

**Untersuchungen zur Regulation des Transkriptionsfaktors
NF- κ B-p65 durch eine Phosphorylierung an Serin-536
und durch die putativen Phosphoakzeptoren
Threonin-308 und Serin-468**

**Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von Dipl.-Biochem. Holger Gerhard Buß
geboren am 27. Juli, 1973
in Aurich**

Referent: Prof. Dr. W. Müller
Institut für Physiologische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. M. Kracht
Institut für Pharmakologie
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 27. Mai 2004

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst habe. Alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen habe ich hierbei angegeben. Diese Dissertation wurde bisher weder als Diplomarbeit noch als eine andere Prüfungsarbeit verwendet.

Holger Buß

Hannover, den 19.04.2004

Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, allen zu danken, die auf verschiedene Weise zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Michael Kracht danke ich für das überlassene Thema, die hervorragende Betreuung bei der Durchführung des Projektes und für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus Resch bedanke ich mich dafür, dass es möglich war, die Arbeiten zu dieser Dissertation im Institut für Pharmakologie durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller danke ich für das freundlicherweise übernommene Referat.

Besonderer Dank gebührt Anneke Dörrie für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Weiter möchte ich mich bei Daniela Buhrow, Elke Hoffmann, Solveig Kälble, Heike Schneider, Sabine Wolter, Oliver Dittrich-Breitholz, David Holzberg, Axel Thiefes und Axel Weber für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag, für gute Ratschläge und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Außerdem danke ich allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover für die gute Zusammenarbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Lienhard Schmitz, Universität Bern, möchte ich mich für die sehr gute Kooperation bei der Durchführung des Projektes bedanken.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Dr. Ronald Frank, GBF, Braunschweig, von dessen Arbeitsgruppe die verwendeten Peptid-*Arrays* synthetisiert wurden.

Meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich für die große Unterstützung während des Studiums und danach danken.

Erratum:

unterer Abschnitt, S. 112:

Das Reaktionsprodukt der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Reaktion ist Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (nicht Inositol-1,4,5-trisphosphat). Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat moduliert die Aktivität von PDK1 (*Phosphatidylinositol-Dependent-Kinase-1*), wodurch PKC reguliert wird.

Zusammenfassung

Durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B wird die Expression einer hohen Anzahl von Genen reguliert, die eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, bei Entzündungsreaktionen, zellulären Stressreaktionen, Apoptose und in der Karzinogenese spielen. In der ruhenden Zelle wird NF- κ B durch das Inhibitorprotein I κ B im Cytosol verankert. Ein notwendiger Schritt der Aktivierung von NF- κ B ist die induzierte Degradation von I κ B, was zur Freisetzung von NF- κ B führt und die Translokation in den Zellkern ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurden komplexe Mechanismen untersucht, die zeigen, dass darüber hinaus die Aktivität von NF- κ B in einem erheblichen Maße durch induzierte Phosphorylierungen reguliert wird.

Hierbei wurde schwerpunktmäßig die durch IL-1-induzierte Phosphorylierung der p65(rel-A)-Untereinheit von NF- κ B an Ser536 untersucht. Mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers gegen die endogen phosphorylierte Form konnte gezeigt werden, dass diese Phosphorylierung physiologisch relevant ist und nicht durch die drei MAP Kinase Signalwege JNK, p38 und ERK reguliert wird. IKK β war bisher als einzige an Serin-536-phosphorylierende Proteinkinase im TNF-Signalweg näher charakterisiert worden. Die Hemmung der Aktivität von IKK β mit verschiedenen Methoden (Suppression mit siRNA, Koexpression von dominant-negativen Mutanten, Verwendung des IKK β -spezifischen Inhibitors SC-514) führte allerdings nur zu einer partiellen Inhibition der IL-1-induzierten Phosphorylierung an Serin-536. Mittels analytischer Ionenaustauschchromatographie von Zellextrakten konnten drei Proteinkinasen charakterisiert werden, die Ser536 von NF- κ B-p65 phosphorylieren können. Hierbei handelt es sich um IKK und TBK1 und eine neue, bisher nicht bekannte p65-Ser536-Proteinkinase. Diese Daten zeigen, dass Ser536 ein Konvergenzpunkt der Signaltransduktion zur Regulation der p65-Funktion darstellen muss.

Die an Ser536 phosphorylierte Form von p65 bindet IL-1-abhängig an den endogenen IL-8 Promoter. In einem zweiten Teil der Arbeit wurde daher versucht, die funktionelle Relevanz der Phosphorylierung von p65 an Ser536 aufzuklären. Hierzu wurden p65-defiziente Mausfibroblasten mit phosphomimetischen (Ser536 zu Glutamat oder Aspartat) und potentiell inhibitorischen (Ser536 zu Alanin oder Asparagin) Mutanten systematisch rekonstituiert und die Auswirkung auf ein IL-8-Promoter-Reportergenkonstrukt analysiert. Diese Daten zeigen, dass die Phosphorylierung an Serin-536 (bzw. die Substitution des Serins durch Glutamat oder Aspartat) die transkriptionelle Aktivität von p65 erhöht, während die Mutation zu Asparagin die Aktivität hemmt. Basierend auf den Daten weiterer

Untersuchungen wie *in-vitro*-Bindungsassays und Koexpression des Koaktivators TAFII31 und des Korepressors AES mit diesen Mutanten konnte ein Modell für die Funktion der Serin-536-Phosphorylierung postuliert werden. Hiernach inhibiert die IL-1-induzierte Phosphorylierung an Serin-536 die konstitutive Bindung von AES und ermöglicht im Gegenzug die Interaktion von TAFII31 mit der Transaktivierungsdomäne von p65. Dieses Modell erklärt, wie p65 an die basale Transkriptionsmaschinerie gekoppelt sein könnte und stimulus-abhängig Gentranskription bewirkt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde versucht, mit einem Peptid-Array neue Phosphorylierungsstellen in p65 zu identifizieren. Ein Protokoll konnte dabei erfolgreich für den Versuchsansatz modifiziert werden. Mit dieser Methode wurden Threonin-308 und Serin-468 als neue putative Phosphorylierungsstellen in p65 ermittelt. In einem initialen Experiment führte der Austausch dieser Aminosäuren mit Alanin zu einer Verminderung der transkriptionellen Aktivität in p65-defizienten MEF-Zellen nach IL-1 α -Stimulation.

Da in der Literatur berichtet wurde, dass der nukleäre Transport von dem p65-Homologon Dorsal, einem Rel-Protein aus *Drosophila Melanogaster*, durch eine Serin-Phosphorylierung in einem hochkonservierten Bereich reguliert wird, wurde zusätzlich eine Alanin-Mutante (S281A) des homologen Serins in humanen p65 generiert und charakterisiert. Diese Mutation führt zu einer stark reduzierten Expression in HeLaTA-Zellen, zum Verlust der DNA-Bindungsfähigkeit von p65 und zu einer starken Verminderung der transkriptionellen Aktivität in IL-1 α -stimulierten p65-defizienten MEF-Zellen. Strukturvorhersagen legen hierbei nahe, dass diese Mutation das Protein durch Eliminierung von Wasserstoffbrückenbindungen destabilisiert.

Schlagwörter: NF- κ B, Proteinkinasen, Phosphorylierung

Abstract

The transcription factor NF- κ B regulates the expression of a large number of genes with important functions in the immune-response, inflammation, cellular stress-reactions, carcinogenesis and apoptosis. In resting cells NF- κ B is trapped in the cytoplasm by its interaction with the inhibitor I κ B. A necessary step in activation of NF- κ B is the stimulus-induced degradation of I κ B, which results in release and nuclear translocation of NF- κ B. However, recent evidence suggests that additional mechanisms exist that determine NF- κ B-

activity. In this thesis complex mechanisms were investigated that regulate the activity of NF- κ B by modulatory phosphorylations.

A major focus of the work was the phosphorylation of the p65 subunit of NF- κ B at Ser536. As assessed by a highly specific antibody, phosphorylation of endogenous p65 at Ser536 is regulated by IL-1 independently of the major MAP kinase pathways JNK, p38 and ERK. So far, only IKK β had been characterized as Ser536 kinase. Inhibition of IKK β by a variety of approaches (suppression by siRNA, dominant negative mutants and the pharmacological inhibitor SC-514) did not result in complete inhibition of endogenous Ser536 phosphorylation, suggesting that other Ser536 kinases must exist. By analytical ionexchange chromatography of cell extracts three protein kinases were found that phosphorylate Ser536, namely IKK, TBK1 and an hitherto unknown protein kinase. Collectively, these data illustrate that Ser536 integrates several signalling pathways that may ultimately modulate NF- κ B-activity.

IL-1 induces the recruitment of p65 phosphorylated at Ser536 to the endogenous IL-8 promoter. In the second part of the thesis experiments were performed to identify a function for this type of p65-phosphorylation in IL-8 transcription. p65-deficient mouse fibroblasts were reconstituted with phosphomimetic (Ser536 to glutamate or aspartic acid) or potentially inhibitory (Ser536 to asparagine or alanine) mutants and their effects on the activity of an IL-8 promoter reporter gene was analysed. Apparently, phosphorylation of Ser536 (mimicked by the aspartic acid substitution) enhances transcription, while mutation to asparagine is inhibitory. On the basis of additional experiments such as *in-vitro*-binding assays and coexpression of the individual p65 mutants with either the coactivator TAFII31 or the corepressor AES a model for the function of Ser536 was postulated. Hereby IL-1-induced phosphorylation suppresses the constitutive interaction with AES and promotes the interaction of p65 with TAFII31. As a result transcription is enhanced.

In the third part of the project an attempt was made to identify novel phosphorylation sites within p65. For this purpose, *in vitro*-protein kinase assays were performed with unstimulated and stimulated cell extracts using arrayed peptide substrates covering the p65 primary sequence. With this approach threonine-308 and serine-468 were identified as novel putative phosphorylation-sites. In an initial experiment the exchange of these amino acids by alanine resulted in a reduced transcriptional activity in reconstituted p65-deficient MEF-cells after IL-1 α -stimulation.

Finally, based on reports that the p65-homologon Dorsal, a rel-protein in *Drosophila Melanogaster*, is phosphorylated at a serine within a region highly conserved in all rel-

proteins, which regulates nuclear import, an alanine mutation (S281A) of the homologous serine in human p65 was generated and characterized. This mutation results in a strongly reduced expression in HeLa-cells, in a loss of DNA-binding *in-vitro* and in a strongly reduced transcriptional activity in IL-1 α -stimulated reconstituted p65-deficient MEF-cells. In this case structure prediction suggests, that this mutation destabilizes the protein by elimination of hydrogen-bonds.

Keywords: NF- κ B, protein kinases, phosphorylation

Abkürzungsverzeichnis.....	8
1. Einleitung	11
1.1 NF- κ B-Proteine	11
1.2 Struktur von NF- κ B und I κ B	13
1.4 Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch IKK-induzierte I κ B-Degradation.....	14
1.2 Physiologische Funktion von NF- κ B	16
1.5 Mehrfach-Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren	18
1.6 I κ B-unabhängige Regulation der NF- κ B-Aktivität durch Phosphorylierungen	20
1.7 Zielsetzung	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	37
2.2.1 Arbeiten mit Bakterienkulturen.....	37
2.2.3 Herstellung von Plasmid-DNA	38
2.2.4 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	38
2.2.5 Analytischer und präparativer Restriktionsverdau von DNA	38
2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	39
2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten	40
2.2.9 Zwischenklonierung von PCR-Fragmenten mittels der TOPO-Technologie	41
2.2.10 Ortsgerichtete Mutagenese	41
2.2.11 DNA-Sequenzierung	42
2.3 Zellkulturtechniken	43
2.3.1 Kultivierung von adhärennten Zelllinien	43
2.3.2 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung	43
2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	43
2.3.4 Stimulation und Ernten von Zellen	44
2.3.5 <i>Transfektionsmethoden</i>	44
2.3.5.1 <i>Transfektion mit der Kalziumphosphatmethode</i>	44
2.3.5.2 <i>Lipofektionsmethode</i>	45
2.3.5.3 <i>Transfektion von HEK293IL1R-Zellen mit siRNA</i>	45
2.3.6 Reporter-gen-Untersuchungen.....	46
2.4 Proteinbiochemische Methoden	47
2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford.....	47
2.4.2 Präparation von Zelllysaten.....	48
2.4.2.1 <i>Herstellung von Ganzzellextrakten</i>	48
2.4.2.2 <i>Herstellung von cytosolischen Fraktionen und Kernextrakten</i>	48

2.4.2.3 Herstellung von Direktlysaten.....	49
2.4.3 Acetonfällung von Proteinen.....	50
2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
2.4.5 Coomassiefärbung der SDS-Gele.....	51
2.4.6 Westernblot	51
2.4.7 Immunodetektion von Proteinen im Westernblot	52
2.4.8 Entfernen von Antikörpern von Westernblots (<i>stripping</i>)	52
2.4.9 Densitometrie	52
2.4.10 Ionenaustauschchromatographie von Zellextrakten.....	53
2.4.11 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	54
2.4.12 <i>in-vitro</i> -Translation von Proteinen in Retikulozytenlysaten	55
2.4.13 GST-Bindungsassay mit ³⁵ S-markierten Proteinen.....	56
2.4.14 EMSA (<i>electrophoretic mobility shift assay</i>).....	57
2.4.14.1 Markierung der Oligonukleotide.....	57
2.4.14.2 DNA-Protein-Bindungsreaktion.....	57
2.4.15 Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP-Assay).....	58
2.4.16 Kinaseassays.....	60
2.4.16.1 Kinaseassay mit aufgereinigten Kinasen	60
2.4.16.2 Festphasen-Kinaseassay mit GST-Fusionsproteinen.....	60
2.4.16.3 Kinaseassay mit Peptid-Arrays	61
2.4.16.4 Immunpräzipitation mit anschließendem Kinase-Assay	62
2.5 Methoden der Bioinformatik.....	62
2.5.1 Sekundärstrukturvorhersagen.....	62
2.5.2 Vorhersage von Phosphorylierungsstellen	63
2.5.5 Berechnung eines Hydrophobizitätsprofils	63
2.5.4 Proteinmodellierung.....	63
3. Ergebnisse	65
3.1 Chromatographische Trennung von p65-Kinasen.....	65
3.2 Charakterisierung der IKK β -unabhängigen Ser536-Phosphorylierung von p65	69
3.2.1 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Signalwege auf die Ser536-Phosphorylierung	69
3.2.2 Suppression von IKK α und IKK β durch siRNA.....	72
3.2.3 Überexpression dominant-negativer Mutanten von IKK α und IKK β	73
3.2.4 Inhibition der IKK β -Aktivität durch SC-514	75
3.3 Funktionelle Charakterisierung der Ser536-Phosphorylierung.....	77
3.3.1 EMSA-Analyse der Ser536-Phosphorylierung	77
3.3.2 Analyse der nukleären Konzentration und der Rekrutierung von pSer536p65 am IL-8-Promotor nach IL-1 α -Stimulation	79
3.3.4 Bestimmung der Reportergenaktivität von verschiedenen Ser536-Mutanten von p65	81
3.3.5 Analyse der Interaktion von p65 und dem Koaktivator TAFII31	82
3.4 Bestimmung neuer Phosphorylierungsstellen von p65 durch Peptid-Arrays.....	87
3.4.1 Bestimmung der Substratspezifität der Kinasen 1 bis 3 mit Peptid-Arrays	88
3.4.2 Peptid-Array-Analyse von Phosphorylierungsstellen in p65	91
3.4.3 Analyse der Lösungsmittelzugänglichkeit von Ser281, Thr308 und Ser468.....	94
3.4.4 Festphasen-Kinaseassays mit T308A- und S468A-Mutanten von p65.....	97

3.4.5 Analyse der DNA-Bindung der Mutanten S281A, T308A und S468A.....	98
3.4.6 Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität und Kerntranslokation der Mutanten S281A, T308A und S468A	100
3.4.7 Molekülmodellierung der homologen Mutanten p65-S281A und Dorsal-S317A	105
4. Diskussion	109
Einleitung	109
4.1 Chromatographische Trennung und primäre Charakterisierung von p65-TAD-Kinasen	110
4.2 Charakterisierung der Ser536-Phosphorylierung.....	112
4.2.1 Charakterisierung der IKK-unabhängigen Ser536-Phosphorylierung	112
4.2.2 Funktionelle Charakterisierung der Ser536-Phosphorylierung.....	117
4.3 Bestimmung neuer Phosphorylierungsstellen von p65 durch Peptid-Arrays.....	124
4.4 Funktionelle Charakterisierung der Mutanten S281A, T308A und S468A.....	128
4.4.1 Funktionelle Charakterisierung der T308A-Mutante	128
4.4.2 Funktionelle Charakterisierung der S468A-Mutante	130
4.4.2 Funktionelle Charakterisierung der S281A-Mutante	131
5. Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick.....	134
6. Anhang	137
6.1 Sequenzdaten der Peptid-Arrays	137
6.2 Sequenzalignment von Dorsal, Gambif und c-rel für die Homologiemodellierung	145
7. Literatur.....	146
Lebenslauf.....	155
Veröffentlichungen.....	156

Abkürzungsverzeichnis

A	Amper
Å	Angström, 10^{-10} m
Abb.	Abbildung
ad	bis, auf (lat.), Volumen auffüllen auf
Amp	Ampicilin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
α	Alpha; im Zusammenhang mit Antikörpern kennzeichnet α Antigen-Antikörper-Komplexe
bidest.	bidestilliert
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
c	centi-
CaMK IV	Calmodulin-abhängige Proteinkinase IV
CBB	Coomassie-Brilliant-Blau
Ci	Curie; $3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle/Sekunde
cpm	<i>counts per minute</i> (Zerfälle/Minute)
C-terminal	Carboxy-terminal
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbeco-modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> (verstärkte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraacetat
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	fetal calf serum (hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum)
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$) bzw. Gramm (Masse)
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GSH	Glutathion
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
GZE	Ganzzelleextrakt
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
HeBS	HEPES-gepufferte Salzlösung (<i>HEPES buffered saline</i>)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazinethan-sulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)

IC ₅₀	InhibitorKonzentration, bei der die Ausgangsenzymaktivität um 50 % reduziert ist.
IKK	IκB-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropylthiogalaktose
IκB	Inhibitor von NF-κB
k	kilo-
l	Liter
LB	Laura Bertoni
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF	murine embryonale Fibroblasten
min	Minute
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MSK1	Mitogen- und Stress-aktivierte Kinase-1
MW	Molekulargewicht
μ	mikro-
n	nano-
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
NP-40	Nonidet P-40
N-terminal	Amino-terminal
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Elektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDB	Protein-Datenbank Brookhaven(-Datei)
PEG	Polyethylenglykol
pIκBα	an Ser32 und Ser36 phosphoryliertes IκBα
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-Acetat (Phorbolester)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pSer536p65	an Ser536-phosphoryliertes p65
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rel.	relativ
RHR	Rel-Homologie-Region
RLU	<i>relative light units</i> (relative Lichteinheiten)
RMSD	<i>root mean square deviation</i> (Wurzel der mittleren, quadratischen Abweichung)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute (Upm)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Siemens
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TA1,2	Transaktivierungsdomäne 1, 2
TAD	Transaktivierungsdomäne

TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Pol.	DNA-Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBK1	<i>TANK</i> -bindende Kinase 1
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzym-Einheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
Vol.	Volumen
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewichtsprozent: 1 g/100 ml)
WT	Wildtyp

Es wurden die allgemeinen SI-Einheiten und die chemischen Elementsymbole verwendet. Für Aminosäuren wurden der Ein- und Drei-Buchstaben-Code verwendet. Alle hier nicht aufgeführten Abkürzungen werden im Text erklärt.

1. Einleitung

1.1 NF- κ B-Proteine

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B (Übersicht: Rothenwarf *et al.*, 1999; Gosh *et al.*, 2002) reguliert die Expression einer Vielzahl von Genen, die für Immunreaktionen und die zelluläre Antwort auf diverse Stresszustände funktionell wichtig sind.

NF- κ B wurde identifiziert als nukleärer Transkriptionsfaktor, der an das Enhancer-Element des Gens für die leichte Kette des κ -Immunglobulins bindet. Ursprünglich wurde angenommen, dass NF- κ B nur in B-Lymphozyten exprimiert wird. Diese Annahme führte daher zu der Abkürzung NF- κ B (κ -Immunglobulin-Enhancer-Element-bindender, nukleärer Faktor, engl. *κ -Immunglobulin-enhancer-element binding nuclear factor*) (Sen *et al.*, 1986). Allerdings wurde schnell erkannt, dass NF- κ B in jedem Zelltyp exprimiert wird.

Bei NF- κ B handelt es sich in der DNA-bindenden Form um Homo- und Heterodimere, die sich aus Proteinen der Rel-Familie zusammensetzen.

Alle Rel-Proteine gehören einer Familie eukaryontischer Transkriptionsfaktoren an, deren gemeinsames Strukturmerkmal eine hochkonservierte Rel-Homologie-Region (RHR) ist. Die RHR enthält dabei die DNA-Bindungsdomäne, die Dimerisierungsregion sowie die Kernlokalisierungssequenz. Rel-Proteine werden weiter in zwei Klassen unterteilt, wobei Proteine der Klasse II eine Transaktivierungsdomäne enthalten und Proteine der Klasse I nicht. In Säugetieren existieren fünf Mitglieder dieser Proteinfamilie: p50 (Vorläuferform: p105), p52 (Vorläuferform: p100), c-rel, p65 (rel-A) und rel-B (s. Abb. 1.1). X-Rel1 wurde in *Xenopus Laevis* als p65-Homologon identifiziert (Kao *et al.*, 1991). Von Insekten sind bisher die Proteine Dorsal, Dif sowie Relish aus *Drosophila Melanogaster* (Rothenwarf *et al.*, 1999) und das Dorsal-Homologon Gambif1 aus *Anopheles Gambiae* (Barillas-Mury *et al.*, 1996) beschrieben worden. Bei Säugetieren besitzen nur c-rel und p65 (rel-A) eine Transaktivierungsdomäne (Abk.: TAD). Der am häufigsten auftretende NF- κ B-Komplex ist dabei das Heterodimer aus p50 und p65. NF- κ B-Dimere, die sich nur aus Untereinheiten ohne Transaktivierungsdomäne zusammensetzen, wird eine reprimierende Funktion zugeschrieben.

Das dekamere Konsensus-Motiv der DNA-Erkennungssequenz (κ B-Sequenz) lautet: 5'-GGGRNNYYCC-3' (R: Purin, Y: Pyrimidin, N: beliebige Base). Bezüglich der Bindungsaffinität zu verschiedenen κ B-Konsensus-Motiven konnten aber signifikante Unterschiede zwischen den Monomeren der Klasse I und II festgestellt werden (Coleman *et*

al., 1993; Urban *et al.*, 1991; Kunsch *et al.*, 1992), so dass die resultierende Bindungsaffinität der NF- κ B-Dimere je nach genauer κ B-Sequenz und Zusammensetzung des Dimers variieren kann.

In der unstimulierten Zelle liegt das NF- κ B-Dimer im Komplex mit dem Inhibitorprotein I κ B vor. I κ B maskiert hierbei die Kernlokalisierungssequenz und die DNA-Bindungsdomäne in der RHR, so dass die Translokation in den Kern und die DNA-Bindung inhibiert werden. Alle I κ B-Proteine enthalten entweder sechs oder sieben Ankyrin-*Repeats*, durch die die Interaktion mit NF- κ B ermöglicht wird.

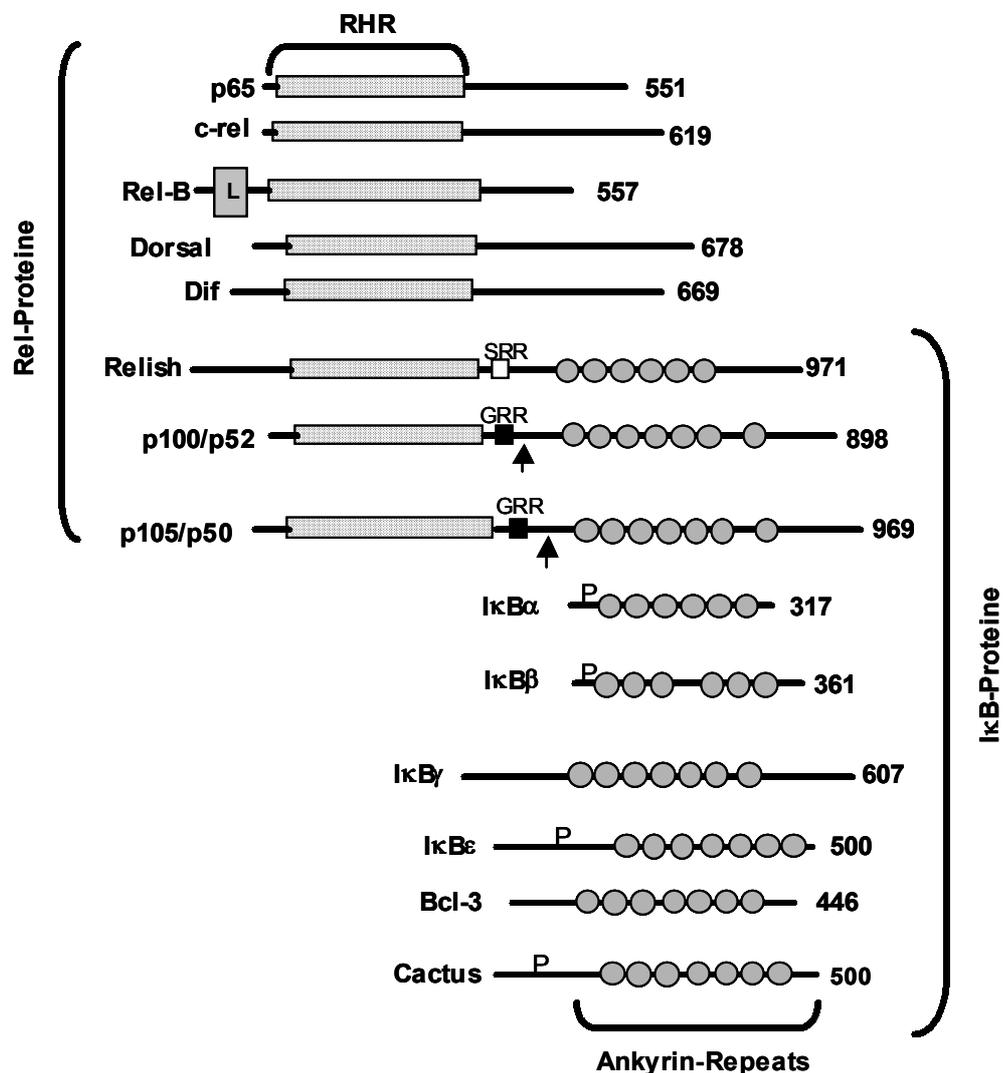


Abb. 1.1: Struktur von Rel- und I κ B-Proteinen

Schematisch ist die Struktur aller humanen Rel- und I κ B-Proteine sowie der homologen Formen aus *Drosophila Melanogaster* (Dorsal, Dif, Relish und Cactus) dargestellt. Die Pfeile in p100 und p105 zeigen den C-Terminus von p52 und p50 nach dem proteolytischen Prozessieren an. Die Position der beiden Serine, deren induzierte Phosphorylierung die Degradation der I κ B-Proteine einleitet, ist mit P gekennzeichnet. Abkürzungen: SRR: Serin-reiche Region, GRR : Glycin-reiche Region, L (in rel-B): Leucin-Zipper (nach Rothenwarf *et al.*, 1999).

Die I κ B-Familie enthält die Säugetierformen I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ sowie p100 und p105, die Vorläuferformen von p50 und p52, die sowohl die Rel-Homologie-Region als auch die I κ B-Proteine kennzeichnenden Ankyrin-*Repeats* enthalten. p100 kann daher möglicherweise sowohl als Rel-Protein als auch als I κ B-Protein fungieren (Gosh. *et al.*, 2002). Von I κ B β existieren noch die zwei Isoformen I κ B β 1 und -2, bei denen es sich um Produkte alternativen Spleissens handelt. In *Drosophila Melanogaster* wurde Cactus als ein I κ B-Homologon identifiziert.

Von den I κ B-Proteinen enthalten nur I κ B α , - β und - ϵ eine N-terminale regulatorische Region, die bei Aktivierung des NF- κ B-Signalweges zur proteolytischen Degradation der I κ B-Proteine führt, was dann die Kerntranslokation und DNA-Bindung des freigesetzten NF- κ B-Dimers ermöglicht.

I κ B α ist das bisher am besten untersuchte I κ B-Protein. Die Genexpression von I κ B α wird hierbei entscheidend von NF- κ B reguliert, was auf der Ebene der Genexpression zu einer negativen Rückkopplungsregulation der NF- κ B-Aktivität führt.

