Ein alternierender Gebrauch beider inhibitorischer Strategien während der Therapie würde eine Erschöpfung beider Signalübertragungswege verhindern, die Entzündung jedoch effektiv hemmen.

5 Zusammenfassung

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Rolle von Transkriptionsfaktoren der Nuklearfaktor- κ B (NF- κ B)/Rel-Familie bei akut oder chronisch entzündlichen Prozessen besser zu verstehen. Proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise der Tumornekrosefaktor (TNF) führen zu einer Aktivierung des NF- κ B-Systems. Die präsentierte Arbeit befasst sich mit der Rolle von IKK-Subkomplexen bei der TNF-vermittelten Signalübertragung.

Zu Beginn der vorliegenden Studien wurde die Existenz von endogenen I κ B-Kinase (IKK)-Subkomplexen in monozytären Zellen nachgewiesen. Es wurden IKK β /IKK γ -Subkomplexe dargestellt, die neben dem Adapter IKK γ lediglich IKK β , nicht jedoch IKK α , als kinaseaktive Untereinheit enthalten. Die IKK β /IKK γ -Subkomplexe können durch TNF aktiviert werden und scheinen somit an der regulären NF- κ B-vermittelten Signalkaskade beteiligt zu sein. Im Gegensatz hierzu kann die NF- κ B-induzierte Kinase (NIK) diese IKK-Subkomplexe nicht induzieren. Dies deutet auf eine selektive Aktivierbarkeit der IKK β /IKK γ -Subkomplexe hin. Um die Signalübertragungswege, die mit diesen IKK-Subkomplexen assoziiert sind, näher zu charakterisieren, wurden IKK α -Knock out-Zellen verwendet, in denen sich aufgrund des nicht vorhandenen IKK α -Proteins ebenfalls IKK β /IKK γ -Subkomplexe bilden. In Zeitverlaufexperimenten, in denen die IKK $\alpha^{-/-}$ -Fibroblasten unterschiedlich lange mit TNF stimuliert wurden, konnte gezeigt werden, dass es hierbei zu einer verzögerten Phosphorylierung und Proteolyse von I κ B α kommt. Im Gegensatz dazu wurde die Degradierung von I κ B ϵ durch die Abwesenheit von IKK α -Protein nicht beeinflusst. Dies könnte bedeuten, dass die reduzierte IKK-Aktivität in Knock out-Fibroblasten ausreicht, um den Abbau von I κ B ϵ , nicht jedoch von I κ B α , zu vermitteln. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die IKK β /IKK γ -Subkomplexe eine unterschiedliche Dynamik der Signalübertragung, verglichen mit den „klassischen“ IKK α -haltigen IKK-Komplexen, aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurden IKK β /IKK γ -Subkomplexe identifiziert und näher charakterisiert. Die erhaltenen Ergebnisse liefern einen wichtigen Beitrag für ein besseres Verständnis der TNF-vermittelten Signalübertragung und bieten möglicherweise neue

therapeutische und diagnostische Ansatzpunkte für entzündliche oder auch maligne Erkrankungen.