Nicht vollständig verstanden ist das genaue Wechselspiel zwischen den beiden am häufigsten auftretenden Formen I κ B α und - β . Beide Formen scheinen funktionell weitgehend äquivalent zu sein und können durch die jeweils andere Form substituiert werden (Cheng *et al.*, 1998). I κ B α zeigt jedoch eine schnellere Degradationskinetik als I κ B β (Tran *et al.*, 1997). Anders als I κ B, verfügt I κ B α möglicherweise über eine atypische Kernlokalisierungssequenz und über eine Kernexportsequenz, was dazu führt, dass I κ B α im Kern NF- κ B komplexieren und so wieder aus dem Kern transportieren kann (Harhaj *et al.*, 1999). Ternäre Komplexe mit I κ B β scheinen hingegen ausschließlich im Cytosol vorzuliegen. (Huang, T.T. *et al.*, 2001; Malek *et al.*, 2001)

1.2 Struktur von NF- κ B und I κ B

Mittlerweile existieren im Bereich der RHR von fast allen NF- κ B-Proteinen Strukturdaten aus Röntgenkristallstruktur- oder NMR-Untersuchungen. In Abb. 1.2 ist ein p50-p65-Heterodimer, gebunden an DNA (Berkowitz *et al.*, 2002; PDB-Datei: 1LE5) und im Komplex mit I κ B α (Huxford *et al.*, 1998; 1IKN) dargestellt. Die RHR umfasst ungefähr 300 Aminosäuren und gliedert sich in zwei Ig-artige Domänen, die durch eine flexible Linker-Region verbunden sind. Beide Domänen zeigen eine ausgeprägte β -Faltblattstruktur und interagieren mit der DNA, in der C-terminalen Domäne liegt zusätzlich die aus drei β -Faltblattsträngen bestehende Dimerisierungsregion. In der Dimerisierungsregion inter-

agieren die Monomere durch ein sehr homologes Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Kontakten miteinander. Der DNA-gebundene Komplex zeigt dabei die für NF- κ B-charakteristische schmetterlingsartige Quartärstruktur.

In I κ B bilden die Ankyrin-*Repeats*, die sich aus je zwei dicht gepackten α -Helices zusammensetzen, eine stapelförmige Anordnung, die die Interaktion mit der Dimerisierungsregion der NF- κ B-Proteinen ermöglicht. Die Kernexportsequenz von I κ B α ist dabei exponiert. Durch die Aufklärung der Struktur eines ternären Komplexes aus I κ B β und einem Homodimer aus p65 konnte des Weiteren gezeigt werden, dass Teile der Kernlokalisierungssequenz durch I κ B β maskiert werden (Malek *et al.*, 2003). Eine Interaktion mit Karyophorinen wird somit effektiv blockiert.

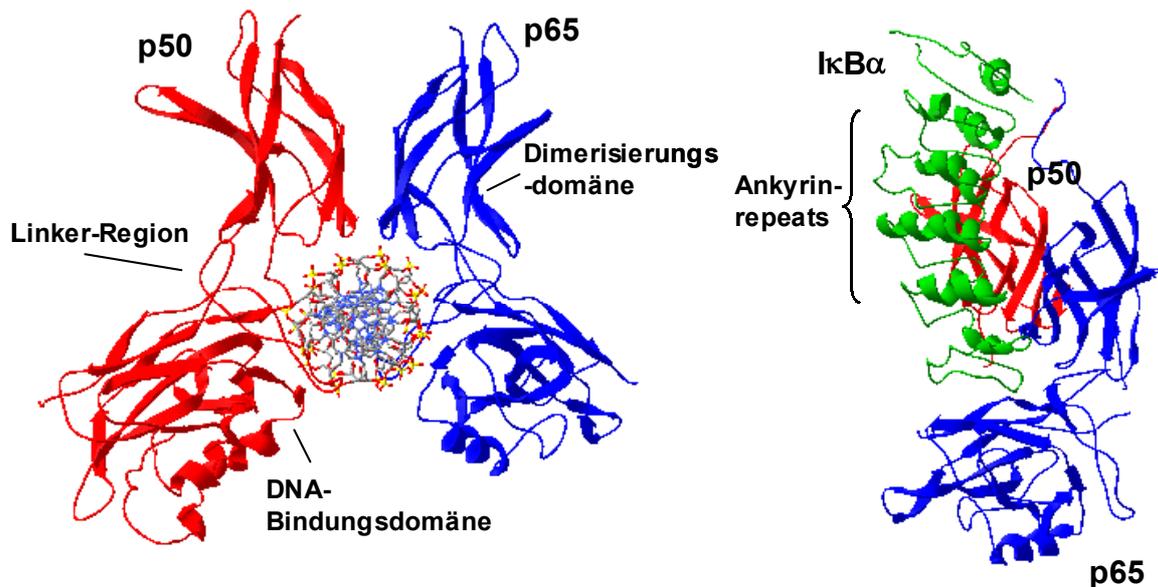


Abb. 1.2: Struktur von NF- κ B und I κ B

Links: Komplex aus p50 und p65 (jeweils N-terminaler Bereich mit der Rel-Homologie-Region (RHR)), gebunden an DNA (nach der Struktur 1LE5.PDB; Berkowitz *et al.*, 2002).

Rechts: p50-p65-Heterodimer (jeweils N-terminaler Bereich um RHR) komplexiert mit einem I κ B α -Fragment (nach der Struktur 1IKN.PDB; Huxford *et al.*, 1998). Das Peptidrückgrat ist in der Bänderdarstellung, die Atome der DNA in der Stabmodellform abgebildet (grau: Kohlenstoff, blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, Orange: Phosphor).

1.4 Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch IKK-induzierte I κ B-Degradation

NF- κ B wird durch sehr viele Stimuli, wie z.B. pro-inflammatorische Zytokine (u.a. IL-1, TNF), Phorbolster, Mitogene, Bestandteile von Bakterien und Viren (u.a. LPS, virale

Proteine und dsRNA), physikalische und chemische Stressoren aktiviert (Rothenwarf *et al.*, 1999).

Die Mehrheit dieser Stimuli führt zu der Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes (IKK), der I κ B α im N-Terminus an den Serinen 32 und 36 phosphoryliert (DiDonato *et al.*, 1996; DiDonato *et al.*, 1997). In I κ B β und - ϵ existieren hierbei analoge Serine. Die phosphorylierte Form von I κ B α wird dann durch einen E3-Ubiquitin-Ligase-Kinase-Komplex an den Lysin 21 und 22 polyubiquitinyliert, was zu der proteolytischen Degradation des Proteins im 26S-Proteasom führt. Das so freigesetzte NF- κ B-Dimer kann dann in den Kern eindringen und an die DNA binden. Außerdem wurde beschrieben, dass andere Stimuli über eine Phosphorylierung an Tyrosin 42 eine proteolytische Degradation von I κ B α induzieren können (Imbert *et al.*, 1996)

Bei IKK handelt es sich um einen hochmolekularen Proteinkomplex (apparentes Molekulargewicht von 700–900 kDa in der Gelfiltrationschromatographie). Die Kernstruktur von IKK setzt sich hierbei aus den katalytischen Untereinheiten IKK α und/oder IKK β sowie aus der regulatorischen Untereinheit IKK γ (NEMO) zusammen. Möglich sind hierbei Kernstrukturen mit der Stöchiometrie $\gamma_4\alpha\beta$ oder die Kombinationen mit der Stöchiometrie $\gamma_4\alpha_2$ bzw. $\gamma_4\beta_2$ (Miller *et al.*, 2001; Tegethoff *et al.*, 2003), wobei die Kernstruktur mit der heterodimeren Zusammensetzung aus einer α - und einer β -Untereinheit dominiert. Darüberhinaus wurden Interaktionen mit weiteren Proteinen, wie z.B. den Proteinkinasen NIK oder MEKK1, beschrieben.

IKK α und IKK β zeigen eine hohe Sequenzhomologie (50 % Sequenz-Identität) und enthalten neben der N-terminalen Kinase-Domäne ein Leucin-Zipper- und ein Helix-Loop-Helix-Motiv. Die Dimerisierung zweier katalytischer Untereinheiten im Komplex wird dabei durch die Leucin-Zipper-Motive ermöglicht. Das Helix-Loop-Helix-Motiv, das Ziel von mehrfacher Autophosphorylierung ist, fungiert möglicherweise als ein autoinhibitorisches Element. IKK γ enthält überwiegend helikale Abschnitte und längere Bereiche mit coiled-coil-Strukturen sowie ein C-terminales Leucin-Zipper-Motiv, das an der Interaktion mit anderen IKK γ -Monomeren im Komplex beteiligt ist (Rothenwarf *et al.*, 1999).

Aktiviert wird IKK durch Phosphorylierung von Serinen in den Aktivierungsschleifen von IKK α (Serin 176) und IKK β (Serine 177, 181) (Ling *et al.*, 1998; Mercurio *et al.*, 1997). Eine Reihe von Proteinkinasen sind bereits als Aktivatoren oder Kinasen von IKK identifiziert worden, darunter PKC ζ (Lallena *et al.*, 1999), PKR (Chu *et al.*, 1999) sowie mehrere Mitglieder aus der MAPKKK-Familie (NIK, TAK1, MEKK1,-2,-3 und COT/TPL)

(Referenzen: Rothenwarf *et al.*, 1999, Gosh *et al.*, 2002). Die Aktivierung erfolgt dabei entweder über eine direkte Phosphorylierung oder durch eine erhöhte Autophosphorylierungsrate, die durch Interaktion mit Aktivatoren reguliert wird.

Dem einfachen Modell der Inhibition der nukleären Translokation von NF- κ B durch I κ B bzw. der Aktivierung von NF- κ B durch eine IKK-abhängige I κ B-Degradation stehen jedoch einige Beobachtungen entgegen, die ein komplexeres Modell realistischer erscheinen lassen: So ist neu synthetisiertes I κ B α in der Lage, in den Kern einzudringen, wo es NF- κ B komplexiert und aus dem Kern heraus transportiert (Gosh *et al.*, 2002). Hinzu kommt, dass IKK auch im Kern nachgewiesen wurde (Birbach *et al.*, 2002). Die primäre Funktion von I κ B α scheint es daher zu sein, die DNA-Bindung von NF- κ B zu verhindern, während die Verankerung von NF- κ B im Cytosol durch I κ B wesentlich komplexer reguliert zu sein scheint. Sicher ist aber, dass die I κ B-Bindung das Fließgleichgewicht der NF- κ B-Verteilung in Richtung Cytosol verschiebt. Die I κ B-Degradation stellt daher einen notwendigen Schritt der NF- κ B-Aktivierung dar.

1.2 Physiologische Funktion von NF- κ B

NF- κ B nimmt eine zentrale Position in der Regulation einer außergewöhnlich hohen Anzahl von Genen, die eine wichtige Funktion bei der Immunantwort, Entzündungsreaktionen, bei der Vermittlung der Zellproliferation sowie bei der Regulation der Apoptose ausüben.

NF- κ B ist weiter involviert in die Expression von Genen, die eine wichtige Rolle bei der Reaktion der Zelle auf diverse Stressoren, wie z.B. oxidativer Stress oder UV-Strahlung spielen.

Alle bisher durchgeführten Deletionen von NF- κ B-Untereinheiten (p65, p50, p100/p52, c-rel, rel-B) im Mausmodell führten zu einer Reduktion der Immunfunktion. Darüber hinaus wiesen die einzelnen Phänotypen aber auch spezifische Unterschiede auf, die Folge einer unterschiedlichen Gewebsverteilung und unterschiedlicher Genexpressionsmuster sind. Die Deletion von p65 ist im embryonalen Stadium lethal und geht mit einer massiven apoptotischen Leberdegeneration einher (Beg *et al.*, 1995). In p50-defizienten Mäusen verlief die Ontogenese normal, doch war die B-Lymphozyten-abhängige Immunfunktion und die unspezifische Immunantwort stark beeinträchtigt. U.a. erfolgte keine B-Zellproliferation nach LPS-Stimulation und die basale sowie spezifische Antikörperproduktion war gestört (Sha *et al.*, 1995). Mäuse mit einer Deletion im Gen von p100/p52 zeigten eine deutliche Veränderung der B-Lymphozytenverteilung in Milz, Knochenmark und Lymphknoten.

Ähnlich wie im Fall von p50 war auch hier die LPS-stimulierte B-Zellproliferation vermindert, aber die B-Zellreifung und die Antikörperproduktion war normal (Caamano *et al.*, 1998). Reife B- und T-Lymphozyten von Mäusen mit einem inaktivierten c-rel-Gen reagierten nicht auf Stimulation mit den meisten Mitogenen. Die T-Lymphozyten proliferierten jedoch nach Stimulation mit Kalzium-Ionophoren und Phorbol ester (Kontgen *et al.*, 1995). Die Untersuchung von rel-B-defizienten Mäusen zeigte Störungen im Differenzierungsprozess von dendritischen Zellen und des Epithels der Thymusdrüse (Burkly *et al.*, 1995).

Für die Immunantwort relevante, von NF- κ B regulierte Gene sind u.a. Zytokine (z.B. IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IFN- β , LT α und LT β), Chemokine (z.B. IL-8, MIP-1 α , MCP1 und RANTES), Adhäsionsproteine (z.B. ICAM, VCAM und Eotaxin) und induzierbare Enzyme wie iNOS oder COX-2. Auch die Expression antimikrobieller Peptide wie β -Defensine wird entscheidend durch NF- κ B reguliert (Ghosh *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001).

Durch eine Analyse der NF- κ B-abhängigen Genexpression mit Mikro-*Arrays* konnte eine Reihe weiterer wichtiger Gene, wie z.B. der Transkriptionsfaktor STAT5a oder IL-13 identifiziert werden (Hinz *et al.*, 2002; Li, J. *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2003).

Sehr wichtig ist zudem die Rolle des NF- κ B-Signalweges bei der Regulation der Zellproliferation und Apoptose. In der Mehrheit aller Fälle steuert NF- κ B hierbei die Expression von Proteinen, die antiapoptotische und proliferative Effekte hervorrufen (Übersicht: Kucharczak *et al.*, 2003).

Dazu zählen u.a. IAPs (Inhibitoren von Apoptoseproteinen), wie z.B. die Caspase-Inhibitoren c-IAP1, c-IAP2 und XIAP oder Proteine aus der Bcl-2-Familie (z.B. Bcl-2, Bcl-xl), die als Antagonisten der proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie fungieren. Wegen des supprimierenden Effektes auf Apoptose-Vorgänge wird NF- κ B auch eine wichtige Rolle in der Karzinogenese zugewiesen. So wurde in mehreren Krebszelllinien eine konstitutive, nukleäre Aktivität von NF- κ B detektiert (Übersicht: Gilmore *et al.*, 2002).

Die Hemmung von NF- κ B sensibilisierte eine Reihe von Tumorzelllinien gegenüber Apoptose-induzierenden Stimuli, chemotherapeutischen Substanzen oder einer Bestrahlung, so dass NF- κ B auch in der Krebsbehandlung, zusätzlich zur Therapie von Entzündungserkrankungen, als ein attraktives pharmakologisches Ziel angesehen wird (Baldwin *et al.*, 2001).

1.5 Mehrfach-Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren

Bei der Regulation von vielen Transkriptionsfaktoren spielen neben anderen posttranslationalen Modifikationen Phosphorylierungen eine herausragende Rolle. Viele dieser Transkriptionsfaktoren unterliegen hierbei signalabhängig einer mehrfachen (multiplen) Phosphorylierung (Übersicht: Holmberg *et al.*, 2002).

Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren kann dabei auf verschiedenen Ebenen durch Phosphorylierungen moduliert werden:

1. Phosphorylierungen können die Stabilität eines Transkriptionsfaktors, sowohl positiv wie negativ beeinflussen. Beispielsweise stabilisieren Phosphorylierungen den Transkriptionsfaktor p53 (Appella *et al.*, 2000), während der Faktor E2F-1 nach Phosphorylierung degradiert wird (Fuchs *et al.*, 2001).

2. Auch die nukleäre Translokation kann durch Phosphorylierungen gesteuert werden. So können die Mitglieder der NF-AT-Familie im hyperphosphorylierten Zustand nicht in den Kern translozieren. Erst die Kalzium-abhängige Dephosphorylierung durch die Phosphatase Calcineurin erlaubt den Kerneintritt (Macian *et al.*, 2001).

3. Ein weiterer Angriffspunkt für phosphorylierungsabhängige Regulation stellt die DNA-Bindung dar. Ein gutes Beispiel hierfür ist c-Jun, dessen signalabhängige N-terminale Phosphorylierung eine intramolekulare Konformationsumwandlung induziert. Dies führt zur Dephosphorylierung des konstitutiv-phosphorylierten C-Terminus, was dann die Bindung an DNA ermöglicht (Papavassiliou *et al.*, 1992; Whitmarsh *et al.*, 2000).

4. Vor allem Interaktionen mit Proteinen, wie z.B. Koaktivatoren und –repressoren, unterliegen häufig einer Regulation durch Phosphorylierungen. So ermöglicht eine Phosphorylierung an Serin-133 in dem Transkriptionsfaktor CREB die Rekrutierung des Koaktivators CBP (Zor *et al.*, 2002).

Ein hinsichtlich Phosphorylierungen ausführlich untersuchter Transkriptionsfaktor ist der Tumorsuppressor p53, der eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose einnimmt. Zum jetzigen Zeitpunkt sind 16 Phosphorylierungsstellen beschrieben worden, von denen die meisten nach Stress-Induktion phosphoryliert werden. Thr55 und Ser376 werden hingegen nach Stimulation dephosphoryliert und Ser378 liegt konstitutiv phosphoryliert vor (Appella. *et al.*, 2000, 2001; Vousden, 2002). Im Ruhezustand der Zelle bindet p53 an das Inhibitorprotein Mdm2 oder an inaktiver JNK, was zu einer rapiden Degradation im Proteasom führt. Je nach Art der Stress-Induktion und in Abhängigkeit des Zelltypes kann es zu einer ausgeprägten Phosphorylierung an den Positionen Ser15, Thr18, Ser20 und/oder Ser37 kommen (Appella *et al.*, 2000, 2001; Vousden, 2002). Alle diese

Phosphorylierungen destabilisieren die Mdm2-Bindung und tragen so zur Stabilität von p53 dabei. Außerdem erlaubt die Dissoziation von Mdm2 die Rekrutierung von Koaktivatoren, wie z.B. TAFII31 oder CBP/p300 (Jabbur *et al.*, 2002; Appella *et al.*, 2000, 2001; Vousden, 2002) und trägt somit zur Erhöhung der transkriptionellen Aktivität von p53 bei. Eine Phosphorylierung an Ser20 scheint aber nicht ausreichend für eine Stabilisierung von p53 zu sein, wie Untersuchungen mit der entsprechenden Alanin-Mutation zeigten (Appella *et al.*, 2001; Vousden, 2002). Dieses Beispiel demonstriert, dass ein Kennzeichen von Mehrfach-Phosphorylierungen häufig die kooperative bzw. additive Wirkung auf die Proteinaktivität ist. Weitere stabilisierende Effekte wurden für die Phosphorylierungen an Ser33, Ser46, Thr 55, Thr81, Thr155 sowie für C-terminale Phosphorylierungen, insbesondere nach DNA-Schäden, nachgewiesen (Appella *et al.*, 2001; Vousden, 2002; Bech-Otschir *et al.*, 2001; Chernov *et al.*, 2001). Neben der Stabilisierung steuern Phosphorylierungen am N- und C-Terminus die nukleäre Translokation von p53. Außerdem beeinflussen Phosphorylierungen in beiden Regionen die DNA-Bindung (Appella *et al.*, 2001; Vousden, 2002; Waterman *et al.*, 1998; Stavridi *et al.*, 2001). Zudem scheinen Phosphorylierungen an Ser15 und Ser33 für die durch CBP/p300 katalysierte Acetylierung am C-Terminus von p53 erforderlich zu sein, was mit einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität einhergeht (Appella, 2001; Vousden, 2002; Kishi *et al.*, 2001).

Die bisher bekannten Beispiele mehrfach-phosphorylierter Transkriptionsfaktoren illustrieren sehr gut die Vielfalt an qualitativen und quantitativen Effekten, die mehrere Phosphorylierungen auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren ausüben können. Transkriptionsfaktoren stehen häufig an der distalen Position von mehreren Signalwegen. Daher kommt ihnen die entscheidende Rolle als Verrechnungselement und Konvergenzpunkt dieser Signalwege zu. Auf der Ebene der Transkription werden die in Form von Phosphorylierungen und anderen posttranslationalen Modifikationen des Transkriptionsfaktors eingehenden Signale miteinander verrechnet (Signalintegration) und so in ein bestimmtes Genexpressionsmuster transformiert. Die Phosphorylierungen können sich dabei in einer kooperativen Weise verstärken bzw. abschwächen. Möglich ist aber auch, dass mehrere Phosphorylierungen unabhängig von einander die transkriptionelle Aktivität steuern. Ein ebenfalls häufig verwirklichtes Prinzip ist, dass eine bestimmte Phosphorylierungsstelle von mehreren Proteinkinasen phosphoryliert wird. Ein Beispiel ist hierfür Ser133 in CREB, dessen Phosphorylierung die Rekrutierung von CBP steuert. Es wurde gezeigt, dass mehrere Proteinkinasen diese Stelle phosphorylieren können, darunter PKA, CaMK IV, PKC, AKT, MSK-1 und MAPKAP-2 (Gonzalez *et al.*, 1989; Mayr *et al.*, 2001). Dies ermöglicht

einerseits Signalintegration aber auch Konvergenz, da verschiedene Signalwege zum selben Effekt führen. Außerdem kann dadurch eine gewisse Redundanz erreicht werden.

1.6 I κ B-unabhängige Regulation der NF- κ B-Aktivität durch Phosphorylierungen

Die I κ B-Degradation ist bei der NF- κ B-Aktivierung ein notwendiger Schritt, allerdings kein hinreichender Schritt, wie mittlerweile aus einer Vielzahl von Studien abgeleitet werden kann. Auch bei NF- κ B haben posttranslationale Modifikationen, insbesondere Phosphorylierungen eine große regulatorische Bedeutung (Übersicht: Schmitz, Bacher *et* Kracht, 2001).

Die NF- κ B-Untereinheiten p105, p100, c-rel und p65 werden konstitutiv und nach Stimulation phosphoryliert (Neumann *et al.*, 1992, 1994; Li, C.C. *et al.*, 1994). So induziert die Behandlung von Zellen mit verschiedenen Stimuli, wie z.B. Phorbol-12-myristat-13-acetat, TNF α , IL-1 α oder bakterielle Lipopolysaccharide die Phosphorylierung von p65 (Neumann *et al.*, 1992; Heissmeyer *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 1995; Wand *et al.*, 1998, 2000; Anrather *et al.*, 1999; Sakurai *et al.*, 1999; Bird *et al.*, 1997)

Die große Mehrheit dieser Phosphorylierungen scheint auf die Phosphorylierung von Serinen und zu einem geringeren Teil mit schwächerer Signifikanz auf die von Threoninen zurückzugehen (Hayashi *et al.*, 1993; Li, C.C. *et al.*, 1994).

Die Stimulation von T-Zellen mit PMA, CD28 und TNF α resultierte ebenfalls in einer Zunahme der Phosphorylierung von c-rel. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass Ser471 innerhalb der Transaktivierungsdomäne von c-rel TNF α -abhängig phosphoryliert wird (Bryan *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 2000). Außerdem führte die Mutation in einer konstitutiven Phosphorylierungsstelle im Bereich von AS 447-455 innerhalb der TAD von c-rel zu einem Verlust der transkriptionellen Aktivität von c-rel (Fognani *et al.*, 2000).

p105 wird von beiden katalytischen Untereinheiten von IKK an den Positionen Ser921, Ser923 und Ser932 phosphoryliert, was ein limitiertes, proteolytisches Prozessieren zu dem Endprodukt p50 initiiert. Zudem scheinen diese Phosphorylierungen notwendig für die stabile Komplexbildung mit dem nukleären Protein BCL-3, einem I κ B-Homologon, zu sein. BCL-3 kann Koaktivatoren rekrutieren, so dass der Komplex aus p50 und BCL-3 transkriptionelle Aktivität besitzen kann, obwohl p50 selbst keine TAD enthält (Heissmeyer *et al.*, 1999).

Von sehr großem Interesse ist die phosphorylierungsabhängige Regulation von p65, das neben c-rel, das einzige humane Rel-Protein mit einer Transaktivierungsdomäne ist.

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand wird p65 an folgenden Positionen phosphoryliert: Ser276 (Kinasen: PKA, MSK) (Zhong *et al.*, 1997; Vermeulen *et al.*, 2003), Ser311 (Kinase: PKC ζ) (Duran *et al.*, 2003), Ser529 (Kinase: Casein-Kinase II) (Wang *et al.*, 2000), Ser535 (Kinase: CaMKIV) (Bae *et al.*, 2003) und Ser536 (Kinase: IKK β) (Sakurai *et al.*, 1999, 2003; Kishore *et al.*, 2003). Eine schematische Zusammenfassung ist in Abb. 1.3 dargestellt.

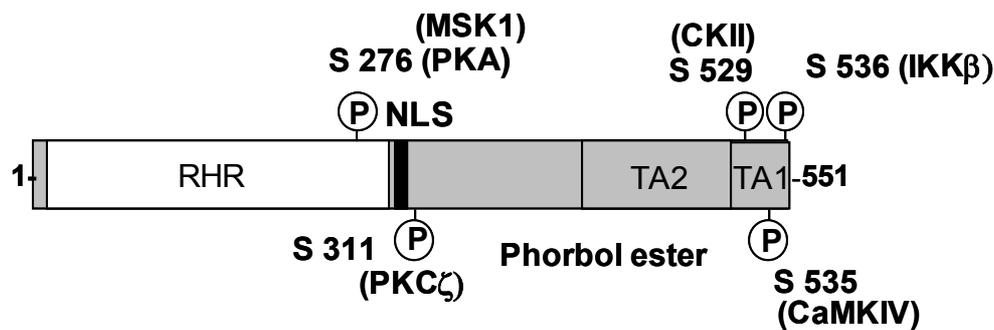


Abb. 1.3: Phosphorylierungsstellen in p65

Es wurden alle bisher identifizierten Phosphorylierungsstellen mit den zugehörigen Proteinkinasen eingezeichnet. Im Bereich TA 2 induziert die Behandlung mit Phorbol ester eine nicht näher lokalisierte Phosphorylierung. Abk.: RHR: Rel-Homologie-Region, NLS: nukleäre Lokalisierungssequenz, TA 1, 2: Transaktivierungsdomäne 1 und 2, PKA: Proteinkinase A, MSK-1: Mitogen- und Stressaktivierte Proteinkinase 1, PKC ζ : Proteinkinase C ζ , CKII: Casein-Kinase II, IKK β : β -Untereinheit des I κ B-Kinase-Komplexes, CaMKIV: Calmodulin-abhängige Proteinkinase IV (modifiziert nach L. Schmitz *et al.*, 2001)

Die Phosphorylierungen an Ser276 und Ser311 führen hierbei zur Bindung des Koaktivators CBP/p300 (Zhong *et al.*, 1998; Duran *et al.*, 2003). Die Bindung von Histon-Deacetyltransferase-1, einem Korepressor, wird durch diese Phosphorylierung hingegen geschwächt (Zhong *et al.*, 2002).

Die Phosphorylierungsstelle Ser276 ist hierbei in Rel-Proteinen hochkonserviert und hat in den diesbezüglich untersuchten Proteinen eine ähnlich wichtige Funktion wie in p65. So resultiert eine Phosphorylierung *in-vitro* an dem homologen Ser337 in p50 durch die Proteinkinase PKA in eine erhöhte DNA-Bindungsaffinität (Hou *et al.*, 2003). In dem Rel-Protein Dorsal aus *Drosophila Melanogaster* führt die Alaninmutation an dieser Stelle (S312A) zu einer Destabilisierung. Darüberhinaus wurde berichtet, dass in Dorsal das benachbarte Ser317 phosphoryliert wird (Drier *et al.*, 1999). Die zugehörige Alanin-Mutation an dieser Position bewirkt die Reduktion des nukleären Imports während der embryonalen Morphogenese.

Eine wachsende Anzahl von Befunden in den letzten Jahren hat zu der Erkenntnis beigetragen, wonach die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B nicht ausschließlich über die Degradation von I κ B kontrolliert wird. So wurde z.B. gezeigt, dass die Hemmung des p38-

Signalweges zu einer deutlichen Reduktion der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B führt (Wesselborg *et al.*, 1997; Carter *et al.*, 1999). Dieser Effekt konnte später durch eine Aktivierung der Kinase MSK-1 durch den p38-Signalweges erklärt werden (Vermeulen *et al.*, 2003). MSK-1 phosphoryliert hierbei Ser276.

Neben dem p38-Signalweg wird aber auch die Beteiligung von anderen Signalwegen bei der NF- κ B-Aktivierung diskutiert. So führte die Inhibition des ERK-Signalweges zu einer deutlichen Abnahme der transkriptionellen Aktivität von GAL-p65-Fusionsproteinen (Vanden-Berghe *et al.*, 1998). Da diese GAL-p65-Proteine aus der DNA-Bindungsdomäne von GAL4, einem Transkriptionsfaktor aus der Hefe, und der Transaktivierungsdomäne von p65 bestehen, sind sie ausschließlich nukleär lokalisiert. Deswegen ist es denkbar, dass an den beschriebenen Effekten, nukleäre Kinasen involviert sind.

Für eine Beteiligung des Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase(PI3K)-Signalweges an der I κ B-unabhängigen Aktivierung von NF- κ B gibt es ebenfalls signifikante Daten. Der Einsatz der PI3K-Inhibitoren Wortmannin und Ly 294002 beeinträchtigt nicht die nukleäre Translokation von NF- κ B (Beraud *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 2000; Sizemore *et al.*, 1999), aber vermindert die IL-1-induzierte p65-Phosphorylierung und die transkriptionelle Aktivität eines GAL-p65-Reportergenkonstruktes, das auch durch eine Überexpression der katalytischen Untereinheit von PI3K aktiviert wird (Sizemore *et al.*, 1999).

Weiter unterstützt werden diese Daten dadurch, dass Akt/PKB, die durch PI3K aktiviert wird, die transkriptionelle Aktivität von p65 beeinflusst. Dieser Effekt konnte allerdings durch eine dominant-negative Mutante von IKK β gehemmt werden (Madrid *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse einer anderen Studie, nach der die PI3K-abhängige NF- κ B-Aktivierung IKK nicht erfordert (Hoeflich *et al.*, 2000).