6 Literaturverzeichnis

1. Agou, F., Ye, F., Goffinont, S., Courtois, G., Yamaoka, S., Israel, A. und Veron, M. (2002). NEMO trimerizes through its coiled-coil C-terminal domain. *J Biol Chem* 277: 17464-75.
2. Anest, V., Hanson, J.L., Cogswell, P.C., Steinbrecher, K.A., Strahl, B.D. und Baldwin, A.S. (2003). A nucleosomal function for I κ B kinase- α in NF- κ B-dependent gene expression. *Nature* 423: 659-63.
3. Baeuerle, P.A. und Baltimore, D. (1996). NF- κ B: ten years after. *Cell* 87: 13-20.
4. Baeuerle, P.A. und Henkel, T. (1994). Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12: 141-79.
5. Baldwin, A.S. (2001). Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *J Clin Invest* 107: 241-6.
6. Baldwin, A.S., Jr. (1996). The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14: 649-83.
7. Baldwin, A.S., Jr. (2001). Series introduction: the transcription factor NF- κ B and human disease. *J Clin Invest* 107: 3-6.
8. Balkwill, F. (2002). Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 135-41.
9. Balkwill, F. und Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357: 539-45.
10. Barnes, P.J. und Karin, M. (1997). Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336: 1066-71.
11. Baud, V. und Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11: 372-7.
12. Baumgartner, B., Weber, M., Quirling, M., Fischer, C., Page, S., Adam, M., Von Schilling, C., Waterhouse, C., Schmid, C., Neumeier, D. und Brand, K. (2002). Increased I κ B kinase activity is associated with activated NF- κ B in acute myeloid blasts. *Leukemia* 16: 2062-71.
13. Bazzoni, F. und Beutler, B. (1996). The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 334: 1717-25.
14. Bell, S., Degitz, K., Quirling, M., Jilg, N., Page, S. und Brand, K. (2003). Involvement of NF- κ B signalling in skin physiology and disease. *Cell Signal* 15: 1-7.
15. Bell, S. und Kamm, M.A. (2000). Antibodies to tumour necrosis factor alpha as treatment for Crohn's disease. *Lancet* 355: 858-60.
16. Bender, K., Gottlicher, M., Whiteside, S., Rahmsdorf, H.J. und Herrlich, P. (1998). Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF- κ B by UV. *Embo J* 17: 5170-81.
17. Beutler, B. (1995). TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Invest Med* 43: 227-35.

18. Beutler, B.A. (1999). The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol Suppl* 57: 16-21.
19. Brand, K., Eisele, T., Kreuzel, U., Page, M., Page, S., Haas, M., Gerling, A., Kaltschmidt, C., Neumann, F.J., Mackman, N., Baeurele, P.A., Walli, A.K. und Neumeier, D. (1997). Dysregulation of monocytic nuclear factor-kappa B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1901-9.
20. Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Brandl, R., Knuechel, R., Page, M., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P.A. und Neumeier, D. (1996). Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 97: 1715-22.
21. Brand, K., Page, S., Walli, A.K., Neumeier, D. und Baeuerle, P.A. (1997). Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis. *Exp Physiol* 82: 297-304.
22. Cao, Y., Bonizzi, G., Seagroves, T.N., Greten, F.R., Johnson, R., Schmidt, E.V. und Karin, M. (2001). IKKalpha provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell* 107: 763-75.
23. Chang, H.Y. und Yang, X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 821-46.
24. Chen, G., Cao, P. und Goeddel, D.V. (2002). TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell* 9: 401-10.
25. Chen, G. und Goeddel, D.V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296: 1634-5.
26. Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D. und Maniatis, T. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 9: 1586-97.
27. Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y. und Karin, M. (1999). Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* 284: 309-13.
28. Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M. und Liu, Z. (2000). The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* 12: 419-29.
29. DiDonato, J., Mercurio, F., Rosette, C., Wu-Li, J., Suyang, H., Ghosh, S. und Karin, M. (1996). Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 16: 1295-304.
30. DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E. und Karin, M. (1997). A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388: 548-54.
31. Ducut Sigala, J.L., Bottero, V., Young, D.B., Shevchenko, A., Mercurio, F. und Verma, I.M. (2004). Activation of transcription factor NF-kappaB requires ELKS, an IkappaB kinase regulatory subunit. *Science* 304: 1963-7.
32. Dunne, A. und O'Neill, L.A. (2003). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003: re3.