Eine weitere wichtige Funktion bei der I κ B-unabhängigen Aktivierung könnte die Proteinkinase GSK3 β haben. So ist in GSK3 β -defizienten Mauszellen die transkriptionelle Aktivität und die DNA-Bindung von NF- κ B vermindert, während die IL-1/TNF-abhängige I κ B-Degradation und die nukleäre Translokation von NF- κ B unbeeinträchtigt war (Hoeflich, *et al.*, 2000). Der Befund, dass GSK3 β den C-Terminus von p65 phosphorylieren kann, erhöht die Evidenz für eine Beteiligung von GSK3 β an der NF- κ B-Regulation (Schwabe *et al.*, 2003). Interessant in diesem Zusammenhang ist auch, dass GSK3 β ein Substrat von PKB/Akt ist. Allerdings führt die PKB/Akt-abhängige Phosphorylierung zu einer Inaktivierung von GSK3 β , so dass eine Verbindung zwischen beiden Signalwegen in der Auswirkung auf die NF- κ B-Regulation sehr kompliziert erscheint.

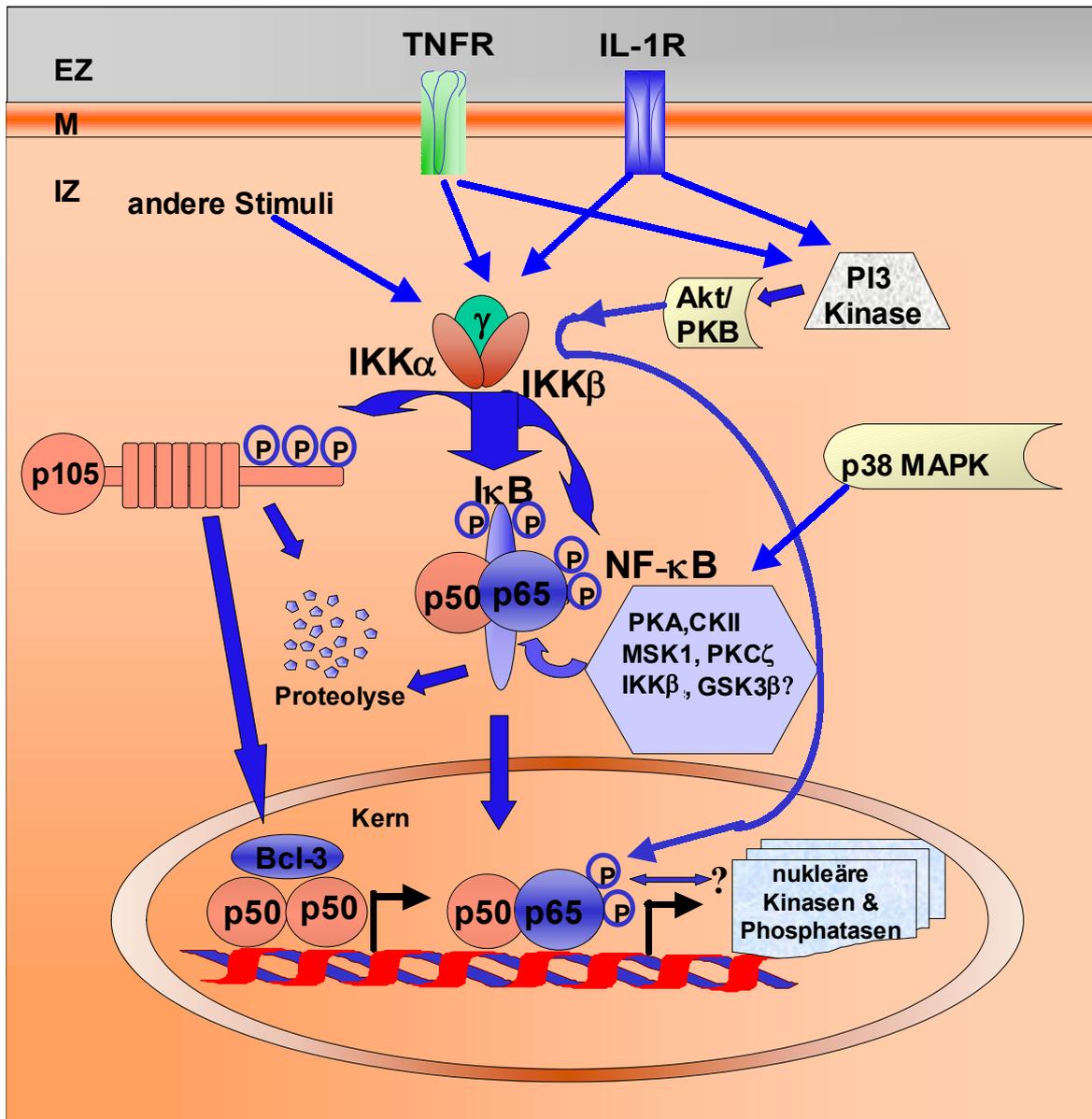


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der NF-κB-Aktivierung

Obige Abbildung zeigt eine schematische Zusammenfassung der Aktivierung des NF-κB-Signalweges. Dargestellt sind alle Proteinkinasen, die bisher als p65-Kinasen beschrieben worden sind sowie alle bekannten Phosphorylierungen (an IκB, p105, p50-p65), an denen IKK beteiligt ist. Abkürzungen: IKK: IκB-Kinase-Komplex; PKA: Proteinkinase A; CKII: Casein-Kinase II; MSK1: Mitogen- und Stress-aktivierte Kinase 1; PKCζ: Proteinkinase Cζ; GSK3β: Glykogen-Synthase-Kinase-3β; PI3-Kinase: Phosphatidyl-Insositol-triphosphat-Kinase; PKB: Proteinkinase B; TNFR: TNF-Rezeptor; IL-1R: IL-1-Rezeptor; EZ: extrazellulär; IZ: intrazellulär; M: Membran (modifiziert nach L. Schmitz *et al.*, 2001).

Auch die atypische Proteinkinase PKCζ ist an einer IκB-unabhängigen Regulation von NF-κB beteiligt (Anrather *et al.*, 1999). PKCζ phosphoryliert hierbei p65 an Ser311 und reguliert so die Rekrutierung von CBP/p300 (Duran *et al.*, 2003). Die Deletion von PKCζ hatte in murinen embryonalen Fibroblasten signifikanten Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von NF-κB (Leitges *et al.*, 2001). Der Phänotyp von GSK3β-defizienten Mausembryonen ähnelt stark den Phänotypen von p65- und IKKβ-defizienten Embryonen (Beg *et al.*, 1995; Li,

Q. *et al.*, 1999; Li, Z.W. *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1999). Alle drei Genotypen sind lethal und führen zu einer starken hepatozytären Apoptose.

Ein schematischer Überblick des NF- κ B-Signalweges unter Berücksichtigung der beteiligten Proteinkinasen ist in Abb. 1.4 dargestellt.

1.7 Zielsetzung

Die Aktivierung von NF- κ B kann durch die I κ B-Degradation nicht vollständig erklärt werden, wie sehr viele Daten in der Literatur zeigen. Insbesondere die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B wird offenbar unabhängig von der I κ B-Degradation reguliert. Es wurde in der Literatur berichtet, dass Untereinheiten von NF- κ B induziert und teilweise mehrfach phosphoryliert werden. Wenig verstanden ist dabei die genaue Funktion dieser Phosphorylierungen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, zum Verständnis der Funktionen dieser Phosphorylierungen beizutragen.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt dabei in der Analyse der Regulation der transkriptionellen Aktivität durch Phosphorylierungen im Kontext mit Entzündungsreaktionen. Hierzu wird die transkriptionell aktive Untereinheit p65 von NF- κ B bezüglich der phosphorylierungsabhängigen Regulation nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 α , TNF α) eingehender untersucht. Außerdem sollen die daran beteiligten Proteinkinasen und Signalwege näher charakterisiert werden.

Noch sehr unerforscht ist, ob die nukleäre Translokation von NF- κ B I κ B-unabhängig durch Phosphorylierungen reguliert wird. Es wurde berichtet, dass der Kerntransport von Dorsal, einem Rel-Homologon aus *Drosophila Melanogaster*, durch Phosphorylierung an einem hochkonservierten Serin (Ser317) reguliert wird (Drier *et al.*, 1999). Um zu überprüfen, ob dieser Mechanismus auf das humane p65 übertragbar ist, soll eine homologe Mutante generiert und analysiert werden.

Ein weiterer Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung neuer Phosphorylierungsstellen von p65. Hierfür sollen durch Verwendung von Peptid-Arrays, die den Sequenzbereich von p65 in Form von Peptiden enthalten, potentielle Phosphorylierungsstellen gefunden werden. Im Anschluss sollen dann diese putativen Phosphorylierungsstellen näher charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Chemikalien und Reagenzien:

Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Serva, Sigma, Merck, Baker, Fluka, Biomol, Promega, Invitrogen und Amersham Pharmacia Biotech bezogen (Qualitätsstufe: *pro analysi*, „Für die Molekularbiologie“ oder *cell culture grade*).

Geräte:

Elektrophorese-, Westernblot- und Fotografiesysteme:

Biometra BioDoc Analyze UV-Transilluminator
Biotec Fisher PHERO-STAB 0632 Spannungsgerät
Hoefer Mighty Small, SE250/260 Gelelektrophorese-Apparatur
Schleicher&Schuell *Semi-Dry-Blotter*
Sigma Vertikale duale Elektrophoresekammer

Mikroskope und Photometer:

Eppendorf BioPhotometer
Leitz Diavert
Leitz Laborlux 11
MR6500 Dynatech Mikrotestplattenleser
Shimadzu Spektralphotometer UV-160A
Zeiss Axiovert 200M

Verschiedenes:

Amersham Pharmacia Biotech Chromatographie-System ÄKTAprime
mit Schreiber REC112
Biometra Gelrockner
Biometra Hybridisierungsofen OV1
B. Braun Biotech International Certomat H Inkubator
EG&G Berthold Lumat LB 9507 Luminometer
Eppendorf Thermomixer 5436

Heidolph Vortex

Landgraf Thermocycler

Lauda C6 CS Wasserbad

Perkin Elmer ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (DNA-Sequenzer)

Protec Optimax Filmentwicklermaschine

Branson Sonifyer 250 G. Heinemann Ultraschall und Labortechnik

Ziegra Eismaschine

ELISA-Reader (Firma Dynatech)

Elma Ultraschallbad

Roth Vakuumfiltrationsapparatur, bestehend aus Schraubfiltervorsatz
und Saugflasche

Laborwaagen:

Chyo Electronic Balance MP-3000

sartorius analytic

Zellkultur:

GFL Wasserbad

Heraeus Brutschrank CO₂ Autozero

Heraeus Sterilwerkbank Lamin Air HB 2472

Zentrifugen:

Beckmann J2-21 Centrifuge

Beckmann L8-70M Ultracentrifuge

Beckmann TL-100 Ultracentrifuge

Eppendorf Concentrator 5301

Heraeus Biofuge Fresco

Heraeus Biofuge Pico

Sorvall RC2B

Sorvall RT6000 Refrigerated Centrifuge (DuPont)

Sigma 4K15

Sigma 6K10

Verbrauchsmaterial:

Plastikwaren, Einwegmaterial und Ähnliches wurden von den Firmen Eppendorf, Sarstedt, Omnilab, Roth, Greiner, Neolab, Nunc und Brand bezogen.

Lösungen und Puffer:Wasser

Falls nicht anders angegeben, wurde bidestiliertes H₂O verwendet.

Coomassie Brilliant Blue-Lösung

0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250

50% (v/v) Methanol

20% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung

30% (v/v) Methanol

1% (v/v) Ameisensäure

2xHeBS (sterilfiltriert)

0,28 mol/l NaCl

0,05 mol/l HEPES

1,5 mmol/l Na₂HPO₄

pH 7,05 mit 5 mol/l NaOH einstellen

10x Laemmli-Laufpuffer

0,5 mol/l Tris

1,92 mol/l Glycin

0,5% (w/v) SDS

4x Laemmli-Auftragspuffer

100 mmol/l Tris (pH 8,8)

8% (w/v) SDS

24% (v/v) Glycin

16% (v/v) β-Mercaptoethanol

0,02% (w/v) Bromphenolblau

mit H₂O auf 25 ml auffüllen

Luziferase-Reagenz

200 mmol/l	Tricin
10,7 mmol/l	(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ *5H ₂ O
26,7 mmol/l	MgSO ₄
333 mmol/l	DTT
10 mg	Coenzym A
5,931 mg	Na-Luziferin
5,3 mmol/l	ATP

Milch

5 ml 5% (w/v) Trockenmilchpulver in TBST-Puffer

PBS

137 mmol/l	NaCl
2,7 mmol/l	KCl
4,3 mmol/l	Na ₂ HPO ₄
1,4 mmol/l	KH ₂ PO ₄

RNA/DNA Auftragspuffer

50% (v/v)	Glycerol
1 mM	EDTA, pH 8
0,25% (w/v)	Bromphenolblau

SDS-PAGE-Sammelgelpuffer

1 mol/l	Tris/HCl, pH 6,8
---------	------------------

SDS-PAGE-Trenngelpuffer

1 mol/l	Tris/HCl, pH 8,8
---------	------------------

10x Semi Dry Blotpuffer

30,25 g	Tris
144,2 g	Glycin

20% (v/v) Methanol

TAE-Puffer

4 mmol/l Tris

0,11% (v/v) Essigsäure

1 mmol/l EDTA

TE-Puffer

10 mmol/l Tris (pH 7,0-8,0)

1 mmol/l EDTA

TBS-Puffer (pH 7,4)

10 mmol/l Tris/HCl

1,54 mol/l NaCl

TBST-Puffer

TBS-Puffer mit 0,05% (v/v) Tween 20

TSS-Lösung

10% (w/v) Polyethylenglykol 6000 oder 8000

5% (v/v) DMSO

50 mmol/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

mit LB-Medium auf 25 ml auffüllen

LB-Medium

10 g BactoTrypton

10 g NaCl

5 g Hefeextrakt

mit H_2O auf 1l auffüllen und autoklavieren

Weitere Materialien, Reagenzien und Kits:

Bradford-Kit

Protein Assay Dye Reagent, Bio Rad

dNTP Set

New England Biolabs, Roche

Gluathion(GSH)-Sepharose 4B

Amersham Pharmacia Biotech

G418 (Geneticin)	Calbiochem
Medium und Zusätze (Zellkultur)	GibcoBRL
Mini-Präp. Kit	Amersham Pharmacia Biotech
Protein A-/G-Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech
PVDF-Membran	Millipore
Qiagen Plasmid Maxi-Kit	Qiagen
Radioaktive Isotope	ICN
	Hartmann Analytics
	Amersham Pharmacia Biotech
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Amersham Pharmacia Biotech
Röntgenfilme	Biomax-ML, Biomax-MR (Kodak)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	GibcoBRL
<i>Cloned Pfu</i> -Polymerase	Stratagene
Zellkulturmaterial	Nunc

Antikörper und rekombinante Proteine:

anti-GFP-Antikörper (Boehringer Mannheim):

Mischung aus zwei monoklonalen Antikörpern aus der Maus (Klone 7.1 und 13.1) gegen GFP; Immunogen: partiell gereinigtes, rekombinantes GFP aus *Aequorea victoria*.

anti-phospho-I κ B α (Cell Signaling Technology):

Aufgereinigte polyklonale Antikörper (Kaninchen); Immunogen: Synthetisches Peptid, in dem Ser32 phosphoryliert ist, mit korrespondierendem Sequenzbereich aus humanem I κ B α .

anti-I κ B α (Cell Signaling Technology):

Aufgereinigte polyklonale Antikörper (Kaninchen); Immunogen: Synthetisches Peptid mit korrespondierendem Sequenzbereich aus humanem I κ B α .

anti-p65(Santa Cruz Biotechnology):

Aufgereinigte polyklonale Antikörper (Kaninchen); Immunogen: Synthetisches Peptid mit korrespondierendem Sequenzbereich aus dem C-Terminus von humanem I κ B α .

anti-pSer536p65 (Cell Signaling Technology):

Polyklonale Antikörper (Kaninchen); Immunogen: Synthetisches Peptid, in dem Serin-536 phosphoryliert ist, mit korrespondierendem Sequenzbereich aus humanem NF- κ B-p65.

anti-IKK α (Santa Cruz Biotechnology):

Polyklonale Antikörper (Kaninchen); Immunogen: rekombinantes humanes IKK α -Fragment AS 1-745.

anti-IKK β (Santa Cruz Biotechnology):

Aufgereinigter polyklonaler Antikörper (Ziege); Immunogen: synthetisches Peptid mit korrespondierendem Sequenzbereich aus dem C-Terminus von humaner IKK β .

anti-TBK1(Santa Cruz Biotechnology):

Polyklonale Antikörper (Kaninchen); Immunogen: Epitop korrespondiert mit dem Bereich AS 355-729 im C-Terminus von muriner TBK1. Die Antikörper erkennen sowohl murine als auch humane TBK1.

Sekundärantikörper für ECL-Reaktionen (konjugiert mit der Peroxidase aus Meerrettich (*horseradish-peroxidase*, HRP) :

anti-Maus-IgG-HRP-konjugierter Antikörper (Schaf), anti-Kaninchen-IgG-HRP- konjugierter Antikörper (Esel) (Amersham Pharmacia Biotech)

anti-Ziege-IgG-HRP-konjugierter Antikörper (Esel) (Dianova)

humanes, rekombinantes IL-1 α

Prof. Saklatvala, London, Großbritannien

humanes, rekombinantes TNF α

Prof. Wajant, Würzburg, Deutschland

Enzyme für molekularbiologische Anwendungen:

Sämtliche Enzyme wurden von den Firmen Invitrogen, MBI Fermentas, Stratagen und Amersham Pharmacia Biotech bezogen und in den entsprechenden Puffern eingesetzt.

Oligonukleotide:

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech bezogen.

für Mutagenese-Reaktionen:

Mutation (Position der Mutation ist unterstrichen):

S536D-*sense*:

5'-CCTCCTTTCAGGAGATGAAGACTTCTCCGACATTGCGGACATGG-3'

S536D-*antisense*:

5'-CCATGTCCGCAATGTCGAGAAGTCTTCATCTCCTGAAAGGAGG-3'

S536E-*sense*:

5'-CCTCCTTTCAGGAGATGAAGACTTCTCCGAAATTGCGGACATGG-3'

S536E-*antisense*:

5'-CCATGTCCGCAATTTCGAGAAGTCTTCATCTCCTGAAAGGAGG-3'

S536N-*sense*:

5'-CCTCCTTTCAGGAGATGAAGACTTCTCCAACATTGCGGACATGG-3'

S536N-*antisense*:

5'-CCATGTCCGCAATGTTGAGAAGTCTTCATCTCCTGAAAGGAGG-3'

S536A-*sense*:

5'-GGCCTCCTTTCAGGAGATGAAGACTTCTCCGCCATTGCGGAC-3'

S536A-*antisense*:

5'-GTCCGCAATGGCGGAGAAGTCTTCATCTCCTGAAAGGAGGCC-3'

S529A/S536A-*sense*:

5'-GGCCTCCTTGCAGGAGATGAAGACTTCTCCGCCATTGCGGAC-3'

S529A/S536A-*antisense*:

5'-GTCCGCAATGGCGGAGAAGTCTTCATCTCCTGCAAAGGAGGCC-3'

S281A-*sense*:

5'-GCCTTCGACCGGGAGCTCGCTGAGCCCATGGAATTCCAGTACC-3'

S281A-*antisense*:

5'-GGTACTGGAATTCCATGGGCTCAGCGAGCTCCCGGTCGGAAGGC-3'

T308A-*sense*:

5'-CGTAAAAGGACATATGAGGCCTTCAAGAGCATCATGAAGAAG-3'

T308A-*antisense*:

5'-CTTCTTCATGATGCTCTTGAAGGCCTCATATGTCCTTTTACG-3'

S468A-*sense*:

5'-CTGTGTTACGACCTGGCAGCCGTCGACAACCTCCGAGTTTCAGC-3'

S468A-*antisense*:

5'-GCTGAAACTCGGAGTTGTCGACGGCTGCCAGGTCTGTGAA CACAG -3'

Sequenzier-Primer:

für die Kontrolle der Mutationen an Position Ser281 und Thr308 in p65:

5'-GACCCCTCCCTACGCAGACCC-3' (3'-Ende: Nukleotid 858 in p65-Gen)

für die Kontrolle der Mutation an Position Ser468 in p65 :

5'-GAAGGAACGCTGTCAGAGGCC-3' (3'-Ende: Nukleotid 1397 in p65-Gen)

für die Kontrolle der Mutationen an Position Ser529 und Ser536 in p65

und Umklonierung mutierter Bereiche im C-Terminus von p65:

p65-*SalI-sense*

5'-GCGCGTCGACAACCTCCGAGTTTCAGC-3' (3'-Ende: Nukleotid 1505 in p65-Gen, enthält eine SalI-Schnittstelle)

p65-*HindIII-antisense*

5'-CGCGAAGCTTTT AGG AGC TGA TCT GAC TCA GCA G-3' (enthält Stopcodon des p65-Gens und eine HindIII-Schnittstelle)

Oligonukleotide aus dem Promotor des humanen IL-8-Gens für Chromatin-

Immunpräzipitation:

sense

5'-AAGAAAACCTTTCGTCATACTCCG- 3' (Nukleotide 1303-1325)

antisense

5'- TGGCTTTTATATCATCACCTAC 3' (Nukleotide 1450-1473)

Oligonukleotide mit NF- κ B-Bindungsmotiv für EMSA-Experimente:*sense*

5'-TGACAGAGGGGACTTTCCGAGA-3'

antisense

5'-TCTCGGAAAGTCCCCTCGTCA-3'

siRNA für RNA-Interferenz-Studien:siRNA SMARTpool IKK α , -IKK β

(Dharmacon)

Die genauen Sequenzinformationen sind nur über einen Aufpreis zu erhalten und waren daher nicht bekannt.

siRNA-Luciferase:

sense

5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAUU-3'

antisense

5'-UCGAAGUAUUCGCGUACGUU-3'

Plasmide:

pGEX-5X-3-p65₃₅₄₋₅₅₁-S529A,-
S536A,

Dr. H. Sakurai, Osaka, Japan

pcDNA3IKK α -flagpcDNA3IKK β -flagpGEX-5X-3-p65₃₅₄₋₅₅₁pNF- κ B₃-LucpcDNA3IKK α -flag-d.n.(S176A)pcDNA3IKK α -flag-d.n.(S177A, S181A)pcDNA3I κ B α -flagpcDNA3I κ B α -SS/AA-flag (S32A/S36A)

pEGFPC1p65

Prof. Dr. L.M. Schmitz, Bern,
SchweizpSV- β Gal

Promega, Karlsruhe, Deutschland

pCS3MT	Dr. P.Holland, Seattle, USA
pUHD133-IL-8-Promotor-Luc-WT	Prof. Dr. Kracht Hannover, Deutschland
pMT7p65	Dr.M. Nourbaksh, Hannover, Deutschland
pMTNHA-TAFII31	Dr.R.Wu, Houston, USA
pGEX2TK-TAFII31	Dr. J.A.A. Ldias, Boston, USA
pCDNA3.1/HisA-AES	Dr. T. Okamoto, Nagoya Japan

E.coli-Bakterienstämme:

XL1 Blue

Genotyp: F⁺ *Tn10 (Tet^r) proA+B+ lacI^q Δ(lacZ)M15I recA1 gyrA96 (Nal^r) thi-1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁻) glnV44 relA1 lac*

TOP10

Genotyp: F⁻ *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*

LKIII

Genotyp: r_k⁻, m_k⁺, thi-1, thr 1, leuB6, onA21supE44, lacI^qYZΔM15, Hfrλ⁺

BL21(DE3)pLysSb (für die Proteinexpression verwendeter Stamm)

Genotyp: F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cm^R)*

Zelllinien

HEK293 IL-1R:

humane, adenovirustransformierte, embryonale Nierenzellen, die konstitutiv das Gen des IL-1-Rezeptors exprimieren; Prof. Dr. K. Matsumoto, Nagoya, Japan

HelatTA :

Transgene Hela-Zelllinie (humane, epitheloide Cervix-Carcinoma Zelllinie), die stabil mit einem konstitutiv regulierten Expressionsplasmid für ein tetrazclin-responsives, transkriptionelles Aktivatorprotein transfiziert wurde (geeignet für die tetrazyklinabhängige Regulation von Transgenexpression) (Gossen, M. et al., 1992).

p65-defiziente MEF-Zellen:

murine embryonale Fibroblastenzelllinie; p65^{-/-}, Dr. T. Okazaki, Tokio, Japan

KB-Zellen:

orale epidermale Karzinomzellen

Elektrophorese-Standards

DNA-Standard

GeneRuler 100 bp DNA Ladder
(MBI Fermentas):

1031 bp
900 bp
800 bp
700 bp
600 bp
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp
80 bp

λ -DNA/ *Eco*RI und *Hind*III Marker 3
(MBI Fermentas):

21226 bp
5148 bp
4973 bp
4268 bp
3530 bp
2027 bp
1904 bp
1584 bp
1375 bp
947 bp
831 bp

Proteinstandard LMW (*Low Molecular Weight*) für SDS-PAGE, Amersham Pharmacia

Biotech:

97 kDa	Phosphorylase B
66 kDa	Albumin
45 kDa	Ovalbumin

30 kDa	Carboanhydrase
20 kDa	Trypsininhibitor
14 kDa	α -Lactalbumin

Proteinstandard mit Farbstoff-markierten Standardproteinen für SDS-PAGE (*Broad Range*),

New England Biolabs :

175 kDa	MBP- β -Galaktosidase (MBP: Maltose-Bindendes-Protein)
83 kDa	MBP-Paramyosin (MBP: Maltose-Bindendes-Protein)
62 kDa	Glutamatdehydrogenase
47,5 kDa	Aldolase
32,5 kDa	Triosephosphatisomerase
25 kDa	β -Lactoglobulin A
16,5 kDa	Lysozym
6,5 kDa	Aprotinin

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Bakterienkulturen

Für molekularbiologische Arbeiten wurden *E.coli*-Stämme verwendet, die sich von dem Sicherheitsstamm K12 ableiten. Die Bakterien wurden entweder in Flüssigkulturen mit LB-Medium oder auf Agarplatten kultiviert. Für die selektive Kultivierung wurden die Antibiotika Ampicilin (Konzentration 100 $\mu\text{g/ml}$), Tetracyclin (12,5 $\mu\text{g/ml}$) und Kanamycin (50 $\mu\text{g/ml}$) verwendet. Die Langzeitlagerung der Bakterienstämme erfolgte in 50% (v/v) Glycerol in LB-Medium bei -80°C .

2.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien und Transformation

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurde eine Flüssigkultur (4 ml LB-Medium) des jeweiligen Leerstammes angeimpft und ü.N. bei 37°C bei 200 rpm inkubiert. Mit der Vorkultur wurde dann eine größere Flüssigkultur angesetzt (50-150 ml LB-Medium) und so lange inkubiert, bis die Extinktion bei 600 nm eine optische Dichte von 0,3-0,5 erreichte. Die Zellen wurden dann sedimentiert (4°C , 3000 g, 10 min) und in 1/10 Volumen TSS bei 4°C resuspendiert. Die Suspension wurde sofort auf Eis in 200 μl Portionen aliquotiert und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien wurden 200 μl -Aliquots der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut, mit einer entsprechenden Menge Plasmid-DNA vereinigt (10 ng zirkuläres Plasmid, 2-10 μl eines Ligationsansatzes) und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Reaktionsgefäße mit den Bakterien bei 42°C in einem vorgeheizten Wasserbad mit einer Temperatur von 42°C für 45-55 s getaucht (Hitzeschock)

und darauf zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 800 µl LB-Medium zum Ansatz hinzugefügt und es folgte eine Inkubation von einer Stunde bei 37°C. Im Anschluss wurden die Bakterien sedimentiert (3-5 min, 3000 rpm, Heraeus Biofuge Pico, RT) und in 100 µl LB-Medium resuspendiert, auf eine Agarplatte ausplattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert.

2.2.3 Herstellung von Plasmid-DNA

Die Präparation kleiner und größerer Mengen DNA erfolgte aus Bakterien-Flüssigkulturen in einer Größe von 2-4 ml (Mini-Präparation) oder 250-350 ml (Maxi-Präparation).

Für Mini-Präparationen von Plasmiden wurde der *GFX Micro Plasmid Prep. Kit* (Amerham Pharmacia Biotech) verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte nach Angabe des Herstellers. Zum Ende der Präparation wurde die Plasmid-DNA von einer Mini-Silikagel-Säule mit 30-50 µl Wasser oder TE-Puffer (pH 7,6) eluiert.

Plasmid-Präparationen im Maxi-Maßstab wurden mit dem *Maxi-Plasmid Prep Kit* (Qiagen) durchgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte hierbei in 100-200 µl H₂O.

2.2.4 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Für die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA wurde unter Verwendung von Quarzküvetten die Extinktion bei 260 nm einer geeigneten Verdünnung gemessen.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$[\text{DNA bzw. RNA}] / (\mu\text{g/ml}) = E_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times F$$

F = 50 bei doppelsträngiger DNA oder 40 bei RNA

2.2.5 Analytischer und präparativer Restriktionsverdau von DNA

Für den Restriktionsverdau von DNA zu analytischen oder präparativen Zwecken wurden Enzyme und Reaktionspuffer von MBI Fermentas verwendet. Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 200-500 ng DNA für 1-2 h mit 5 U Restriktionsenzym unter Verwendung des zugehörigen Reaktionspuffers und den vom Hersteller angegebenen Bedingungen inkubiert. Das finale Reaktionsvolumen betrug in der Regel 20 µl. Der Verdauansatz wurde dann zur Analyse in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

Zu präparativen Zwecken für Klonierungen wurde DNA unter Überverdaubedingungen verdaut (50x), um zu gewährleisten, dass der Verdau nahezu vollständig verläuft. Die

eingesetzten Enzymmengen für einen 50x-Überverdau wurden nach folgender Formel berechnet:

$$(Enzymmenge (U) \times DNA-Menge (\mu g) \times 50) / Dauer des Verdaus (h)$$

Das finale Reaktionsvolumen betrug 100 μ l. Zur Vermeidung von Verdunstung wurde der Ansatz mit Mineralöl beschichtet. Die Isolation des DNA-Fragmentes erfolgte nach einer präparativen Agarosegelelektrophorese mit einem Gel Extraktions Kit (Qiagen).

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese (Agarose: Sigma) wurden zu analytischen und präparativen Zwecken Gele mit einer Agarosekonzentration von 1-2% (w/v) verwendet. Hierfür wurde die notwendige Menge Agarose mit 100 ml TAE-Laufpuffer in einem Erlenmeierkolben in einer Mikrowelle aufgeköcht bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Sobald die Lösung handwarm war, wurden 10 μ l Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration =10 μ g/ml) (Sigma) hinzugefügt und nach Mischen wurde das Agarosegel in die vorbereitete Gelkammer der Elektrophoreseapparatur gegossen. Danach wurde der Probenkamm luftblasenfrei in das Gel gesteckt. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die aufzutragenden Proben wurden mit 1/10 Volumen 10x DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 6-8 V/cm durchgeführt. DNA-Banden mit interkaliertem Ethidiumbromid wurden unter UV-Licht auf einen entsprechenden Leuchttisch sichtbar gemacht und photographiert. Die Durchführung einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese erfolgte hierzu analog. Die notwendige Taschengröße wurde durch das Abkleben von mehreren kleinen Taschen mit Klebeband erreicht. Für die Isolation präparativ-verdauter DNA-Fragmente wurde ein *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers benutzt. Die Quantifizierung der isolierten DNA erfolgte durch Vergleich mit einer bekannten DNA-Menge (z.B. nach Verdau) densitometrisch mit den Programmen *BioDocAnalyzer* (Biometra) oder mit ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>; Stand März 2004).

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Methode der PCR werden DNA-Abschnitte durch eine thermostabile DNA-Polymerase in mehreren Reaktionszyklen amplifiziert. Bei diesen Reaktionszyklen werden nach Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge komplementäre DNA-Stränge neusynthetisiert, indem die Polymerase an das 3'-Ende eines an die Ausgangs-DNA komplementär bindenden Oligonukleotides (*Primer*) Nukleotide anfügt. Theoretisch kann

eine exponentielle Amplifikation des DNA-Abschnittes erreicht werden. Das standardmäßig verwendete Temperaturprofil für den Ablauf einer PCR-Reaktion ist in folgender Tabelle dargestellt:

Schritt	Vorgang	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1	initiale Denaturierung	95	1-5
2	Denaturierung	95	1
3	Anlagerung der Primer	55-70	1
4	Elongation	72	1-2/kBp (<i>Taq</i>); 0,5/kBp (<i>Pfu</i>)
5	finale Elongation	72	6-12

Die Schritte 2-4 werden dann 20-30 x wiederholt.

Zur Berechnung der Schmelztemperatur der *Primer* wurde die 2+4-Formel angewandt:

4°C pro C oder G und 2°C pro A oder T

Die weitere Optimierung erfolgte experimentell.

Die PCR-Reaktionen wurden unter den folgenden Standardbedingungen durchgeführt:

DNA-Matrix (<i>template</i>)	50-100 ng
Primer <i>sense/antisense</i>	je 0,5 µM
10x Reaktionspuffer	1x
dNTP-Mix	0,2 mM (pro Nukleotid)
MgCl ₂	1,5-5 mM
H ₂ O (HPLC-analysiert)	ad 50 µl
<i>Pfu</i> - oder <i>Taq</i> -Polymerase	2,5 U

Der PCR-Ansatz wurde vor Beginn mit 30 µl Mineralöl überschichtet.

Die *Pfu*-Polymerase hat aufgrund einer 3'-5'-Proofreading-Aktivität eine deutlich geringere Fehlerrate und wurde daher für präparative Zwecke eingesetzt. Bei unspezifischer Produktbildung wurde versucht, durch Variation der Schmelztemperatur, der MgCl₂-Konzentration oder durch Zusatz von z.B. DMSO (bis zu 5% (v/v)) das Ergebnis der PCR zu optimieren.

2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Vor der Ligation von DNA-Fragmenten in durch Restriktionsverdau geöffnete Vektor-DNA wurde die genaue Konzentration der DNA-Fragmente und Vektoren nach Agarose-Gelelektrophorese densitometrisch bestimmt. Das zu inserierende DNA-Fragment lag entweder in einem aquimolaren Verhältnis zur Vektor-DNA (200-400 ng) oder im Überschuss (z.B. 1:3; 1:6, 1:9) im Ligationsansatz vor. Die verwendeten Reaktionspuffer und ATP-Lösung sollten generell in kleinen Aliquots portioniert werden und gelagert werden. Ein

typischer Ligationsansatz unter Verwendung von T4-DNA-Ligase hatte folgende Zusammensetzung:

1,3 µl Vektor (300 ng)

1,2 µl DNA-Fragment (1:3)

1 µl 10 mM ATP (final 0,5 mM)

2 µl 10xT4-DNA-Ligase-Reaktionspuffer

0,4 µl T4-DNA-Ligase (2 U)

ad 20 µl mit H₂O (Qualitätsstufe: HPLC-analysiert)

Der Ligationsansatz wurde dann 16-21 h bei 16°C inkubiert.

Für Transformationen wurden dann bis zu 10 µl eines Ligationsansatzes eingesetzt.

2.2.9 Zwischenklonierung von PCR-Fragmenten mittels der TOPO-Technologie

Um PCR-Fragmente effektiv zu verdauen, wurden *Pfu*-amplifizierte PCR-Produkte in den Vektor pCRII-Blunt (*Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit*, Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers kloniert. Der Vektor *pCRII-Blunt* wird dabei in geöffneter Form geliefert, wobei die Enden kovalent mit dem Enzym Topoisomerase I besetzt sind. Dies ermöglicht eine hohe Ligationseffizienz. Für die Ligation ist keine weitere Vorbereitung erforderlich. Optional kann das PCR-Produkt bei Vorliegen von unspezifischer Produktbildung durch eine präparative Gelelektrophorese mit anschließender Isolation aus dem Agarosegel aufgereinigt werden.

2.2.10 Ortsgerichtete Mutagenese

Zur Herstellung von mutierten Proteinen wurden die zugehörigen Gene mit der Methode der ortsgerechten Mutagenese mutiert. Hierfür wurde ein *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene verwendet. Bei dieser Methode werden durch eine Polymerasereaktion DNA-Plasmide amplifiziert, die ein Oligonukleotid mit der gewünschten Mutation inkorporieren. Durch *DpnI*-Verdau wird die methylierte *template*-DNA (DNA aus Bakterien wird in den meisten Stämmen methyliert) selektiv aus dem Reaktionsansatz entfernt, während die unmethylierte Produkt-DNA für die Transformation in Bakterien eingesetzt wird. In der Bakterienzelle wird hierbei der Einzelstrangbruch, der nach Synthese der DNA vorlag, repariert. Die genaue Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Kontrolle der Mutagenese-Reaktion erfolgte durch eine DNA-Sequenzierung

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der *Taq-cycle-sequencing*- Methode (Sears *et al.*, 1992), bei der es sich um eine Kombination aus PCR und Sequenzierungsverfahren nach Sanger (vgl. Sanger *et al.* 1977) handelt. Durch die Polymerase wird der zu sequenzierende Bereich amplifiziert. Im Reaktionsansatz befindet sich ein kleiner Anteil von Didesoxynukleotiden, deren Einbau zum Abbruch der Kettenreaktion aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe führt. Hierbei trägt jedes der Didesoxynukleotide eine bestimmte Fluoreszenzmarkierung, so dass auf diese Weise DNA-Moleküle, die sich um die Länge eines Nukleotids unterscheiden und deren letztes Nukleotid fluoreszenzmarkiert ist, erhalten werden. Die Auftrennung und fluoreszenzabhängige Detektion erfolgt mit einer Kapillarelektrophorese. Ein Sequenzieransatz wurde nach folgendem Schema zusammenpipettiert:

	Volumen	Menge
DNA		200–500 ng
Primer 1:100)	2–10 µl	2–10 pmol
RRM	4-8 µl	
Wasser (HPLC-analysiert)	ad 20 µl	

Die Sequenzierreaktion wurde im *thermocycler* durchgeführt. Das Programmschema hierfür lautete:

Zeit [s]	T [°C]
30	96
15	<i>Annealing</i> -Temperatur (meist 50°C, je nach Primer)
4	60

Verwendetes Material:

DNA Sequencing Kit, BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction
(*ready reaction mix* [RRM], *template supression reagent* [TSR]), ABI PRISM)

Primer, Sammlösung, Konzentration: 100 pmol/µl
3M Natriumacetat (Sigma)

Dabei wurden 25 Zyklen durchlaufen. Anschließend wurden zum Ansatz 80 µl H₂O (HPLC-analysiert) gegeben und der gesamte Ansatz in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum

Fällen der DNA wurden dann 10 µl der NaAc-Lösung und 250 µl 100% Ethanol hinzugefügt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (30 min, 25°C, 13000 rpm in Tischzentrifuge). Der Überstand wurde abgezogen, die DNA mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 25°C, 13000 rpm in Tischzentrifuge). Das DNA-Pellet wurde bei 37°C vollständig getrocknet, in 20 µl TSR aufgenommen und erhitzt (2 min, 95°C). Danach wurde der Ansatz in ein Sequenziergefäß überführt. Die Sequenzierung erfolgte durch den 310 *Abi Prism™* Genetic Analyzer.

2.3 Zellkulturtechniken

2.3.1 Kultivierung von adhärennten Zelllinien

Die adhärennt wachsenden Zelllinien HeLaTA, HEK293-IL1R und MEF-p65^{-/-} wurden bei 37°C mit einer wassergesättigten Atmosphäre und 5% CO₂ in DMEM-Vollmedium (10% (v/v) FKS, 2 mmol/l L-Glutamin, 1 mmol/l Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) kultiviert. Sobald die Zellen einen zusammenhängenden Zellrasen gebildet hatten (ungefähr nach drei bis vier Tagen), wurde das alte Medium entfernt und der Zellrasen wurde nach vorsichtigen Abschlagen (HEK293-IL1R) oder Abschaben in einem geeigneten Volumen von neuem Medium resuspendiert und in eine neue Kulturflasche überführt.

2.3.2 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau-Lösung (0,8% (v/v) in PBS) ungefähr 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Lebende Zellen sind in der Lage, den Farbstoff auszuschleiden, während tote oder geschädigte Zellen den Farbstoff akkumulieren und im mikroskopischen Bild tiefblau erscheinen. Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop. Dabei wurden mindestens vier Großquadrate ausgezählt. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$(Summe\ der\ Zellen\ aller\ Großquadrate/4) \times 10000 \times Verdünnungsfaktor = Zellen/ml$$

2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die mit Medium abgelösten Zellen bei 1000 rpm für 5 min (Sorvall RT6000 Refrigerated Centrifuge) bei RT sedimentiert, in 1 ml kaltem Einfriermedium (50%

(v/v) FKS, 30% (v/v) DMEM, 20% (v/v) DMSO) resuspendiert und in ein vorgekühltes Kryoröhrchen überführt.

Die Kryoröhrchen wurden danach über Nacht in einem auf 4°C vorgekühlten, mit Isopropanol befüllten Nalgene-*Cryo Freezing Container*, der in einem Tiefkühlschrank (-80°C) gestellt wurde, langsam heruntergekühlt und danach für die Langzeitlagerung in einem mit flüssigen Stickstoff gefüllten Dewargefäß aufbewahrt.

Zum Auftauen wurde aus dem Dewargefäß ein Kryoröhrchen entnommen, schnell in der Hand aufgetaut und in 10 ml Medium überführt. Um das DMSO zu entfernen, wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 1000 rpm, RT, Sorvall RT6000 Refrigerated Centrifuge), in frischem Medium mit 20% FKS resuspendiert und in eine Kulturflasche ausgesät.

2.3.4 Stimulation und Ernten von Zellen

Folgende Stimuli wurden verwendet: TNF- α (20 ng/ml), IL-1 α (10 ng/ml) und PMA (20 ng/ml) + Ionomycin (0,5 μ g/ml). Die Stimulation erfolgte in DMEM-Medium unter den in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Bedingungen. Zum Ernten der Zellen nach Stimulation wurden diese zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in PBS abgeschabt, anschließend für 10 min bei 500 g und 4°C abzentrifugiert und im Anschluss je nach Zellysemethode weiterverarbeitet.

2.3.5 Transfektionsmethoden

Für die transiente Transfektion, also dem Einführen von DNA oder siRNA in Zellen, wurden die Kalziumphosphat-Methode oder die Lipofektionsmethode mit den Transfektionsmitteln *Roti-Fect* (Roth) oder *Oligofectamine* (Invitrogene) angewandt.

2.3.5.1 Transfektion mit der Kalziumphosphatmethode

Die zu transfizierende DNA bildet mit Kalziumphosphat Kopräzipitate, die vermutlich durch Endozytose in die Zielzelle gelangen. Mit dieser Methode wurden die Zelllinien HEK293-IL1R und HelatTA transfiziert. Wichtig für das Gelingen der Transfektion ist, dass die Transfektion bei einer Konfluenz von 50-70% erfolgt. Die folgenden Angaben gelten für einen Ansatz pro Loch einer Sechs-Loch-Platte. Je nach Expressionsdauer (24 oder 48 h) wurden 2,5 oder 4×10^5 HelatTA-Zellen (HEK293-IL1R-Zellen) in einem Volumen von 2 ml DMEM am Vortag ausgesät. Alle verwendeten Lösungen waren entweder autoklaviert oder sterilfiltriert worden. Zunächst wurde die gewünschte DNA-Menge mit 225 μ l 2xHEBS-

Puffer (pH 7,05) und 250 µl H₂O gemischt. Es wurden mindestens 3,75 µg DNA eingesetzt, um eine effiziente Kokristallisierung zu erzielen. Zum Erhöhen der Gesamt-DNA-Menge wurde das Plasmid pCS3MT (Träger-DNA) verwendet. Anschließend wurden 31,5 µl einer kalten CaCl₂-Lösung hinzugesetzt. Der Ansatz wurde erneut gemischt und zu den Zellen gegeben. Nach mindestens 4 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 2 ml frischem Medium für weitere 24-48 h kultiviert. Bei HelatTA-Zellen wird direkt nach der Inkubation mit den Kopräzipitaten ein Glycerolschock durchgeführt, um die Transfektionseffizienz zu verbessern. Hierzu wurden die Zellen nach dem Entfernen der Kopräzipitate 3 min mit 10% Glycerol (in DMEM) behandelt, dann zweimal mit PBS gewaschen und in 2 ml frischem Medium weiter kultiviert. Am nächsten Tag wurde dann das Medium erneuert oder die Zellen wurden geerntet.

2.3.5.2 Lipofektionsmethode

p65-defiziente MEF-Zellen wurden nach den Angaben des Herstellers mit dem Transfektionsmittel *Roti-Fect* (Roth) (Lipofektion) transfiziert.

2.3.5.3 Transfektion von HEK293IL1R-Zellen mit siRNA

Als RNA-Interferenz wurde ursprünglich ein Vorgang bezeichnet, bei dem in den Zellen einiger Eukaryonten doppelsträngige, virale RNA durch die RNase *Dicer* in kleine RNA-Duplices mit einer Länge von 21-23 Basenpaare verdaut wird. Diese auch als *small-interfering RNAs* (siRNA) bezeichneten dsRNA-Moleküle werden dann in den sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC) inkorporiert und dort in einer ATP-abhängigen Reaktion entwindet. Die so entstandene, einzelsträngige RNA lagert sich komplementär an die zugehörige virale mRNA an und initiiert dadurch die Degradation der mRNA durch RISC über einen noch nicht näher aufgeklärten Mechanismus. Dieses Phänomen macht man sich bei der gezielten Suppression von Genen für analytische Zwecke zu Nutze.

Zur Suppression der Gene von IKK α und IKK β durch RNA-Interferenz wurden HelatTA-Zellen mit siRNAs, die spezifisch gegen die mRNA-Sequenz dieser Gene gerichtet sind verwendet. Eingesetzt wurden hierbei siRNA SMARTpools der Firma Dharmacon, die vier oder mehr Spezies von siRNA-Duplices gegen das jeweilige Gen enthalten.

4×10^4 HEK293IL1R-Zellen wurden in einem Loch einer 24-Lochplatte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion. Es wurde ein Gemisch aus siRNA gegen IKK α und IKK β (Konzentration 100 nm) sowie DMEM ohne Zusätze (finales Volumen: 42,5 µl)

hergestellt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Da Zusätze wie Serum und Antibiotika die Komplexbildung verhindern, dürfen diese Komponenten nicht im DMEM enthalten sein. In gleicher Weise wurde der Kontrollansatz mit siRNA gegen das Luziferase-Gen hergestellt. Getrennt von diesen Ansätzen wurden jeweils 3 μl *Oligofectamine*-Reagenz (Invitrogen) mit 4,5 μl DMEM ohne Zusätze gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden beide Ansätze vereinigt (finales Volumen: 50 μl), gemischt und zur Komplexbildung zwischen siRNAs und *Oligofectamine* 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Zellen einmal mit DMEM ohne Zusätze gewaschen worden waren, wurden 200 μl DMEM ohne Zusätze auf die Zellen vorgelegt und das finale Gemisch mit dem siRNA-*Oligofectamine*-Komplex hinzugefügt. Die Zellen wurden dann für 4 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die Transfektion durch Zugabe von 125 μl DMEM mit 30% (v/v) FKS pro Loch abgestoppt und die Zellen wurden weiter inkubiert. Am nächsten Tag wurden 625 μl DMEM hinzugefügt und die Zellen wurden 48 h weiterinkubiert.

2.3.6 Reporter-Gen-Untersuchungen

Durch die Transfektion von Reporter-Gen-Plasmiden, die unter der Kontrolle des zu untersuchenden Promotors oder Promotorabschnittes stehen, wurde die Promotoraktivität in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors NF- κB gemessen. Als Reporter-Gen wurde das Luziferase-Gen verwendet. Die Luziferase setzt unter ATP-Verbrauch mit CoA den Farbstoff Luziferin (AppliChem) um, was durch Chemilumineszenz zur Lichtemission führt.

Die Herstellung der Lysate wurde wie folgt durchgeführt: Der Zellinhalt einer Sechslöchplatte wurde nach Entfernen des Mediums einmal mit 2 ml kaltem PBS gewaschen, und in 1 ml PBS resuspendiert und sedimentiert (1 min, 10000 g, 4°C). Danach erfolgte die Lyse der Zellen im β -Galaktosidasepuffer mit folgender Zusammensetzung

β -Gal. Lysepuffer: 4,25 ml 200 mM KH_2PO_4
 45,75 ml 200 mM K_2HPO_4
 200 μl Triton X-100
 H_2O ad 100 ml
 1 $\mu\text{mol/l}$ Pepstatin
 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Leupetin
 0,5 mmol/l PMSF

Dabei wurde die Suspension heftig geschüttelt (Vortexer) und 5-15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation von 15 min bei 10000 g und 4°C wurde der Überstand (β -Gal.-Lysat) abgenommen.

Die Bestimmung der Luziferaseaktivität erfolgte immer in einer Doppelbestimmung. Hierzu wurden 20 µl Lysat in einem Messröhrchen vorgelegt und in das Luminometer gestellt. Nach Zugabe von 100 µl des Luziferase-Reagenzes durch das Gerät wurde 5 Sekunden später die Chemilumineszenz für 10 Sekunden gemessen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Reporter-Plasmide verwendet:

Das Konstrukt p(NF-κB)₃-Luc steht unter Kontrolle eines Promotors mit einer dreifachen Konsensus-Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF-κB.

Bei dem Plasmid pUHD133-IL-8-Promotor-Luc-WT wird das Reporter-Gen von einem minimalen humanen IL-8 Promotor kontrolliert, der unter anderem Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-κB besitzt.

Für die Normalisierung wurde das Plasmid pSVβ-Gal verwendet, bei dem das β-Galaktosidase-Gen unter der Kontrolle eines konstitutiven SV40 Promotors exprimiert wird. Die β-Galaktosidaseaktivität wurde ebenfalls durch Messung der Chemilumineszenz eines umgesetzten Substrates bestimmt. Dazu wurden in einem 15 µl Lysat 1h bei 50°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und wieder auf Raumtemperatur erwärmt. Danach wurden 5 µl-Aliquots mit 50 µl β-Gal.-Puffer (Clontech) versetzt und für 30 min. bei Raumtemperatur in einem Messröhrchen inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Messung der Chemilumineszenz für 10 s im Luminometer.

Entweder wurden die Werte der Luziferaseaktivitäten oder der relative Induktion in Abbildungen dargestellt. Die relative Induktion wurde berechnet, indem die durch die β-Gal.-Aktivität normalisierte Luziferaseaktivität eines unstimulierten Ansatzes, der nur mit den Reporter-Plasmiden und dem Plasmid pCS3MT (Träger-DNA) transfiziert worden war, im Vergleich zu anderen Werten gleich eins gesetzt wurde.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung und einer dadurch resultierenden Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm. Das Reagenz wurde aus einer Mischung von dem Farbstoffkonzentrat *Roti Quant* (40% (v/v)) (Roth) und H₂O (60% (v/v)) hergestellt. In einer 96-Loch-Platte wurden Triplikate von je 100 µl der zu messenden Probe und der BSA-Kalibrationsstandard-Reihe (Standardreihe, 0-35 µg/ml, in

Intervallen zu je 5 µg/ml) in PBS Puffer vorgelegt und mit 100 µl der Farbstofflösung versetzt. Nach Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurde im *Elisa Reader* die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Konzentration der Probe wird mit der Kalibrationsgeraden bestimmt.

2.4.2 Präparation von Zelllysaten

2.4.2.1 Herstellung von Ganzzellextrakten

Die nach Ernte erhalten Zellpellets wurden in Lysepuffer resuspendiert (z.B. Zellpellet aus T175-Flasche mit 250 µl) und mehrfach rigoros im Vortexer gemischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die lysierten Zellen abzentrifugiert (13000 rpm, 15 min, 4°C, Heraeus Biofuge Fresco) und der Überstand abgenommen. Dieser wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert

Lysepuffer für Ganzzellextrakte (GZE-Lysepuffer):

40 mmol/l	Tris (pH 7,05)
120 mmol/l	Natriumpyrophosphat
80 mmol/l	β-Glycerophosphat
200 mmol/l	NaCl
200 mmol/l	NaF
8 mmol/l	Na ₃ VO ₄
1% (v/v)	Triton X-100
0,5 mmol/l	PMSF
0,5 µg/ml	Leupeptin
0,5 µg/ml	Pepstatin
10 mM	DTT

Auf diese Weise hergestellte Ganzzellextrakte wurden für Festphasen-Kinaseassays, Peptid-*Array*-Kinaseassays, Westernblots und Immunpräzipitationen verwendet.

2.4.2.2 Herstellung von cytosolischen Fraktionen und Kernextrakten

Zellen aus einer konfluenten T75-Flasche wurden in kaltem PBS gewaschen, resuspendiert und bei 500 g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 150 µl Puffer A resuspendiert und für 5 Minuten bei 4°C und 10.000 g pelletiert. Danach wurde dieses Pellet in 150 µl Puffer A mit 0,1% (w/v) NP-40 resuspendiert, rigoros mehrfach geschüttelt (Vortexer) und für 10 Minuten in Eis inkubiert. Darauf folgte eine Zentrifugation (5 Minuten, 10000 g, 4°C). Der Überstand (Cytosol) wurde abgenommen und bei -80°C eingefroren. Das Pellet wurde in 60 µl Puffer B resuspendiert, in Eis 1h inkubiert und in regelmäßigen Abständen (alle 10-15 min)

rigoros geschüttelt (Vortexer). Nach erneuter Zentrifugation (5 Minuten, 10000 g, 4°C) wurde der erhaltene Überstand (Kernextrakt) ggf. in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4x Puffer I Standardlösung

40 mmol/l HEPES pH 7,9
40 mmol/l KCl,
6 mmol/l MgCl₂,
1,2 mmol/l Na₃VO₄,
80 mmol/l β-Glycerophosphat

4x Puffer II Standardlösung

80 mmol/l HEPES, pH 7,9
1.68 mmol/l NaCl
6 mmol/l MgCl₂
0.8 mmol/l EDTA
1.2 mmol/l Na₃VO₄,
80 mmol/l β-Glycerophosphat

Puffer A

1x Puffer I
10 μmol/l E64
2,5 μg/ml Leupeptin
0,3 mmol/l PMSF
1 μmol/l Pepstatin
5 mmol/l DTT
400 nmol/l Okadainsäure

Puffer A mit 0,1% (w/v) NP-40

Puffer B

1x Puffer II
10 μmol/l E64
2,5 μg/ml Leupeptin
0,3 mmol/l PMS
1 μmol/l Pepstatin
5 mmol/l DTT
400 nmol/l Okadainsäure
25% (v/v) Glycerol

2.4.2.3 Herstellung von Direktlysaten

Die Zellen aus dem Loch einer Sechs-Lochplatte wurden mit kaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde vollständig durch Absaugen entfernt. Dann wurden die Zellen in einem Loch einer Sechs-Lochplatte in 100 μl Direktlysepuffer direkt abgeschabt und resuspendiert und

auf Eis gestellt. Alle Proben wurden gleichzeitig für 5-10 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Aliquots von 50 µl wurden zur Untersuchung im Westernblot eingesetzt. Das eingesetzte Volumen des Direktlysepuffers wurde proportional der Fläche der Zellkulturgefäße angepasst.

Direktlysepuffer:

62,5 mmol/l Tris pH 6,8
2% (w/v) SDS
10% (v/v) Glycerol
50 mmol/l DTT,
0,01% (w/v) Bromphenol-Blau

2.4.3 Acetonfällung von Proteinen

Zur Konzentrierung von Proteinen vor Durchführung einer Gelelektrophorese wurde 1 Volumen Probe mit 4 Volumina Aceton gemischt und 1 h oder ü.N. bei -20°C inkubiert. Danach wurde zentrifugiert (15 min, 13 000 rpm, 4°C, Heraeus Biofuge Fresco) und der Überstand entfernt. Das erhaltene Pelett wurde dann in 1x-Laemmli-Auftragspuffer aufgenommen.

2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970) wurden Trenngele mit einer Monomerenkonzentration von 10% und Sammelgele mit einer Monomerenkonzentration von 5% gegossen. Für die Probenaufbereitung wurden 3 Volumen Probe mit einem Volumen 4xLaemmli-Auftragspuffer gemischt und optional 5-10 min bei 95°C gekocht und auf Eis gekühlt. Die Elektrophorese erfolgte je nach der Länge der verwendeten Gele bei folgenden Stromstärken:

Gele mit 7 cm Trennstrecke: 38 mA pro Gel

Gele mit 12 cm Trennstrecke: 48 mA pro Gel

Exemplarisch ist das Pipettierschema für ein 12 ml Trenngel mit 10% PAA und für ein 5 ml Sammelgel aufgeführt.

	Trenngel (10% PAA) [μl]	Sammelgel (5% PAA)[μl]
H ₂ O	2740	3255
Trenngel-Puffer, pH 8,8	4600	0
Sammelgel-Puffer, pH 6,8	0	630
AA/BA 30% (v/v)	4000	840
SDS 2% (w/v)	600	250
APS 40%(w/v)	36	15
TEMED	24	10

2.4.5 Coomassiefärbung der SDS-Gele

Nach der Elektrophorese wurden die Gele 15-30 min in einer *Coomassie Brilliant Blue* G250-Lösung unter leichtem Schütteln inkubiert und solange mit Entfärbelösung gewaschen, bis der Hintergrund verschwunden war.

2.4.6 Westernblot

Für den Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf PVDF-Membranen (Millipore) wurden Westernblots (*Elektroblotting*) nach dem *Semi-Dry-Verfahren* durchgeführt. Dazu wurde eine auf das Gel zugeschnittene PVDF-Membran zunächst mit Methanol kurz benetzt, in H₂O inkubiert und dann in Blotpuffer (1x *Semi-Dry*-Blotpuffer mit 20% (v/v) Methanol) äquilibriert. Der Blot-Sandwich wurde folgendermaßen aufgebaut: Nach dem Anfeuchten der unteren Elektrodenplatte (Anode) wurden zwei Lagen in Blotpuffer getränkte Filterpapiere (1,2 mm Dicke, Schleicher und Schuell) aufgelegt. Darauf wurde das Gel und die PVDF-Membran sowie wieder zwei Lagen in Blotpuffer getränkte Filterpapiere luftblasenfrei aufgelegt. Auf diesen Stapel wurde nun die Kathodenplatte vorsichtig aufgesetzt.

Die Elektrophorese erfolgte für 1-2 h bei $0,75 \text{ mA/cm}^2$, wobei der Transfer der Proteine im Anschluss durch Färbung der Membran mit *Coomassie Brilliant Blue* G250-Lösung überprüft

wurde. Nach Dokumentation der gefärbten Proteinbanden wurde die Membran mit 100% Methanol vollständig entfärbt und in TBST gewaschen.