33. Fischer, C., Page, S., Weber, M., Eisele, T., Neumeier, D. und Brand, K. (1999). Differential effects of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor on monocytic IkappaB kinase signalsome activation and IkappaB proteolysis. *J Biol Chem* 274: 24625-32.
34. Ghosh, S. und Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl: S81-96.
35. Ghosh, S., May, M.J. und Kopp, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-60.
36. Gilmore, T.D., Koedood, M., Piffat, K.A. und White, D.W. (1996). Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. *Oncogene* 13: 1367-78.
37. Greten, F.R. und Karin, M. (2004). The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett* 206: 193-9.
38. Grilli, M., Chiu, J.J. und Lenardo, M.J. (1993). NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol* 143: 1-62.
39. Hilt, W. und Wolf, D.H. (1996). Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem Sci* 21: 96-102.
40. Hotchkiss, R.S. und Karl, I.E. (2003). The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348: 138-50.
41. Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R. und Karin, M. (1999). Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science* 284: 316-20.
42. Hu, Y., Baud, V., Oga, T., Kim, K.I., Yoshida, K. und Karin, M. (2001). IKKalpha controls formation of the epidermis independently of NF-kappaB. *Nature* 410: 710-4.
43. Israel, A. (2000). The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol* 10: 129-33.
44. Israel, A. (2003). Signal transduction: A regulator branches out. *Nature* 423: 596-7.
45. Jones, R.E. und Moreland, L.W. (1999). Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis. *Bull Rheum Dis* 48: 1-4.
46. Karin, M. (1999). The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 274: 27339-42.
47. Karin, M. (1999). How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18: 6867-74.
48. Karin, M. und Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18: 621-63.
49. Karin, M. und Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3: 221-7.
50. Karin, M., Yamamoto, Y. und Wang, Q.M. (2004). The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 3: 17-26.
51. Kearns, J.D., Basak, S., Werner, S.L., Huang, C.S. und Hoffmann, A. (2006). I{kappa}B{varepsilon} provides negative feedback to control NF-{kappa}B

- oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression. *J Cell Biol* 173: 659-64.
52. Kunsch, C., Lang, R.K., Rosen, C.A. und Shannon, M.F. (1994). Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J Immunol* 153: 153-64.
 53. Kwak, Y.T., Guo, J., Shen, J. und Gaynor, R.B. (2000). Analysis of domains in the IKKalpha and IKKbeta proteins that regulate their kinase activity. *J Biol Chem* 275: 14752-9.
 54. Lee, F.S., Hagler, J., Chen, Z.J. und Maniatis, T. (1997). Activation of the IkappaB alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* 88: 213-22.
 55. Leonardi, A., Chariot, A., Claudio, E., Cunningham, K. und Siebenlist, U. (2000). CIKS, a connection to Ikappa B kinase and stress-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10494-9.
 56. Li, N. und Karin, M. (1998). Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kappaB through two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13012-7.
 57. Li, Q., Estepa, G., Memet, S., Israel, A. und Verma, I.M. (2000). Complete lack of NF-kappaB activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation. *Genes Dev* 14: 1729-33.
 58. Li, Q., Lu, Q., Hwang, J.Y., Buscher, D., Lee, K.F., Izpisua-Belmonte, J.C. und Verma, I.M. (1999). IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. *Genes Dev* 13: 1322-8.
 59. Li, Q., Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K.F. und Verma, I.M. (1999). Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science* 284: 321-5.
 60. Li, X., Commane, M., Nie, H., Hua, X., Chatterjee-Kishore, M., Wald, D., Haag, M. und Stark, G.R. (2000). Act1, an NF-kappa B-activating protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10489-93.
 61. Li, Z.W., Chu, W., Hu, Y., Delhase, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R. und Karin, M. (1999). The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* 189: 1839-45.
 62. Lin, X., Mu, Y., Cunningham, E.T., Jr., Marcu, K.B., Geleziunas, R. und Greene, W.C. (1998). Molecular determinants of NF-kappaB-inducing kinase action. *Mol Cell Biol* 18: 5899-907.
 63. Ling, L., Cao, Z. und Goeddel, D.V. (1998). NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3792-7.
 64. Mackman, N., Brand, K. und Edgington, T.S. (1991). 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: 1517-26.
 65. Malinin, N.L., Boldin, M.P., Kovalenko, A.V. und Wallach, D. (1997). MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385: 540-4.