2.4.7 Immunodetektion von Proteinen im Westernblot

Für die Immunodetektion wurde die Membran in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST-Puffer 1 h unter Schütteln inkubiert (oder über Nacht bei 4°C), um unspezifische Bindungstellen zu blocken. Die Membran wurde mit einer Verdünnung des Primärantikörpers in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST-Puffer für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht unter Schwenken bei 4°C inkubiert. Dann wurde die Membran dreimal 10 min in TBST-Puffer gewaschen und mit einer Verdünnung des zweiten HRP-Antikörpers (HRP: *Horseradish*-Peroxidase) in 5% Magermilch für 1-2 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert und erneut dreimal 10 min mit TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz, die durch die Enzym-Substrat-Reaktion der HRP mit dem ECL-Reagenz (Amersham Pharmacia Biotech) entsteht, gemäß den Angaben des Herstellers.

2.4.8 Entfernen von Antikörpern von Westernblots (*stripping*)

Zur Durchführung von mehreren Immunodetektionen mit derselben Membran wurde ggf. der nach einer Immunodetektion gebundene Antikörper von der PVDF-Membran durch eine *stripping*-Prozedur entfernt. Hierzu wurde die Membran fünfmal 5 min mit TBST gewaschen und dann 30 min bei 50°C in *stripping*-Puffer inkubiert und danach sechsmal 5 min mit TBST. Danach konnte die Membran erneut für Immunodetektionen verwendet werden.

stripping-Puffer:

7,6 g/l Tris/HCl, pH 6,8
2% (w/v) SDS
0,7% (v/v) β -Mercaptoethanol

2.4.9 Densitometrie

Zur Quantifizierung von Bandenintensitäten in Gelen und auf Filmen (Autoradiographien, Immunodetektion) wurden die Gele und Filme eingescannt (Umax Astra 1220S) und mit den Programmen *BioDocAnalyzer* (Biometra) oder mit *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij>; Stand März 2004) ausgewertet.

2.4.10 Ionenaustauschchromatographie von Zellextrakten

verwendete Puffer:

Laufpuffer A:

20 mM	Tris/HCl, pH 8,5
20 mM	β -Glycerophosphat
20 mM	NaF
0,1 mM	Na_3VO_4
0,5 mM	EDTA
0,5 mM	EGTA
0,05% (w/v)	NP-40
2 mM	DTT

Laufpuffer B:

gleiche Zusammensetzung wie Laufpuffer A, + 2 M NaCl

Resource-Q-Lysepuffer:

20 mM	Tris/HCl, pH 8,5
20 mM	β -Glycerophosphat
20 mM	NaF
0,1 mM	Na_3VO_4
0,5 mM	EDTA
0,5 mM	EGTA
0,1% (w/v)	NP-40
2 mM	DTT
10 μM	E64
2,5 $\mu\text{g/ml}$	Leupeptin
1 mM	PMSF
1 μM	Pepstatin
400 nM	Okadainsäure

Die Ionenaustauschchromatographie wurde mit dem Chromatographie-System *Äktaprime* (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Als Anionenaustauschersäule wurde eine Resource-Q-Säule (quaternäre Triaminoethyl-Anionenaustauschermatrix, Amersham Pharmacia Biotech) mit einem Säulenvolumen von 1 ml verwendet. Die Aufzeichnung der Absorption bei 280 nm und der Leitfähigkeit erfolgte mit dem Schreiber REC 112 (Amersham Pharmacia Biotech). Ganzzellextrakte für die Ionenaustauschchromatographie wurden folgendermaßen präpariert (alle Arbeitsschritte erfolgen bei 4°C) :

Der Zellinhalt von drei bis vier konfluent-bewachsenen T175-Zellkulturflaschen wurde nach Stimulation und Entfernung des Mediums zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, abgeschabt und in 10 ml PBS resuspendiert. Nach Zentrifugation (5 min, 500 g) wurde der Überstand abdekantiert und das Zellpellet in je 400 μl Resource-Q-Lysepuffer resuspendiert. Die Lyse des Zellpellets erfolgte durch Scheren mit Injektionskanülen (dreimal mit Kanülengröße 20 gauge, dann dreimal mit 25 gauge). Danach wurde das Lysat 20 min bei 15000 g zentrifugiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Vor dem Probenauftrag wurde das Lysat auf Eis

aufgetaut, in Laufpuffer A aufgenommen (finales Volumen 2,5 ml) und sterilfiltriert (Filterdurchmesser 0,2 µM, Schleicher&Schuell). Die Laufpuffer A und B wurden vor Verwendung mit Membranfilter (Filterdurchmesser 0,2 µM, Schleicher&Schuell) sterilfiltriert und 10 min im Ultraschallbad entgast. Pro Chromatographielauf wurden ungefähr 2,5 bis 6 mg Gesamtprotein aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Kochsalzgradienten von 0 auf 0,75 M bei einem Elutionsvolumen von 16 ml und mit einer Flussrate von 1 ml/min (Fraktionsgröße 1 ml). Die erhaltenen Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.11 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Für die bakterielle Expression von GST-Fusionsproteinen wurde der Protease-defiziente *E.Coli*-Stamm BL21(DE3)pLysSb benutzt. Als Expressionsplasmide wurden Vektoren aus der pGEX-Reihe (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Die klonierten Proteine wurden daher als Fusionsproteine mit einem GST-Teil (Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonicum*) exprimiert, wodurch die Affinitätsaufreinigung mit Glutathion-Sepharose möglich war. Die pGEX-Vektoren enthalten hierbei einen *lac*-Promotor, so dass die Induktion der Expression durch Zugabe des Laktose-Derivates IPTG erfolgte.

Am Tag vor der Fermentation wurde eine Über-Nacht-Kultur mit dem entsprechenden Bakterienstamm angesetzt (100 ml LB-Medium, 0,1 mg Ampicilin/ml) und über Nacht bei 37°C in einem sterilen Erlenmeierkolben mit Schickanen bei einer Umdrehungszahl von 160 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 2-2,5 l LB-Medium (0,1 mg Ampicilin/ml) mit der Vorkultur angeimpft, so dass die finale Extinktion bei 600 nm bei 0,05 OD lag. Die Bakterienkultur wurde dann bei 37°C unter Schütteln (160 rpm) solange inkubiert, bis die Extinktion bei 600 nm zwischen 0,6-0,9 OD lag. Darauf folgte die Induktion durch Zugabe von IPTG (finale Konzentration 0,5 mM). Die Fermentation wurde dann über einen Zeitraum von drei bis vier Stunden fortgesetzt. Danach wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert (15 min, 4°C, 5000 g), in 50 ml kaltem PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert (10 min, 4°C, 5000 g). Der Überstand wurde dann abdekantiert und das erhaltene Bakterienpelett wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

Für die Aufarbeitung wurde das Bakterienpelett kurz bei 37°C aufgewärmt und in 10 ml Lysepuffer (PBS, 1-2 mM DTT, 1 mM PMSF) resuspendiert und dann unter Kühlung durch ein Eiswasserbad sonifiziert (Branson sonifyer 250, Stufe 5, je 10x 30 s, dazwischen eine Pause von 15 s). Der Suspension wurde dann NP-40 (finale Konzentration: 0,1% (w/v))

zugesetzt und danach erfolgte eine Zentrifugation (10000 g, 20 min, 4°C) zur Abtrennung der unlöslichen Bestandteile. Dem erhaltenen Überstand wurde dann in Lysepuffer äquilibrierte GSH-Sepharose 4 B (1 ml GSH-Sepharose wurde viermal mit 1 ml Lysepuffer gewaschen) zugesetzt und unter kontinuierlicher Rotation bei 4°C für 30 min inkubiert. Im Anschluß wurde die GSH-Sepharose 4B abzentrifugiert (1 min, 300 g, 4°C) und in einem 2 ml Reaktionsgefäß viermal mit 1 ml Lysepuffer gewaschen: Dazu wurde die GSH-Sepharose 4 B mit dem Lysepuffer resuspendiert und abzentrifugiert (4°C, 1 min, 13000 rpm, Heraeus Biofuge Fresco). Das an der GSH-Sepharose 4 B gebundene Protein wurde dann in vier Schritten mit je 1 ml Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 20 mM Glutathion) eluiert. Hierzu wurde die GSH-Sepharose 4 B-Suspension bei Raumtemperatur 10 min unter Schütteln mit dem Elutionspuffer inkubiert. Die Abtrennung des Eluates erfolgte durch jeweils einen Zentrifugationsschritt (1 min, 13000 rpm, Heraeus Biofuge Pico). Die erhaltenen Fraktionen wurde dann in der SDS-PAGE analysiert.

Zur Entfernung des Glutathions wurden dann die vereinigten Eluate gegen 1 l 20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl, 2 mM DTT dialysiert. Der verwendete Dialyseschlauch Spectrapor MWCO 6000-8000 war zuvor 10 min in 1 l 10 mM EDTA, 100 mM NaHCO₃ ausgekocht worden. Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung auf das gewünschte Volumen durch eine Ultrafiltration (Vivaspin 2 ml Concentrator RC, 10000 MWCO, Vivascience; 4900 g, 4°C) aufkonzentriert, mit Glycerol versetzt (finale Konzentration 50% (v/v)) und bei -20°C gelagert.

2.4.12 *in-vitro*-Translation von Proteinen in Retikulozytenlysaten

Für die Expression kleiner Mengen (150-300 ng) von Proteinen, die nicht in ganzer Größe in *E.coli* exprimiert werden konnten, und zur radioaktiven Markierung von Proteinen mit ³⁵S-L-Methionin (oder -Cystein) wurde der *in-vitro*-Translations-Kit *TNT Rabbit Reticulocyte* (Promega) verwendet. In diesen Retikulozyten-Lysaten erfolgt mit einer T7-RNA-Polymerase *in-vitro* die Transkription und Translation von Genen, die unter Kontrolle eines T7-Promotors stehen. Die genaue Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Retikulozyten-Lysate können maximal zweimal aufgetaut werden und wurden daher vor der zweiten Verwendung aliquotiert, und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die *in-vitro*-translatierten Proteine wurden ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Ein typischer *in-vitro*-Translationsansatz für die ³⁵S-Markierung eines Proteins hatte folgende Zusammensetzung:

25 µl Retikulozytenlysat
5 µl TNT-10x-Reaktionspuffer
1 µl TNT-T7-RNA-Polymerase
1 µl TNT-Aminosäure-Gemisch ohne Methionin
40 µCi ³⁵S-L-Methionin (1000 Ci/mmol)
1 µl RNasin (RNase-Inhibitor, 40 U/µl)
1 µg DNA
ad 50 µl mit nukleasefreiem Wasser

Der Ansatz wurde dann bei 30°C 90 min inkubiert. Danach erfolgte die Produktanalyse in der SDS-PAGE. Nichtradioaktive Proteine wurden dann im Westernblot nachgewiesen, die Detektion ³⁵S-markierter Proteine nach SDS-PAGE erfolgte durch Autoradiographie mit einem Biomax-MR-Film. Hierzu wurde das Gel 30 min mit Entfärbelösung fixiert und 30 min mit *Amplifyer*-Lösung (Amersham Pharmacia Biotech) inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Gel getrocknet und autoradiographiert.

2.4.13 GST-Bindungsassay mit ³⁵S-markierten Proteinen

Bindungsuntersuchungen mit an GSH-Sepharose immobilisierten GST-Fusionsproteinen wurden im sogenannten GST-Bindungsassay durchgeführt. Hierzu wurden 2-5 µg GST-Fusionsprotein (Mengenangabe bezieht sich nur auf die Spezies des GST-Fusionsproteins und nicht auf die Gesamtproteinmenge der Präparation) zunächst an 30 µl GSH-Sepharose, die zuvor zweimal mit dem zweifachen Bettvolumen in PBS (+ 2 mM DTT, 1 mM PMSF) äquilibriert worden waren, in einem Ansatz mit folgender Zusammensetzung immobilisiert:

40 µl GSH-Sepharose 4B (entsprechen 30 µl GSH-Sepharose 4B)
2-5 µg GST-Fusionsprotein (in 50% (v/v) Glycerol) oder GST zur Kontrolle
ad 320 µl mit PBS (+ 2 mM DTT, 1 mM PMSF)

Der Ansatz wurde dann 30 min bei 30°C im Thermomixer (700 rpm) inkubiert. Danach wurde der Überstand nach Zentrifugation (13000 rpm, 1 min, Heraeus Biofuge Pico) vorsichtig abgenommen. und zu der GSH-Sepharose 70 µl Bindungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 0,3 M NaCl, 1% (w/v) BSA, 0,1% (w/v) NP-40, 2 mM DTT, 1 mM PMSF) sowie 3,5 µl eines *in-vitro*-Translationansatzes mit dem zu untersuchenden Bindungspartner zugesetzt. Dieser Bindungsansatz wurde 60 min bei 30°C im Thermomixer (700 rpm) inkubiert. Die GSH-Sepharose wurde nach der Bindungsreaktion zweimal mit 300 µl mit Waschpuffer (Bindungspuffer ohne BSA) gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden durch Abkochen

in 25 µl 2x-Laemmli-Auftragspuffer eluiert und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde in Entfärbelösung 30 min fixiert, mit *Amplifyer*-Lösung (Amersham Pharmacia Biotech) behandelt, getrocknet und bei -80°C autoradiographiert.

2.4.14 EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*)

Für die Untersuchung der DNA-Bindung wurden EMSA-Untersuchungen durchgeführt. Bei dieser Methode werden Komplexe aus radioaktiv-markierter DNA und Proteinen durch eine native PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert.

2.4.14.1 Markierung der Oligonukleotide

Je 10 µl einzelsträngige *antisense*- oder *sense*-Oligonukleotide (1 µM) (Sequenz s. Material) wurde mit 3 µl 10-fach Polynukleotid-Kinasepuffer, 30 µCi γ -[^{32}P]-ATP und 10 U T4-Polynukleotidkinase und H₂O in einem finalen Volumen von 30 µl zusammenpipettiert. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Beide Ansätze wurden vereinigt, für 5 min auf 95°C erhitzt und zur Bildung des Doppelstranges langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde das überschüssige ATP durch eine Gelfiltration mit einer S-200 HR-Gelfiltrationssäule nach Herstellerangaben abgetrennt.

Je 1 µl der Lösung vor und nach Zentrifugation wurden abgenommen, um die Effizienz der Markierung im Szintillationszähler zu bestimmen. Die Oligonukleotide wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.4.14.2 DNA-Protein-Bindungsreaktion

Die nukleären Extrakte (5-20 µg), 1 µl polyIdC (1µg/µl) (Kompetitor-DNA gegen unspezifische DNA-Protein-Komplexe), 1 µl 10xHamburg-Puffer, das markierte Oligodesoxynukleotid (70000-100000 cpm) sowie je nach Versuchsansatz kompetitive, unmarkierte DNA wurden zusammengegeben und mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Ansätze werden für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für *supershift*-Reaktionen wurden spezifische Antikörper (2 µg) nach diesen 30 min dem Ansatz zugefügt und der Ansatz wurde für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 1,1 µl 10xDNA-Auftragspuffer zugesetzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 5% PAA-Gel (53 ml H₂O, 11 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%), 1,65 ml TBE, 300 µl 40% (w/v) APS, 75 µl TEMED) mit 0,25xTBE als Laufpuffer.

Nach einstündigen Vorlauf bei 220 V wurde das Gel beladen und für 3 h bei 220 V laufen gelassen. Das Gel wurde auf Filterpapier (Firma Whatman, 3MM) getrocknet. Der 10x Hamburg-Puffer wurde nach folgendem Pipettierschema hergestellt.

Substanz	Menge	im 10x-Puffer
Tris/HCl, pH 7.5 (1 M)	100 μ l	10 mM
EDTA (0.5 M)	200 μ l	10 mM
Magermilchpulver	50 mg	0.5% (w/v)
NaCl (5 M)	1 ml	500 mM
DTT	15.43 mg	10 mM
Glycerin	5 ml	50% (v/v)

Die Lösung wurde 20 min bei 95°C abgekocht und 30 min bei 10000 g abzentrifugiert. Als Hamburg-Puffer wurde dann der Überstand verwendet.

2.4.15 Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP-Assay)

Die Chromatin-Immunpräzipitationen wurden freundlicherweise von Dr. Elke Hoffmann, Institut für Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

Die zu analysierenden DNA-Protein-Komplexe wurden fixiert, indem die Zellen einer T175-Flasche nach Entfernen des Mediums mit 10 ml warmer Fixierlösung (1% (v/v) Formaldehyd in PBS) für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Danach wurde zum Abstoppen der Reaktion 0,125 M Glycin (in PBS, 10 ml, warm) hinzugefügt und das Gemisch Glycin-PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen in kaltem, sterilen PBS abgeschabt und resuspendiert und anschließend bei 1200 rpm und 4°C für 5 min sedimentiert (Sigma 4K15). Danach wurde das Pelett ein zweites Mal mit 20 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden dann im RIPA-Puffer resuspendiert (3 ml pro Pelett aus einer T175-Flasche) und unter Eiskühlung sonifiziert (4x 1 min, dazwischen 1 min Pause; Parameter des Branson Sonifyer 250: *Duty cycle*: 50 %; *Output control*: 1). Das Lysat wurde dann 20 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert (Heraeus Biofuge Fresco). Für die Immunpräzipitation wurden dann 5 μ l Antiserum gegen an Ser536-phosphoryliertes p65 zu 500 μ l des

Überstandes pipettiert und über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Präzipitation erfolgte mit einem Gemisch aus je 20 µl Protein A- und Protein G-Sepharose, das in RIPA-Puffer äquilibriert worden war. Hierzu wurde der Ansatz mit der Protein A- und -G-Sepharose 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Protein A- und Protein G-Sepharose zweimal mit 1400 µl RIPA-Puffer und dann einmal mit dem gleichen Volumina Hochsalzpuffer (2 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1% (w/v) NP-40, 0,5% (w/v) Desoxycholat, 1 mM EDTA) sowie RIPA-Puffer gewaschen. Danach folgte ein Waschschrift mit TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1mM EDTA) bei Raumtemperatur. Die Elution der gebundenen Antigen-DNA-Komplexe erfolgte in 55 µl TE-Puffer mit 1% (w/v) SDS im Thermomixer (30°C, 15 min, 1200 rpm). Der Überstand wurde mit TE-Puffer auf 200 µl aufgefüllt und dem Ansatz wurde 1 µl RNaseA (10 µg/µl) zugesetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurden dem Ansatz 5 µl Proteinase K (20 µg/µl) zugefügt und einmal 6 h bei 37°C (Proteinverdau) und dann bei 6 h bei 65°C (Umkehr der Fixierung) inkubiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte durch eine Qiaquick Säule (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Mit der so erhaltenen DNA wurde der Bereich um den IL-8-Promotor in einer PCR mit dem unten aufgeführten Material und PCR-Parametern detektiert:

3,0 µl DNA-Lösung

3 µl dNTP-Gemisch (final 0,2 mM)

3 µl 10x *Hotstart* PCR Puffer (Qiagen)

3 µl Primergemisch (final 1 µM)

2,5U *Hotstart* taq Polymerase (Qiagen)

ad 30 µl H₂O

PCR Protokoll:

Vordenaturierung: 15 min, 95°C (Aktivierung des Enzyms)

Denaturierung: 20 s, 94°C

Annealing: 20 s, 55°C (36 Zyklen)

Elongation: 20 s, 72°C

Finale Elongation: 7 min, 72°C

RIPA-Puffer:

10 mM Tris, pH 7,5

150 mM NaCl

1 % (w/v) NP-40

1 % (w/v) Desoxycholat

0,1 % (w/v) SDS

1 mM EDTA
1% (v/v) Aprotinin

2.4.16 Kinaseassays

2.4.16.1 Kinaseassay mit aufgereinigten Kinasen

Der Ansatz für Kinaseassays mit Fraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie oder aufgereinigten Kinasen (z.B. nach Immunpräzipitationen) wurde nach folgendem Pipettierschema in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammengestellt :

10 µl Fraktion/Kinase-Lösung

10 µl Substrat-Lösung (z.B. 2-5 µg GST-p65₃₅₄₋₅₅₁, verdünnt in GZE-Lysepuffer)

10 µl ATP-Reaktionslösung (150 mmol/l Tris, pH 7,4, 30 mmol/l MgCl₂, 60 µM ATP, 2 µCi γ -³²P-ATP)

Optional wurde zur Kontrolle des Hintergrundes ein Kinaseassay ohne Substrat durchgeführt. Der finale Glycerolanteil, der u.a. durch die Substratproteine in den Ansatz gelangte, war nach Möglichkeit nicht höher als 15% (v/v), da sich dieses unter Umständen inhibitorisch auf die Kinaseaktivität auswirkte.

Der Ansatz wurde kurz durch Umrühren mit der Pipettenspitze gemischt und für 30 min bei 30°C inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 10 µl 4x-Laemmli-Auftragspuffer abgestoppt. Danach wurden die Reaktionsansätze mit einer SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt, getrocknet und autoradiographiert.

2.4.16.2 Festphasen-Kinasenassay mit GST-Fusionsproteinen

Für die selektive Analyse der Phosphorylierung eines GST-Fusionsproteins in Zellextrakten wurde, während des Kinaseassays eine Affinitätsaufreinigung mit GSH-Sepharose-4B (Festphase) durchgeführt. Dies ermöglichte die Abtrennung des Substrates von den Proteinen des Zellextraktes und verminderte den Phosphorylierungshintergrund. Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz zusammenpipetiert:

10 µl Ganzzellextrakt (50 µg Gesamtprotein)

10 µl GST-Fusionsprotein (Substrat, 2-10 µg, verdünnt in GZE-Lysepuffer)

10 µl ATP-Reaktionslösung (150 mmol/l Tris, pH 7,4, 30 mmol/l MgCl₂, 60 µM ATP, 3 µCi γ -³²P-ATP)

Der Ansatz wurde gemischt und für 15 min bei 30°C inkubiert. Danach wurde dieser Ansatz in eine Reaktionsgefäß, in dem 30 µl äquilibrierte GSH-Sepharose 4B (zweimal mit

zweifachen Bettvolumen gewaschene GSH-Sepharose 4B) mit 20 µl GZE-Lysepuffer vorgelegt worden waren, überführt und für 30 min weiter inkubiert. Im Anschluss wurde die GSH-Sepharose zweimal mit 200 µl GZE-Lysepuffer gewaschen (Zentrifugationsschritte: je 1 min, 10000 g) und mit 40 µl 2xLaemmli-Auftragspuffer abgekocht. Die so eluierten Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, getrocknet und autoradiographiert.

2.4.16.3 Kinaseassay mit Peptid-Arrays

Für die Phosphorylierungskartierung von p65 wurden *Peptid-Arrays* verwendet, die freundlicherweise in der Arbeitsgruppe Molekulare Erkennung von Dr. Ronald Frank an der GBF, Braunschweig, hergestellt wurden. Bei der Matrix dieser *Arrays* handelt es sich um eine Cellulose-Membran auf der 15mere Peptide N-terminal kovalent immobilisiert wurden (Übersicht und genaue Informationen über die Synthese: Frank *et al.*, 2002). Die Peptide wurden in Reihen und Spalten auf die Membran in kreisförmige Bezirke bzw. *Spots* (Durchmesser: 3 mm) in Abständen von 4 mm an die Membran gekoppelt. Die Peptidmengen in den *Spots* betragen ungefähr 5 nmol.

Die Langzeitlagerung dieser *Peptid-Arrays* erfolgte, vor Feuchtigkeit und Licht geschützt, bei -20°C. Alle Lösungen, Lösungsmittel und finalen Reaktionsansätze wurden sterilfiltriert. (Filterporengröße : 0,2 µm). Nach dem Auftauen wurden die *Arrays* kurz mit Ethanol benetzt und dann in H₂O eingelegt. Danach wurde der *Peptid-Array* vorsichtig in ein Hybridisierungsröhrchen überführt. Um zu gewährleisten, dass die Membran an der Glaswandung haftet, wurde die Membran mit einem Stück Klarsichthülle fest angedrückt.

Der Kinaseansatz wurde wie folgt hergestellt:

- 2 ml Extrakt/Fraktion
- 2 ml Zellyse-Puffer (GZE-Puffer)
- 2 ml ATP-Reaktionspuffer (150 mM Tris, pH 7,4, 30 mM MgCl₂, 30 µM ATP, 200 µCi γ-³²P-ATP)

Der Reaktionsansatz wurde nach Sterilfiltration zu dem *Peptid-Array* gegeben und 30 oder 45 min im Hybridisierungsöfen bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte folgende Waschprozedur:

- zwei Waschschrte mit PBS (10 min),
- zwei Waschschrte mit 8 M Harnstoff, 1% (w/v) SDS,

0,5% (v/v) β -Mercaptoethanol (30 min, 40 °C),

zwei Waschritte mit H₂O (10 min)

drei Waschschritte mit Ethanol (5 min)

Danach wurde der *Peptidarray* an der Luft getrocknet, in Klarsichthülle eingelegt und bei Raumtemperatur oder bei 4°C autoradiographiert.

2.4.16.4. Immunpräzipitation mit anschließendem Kinase-Assay

Ganzzellextrakte mit 250 μ g–1 mg Protein wurden in einem finalen Volumen von 500 μ l mit GZE-Lysepuffer oder IP-Puffer versetzt.

IP-Puffer:

20 mmol/l Tris/HCl, pH 7,4
154 mmol/l NaCl
50 mmol/l NaF
1 mmol/l Na₃VO₄
1% (v/v) Triton X-100

1-2 μ g von einem Antikörper gegen die jeweilige Proteinkinase von Interesse wurde dem Ansatz zugefügt, der dann bei 4 °C für mindestens 2 h bei 4°C unter ständigem Rotieren inkubiert wurde. Mit Hilfe der verwendeten Antikörper wurden die Proteine, deren Aktivität untersucht werden sollte, aus dem Ansatz entfernt. Die Antikörper-Antigen-Komplexe wurden anschließend durch Inkubation mit der im eingesetzten Puffer äquilibrierten Protein A- oder Protein G-Sepharose für mindestens 1 h bei 4 °C unter ständigem Rotieren aus dem Ansatz entfernt. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation sedimentiert (10000 g, 3 min, 4°C) und dreimal mit 500 μ l IP-Puffer gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde zu der Sepharose 10 μ l IP- oder GZE-Lysepuffer pipettiert und dann in dem Kinaseassay eingesetzt. Für die Reaktion wurden 10 μ l Immunpräzipitat, 10 μ l Substratprotein (2-5 μ g, verdünnt in IP- oder GZE-Lysepuffer) und 10 μ l ATP-Reaktionspuffer (150 mmol/l Tris, pH 7,4, 30 mmol/l MgCl₂, 20 μ M ATP, 2-4 μ Ci γ -³²P-ATP) für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l 4x-Laemmli-Auftragspuffer und Abkochen bei 95°C für 5 min gestoppt. Danach wurde der Ansatz in der SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, getrocknet und autoradiographiert.

2.5 Methoden der Bioinformatik

2.5.1 Sekundärstrukturvorhersagen

Sekundärstrukturvorhersagen wurden mit dem Internet-Server JPred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred>; Stand März 2004), der ein

Konsensusergebnis aus sechs verschiedenen Sekundärstrukturvorhersage-Methoden bildet (Cuff *et al.*, 1998), durchgeführt.

2.5.2 Vorhersage von Phosphorylierungsstellen

Vorhersagen von Phosphorylierungsstellen mit Hilfe eines Neuralen Netzwerkes (Blom *et al.*, 1999) wurden mit NeTPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>; Stand März 2004) erhalten.

2.5.5 Berechnung eines Hydrophobizitätsprofils

Hydrophobizitätsprofile nach der Methode von Kyte&Doolittle (Kyte & Doolittle , 1982) wurden mit Protscale (<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>; Stand März 2004) erstellt.

2.5.4 Proteinmodellierung

Für die Proteinmodellierung wurde das Modellierungsprogramm DeepView v.3.7 (<http://www.expasy.org/spdbv>, Stand März 2004 ; Guex *et al.*, 1997, 1999) verwendet.

Das Strukturmodell von Dorsal₄₇₋₃₂₇ wurde mit der Methode der Homologie-Modellierung (Komparative Protein-Modellierung) generiert. Als Strukturvorlagen fungierte für die DNA-bindende Domäne von Dorsal die gelöste Struktur von Gambif1 gebunden an DNA (1bvo.PDB; Cramer *et al.*, 1999) und für die Erzeugung des C-terminalen Bereiches wurde die Struktur von humanen c-rel, ebenfalls gebunden an DNA (1gji.PDB; Huang, D.B. *et al.*, 2001) verwendet. Zunächst wurde eine primäre Superposition der Zielsequenz mit den ExpPDB-Dateien von 1bvo.PDB und 1gji.PDB mit der MAGIC FIT-Funktion durchgeführt. Diese Superposition konnte anhand einer iterativen Superposition (ITERATIVE FIT) optimiert werden. Das im Anschluss generierte Struktur-Alignment (GENERATE STRUCTURAL ALIGNMENT) wurde daraufhin bezüglich der *Threading*-Energie nach der Sippl-Methode (Sippl ,1990) eingehender analysiert. Die so erstellte Projekt-Datei wurde dann an den SWISS-MODELL-Server (<http://swissmodel.expasy.org>, Stand März 2004) gesandt. Während der Modellierungsprozedur wurde hierbei eine Energieminimierung mit dem CHARMM-Kraftfeld (Brooks *et al.*, 1983) durchgeführt. Zunächst erfolgte dabei eine Minimierung mit dem Algorithmus *steepest descent* (50 Zyklen), die dann mit dem Algorithmus *conjugate gradient* (500 Zyklen) fortgesetzt wurde.