66. Massberg, S., Brand, K., Gruner, S., Page, S., Muller, E., Muller, I., Bergmeier, W., Richter, T., Lorenz, M., Konrad, I., Nieswandt, B. und Gawaz, M. (2002). A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 196: 887-96.
67. May, M.J. und Ghosh, S. (1997). Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 8: 63-73.
68. Mercurio, F., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Young, D.B., Li, J.W., Pascual, G., Motiwala, A., Zhu, H., Mann, M. und Manning, A.M. (1999). IkappaB kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. *Mol Cell Biol* 19: 1526-38.
69. Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Li, J., Young, D.B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A. und Rao, A. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 278: 860-6.
70. Miller, B.S. und Zandi, E. (2001). 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: 36320-6.
71. Muller, J.R. und Siebenlist, U. (2003). Lymphotoxin beta receptor induces sequential activation of distinct NF-kappa B factors via separate signaling pathways. *J Biol Chem* 278: 12006-12.
72. Nakano, H., Shindo, M., Sakon, S., Nishinaka, S., Mihara, M., Yagita, H. und Okumura, K. (1998). Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3537-42.
73. O'Connell, M.A., Bennett, B.L., Mercurio, F., Manning, A.M. und Mackman, N. (1998). Role of IKK1 and IKK2 in lipopolysaccharide signaling in human monocytic cells. *J Biol Chem* 273: 30410-4.
74. Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6853-66.
75. Papadakis, K.A. und Targan, S.R. (2000). Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology* 119: 1148-57.
76. Park, K.J., Gaynor, R.B. und Kwak, Y.T. (2003). 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: 35272-8.
77. Peters, R.T., Liao, S.M. und Maniatis, T. (2000). IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex. *Mol Cell* 5: 513-22.
78. Phelps, C.B., Sengchanthalangsy, L.L., Huxford, T. und Ghosh, G. (2000). Mechanism of I kappa B alpha binding to NF-kappa B dimers. *J Biol Chem* 275: 29840-6.
79. Piccolella, E., Spadaro, F., Ramoni, C., Marinari, B., Costanzo, A., Levrero, M., Thomson, L., Abraham, R.T. und Tuosto, L. (2003). Vav-1 and the IKK alpha subunit of I kappa B kinase functionally associate to induce NF-kappa B activation in response to CD28 engagement. *J Immunol* 170: 2895-903.

80. Poyet, J.L., Srinivasula, S.M., Lin, J.H., Fernandes-Alnemri, T., Yamaoka, S., Tschlis, P.N. und Alnemri, E.S. (2000). Activation of the Ikappa B kinases by RIP via IKKgamma /NEMO-mediated oligomerization. *J Biol Chem* 275: 37966-77.
81. Prajapati, S. und Gaynor, R.B. (2002). Regulation of Ikappa B kinase (IKK)gamma /NEMO function by IKKbeta -mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 277: 24331-9.
82. Quirling, M., Page, S., Jilg, N., Plenagl, K., Peus, D., Grubmuller, C., Weingartner, M., Fischer, C., Neumeier, D. und Brand, K. (2004). Detection of IKKbeta-IKKgamma subcomplexes in monocytic cells and characterization of associated signaling. *J Biol Chem* 279: 37452-60.
83. Regnier, C.H., Song, H.Y., Gao, X., Goeddel, D.V., Cao, Z. und Rothe, M. (1997). Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 90: 373-83.
84. Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V.M. und Goeddel, D.V. (1995). TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 269: 1424-7.
85. Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J. und Goeddel, D.V. (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78: 681-92.
86. Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G. und Karin, M. (1998). IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature* 395: 297-300.
87. Scherer, D.C., Brockman, J.A., Chen, Z., Maniatis, T. und Ballard, D.W. (1995). Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11259-63.
88. Schmidt, M., Schmidtke, G. und Kloetzel, P.M. (1997). Structure and structure formation of the 20S proteasome. *Mol Biol Rep* 24: 103-12.
89. Schmitz, M.L., Mattioli, I., Buss, H. und Kracht, M. (2004). NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem* 5: 1348-58.
90. Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C. und Karin, M. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293: 1495-9.
91. Senftleben, U. und Karin, M. (2002). The IKK/NF-kappa B pathway. *Crit Care Med* 30: S18-26.
92. Siebenlist, U., Franzoso, G. und Brown, K. (1994). Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 10: 405-55.
93. Stancovski, I. und Baltimore, D. (1997). NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed? *Cell* 91: 299-302.
94. Tak, P.P. und Firestein, G.S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107: 7-11.
95. Takeda, K., Kaisho, T. und Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335-76.
96. Takeda, K., Takeuchi, O., Tsujimura, T., Itami, S., Adachi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Yoshikawa, K., Terada, N. und Akira, S. (1999). Limb and skin abnormalities in mice lacking IKKalpha. *Science* 284: 313-6.

97. Tanaka, M., Fuentes, M.E., Yamaguchi, K., Durnin, M.H., Dalrymple, S.A., Hardy, K.L. und Goeddel, D.V. (1999). Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity* 10: 421-9.
98. Tang, E.D., Wang, C.Y., Xiong, Y. und Guan, K.L. (2003). A role for NF-kappaB essential modifier/IkappaB kinase-gamma (NEMO/IKKgamma) ubiquitination in the activation of the IkappaB kinase complex by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 278: 37297-305.
99. Tegethoff, S., Behlke, J. und Scheidereit, C. (2003). Tetrameric oligomerization of IkappaB kinase gamma (IKKgamma) is obligatory for IKK complex activity and NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 23: 2029-41.
100. ten Hagen, T.L., Eggermont, A.M. und Lejeune, F.J. (2001). TNF is here to stay--revisited. *Trends Immunol* 22: 127-9.
101. Thanos, D. und Maniatis, T. (1995). NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 80: 529-32.
102. Thompson, J.E., Phillips, R.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Ghosh, S. (1995). I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* 80: 573-82.
103. Tojima, Y., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., Karin, M. und Nakanishi, M. (2000). NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature* 404: 778-82.
104. Tracey, K.J. und Cerami, A. (1994). Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 45: 491-503.
105. Traenckner, E.B., Wilk, S. und Baeuerle, P.A. (1994). A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. *Embo J* 13: 5433-41.
106. Whiteside, S.T., Epinat, J.C., Rice, N.R. und Israel, A. (1997). I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *Embo J* 16: 1413-26.
107. Woronicz, J.D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M. und Goeddel, D.V. (1997). IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science* 278: 866-9.
108. Wulczyn, F.G., Krappmann, D. und Scheidereit, C. (1996). The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med* 74: 749-69.
109. Xiao, G. und Sun, S.C. (2000). Negative regulation of the nuclear factor kappa B-inducing kinase by a cis-acting domain. *J Biol Chem* 275: 21081-5.
110. Yamamoto, Y. und Gaynor, R.B. (2001). Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 107: 135-42.
111. Yamamoto, Y., Verma, U.N., Prajapati, S., Kwak, Y.T. und Gaynor, R.B. (2003). Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature* 423: 655-9.

112. Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J. und Israel, A. (1998). Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93: 1231-40.
113. Yujiri, T., Ware, M., Widmann, C., Oyer, R., Russell, D., Chan, E., Zaitso, Y., Clarke, P., Tyler, K., Oka, Y., Fanger, G.R., Henson, P. und Johnson, G.L. (2000). MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7272-7.
114. Zandi, E., Chen, Y. und Karin, M. (1998). Direct phosphorylation of IkappaB by IKKalpha and IKKbeta: discrimination between free and NF-kappaB-bound substrate. *Science* 281: 1360-3.
115. Zandi, E. und Karin, M. (1999). Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the IkappaB kinase complex. *Mol Cell Biol* 19: 4547-51.
116. Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M. und Karin, M. (1997). The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 91: 243-52.
117. Zhang, S.Q., Kovalenko, A., Cantarella, G. und Wallach, D. (2000). Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity* 12: 301-11.

7 Anhang

7.1 Publikation

- Quirling, M.*, Page, S.*, Jilg, N., Plenagl, K., Peus, D., Grubmüller, C., Weingärtner, M., Fischer, C., Neumeier, D. und Brand, K. (2004). Detection of IKK β /IKK γ subcomplexes in monocytic cells and characterization of associated signaling. *J. Biol. Chem.* 279: 37452-37460.

7.2 Kongressbeiträge

- Quirling, M., Page, S., Jilg, N., Plenagl, K., Peus, D., Grubmüller, C., Weingärtner, M., Neumeier, D. und Brand, K. (2004). Identification of IKK β /IKK γ subcomplexes in monocytic cells and characterization of associated signaling. H.J. Staudinger Symposium, Forschung in Pathobiochemie, Klinischer Chemie und Laboratoriumsmedizin. Bad Staffelstein *Abstract Book*.
- Quirling, M., Page, S., Jilg, N., Plenagl, K., Peus, D., Grubmüller, C., Weingärtner, M., Neumeier, D. und Brand, K. (2004). Identification of IKK β /IKK γ subcomplexes in monocytic cells and characterization of associated signaling. Kongress für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin. Düsseldorf (Poster).
- Quirling, M., Page, S., Jilg, N., Plenagl, K., Peus, D., Grubmüller, C., Weingärtner, M., Neumeier, D. und Brand, K. (2004). Detection of IKK β /IKK γ subcomplexes in monocytic cells and characterization of associated signaling. Kongress für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin. Düsseldorf Abstract Book *CCLM*. 42: A103-159.

7.3 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl-
Act1	NF- κ B-Aktivator 1
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfourid
Ak	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
Ala	Alanin
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	activator protein-1
aPKC	atypische Proteinkinase C
ARD	ankyrin repeat domain
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
cAMP	cyclo-AMP
CBP	CREB-bindendes Protein
Cdc	cell division control
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
cIAP	cellular inhibitors of apoptosis
CIKS	connection to IKK and SAPK/JNK
CMV	Cytomegalievirus
CRE	cAMP response element
CREB	CRE-bindendes Protein
Da	Dalton
DD	Dimerisierungsdomäne
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELKS	Glutaminsäure/Leucin/Lysin/Serin
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FADD	Fas-associated death domain protein
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
Gadd45 β	growth arrest and DNA damage-45 β
Glu	Glutaminsäure
GSK-3 β	glycogen synthase kinase-3 β
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HDAC	Histondeacetylase
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix
Hsp	Hitzeschockprotein
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
ID	Immundepletion
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase-Komplex
IKK- $\alpha^{-/-}$	IKK alpha knock out
IKKs	IKK-Kinasen
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1 Rezeptor
Ile	Isoleucin
IP	Immunpräzipitation
I κ B	Inhibitor-kappa B
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDA	Kilodalton
KD	Kinasedomäne
LPS	Lipopolysaccharid
LZ	Leucin-Zipper
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	mitogen activated protein kinases

MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MEF	murine embryonic fibroblast
MEKK-1/-3	mitogen-activated protein kinase /ERK kinase kinase-1/-3
Mg	Magnesium
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
μM	mikromolar
mut	mutierte Form
MW	Mittelwert
NAK	NF-κB-aktivierende Kinase
NEMO	NF-κB essential modulator
NF-κB	Nuklearfaktor-kappa B
ng	Nanogramm
NIK	NF-κB-induzierende Kinase
NLS	nuclear localisation site
nm	Nanometer
NRD	NF-κB/Rel/dorsal
Oct-1	octamer transcription factor 1
oxLDL	oxidiertes Low Density-Lipoprotein
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEST	proline-, glutamic acid-, serine- and threonin-rich region
pg	Picogramm
PI3K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
PK	Proteinkinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKR	Proteinkinase R
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid

pNA	p-Nitroanilin
pp90 ^{rsk}	mitogen-activated ribosomal S6 protein kinase
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RIP1	receptor-interacting protein 1
RT	Raumtemperatur
SAPK	stress-activated protein kinase
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler
Sp-1	Transkriptionsfaktor Sp-1
SRD	signal receiving domain
TBP	TATA-bindendes Protein
TFIIB	transcription factor class II B
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1/II	TNF-Rezeptor I/II
TRADD	TNFR1-associated death domain protein
TRAF1/2	TNFR-associated factor 1/2
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	units
u.a.	unter anderem
Überexpr.	Überexpression
UV	ultraviolett
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
WB	Western Blot
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzoldisulfonat
Wt	Wildtyp
XIAP	X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis
z.B.	zum Beispiel

7.4 Danksagung

Die vorliegende Doktorarbeit wurde am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität München in der molekularbiologischen Forschungsgruppe von Herrn Prof. Dr. Korbinian Brand durchgeführt. Dem Direktor des Instituts, Herrn Prof. Dr. Neumeier, sowie Herrn Prof. Dr. Brand möchte ich an dieser Stelle für hervorragende Arbeitsbedingungen Dank sagen.

Herrn Prof. Dr. Brand möchte ich außerdem besonders für die Bereitstellung dieses interessanten und spannenden Themas, die wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertation und die umfangreiche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit danken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Brand bedanken. Für ein hervorragendes Arbeitsklima und das kollegiale Miteinander bin ich Herrn Peter Heiß, Frau Dr. Caroline Nothdurfter, Frau Dr. Carmen Sydlik, Frau Dr. Marion Wagner, Herrn Andreas Zwergal, Frau Dr. Sharon Page, Herrn Bernd Saugel sowie Frau Dr. Monika Weingärtner sehr dankbar.

Frau Ursula Schmitz und Frau Christine Grubmüller möchte ich darüber hinaus für die Einarbeitung in die Zellkultur sowie andere gängige Labortechniken und Frau Martina Krautkrämer für die Unterstützung bei der vorliegenden Arbeit sehr danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Martina Quirling für die Einarbeitung sowie erfolgreiche und produktive Zusammenarbeit bei der Charakterisierung der IKK-Subkomplexe. In allen Höhen und Tiefen bei der Erstellung der Arbeit hatte sie stets ein offenes Ohr für mich. Für ihre umfassende Unterstützung, ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft bei fachlichen Fragestellungen sowie unzähligen Computerproblemen, ihre Geduld und ganz besonders für ihre stets aufmunternde Fröhlichkeit möchte ich mich sehr herzlich bei ihr bedanken.

Weiterhin geht ein Dankeschön an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie.

Ein Dank gebührt auch meinen Freunden für ihre Hilfe und ihr Verständnis während der Zeit im Labor sowie beim Schreiben der Promotion.

Mein größter Dank geht jedoch an meine Familie. Meiner Schwester Christine möchte ich für ihre Unterstützung während unseres Studiums bedanken und dafür, dass sie sich Zeit für das Korrekturlesen meiner Arbeit genommen hat. Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt und dass sie immer für mich da waren. Sie haben mich stets gefördert und mir so meinen bisherigen Werdegang erst ermöglicht. Meinem Verlobten Gerhard danke ich für seine liebevolle Unterstützung, seine große Geduld und dafür, dass er immer für mich da ist