Um ein Strukturmodell des Homodimers von Dorsal, gebunden an DNA, zu erhalten, wurde zunächst das Strukturmodell von dem Gambif1-Homodimer-DNA-Komplex erzeugt. Durch eine Kristall-Symmetrie-Operation (Funktion BUILD CRYSTRALOGRAPHIC SYMMETRY, Operator: X,-Y,1/2-Z, Raumgruppe P4₃22) wurde eine zweite Monomer-

Orientierung von Gambif gebildet, die dann mit der ursprünglichen Orientierung zu einem Homo-Dimer vereinigt wurde. Je zwei modellierte Dorsal-Monomere wurden darauf über die Gambif1-Monomere superpositioniert (Funktionen MAGIC FIT, ITERATIVE FIT). Aminosäuren, die miteinander kollidierten wurden durch eine Rotameränderung (Funktion FIX SELECTED SIDECHAINS > QUICK AND DIRTY) oder durch eine selektive Energieminimierung (20 Zyklen *steepest descent*, voreingestellte Parameter) mit dem implementierten GROMOS 96-Kraftfeld (van Gunsteren *et al.*, 1996) reorientiert.

Um die Ser281Ala-Mutation von p65 zu generieren, wurde in dem p65-Monomer in der Struktur 1LE5.PDB Ser281 mit der Funktion MUTATE durch Alanin in der besten Rotamerorientierung ausgetauscht. Im Anschluss wurde eine lokale Energieminimierung (GROMOS96-Kraftfeld, 20 Zyklen *steepest descent*, voreingestellte Parameter) durchgeführt, um Störungen der Proteinstruktur infolge der Mutation zu entfernen. Im Anschluss erfolgte dann eine Berechnung aller möglichen Wasserstoffbrückenbindungen mit den in DEEVIEW v.3.7 voreingestellten Detektionsparametern.

Analog wurde bei der Modellierung der Ser317Ala-Mutante von Dorsal₄₇₋₃₂₇ verfahren. Die Berechnung der Lösungsmittelzugänglichkeit einer Aminosäure erfolgte mit dem Programm WHATIF (Vriend,1990; <http://www.cmbi.kun.nl/gv/servers/WIWWWI/>, Stand März 2004).

3. Ergebnisse

3.1 Chromatographische Trennung von p65-Kinasen

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei p65 um ein mehrfach-phosphoryliertes Protein. Um daher selektiv Phosphorylierungen in der TAD von p65 unabhängig von Phosphorylierungen im N-Terminus oder anderen Bereichen zu analysieren, wurde als Substrat ein GST-Fusionsprotein mit dem C-terminalen Bereich von AS 354-551 von p65 verwendet. Abb. 3.1 zeigt ein repräsentatives Ergebnis eines Festphasen-Kinaseassays mit Ganzzellextrakten aus IL-1 α -stimulierten HelatTA-Zellen. Deutlich erkennbar ist, dass die C-terminale Phosphorylierung von p65 durch IL-1 α reguliert wird.

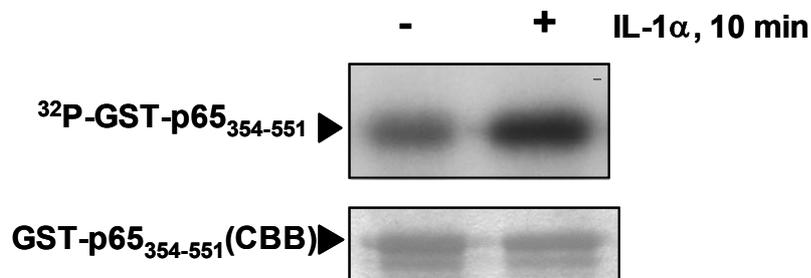


Abb. 3.1 : IL-1 α -abhängige Phosphorylierung im C-terminalen Bereich von p65

Mit Ganzzellextrakten (50 μg Protein) aus HelatTA-Zellen (+ 10 ng/ml IL-1 α , 10 min) wurde ein Festphasen-Kinaseassay mit GST-p65 354-551 als Substrat durchgeführt. Nach Affinitätsaufreinigung wurde das Substrat in der SDS-PAGE getrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt (unteres Feld), entfärbt, getrocknet und anschließend autoradiographiert.

Da bereits zwei Phosphorylierungen in diesem Bereich beschrieben worden waren, nämlich an Ser529 durch Casein-Kinase II (Wang *et al.*, 2000) und an Ser536 durch IKK β (Sakurai *et al.*, 1999, 2003; Kishore *et al.*, 2003) wurden Zellextrakte mittels Anionenaustauschchromatographie fraktioniert, um diese und ggf. andere Kinasen getrennt von einander analysieren zu können. Für die Anionenaustauschchromatographie wurde eine Resource-Q-Säule (Säulenvolumen: 1 ml) mit einem Elutionsgradienten von 0-0,75 M NaCl bei einem totalen Volumen von 16 ml gewählt (s. Abb. 3.2 A). Mit dem eingestellten pH von 8,5 sollte eine maximale Proteinbindung erreicht werden, ohne dabei die Kinaseaktivitäten maßgeblich zu beeinträchtigen. Durch die so gewählten Bedingungen konnten im anschließenden Kinaseassay drei p65-phosphorylierende Kinase-Aktivitätspeaks detektiert werden (s. Abb. 3.2 B) : Die erste Kinase-Aktivität (im Folgenden Kinase 1 genannt) eluiert mit dem messbaren Teil seiner Aktivität bei einer NaCl-Konzentration von 28 mM bis 174 mM (Fraktionen 5 bis 8),

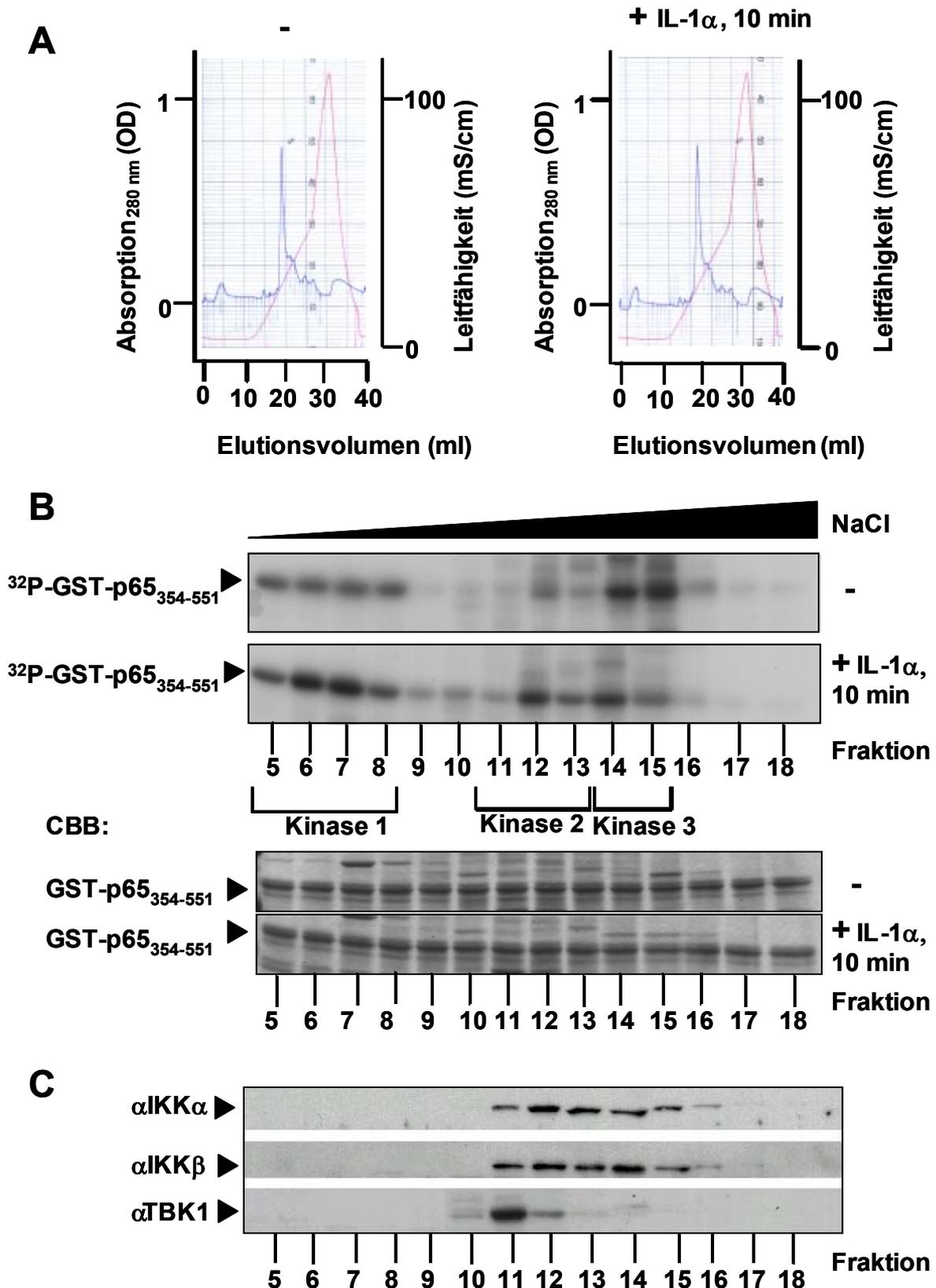


Abb 3.2 : Anionenaustauschchromatographie von HelatTA-Ganzzelextrakten

Ganzzelextrakte (4,75 mg Gesamtprotein) aus unstimulierten und mit IL-1 α -stimulierten HelatTA-Zellen (10 ng/ml IL-1 α , 10 min) wurden auf eine Resource-Q-Säule (1 ml) geladen und anschließend mit einem NaCl-Gradienten von 0-0,75 M bei einem Elutionsvolumen von 16 ml (Fraktionsgröße 1 ml) fraktioniert. **A:** Zugehörige Chromatogramme mit dem Verlauf der Absorption bei 280 nm (blaue Kurve) und dem Verlauf der Leitfähigkeit (rote Kurve). **B:** Mit 10 μ l der Fraktionen wurden darauf Kinaseassays mit GST-p65₃₅₄₋₅₅₁ als Substrat durchgeführt. Nach Auftrennung des Substrates in der SDS-PAGE wurde das Gel (Fortsetzung s. nächste Seite)

coomassie-gefärbt (CBB), entfärbt, getrocknet und autoradiographiert. C: Die Proteine aus 200 µl der Fraktionen eines stimulierten Ganzzellextraktes wurden mit einer Acetonfällung präzipitiert und im Westernblot mit Antikörpern (α -) gegen IKK α ,IKK β und TBK1 analysiert.

der zweite *Peak* (Kinase 2) eluiert mit einem Aktivitätsmaximum zwischen 347 mM und 486 mM NaCl (Fraktionen 11 bis 13) und der dritte *Peak* (Kinase 3) eluiert mit seinem Aktivitätsmaximum zwischen 486 mM bis 625 mM NaCl (Fraktionen 14 bis 15), wobei sich *Peak 2* und *Peak 3* teilweise überlappen. Kinase 1 und Kinase 2 zeigen dabei eine IL-1 α -abhängige Regulation ihrer p65-Kinaseaktivität, während Kinase 3 in der Regel keine signifikante Regulation aufwies. Da der größte Teil der zellulären Proteine allerdings im Bereich um Kinase 3 (s. hierzu auch Absorption_{280nm}) eluiert und es stimulationsabhängig zu einer Veränderung des Phosphorylierungsstatus und damit auch zu einer Veränderung im Elutionsverhalten vieler Proteine, die während des Kinaseassays phosphoryliert werden oder ³²P-markiertes Phosphat bzw. ATP binden, kommt, ist der direkte Vergleich zwischen den Fraktionen im Bereich zwischen Fraktion 14 und 15 erschwert. Hinzu kommt, dass auf Höhe der Substratbande in der SDS-PAGE viele Phosphoproteine laufen, deren Signale sich mit dem Signal der substratspezifischen Phosphorylierung überlagern (s. Abb. 3.3, Hintergrundkontrolle von Kinase 3).

IL-1 α -regulierte Aktivität von Kinase 1 konnte in einem Zeitraum von 10 bis 30 min beobachtet werden, eine regulierte Aktivität von Kinase 2 bei 30 min Stimulationsdauer konnte dagegen nicht mehr detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Bei dieser Stimulationsdauer konnte für die Kinase 3 niemals eine Regulation festgestellt werden.

Es wurde darauf versucht, die so getrennten Kinaseaktivitäten anhand ihrer Substratspezifität den bereits beschriebenen p65-Kinasen IKK β und Casein-Kinase II zuzuordnen. Hierzu wurden als Substrate Mutanten des GST-p65₃₅₄₋₅₅₁-Proteins, bei denen die von diesen Proteinkinasen phosphorylierten Serine durch Alanine ausgetauscht worden waren, eingesetzt (Abb. 3.3). Kinase 1 (*Pool* aus Fraktion 6 und Fraktion 7, stimuliert) phosphoryliert demnach an Ser536, da es zum Ausfall der beim Wildtyp gemessenen Phosphorylierung bei den Mutanten S536A und der Doppelmutante S529A/S536A kommt. Kinase 2 (Fraktion 12, stimuliert) zeigt die gleiche Substratspezifität wie Kinase 1. Auch hier werden nur diejenigen Mutanten phosphoryliert, die Ser536 enthalten, also den Wildtyp und die S529A-Mutante. Interessanterweise phosphorylieren die beiden Ser536-Proteinkinasen Kinase 1 und Kinase 2 die S529A-Mutante weniger effektiv als den Wildtyp trotz vergleichbarer Substratmengen (s. CBB-Bande). Kinase 3 (*Pool* aus Fraktion 14 und Fraktion 15, stimuliert) phosphoryliert offensichtlich an Ser529, da die Intensität der Phosphobanden bei der S529A- und der

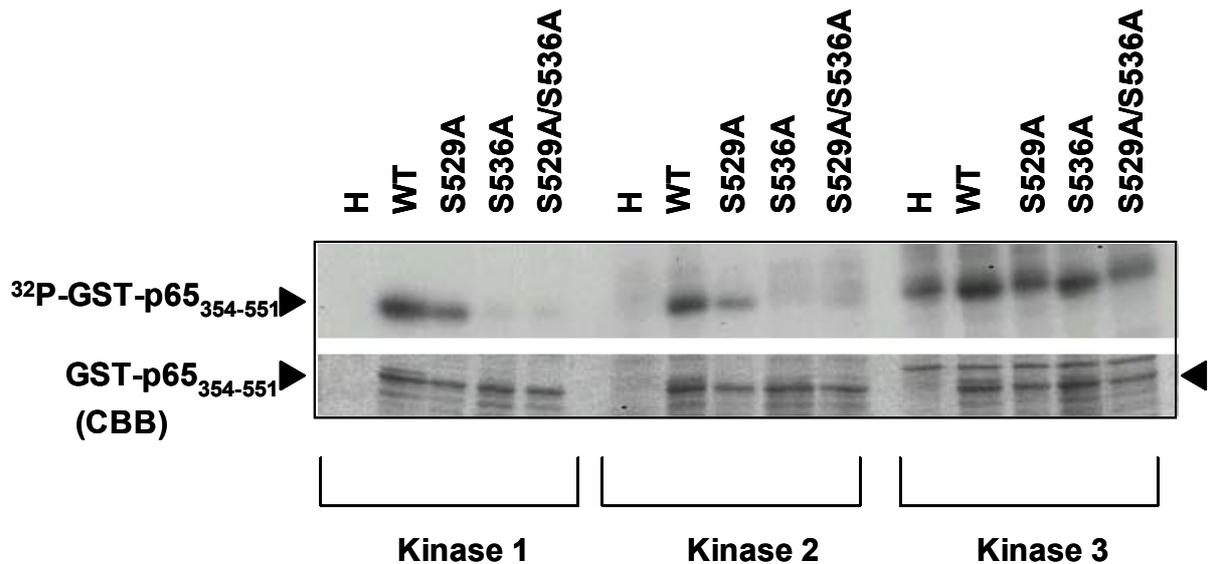


Abb. 3.3: Bestimmung der Phosphorylierungsstellen der mit der Resource-Q-Säule getrennten Kinase-Aktivitäten mit mutiertem p65-Substrat

Oben: Zur Bestimmung der Phosphorylierungsstellen in p65 der drei Kinase-Peaks aus den Resource-Q-Läufen wurden mit Pools der Peaks Kinase-Assays durchgeführt. Als Substrat wurden der Wildtyp (WT) sowie die Mutanten S529A, S536A und S529A/S536A von GST-p65₃₅₄₋₅₅₁ verwendet. Zusätzlich wurde der Hintergrund (H) (= Fraktionspool ohne Substrat) geprüft. Unten: CBB-gefärbte Substratbande.

Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp abnimmt und den Intensitätswert des unspezifischen Hintergrundes (H), also der Negativkontrolle (Ansatz ohne Substrat), erreicht. Nach diesen Daten phosphorylieren Kinase 1 und Kinase 2 p65 an Ser536, Kinase 3 p65 an Ser529, wobei nur Kinase 1 und Kinase 2 eine nennenswerte IL-1 α -abhängige Regulation ihrer Aktivität zeigen. Aufgrund der Substratspezifität ist eine Identität zwischen Kinase 3 und Casein-Kinase II sehr wahrscheinlich. Bei Kinase 1 und Kinase 2 könnte es sich wegen der Phosphorylierungsstelle Ser536 um IKK β handeln. Zudem wurde kürzlich berichtet, dass die Kinase TBK-1/NAK *in-vitro* ebenfalls p65 an Ser536 phosphorylieren kann (Fujita *et al.*, 2003, Kishore *et al.*, 2003). Um diesen Sachverhalt zu klären, wurde mit den Fraktionen aus stimulierten Extrakten Westernblots durchgeführt (Abb. 3.2 C). Danach eluiert IKK β , wie die andere katalytische Untereinheit des I κ B-Kinase-Komplexes, IKK α , mit einem Peakmaximum in Fraktion 12 im Bereich von Kinase 2. Dies korreliert mit dem Aktivitätsmaximum von Kinase 2 in Fraktion 12 (Abb. 3.2 B). Eine Identität zwischen IKK β und Kinase 2 scheint daher sehr gut möglich. Eine Identifizierung von Kinase 1 gelingt dagegen nicht. Weder koeluiert Kinase 1 mit IKK β und IKK α , noch mit TBK-1, deren Peakmaximum in Fraktion 11 liegt, da in den Fraktionen 5-8 keine dieser drei Proteinkinasen nachzuweisen ist.

3.2 Charakterisierung der IKK β -unabhängigen Ser536-Phosphorylierung von p65

Wie die Ergebnisse aus der Ionenaustauschchromatographie zeigen, gibt es neben IKK β mit Kinase 1 mindestens noch eine weitere IL-1 α -regulierte Proteinkinase, die Ser536 phosphoryliert. Zusätzlich wurde TBK-1 als eine weitere Kinase identifiziert, die Ser536 phosphorylieren kann (Fujita *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Daten ist die physiologische Relevanz der Ser536-Phosphorylierung durch IKK β noch unklar. Im Folgenden wurde daher versucht, den Anteil von IKK β an der Ser536-Phosphorylierung von p65 *in-vivo* weiter zu charakterisieren. Hierfür wurden verschiedene Strategien zur spezifischen Hemmung von IKK β angewandt, insbesondere die Koexpression dominant-negativer Mutanten, Verwendung spezifischer siRNA (*small interfering RNA*) zur Suppression der IKK α - und IKK β -Expression (*knock-down*) und der Einsatz eines spezifischen niedermolekularen Hemmstoffs gegen IKK β .

3.2.1 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Signalwege auf die Ser536-Phosphorylierung

Zunächst wurde überprüft, ob bestimmte MAP-Kinase-Signalwege an der Ser536-Phosphorylierung von p65 beteiligt sind. Zu diesem Zweck standen einige bereits gut charakterisierte Inhibitoren zur Verfügung: PD 98059 hemmt die MAPKK MEK1, 2 sowie 5 und somit die ERK1/2/5-Signalwege. SP600125 inhibiert den JNK-Signalweg und die Substanz SB203580 hemmt den p38-Signalweg. Zusätzlich wurde der PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase)-Inhibitor Wortmannin eingesetzt, da dieser Signalweg an der NF- κ B-Aktivierung beteiligt ist (Beraud *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 2000; Sizemore *et al.* 1999). Eine wichtige regulatorische Funktion bei vielen Signalwegen wird dem Ubiquitin-Proteasom-System zugeschrieben. Bei der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges spielt es wegen der Degradation von I κ B und wegen des proteolytischen Prozessierens von p105, dem Vorläufer von p50, sogar eine zentrale Rolle: Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob der Proteasom-Inhibitor MG132 einen messbaren Einfluss auf die Ser536-Phosphorylierung hat. Für diesen Versuch wurden HeLaTA-Zellen mit PMA/Ionomycin, IL-1 α und TNF α 10 und 30 min stimuliert. In den nicht behandelten Zellen induzieren alle drei Stimuli die Ser536-Phosphorylierung, wobei das Maximum der Intensität der Phosphobande im Westernblot bei allen drei Stimuli bereits nach 10 min Stimulation erreicht wird und 30 min nach Stimulation wieder abnimmt. Ein signifikanter Hemmeffekt auf die Ser536-Phosphorylierung konnte durch die Inhibitoren PD98059, SP600125 und SB203580 nicht erzielt werden (Abb. 3.4).

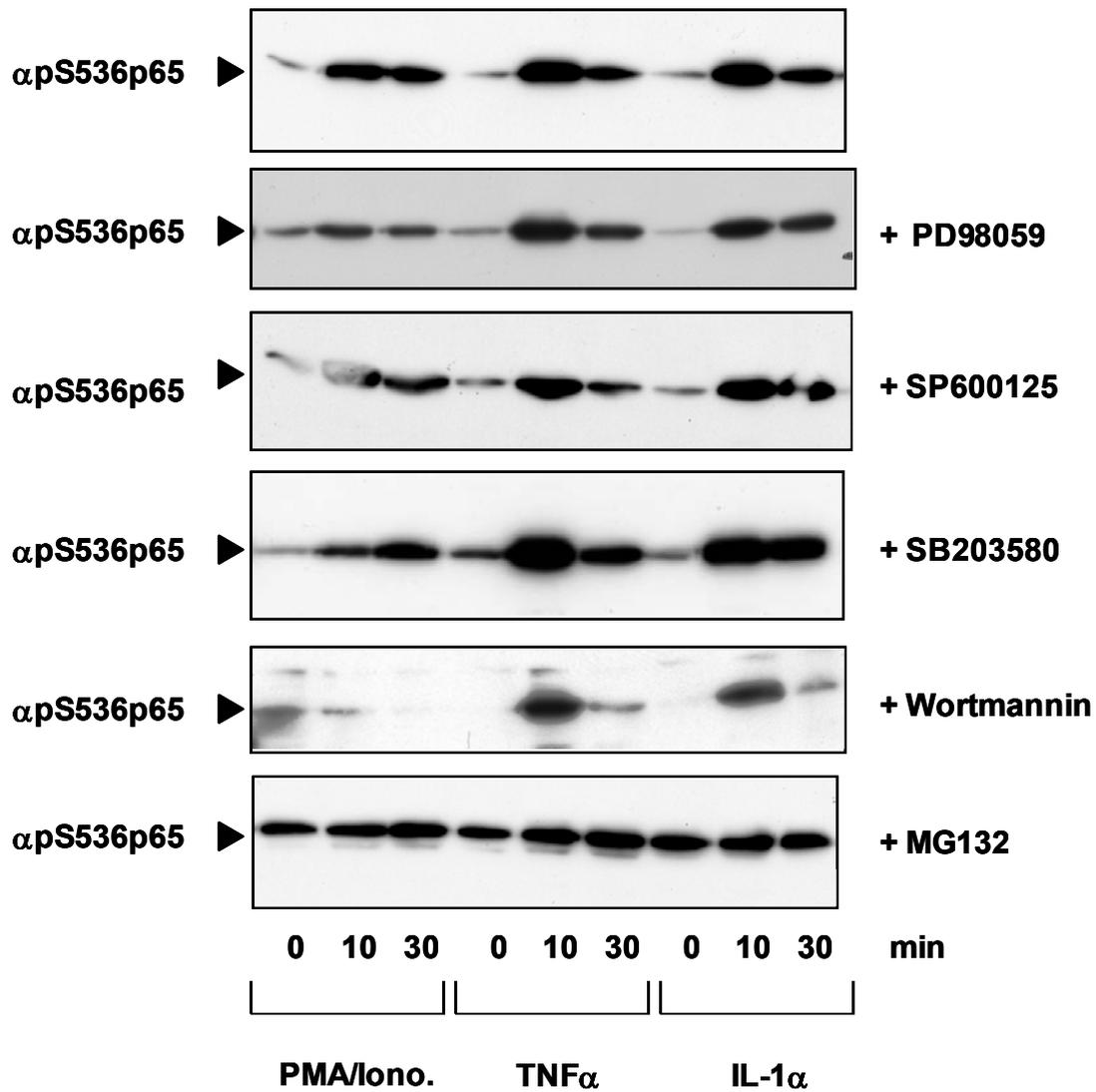


Abb. 3.4 : Kinetik der Ser536-Phosphorylierung in Abhängigkeit verschiedener Stimuli und unter dem Einfluss verschiedener Inhibitoren

HelatTA-Zellen wurden in Sechs-Lochplatten ausgesät (4×10^5 pro Loch) und am nächsten Tag unter Verwendung verschiedener Inhibitoren mit PMA (20 ng/ml) + Ionomycin (0,5 μ g/ml), TNF- α (20 ng/ml) und IL-1 α (10 ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden dann im Direktlysepuffer lysiert und in den so erhaltenen Lysaten wurde im Westernblot die Ser536-Phosphorylierung von p65 detektiert. Die Inhibitoren wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt (Zugabe 30 min vor Stimulation): 10 μ M MG132 (Proteasom), 20 μ M SP600125 (JNK); 50 μ M PD98059 (MEK 1/2,-5), 2 μ M SB203580 (p38).

Daher kann eine Beteiligung der hierdurch hemmbaren Signalwege ausgeschlossen werden. Wortmannin dagegen hemmt die PMA/Ionomycin-abhängige Ser536-Phosphorylierung, nicht aber die IL-1 α - und TNF α -abhängige Phosphorylierung. Einen interessanten Befund stellt außerdem die detektierte Ser536-Phosphorylierung in den unstimulierten, mit MG132-behandelten Zellen dar. Hier ist in den unstimulierten Zellen bereits eine deutliche Ser536-Phosphorylierung, die durch Stimulation nicht wesentlich gesteigert werden kann, detektierbar. Demnach scheint MG132 selbst diese Phosphorylierung zu induzieren. Die

Dosisabhängigkeit und Zeitkinetik einer MG132-induzierten Ser536-Phosphorylierung wurde daher im Westernblot eingehender untersucht (Abb. 3.5):

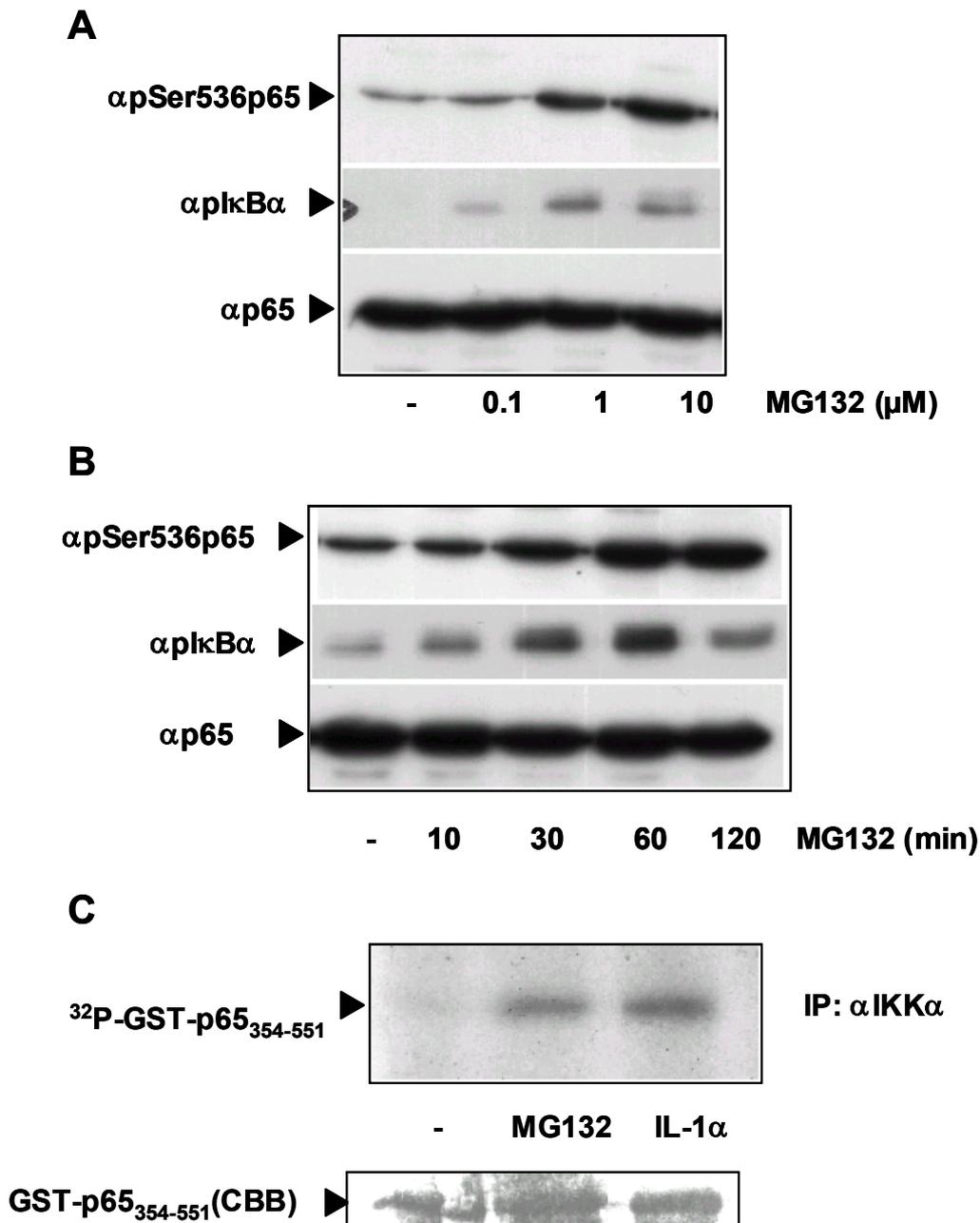


Abb. 3.5: MG132-induzierte Ser536-Phosphorylierung durch Aktivierung von IKK

HelatTA-Zellen wurden in Sechslöchplatten ausgesät (4×10^5 pro Loch) und am nächsten Tag entweder 1 h mit MG132 in variierenden Konzentrationen (**A**) oder für eine Zeitkinetik über verschiedene Zeiträume mit $10 \mu\text{M}$ MG132 behandelt (**B**), in Direktlyse-Puffer lysiert und im Westernblot analysiert.

C: Aus Ganzzellextrakten ($0,5 \text{ mg}$ Protein) von HelatTA-Zellen, die entweder mit IL- 1α (10 ng/ml) 10 min oder mit MG132 ($10 \mu\text{M}$) 1 h stimuliert wurden, wurde durch eine Immunpräzipitation mit einem anti-IKK α -Antikörper der IKK-Komplex immunpräzipitiert (IP) und die p65-Phosphorylierung in einem anschließenden Kinaseassay untersucht.

Die Ser536-Phosphorylierung nimmt hierbei von 0,1 über 1 bis 10 μM MG132 bei einer Behandlungsdauer von 60 min zu (Abb. 3.5 A) und erreicht nach 60 min Behandlungsdauer mit 10 μM MG132 ein Maximum (Abb. 3.5 B). Sowohl die Dosisabhängigkeit als auch die Zeitkinetik der Ser536-Phosphorylierung korreliert bis zu einer Dosis von 1 μM und einer Dauer von 60 min mit der Phosphorylierung von I κ B. Die daraus abgeleitete Vermutung, dass die MG132-induzierte Ser536-Phosphorylierung durch eine Aktivierung von IKK vermittelt wird, konnte in einer Immunpräzipitation von IKK durch einen Antikörper gegen IKK α mit anschließendem Kinaseassay mit GST-p65₃₅₄₋₅₅₁ als Substrat bestätigt werden (Abb. 3.5 C): MG132 (10 μM) aktiviert nach 60 min in einem ähnlichen Ausmaß wie IL-1 α (10 ng/ml) nach 10 min den IKK-Komplex, wie an der IKK β -abhängigen Ser536-Phosphorylierung von p65 erkennbar ist.

3.2.2 Suppression von IKK α und IKK β durch siRNA

Eine Möglichkeit, die physiologische Bedeutung von IKK β an der IL-1 α -regulierten Ser536-Phosphorylierung zu bestimmen, stellt die Suppression mit spezifischen siRNAs gegen IKK β dar. Die Verwendung von spezifischen siRNAs führt zur raschen Degradation der mRNA und sollte durch die resultierende Hemmung der Translation zu einer Verminderung der zellulären Konzentration der betroffenen Proteine führen. In Abb. 3.6 sind die Ergebnisse eines solchen Ansatzes zusammengestellt. Nach Transfektion von HEK293IL1R mit einem Gemisch aus siRNA-Molekülen (100 nm), die spezifisch gegen die mRNA von IKK β oder gegen die von IKK α gerichtet sind, konnte eine sehr deutliche Abnahme sowohl von IKK α wie von IKK β im Vergleich zu untransfizierten Zellen festgestellt werden. Hierbei konnten keine Effekte beobachtet werden, die auf eine unspezifische siRNA-Wirkung (Luciferase-Kontrolle) oder auf das verwendete Transfektionsmittel (*Oligofectamine*-Kontrolle) zurückzuführen sind. Im Vergleich zu allen Kontrollen nimmt die IL-1 α -regulierte Ser536-Phosphorylierung nicht maßgeblich ab, die regulierte I κ B α -Phosphorylierung dagegen ist reduziert. Diese Daten zeigen somit sehr deutlich, dass außer IKK β andere Kinasen einen hohen Anteil an der regulierten Ser536-Phosphorylierung haben müssen.

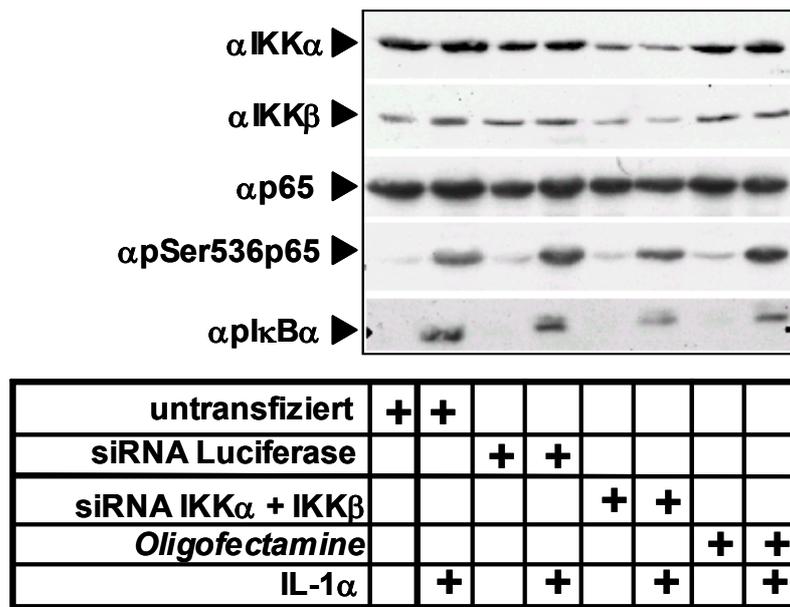
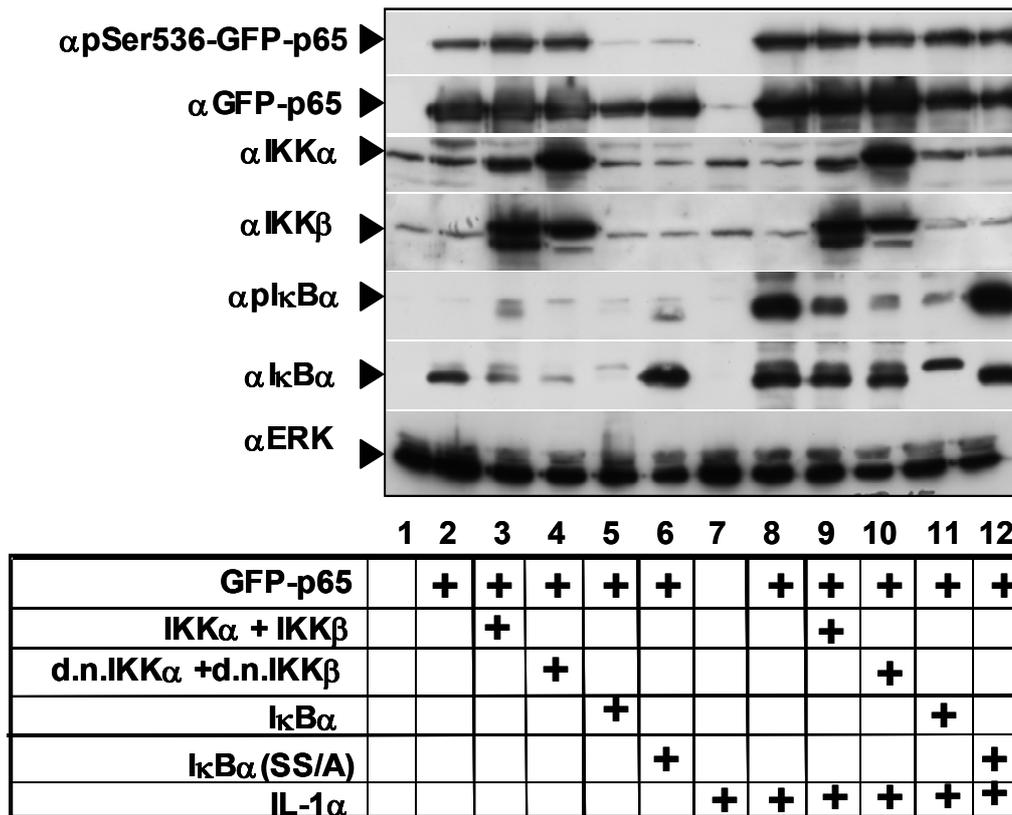
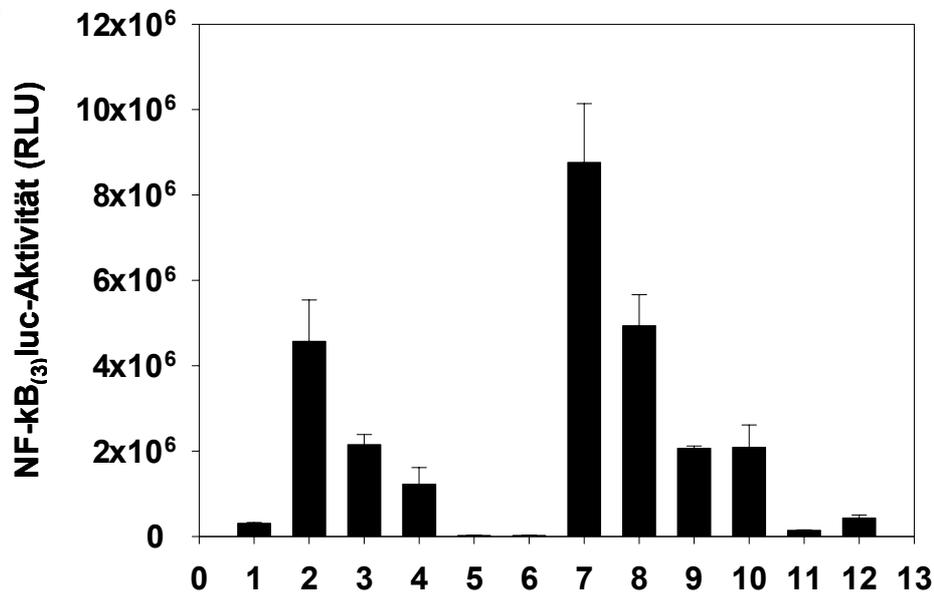


Abb 3.6: Suppression von IKKα und IKKβ durch spezifische siRNAs

HEK293IL1R-Zellen wurden in 24-Lochplatten ausgesät (4×10^4 pro Loch), am nächsten Tag mit spezifischer siRNA (100 nm) gegen IKKα und IKKβ oder zur Kontrolle gegen Luciferase, komplexiert mit *Oligofectamine*, transfiziert. Nach 72 h Inkubation wurden die Zellen mit IL-1α (10 ng/ml, 10 min) stimuliert und im Direktlysepuffer lysiert. Die so erhaltenen Lysate wurden dann im Westernblot mit den oben aufgeführten Antikörpern (α-) untersucht.

3.2.3 Überexpression dominant-negativer Mutanten von IKKα und IKKβ

Eine weitere Strategie zur Hemmung eines Enzyms stellt die Überexpression katalytisch-inaktiver Mutanten dar, die als dominant-negative Mutanten wirken. Bei den verwendeten dominant-negativen Mutanten von IKKα und IKKβ wurden durch Mutagenese in der T-Aktivierungsschleife diejenigen Serine durch Alanine ausgetauscht, deren induzierte Phosphorylierung die Enzyme aktiviert (Ser176 in IKKα sowie Ser177 und Ser181 in IKKβ), was so zum dominant-negativen Effekt führt (Hehner *et al.*, 2000). In Abb. 3.7 sind die Ergebnisse von Versuchen, bei denen diese dominant-negativen Mutanten in HEK293IL1R-Zellen überexprimiert wurden, zusammengefasst. Wie der Westernblot in Abb. 3.7 A zeigt, nimmt durch Überexpression der dominant-negativen Mutanten von IKKα und -β die IκBα-Phosphorylierung sowohl in den unstimulierten, als auch in den IL-1α-stimulierten Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Formen sehr deutlich ab (Bahnen 3, 4 und 9, 10). Danach wird die IKK-Aktivität tatsächlich durch die dominant-negativen Mutanten gehemmt. In den stimulierten Zellen nimmt allerdings die IκBα-Phosphorylierung auch durch die Überexpression der IKK-Wildtyp-Formen ab. Dies legt nahe, dass auch die Wildtyp-Formen bei starker Überexpression einen hemmenden Effekt auf die induzierte Aktivierung von IKK haben (Bahn 9). Die Ser536-Phosphorylierung eines koexprimierten GFP-p65-

A**B****Abb 3.7: Überexpression dominant-negativer Mutanten von IKKα und IKKβ**

2,5 x 10⁵ HEK293IL1R-Zellen pro Loch wurden in Sechs-Lochplatten ausgesät und am nächsten Tag mit folgenden Plasmiden transient transfiziert: GFP-p65 (0,5 µg), NF-κB₍₃₎luc (0,25 µg) und β-Gal. (0,5 µg). Zusätzlich wurden je nach Ansatz Expressionsplasmide für folgende Proteine zugefügt: IKKα und IKKβ (je 3 µg), dominant-negative (d.n.) Mutanten von IKKα und IKKβ (je 3 µg), IκBα (6 µg) oder IκBα-SS/AA (6µg). Die Ansätze wurden dann mit dem Plasmid pCS3MT auf 7,25 µg Gesamt-DNA aufgefüllt. Die transfizierten Zellen wurden am folgenden Tag dann entweder mit IL-1α (10 ng/ml) 10 min stimuliert, lysiert und im Westernblot analysiert (A) oder nach vierstündiger IL-1α-Stimulation auf Reporteragenaktivität untersucht (B). In B ist der Mittelwert der gemessenen Luciferase-Aktivitäten von drei Ansätzen (jeweils Duplikate) mit dem jeweiligen Standardfehler dargestellt. αERK: Auftragskontrolle.

Fusionsproteins nimmt sowohl durch die überexprimierten Wildtyp-Formen (Bahn 3) als auch durch die dominant-negativen-Mutanten (Bahn 4) im Vergleich zu der Kontrolle (Bahn 2) bereits in den unstimulierten Zellen gleichermaßen zu. Außerdem hebt die Überexpression von GFP-p65 die IL-1 α -induzierte NF- κ B-Aktivierung auf, wie die Reporter-gen-Untersuchung ergab (Abb. 3.7 B, 8), aber nicht die induzierte I κ B α -Phosphorylierung (Bahn 8). Ein Unterschied in der Ser536-Phosphorylierung von GFP-p65 ist nach Überexpression der Wildtyp-Formen und der Mutanten nach IL-1 α -Stimulation verglichen mit den entsprechenden unstimulierten Ansätzen nicht erkennbar (Bahnen 3 und 4, 9 und 10). Interessant ist aber, dass die Überexpression sowohl von I κ B α als auch der I κ B α -Mutante I κ B α (SS/AA), bei der die Serine 32 und 36 durch Alanine ausgetauscht wurden, zu einer deutlichen Abnahme der konstitutiven Ser536-Phosphorylierung von GFP-p65 führen (Bahnen 5 und 6). Zusätzlich ist eine starke Zunahme der regulierten phospho-I κ B α -Bande nach Überexpression der I κ B-Mutante feststellbar (Bahn 12). Außerdem ist an den I κ B α -Banden sehr gut erkennbar, dass GFP-p65 die Expression von I κ B α , einem Zielgen von NF- κ B, induziert (Bahnen 2 und 8). Bemerkenswert ist auch, dass die Überexpression der Wildtyp-Formen von IKK, ähnlich wie bei den dominant-negativen Mutanten, sowohl in den unstimulierten als auch stimulierten Zellen zu einer messbaren Abnahme der Luciferase-Aktivität führte (3.7 B, Ansätze 3 und 4, 9 und 10).

3.2.4 Inhibition der IKK β -Aktivität durch SC-514

Kürzlich wurde mit der Substanz SC-514 (Strukturformel: 3.8 A) ein selektiver Inhibitor von IKK β beschrieben. SC-514 weist eine IC₅₀ von 11,2 μ M (*in-vitro*) für die Hemmung von IKK β auf, während die IC₅₀ für die meisten anderen Proteinkinasen mehr als zehnmal so groß ist (Kishore *et al.*, 2003). Damit stand ein spezifischer Inhibitor für die Charakterisierung der IKK β -unabhängigen Ser536-Phosphorylierung von p65 zur Verfügung mit dem die Daten aus den vorangegangenen Experimenten ergänzt werden konnten. Die Behandlung von HelatTA-Zellen mit SC-514 in einer Konzentration von 50 μ M führte zu einer sehr starken Hemmung der IL-1 α -regulierten Phosphorylierung von I κ B α (Abb. 3.8 B).

Eine Erhöhung der Konzentration auf 100 μ M führte zu keiner weiteren Reduktion der I κ B α -Phosphorylierung. Hieraus geht hervor, dass die IKK β -abhängige Phosphorylierung von I κ B α bereits ab 50 μ M maximal gehemmt ist. Auch bei der IL-1 α -induzierten Ser536-Phosphorylierung von p65 wird eine maximale Hemmung schon bei 50 μ M erreicht, da eine Erhöhung auf 100 μ M auch keine weitere Abnahme der Phosphorylierung bewirkt. Dennoch ist der IL-1 α -regulierte Teil der Ser536-Phosphorylierung nicht vollständig gehemmt.

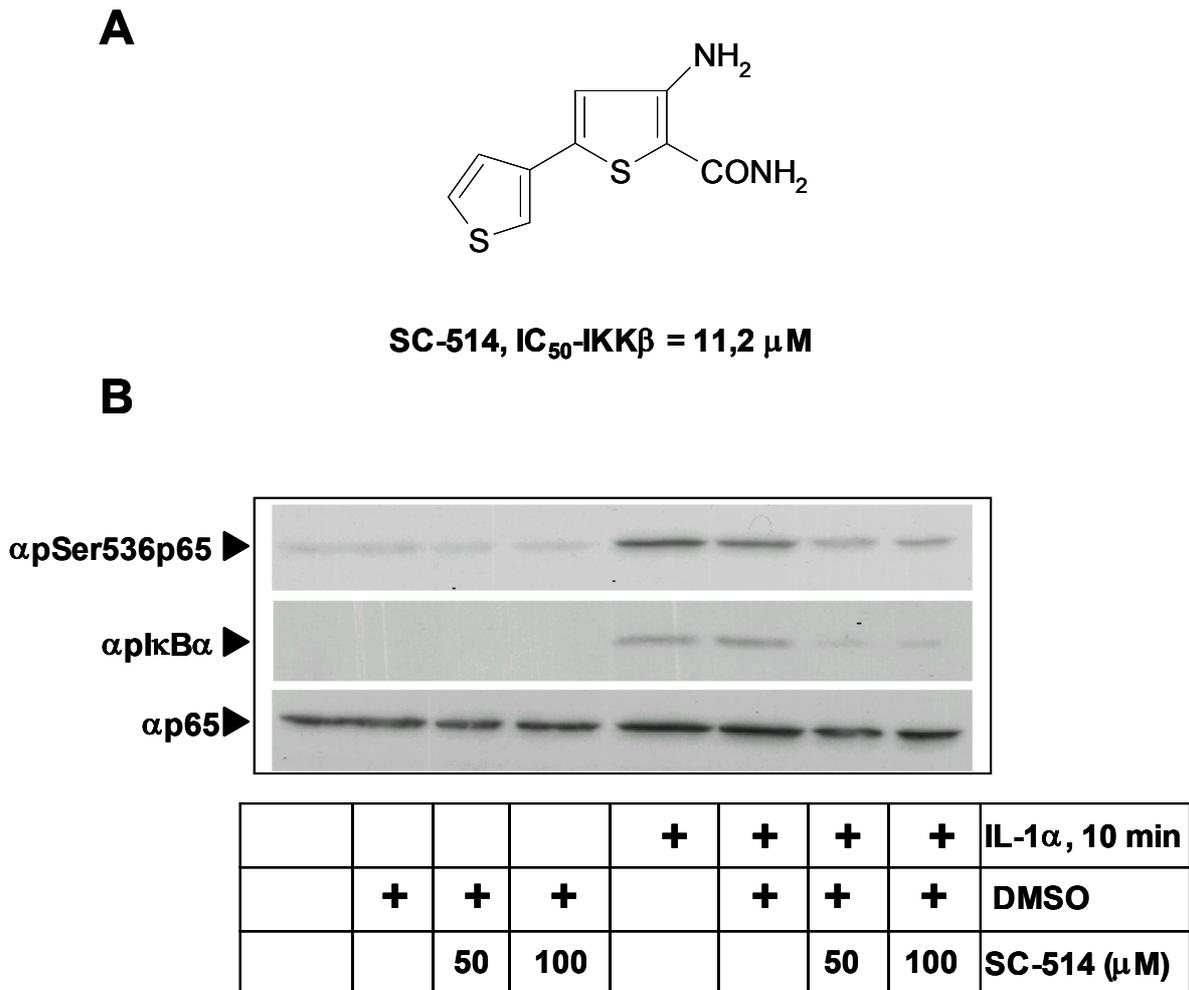


Abb. 3.8: Anwendung des IKKβ-selektiven Inhibitors SC-514

A: Strukturformel von SC-514. **B:** HelatTA-Zellen wurden in 12-Lochplatten ausgesät, nach Erreichen der Konfluenz 1 h mit dem Inhibitor SC-514 in 0,02% DMSO oder mit Medium mit und ohne DMSO vorinkubiert und dann 10 min mit IL-1α (10 ng/ml) mit und ohne SC-514 stimuliert. Nach zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen in Direktlysepuffer lysiert und die erhaltenen Lysate wurden im Westernblot analysiert.

Außerdem ist das Ausmaß der Hemmung der IL-1α-induzierten Ser536-Phosphorylierung durch SC-514 kleiner als das der Hemmung der IκBα-Phosphorylierung, wie der Vergleich mit den unbehandelten Ansätzen zeigt. So beträgt der Wert für die densitometrisch bestimmte Intensität der regulierten pSer536p65-Bande nach SC-514-Behandlung in Abb. 3.8 ungefähr 34% des Wertes für die regulierte pSer536p65-Bande aus unbehandelten Zellen. Eine genaue densitometrische Quantifizierung der pIκBα-Banden hingegen war mit der verwendeten Methode nicht mehr möglich, da die Intensität der regulierten pIκBα-Bande nach SC-514-Behandlung zu schwach war. Dieser Versuch zeigt somit, dass bei einer maximalen IKKβ-Hemmung die regulierte Ser536-Phosphorylierung zwar abnimmt, aber nicht vollständig inhibiert werden kann und somit Proteinkinasen an der Serin-536-Phosphorylierung beteiligt sein müssen, die nicht durch SC-514 gehemmt werden.

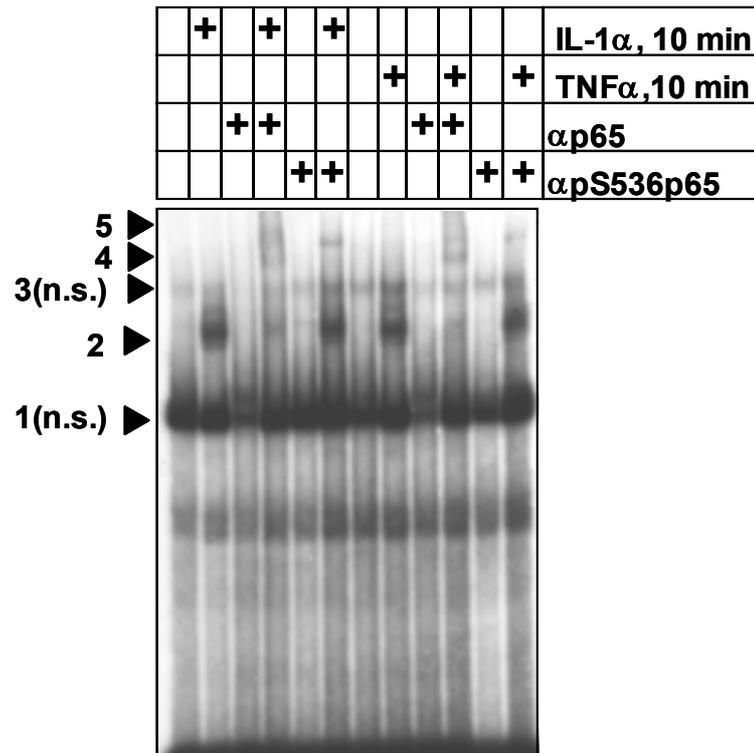
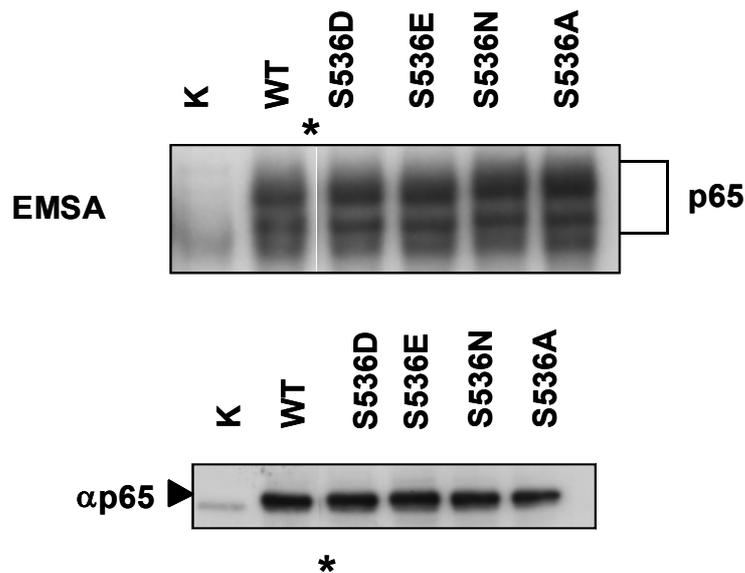
3.3 Funktionelle Charakterisierung der Ser536-Phosphorylierung

In diesem Teil werden die Ergebnisse von Versuchen vorgestellt, die das Ziel hatten, die Ser536-Phosphorylierung auf ihre Funktion näher zu untersuchen.

3.3.1 EMSA-Analyse der Ser536-Phosphorylierung

Ser536 liegt in der bereits sehr gut charakterisierten Transaktivierungsdomäne von p65. Ein direkter Einfluss auf die DNA-Bindung durch die Ser536-Phosphorylierung ist daher sehr unwahrscheinlich. Neben der Analyse von DNA-Protein-Interaktionen bietet die EMSA-Analyse, wenn sie mit Kernextrakten durchgeführt wird, auch die Möglichkeit, Informationen über die Konzentrationen von DNA-bindenden Proteinen im Kern sowie über mögliche Interaktionen mit anderen Proteinen zu gewinnen. Abb. 3.9 A zeigt das Resultat einer EMSA-Analyse mit Kernextrakten aus HelatTA-Zellen, die entweder mit IL-1 α oder TNF α stimuliert worden waren. Das verwendete Oligonukleotid enthielt dabei das NF- κ B-Erkennungsmotiv 5'-GGGACTTCC-3'. Dabei wurden fünf DNA-Protein-Komplexe detektiert: Die Bande von Komplex 2, die in allen stimulierten Ansätzen erscheint, wird nach Zugabe von Antiserum gegen p65 (α p65) von Antikörpern gebunden und der resultierende Komplex weist eine geringere elektrophoretische Mobilität auf (*supershift*). Dies führt zum Verschwinden von Komplex 2, woraus abzuleiten ist, dass Komplex 2 p65 enthält. Bei den Komplexen 1 und 3 handelt es sich offenbar um unspezifische Interaktionen von Proteinen mit der verwendeten DNA, da diese Bande durch Antiserumgabe nicht vermindert wird.

Die Intensität und elektrophoretische Mobilität des NF- κ B-Komplexes (Komplex 2) in den Extrakten der IL-1 α -stimulierten Zellen unterscheidet sich dabei nicht signifikant von denen aus den TNF α -stimulierten Zellen. Neben Komplexen 1 und 2 treten in den stimulierten Ansätzen nach Zusatz von Antiseren gegen p65 und pSer536p65 (im Folgenden wird an Ser536 phosphoryliertes p65 durch pSer536p65 abgekürzt) Banden mit einer geringen elektrophoretischen Mobilität auf, die möglicherweise auf verschiedene Komplexbildungsstufen zwischen dem NF- κ B-Komplex und dem Antikörper zurückzuführen sind (Komplexe 4 und 5). Allerdings ist die Intensität beider Komplexe sehr schwach. Da Komplex 4 nur in stimulierten Extrakten nach Zugabe von Antiserum gegen p65, nicht aber bei Verwendung des Antiserums gegen an Ser536-phosphoryliertes p65 detektiert werden kann, hat möglicherweise auch die Art des Antiserums oder die Ser536-Phosphorylierung hier einen Einfluss. Durch Zugabe von Antiserum gegen an Ser536-phosphoryliertes p65 (α Ser536p65) ist aber kein typischer *supershift*-Effekt verglichen mit dem *supershift* nach Zugabe von Antiserum gegen p65 feststellbar (mit Ausnahme der Komplexe 4 und 5). Hierfür gibt es

A**B****Abb. 3 9: Analyse der DNA-Bindung von pSer536p65 und Ser536-Mutanten**

A: Mit Kernextrakten (20 μ g Protein) aus unstimulierten HeLaTA-Zellen oder HeLaTA-Zellen, die entweder mit IL-1 α (10 ng/ml) oder mit TNF α (20 ng/ml) 10 min stimuliert worden waren, wurde ein EMSA-Experiment durchgeführt. Das verwendete Oligonukleotid enthielt dabei die NF- κ B-Konsensus-Bindungsstelle. Für die Supershift-Reaktionen wurden jeweils 2 μ l α p65-Serum oder 2 μ l α pSer536p65-Serum der Bindungsreaktion zugesetzt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und autoradiographiert. **B:** p65-WT wurde zusammen mit den Mutanten S536D, -E, -N und -A in Retikulozyten-Lysaten *in-vitro*-translatiert. Je 1,5 μ l dieser *in-vitro*-Translationsansätze wurde dann zusammen mit Retikulozyten-Lysat ohne p65 (K) mit dem gleichen Oligonukleotid wie in A im EMSA analysiert. Die Input-Kontrolle von je 1 μ l *in-vitro*-Translationsansatz im Westernblot zeigte eine gleich starke Expression der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (unteres Feld).

*) : Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die beiden Abbildungen in B umgestaltet. Die Bahnen K, WT sind identisch mit denen in Abb. 3.20, da die Ser536-Mutanten mit den anderen Mutanten (s. Abb. 3. 20) getestet wurden.

mehrere Erklärungsmöglichkeiten: Zum einen könnte der Anteil an pSer536p65 an der Gesamtmenge von p65 im Kern sehr gering sein, zum anderen könnte die Bindungsstelle für den phospho-spezifischen Antikörper durch Interaktion mit anderen Proteinen maskiert sein oder die Ser536-Phosphorylierung beeinflusst die DNA-Bindung möglicherweise negativ. Letzteres wurde in einem anderen EMSA-Experiment (Abb. 3.9 B) überprüft. Bei diesem Versuch wurde der Wildtyp von p65 sowie verschiedene Mutanten von p65 in Retikulozyten-Lysaten *in-vitro* translatiert und in ihrer DNA-Bindung verglichen. In den Mutanten wurde hierbei die Aminosäure Ser536 gegen Aspartat (S536D), Glutamat (S536E), Alanin (S536A) oder Asparagin (S536N) ausgetauscht. Durch Einbau der sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat wurde versucht, den Effekt der zusätzlichen negativen Ladungen durch die Phosphatgruppe an Ser536 zu imitieren (phosphomimetische Mutanten). Der Versuch zeigte aber, dass alle Mutanten die gleiche Affinität wie der Wildtyp zum NF- κ B-Konsensusmotiv aufweisen. Ein modulierender Einfluss der Phosphorylierung an Ser536 auf die DNA-Bindung konnte so nicht nachgewiesen werden.

3.3.2 Analyse der nukleären Konzentration und der Rekrutierung von pSer536p65 am IL-8-Promotor nach IL-1 α -Stimulation

Die Kinetik der nukleären Konzentration von p65 und pSer536p65 in Abhängigkeit von der IL-1 α -Stimulationsdauer wurde anhand eines Westernblots ermittelt, der in Abb. 3.10 A gezeigt ist: Die Konzentrationen sowohl von p65 wie die von pSer536p65 nehmen nach 0,2 h (12 min) in den Kernextrakten von HelatTA-Zellen zu und erreichen ungefähr zwischen 0,2 h und 0,5 h (30 min) ihr Maximum und nehmen zwischen 0,5 h und 1 h wieder ab. Der Abfall ist hierbei bei pSer536p65 deutlich stärker als bei p65: Mit der Methode der Chromatin-Immunpräzipitation (s. Material und Methoden) kann die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren an ihren Zielpromotoren gemessen werden: Nach Quervernetzung mit Formaldehyd wird der entstandene Komplex aus Transkriptionsfaktor und Promotor-DNA selektiv mit einem spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Da die Formaldehyd-Fixierung reversibel ist, kann nach einer entsprechenden Behandlung die kopräzipitierte Promotor-DNA durch eine PCR quantifiziert werden, was Rückschlüsse auf die Menge des rekrutierten Transkriptionsfaktor zulässt. In Abb. 3.10 B ist das Ergebnis einer solchen Chromatin-Immunpräzipitation dargestellt. Der hierbei untersuchte IL-8-Promotor weist eine NF- κ B-Bindungsstelle auf und für seine maximale Aktivität ist NF- κ B notwendig (Hoffmann *et al.*, 2002). Wie anhand der PCR-amplifizierten Banden zu sehen ist, kommt es innerhalb von 30 min nach Stimulation zu einer deutlichen Rekrutierung von pSer536p65 an den IL-8-

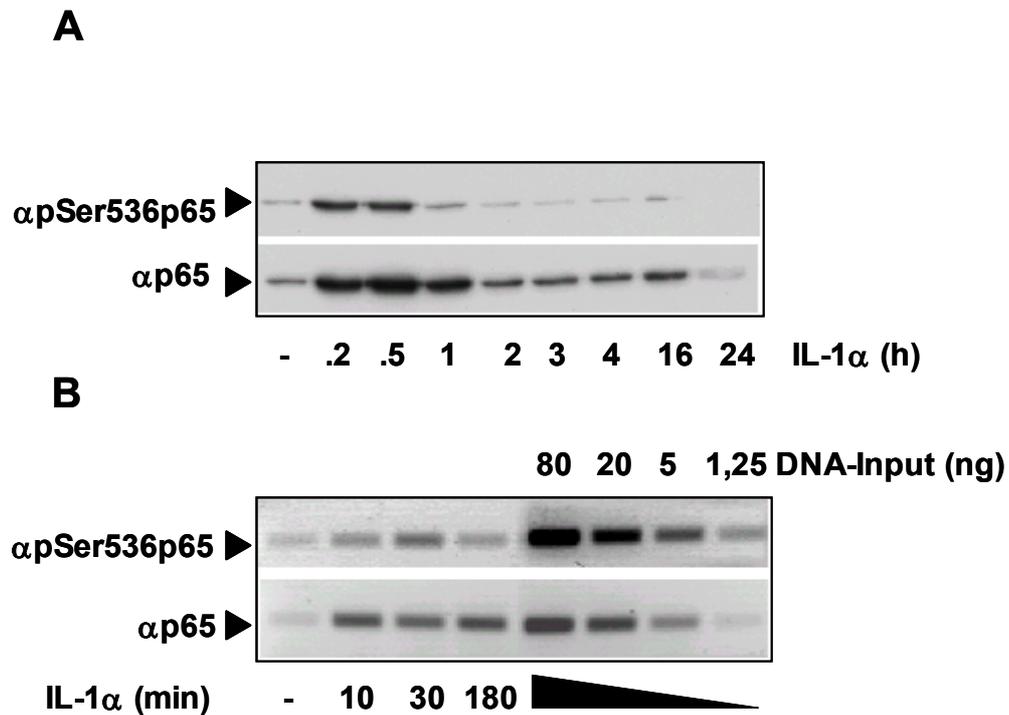


Abb. 3.10: Analyse der signalabhängigen nukleären Konzentration und Promotorbindung von p65

A: Kernextrakte (100 μ g Protein) von HelatTA-Zellen wurden nach unterschiedlichen Stimulationszeitpunkten mit IL-1 α (10 ng/ml) im Westernblot analysiert.

B: Chromatin-Immünpräzipitation des IL-8-Promotors mit Antiseren gegen p65 und pSer536p65: Zur Immunpräzipitation wurden für je 250 μ l CHIP-RIPA-Lysate aus KB-Zellen 5 μ l α p65-Antiserum oder 4 μ l α pSer536p65-Serum eingesetzt. Nach weiterer Aufarbeitung erfolgte dann die Detektion durch PCR und Agarosegelelektrophorese. Zur Quantifizierung wurden den Lysaten Aliquots entnommen und nach DNA-Bestimmung und PCR ebenfalls in den angegebenen Mengen auf das Gel aufgetragen.

Promotor, die danach wieder sehr schnell abnimmt. Der Anteil von gebundenem p65 erreicht bereits nach 10 min sein Maximum und bleibt über einen Zeitraum von 180 min weitgehend konstant. Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass die Menge von pSer536p65 und p65 IL-1 α -abhängig sowohl im Kern als auch am IL-8-Promotor zunimmt, dass aber die Kinetik beider Formen sich teilweise deutlich unterscheidet, da p65 in der dephosphorylierten Form länger am Promotor gebunden bleibt.

3.3.4 Bestimmung der Reporterogenaktivität von verschiedenen Ser536-Mutanten von p65

Nach den oben gezeigten Daten nimmt die nukleäre Konzentration und Bindung an den IL-8-Promotor nach IL-1 α -Stimulation (s. Abb. 3.10 B) zu. Dies korreliert mit der NF- κ B-Aktivierung, da in den beobachteten Zeiträumen der NF- κ B-Signalweg aktiviert ist. Die detektierte Zunahme von an dem IL-8-Promotor gebundenem pSer536p65 legt die Vermutung nahe, dass die Ser536-Phosphorylierung einen modulierenden Einfluss auf die IL-1 α -abhängige Regulation des IL-8-Gens ausübt. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde in p65-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (p65^{-/-}-MEF) der Einfluss der Ser536-Phosphorylierung auf die Aktivität des IL-8-Promotors im Reportergen-Assay untersucht.

Frühere Versuche mit der Mutante S536A (Ser536Ala) von p65 führten zu keiner signifikanten Hemmung der regulierten Reportergenaktivität (Daten nicht gezeigt). Hieraus hätte gefolgert werden können, dass die Ser536-Phosphorylierung keinen oder einen inhibitorischen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von p65 hat. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden neben der S536A-Mutante noch die phosphomimetische Mutante S536D (Ser536Asp) und die Mutante S536N (Ser536Asn) im Reportergen-Assay getestet. Die Ergebnisse des Reportergen-Assays sind in Abb. 3.11 dargestellt. Hier weist die S536A-Mutante in den IL-1 α -stimulierten Proben mit einer relativen Induktion von 22,31 eine etwas höhere transkriptionelle Aktivität als der Wildtyp (relative Induktion = 16,77) auf, wobei sich die transkriptionelle Aktivität des Wildtypes nach Stimulation ungefähr um den Faktor 2,1 erhöht. Der Wert für die Alanin-Mutante ist allerdings mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, da der Standardfehler des Mittelwertes einen Betrag von 11,31 aufweist. Sehr deutlich ist der Unterschied hingegen zwischen dem WT und der phosphomimetischen S536D-Mutante, die sich stark aktivierend auf die Reportergenaktivität nach Stimulation verhält (relative Induktion = 26,05). Nach dem Verhalten der phosphomimetischen Mutante S536D reguliert die Ser536-Phosphorylierung die transkriptionelle Aktivität positiv. Diese Schlussfolgerung wird durch den deutlich inhibitorischen Einfluss der S536N-Mutante auf die Aktivität unterstützt, da diese sowohl konstitutiv (relative Induktion = 2,91) als auch nach Stimulation (relative Induktion = 8,52) die niedrigste Aktivität aufweist.

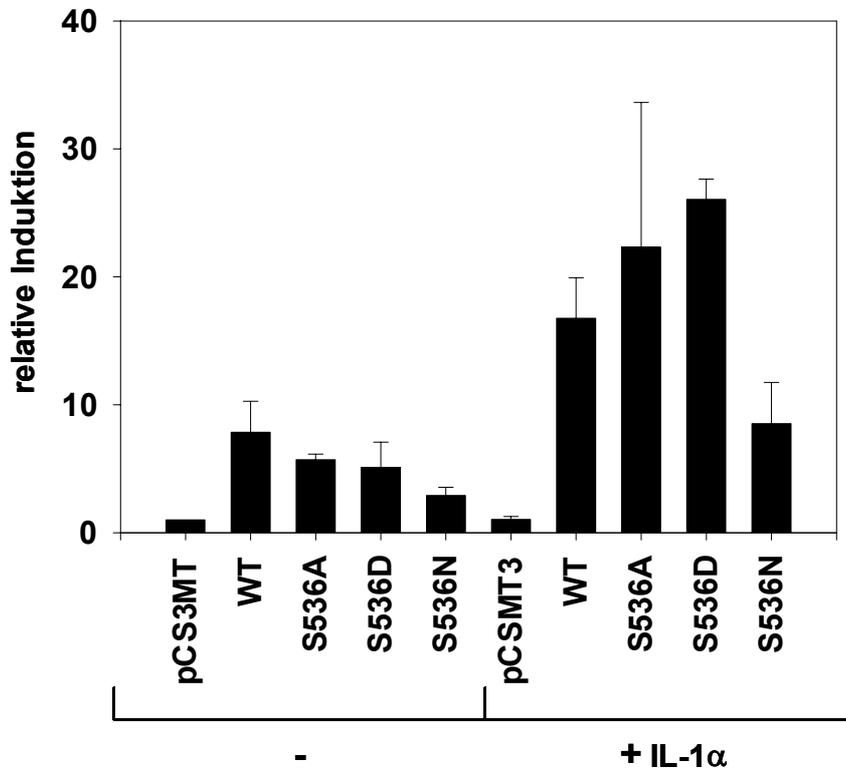


Abb. 3.11: Reporter-gen-Aktivität von Ser536-Mutanten von p65 in p65-defizienten MEF-Zellen
 p65^{-/-}-MEF-Zellen wurden in Sechs-Lochplatten ausgesät und bei 70% Konfluenz transient transfiziert (Lipofektions-Methode). Pro Loch wurden dabei 0,3 μ g Expressionsplasmid für p65-WT und die Ser536-Mutanten eingesetzt. Zusätzlich wurden pro Loch 0,25 μ g des vom IL-8-Promotor-kontrollierten Reporter-gen-Plasmides (IL-8-Pr.luc-WT) und 0,5 μ g des Expressionsplasmides für β -Galaktosidase verwendet. Der DNA-Gehalt pro Transfektionsansatz wurde mit dem Plasmid pCS3MT auf insgesamt 3,75 μ g erhöht. Am nächsten Tag erfolgte dann nach 4 h IL-1 α -Stimulation (10 ng/ml) die Lyse und die Reporter-gen-Aktivitäts-Messung. Die relative Induktion wurde durch Normalisierung der Luziferase-Aktivität mit der β -Galaktosidase-Aktivität berechnet. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Messungen (jeweils Duplikate) mit dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.3.5 Analyse der Interaktion von p65 und dem Koaktivator TAFII31

Es wurde berichtet, dass p65 in der TAD im Bereich von AS 532-548 den Koaktivator TAFII31 bindet (Uesugi *et al.*, 1999). Daraus ergab sich die Frage, ob die Phosphorylierung an Ser536 die Interaktion mit TAFII31 beeinflussen und so die transkriptionelle Aktivität von p65 regulieren kann. Um den Effekt einer Interaktion von p65 mit TAFII31 in Abhängigkeit der Ser536-Phosphorylierung zu messen, wurden Reporter-genassays mit p65 und den Ser536-Mutanten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden in p65-defizienten MEF-Zellen p65-WT und die Ser536-Mutanten mit TAFII31 koexprimiert und der Effekt auf die Aktivität des IL-

8-Promotors getestet. In einigen Experimenten wurde zur Erhöhung der β -Gal.-Aktivität (Normalisierung) die Menge des Expressionsplasmides für β -Gal. von 0,5 μ g auf 1 μ g erhöht. Dies veränderte aber nicht die induzierten Luziferase-Aktivitäten und beeinflusste auch nicht die Berechnung der relativen Induktion, da nur die Verhältnisse der β -Galaktosidase-Aktivitäten in die Berechnung eingehen. Die dazugehörigen Ergebnisse sind in Abb. 3.12 dargestellt:

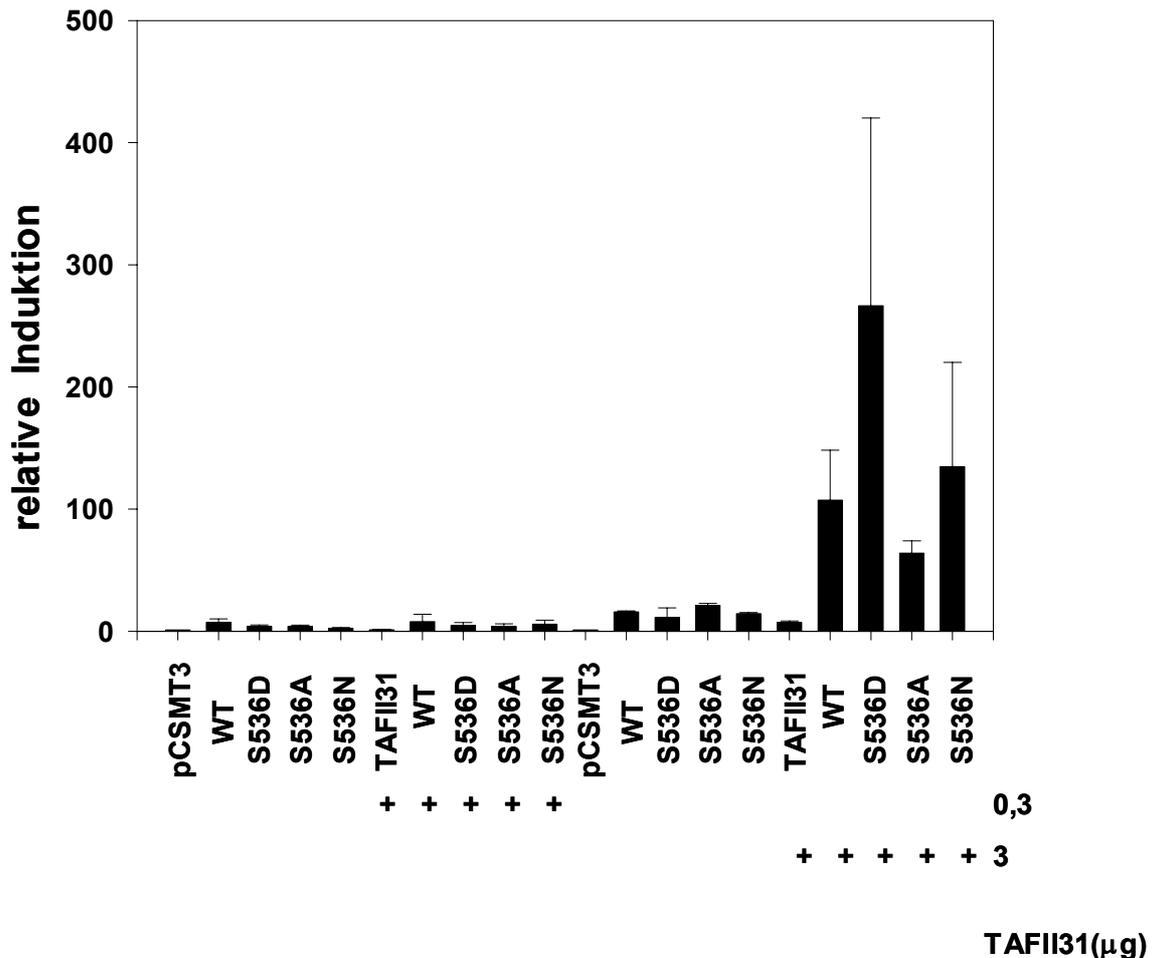


Abb. 3.12: Reporter-Untersuchungen zur Interaktion von p65 und TAFII31

$p65^{-/-}$ -MEF-Zellen wurden in Sechs-Lochplatten ausgesät und bei einer Konfluenz von ungefähr 70% mit Expressionsplasmiden für HA-TAFII31, p65-WT und -Mutanten sowie mit den Reporterplasmiden IL-8-Prom.-luc (IL-8-Promotor) und β -Gal. transient transfiziert (Lipofektionsmethode). Am nächsten Tag erfolgte die Zellyse und die Messung der Reporteraktivität. Es wurden folgende Mengen eingesetzt. Linke Hälfte: 0,3 μ g HA-TAFII31, 0,3 μ g p65 (WT/Mutanten), 0,25 μ g IL-8-Prom. luc., 0,5 μ g β -Gal. Mit pCSMT3 (Träger-DNA) wurde der DNA-Gehalt auf insgesamt 3,75 μ g aufgefüllt. Rechte Hälfte: 3 μ g HA-TAFII31, 0,3 μ g p65 (WT/Mutanten), 0,25 μ g IL-8-Prom. luc., 0, 5 oder 1 μ g β -Gal., und 3 μ g pCS3MT. Legende: pCSMT3 (nur pCSMT3), TAFII31 (nur TAFII31, ohne p65-WT/Mutanten)

Dargestellt wurden die Messwerte aus jeweils zwei oder drei unabhängigen Experimenten mit dem Standardfehler des Mittelwertes. Zur Verbesserung der Normalisierung wurde in einigen Experimenten 1 μ g statt 0,5 μ g β -Gal. eingesetzt. Dies veränderte aber nicht die induzierte Luziferase-Aktivität und hatte auch keinen Einfluss auf die Berechnung und Vergleichbarkeit der relativen Induktion.

Wie die Ergebnisse zeigen besteht ein funktioneller Synergismus zwischen p65 und TAFII31, da eine TAFII31-Überexpression ohne Koexpression mit den p65-Konstrukten die Reporterogenaktivität nicht erhöht. Der Effekt der TAFII31-Überexpression ist also eindeutig von p65 abhängig. Dabei konnte ein Dosis-abhängiger Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von p65 in Abhängigkeit der exprimierten TAFII31-Menge festgestellt werden. So ist z.B. eine signifikante Erhöhung der transkriptionellen Aktivität von p65-WT erst bei einer eingesetzten Menge von 3 µg TAFII31-Expressionsplasmid feststellbar, während bei 0,3 µg keine Effekte erkennbar sind. Ein ähnliches Verhalten zeigen auch die anderen Ser536-Mutanten von p65.

Die phosphomimetische S536D-Mutante zeigt einen deutlich höheren Anstieg in der transkriptionellen Aktivität (rel. Induktion = 266,57) als der WT (rel. Induktion = 107,32), wenn TAFII31 koexprimiert wird. Die S536N-Mutante dagegen zeigt unter dem Einfluss von TAFII31 mit einer rel. Induktion von 134,82 eine ähnliche Aktivität wie der WT. Bei der Alanin-Mutante S536A hingegen nimmt die relative Induktion nach TAFII31-Koexpression nur geringfügig zu (von 21,15 auf 63,97). Teilweise sind diese Werte aber mit einer recht hohen Unsicherheit behaftet, wie anhand der jeweiligen Standardfehler zu erkennen ist. Dies kann u.a. auf die kleine Anzahl von Experimenten zurückgeführt werden. Nach diesen Daten könnte ein funktioneller Synergismus zwischen p65 und TAFII31 bestehen, wobei die phosphomimetische Mutation an Position 536 einen stark aktivierenden Effekt zeigt.

Da TAFII31 an der TAD bindet, wurde untersucht, ob Mutationen an Position Ser536 die Bindung von TAFII31 beeinflussen. Hierzu wurden GST-Bindungsassays mit GST-TAFII31 und den in einer *in-vitro*-Translation mit ³⁵S-markierten p65-Mutanten durchgeführt. Frühere Versuche hatten ergeben, dass unter den anfänglich gewählten Bedingungen im Bindungspuffer (PBS, 1% (w/v) BSA, 2 mM DTT, 1mM PMSF) ein relativ hoher Anteil von p65 unspezifisch an GST oder an der GSH-Sepharose-Matrix bindet. Durch Verwendung eines stringenteren Bindungspuffers (20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 0,3 M NaCl, 0,1% (w/v) NP-40, 1% (w/v) BSA) konnte die unspezifische Bindung von p65 auf ein akzeptables Maß reduziert werden. Nach den Ergebnissen im GST-Bindungsassay konnten dabei keine signifikanten Unterschiede im Bindungsverhalten von p65 und den Mutanten festgestellt werden. Im Vergleich zum aufgetragenen Input ist der gebundene Anteil (Output) bei allen Mutanten ähnlich wie der gebundene Anteil beim Wildtyp (Abb. 3.13 A). Nach diesen Ergebnissen scheint die phosphomimetische Mutante S536D die Interaktion von p65 mit TAFII31 nicht direkt zu beeinflussen, obwohl *in-vivo*, wie die Reportergen-Assays zeigten, durchaus Effekte nachweisbar waren.

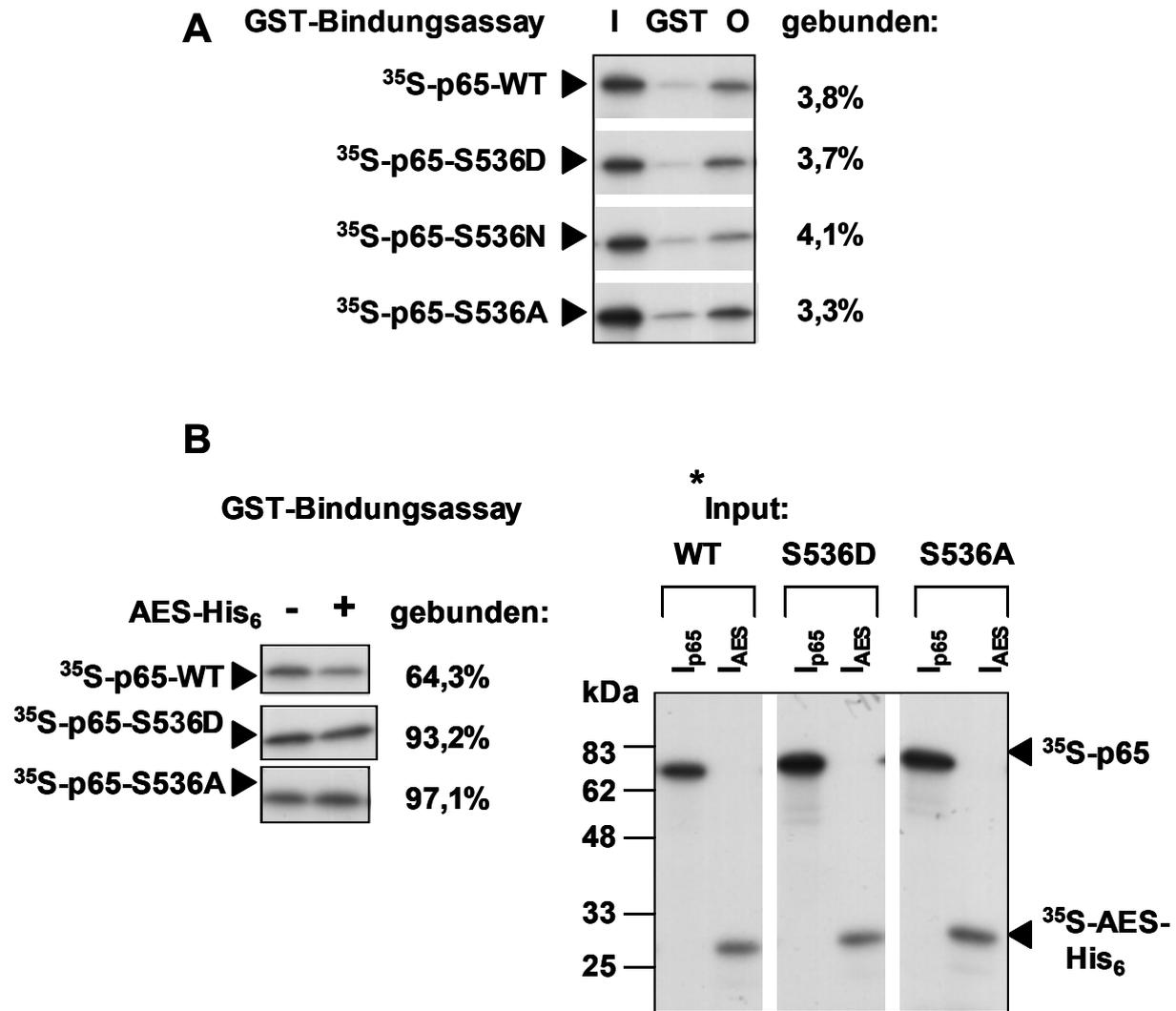


Abb. 3.13: Analyse der Interaktion von p65 mit TAFII31 mit GST-Bindungsassays

A: p65-WT und die Mutanten S536D, S536N und S536A wurden in Retikulozyten-Lysaten *in-vitro*-translatiert und dabei mit ³⁵S-L-Methionin markiert. Je 3,5 µl der *in-vitro*-Translationsansätze wurden dann in den Bindungsassays mit einer GST-TAFII31-Präparation (3,2 µg Protein) eingesetzt. Nach Durchführung des Bindungsassays wurde das an der GSH-Sepharose gebundene Protein im Laemmli-Auftragspuffer eluiert und in einer SDS-PAGE getrennt. Das Gel wurde mit einer signalverstärkenden *Amplifyer*-Lösung behandelt, getrocknet und autoradiographiert. Aufgetragen wurden: 1/10 der eingesetzten Menge bzw. des Inputs (I), der an GST gebundene Teil (GST) sowie der an GST-TAFII31 gebundene Teil bzw. Output (O). Daneben ist der densitometrisch bestimmte Anteil (%) an gebundenem Protein bezogen auf die eingesetzte Menge nach Subtraktion des Hintergrundes (GST) angegeben.

B: Die Bindungsassays wurden wie in A durchgeführt, zusätzlich wurde *in-vitro*-translatiertes ³⁵S-AES in einem äquimolaren Mengenverhältnis zu p65 eingesetzt. Es wird jeweils von einem Bindungsassay der gebundene Anteil von p65-WT und den Mutanten S536D und S536A (ohne oder bei Zusatz von ³⁵S-AES) gezeigt. Der gebundene Anteil (%) bei Zusatz von ³⁵S-AES bezogen auf den Anteil ohne ³⁵S-AES-Zugabe ist daneben angegeben (Mittelwert von zwei unabhängigen Ansätzen). Die Inputkontrolle zeigt je 1/10 des Inputs (I_{p65}) von p65-WT und den Mutanten sowie 1/10 des jeweiligen Inputs von AES (I_{AES}).

*) Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Banden umgruppiert. Es wurden hierbei keine verfälschenden Änderungen vorgenommen.

Eine denkbare Erklärung war, dass die TAFII31-p65-Interaktion indirekt reguliert wird. Beispielsweise könnte die Phosphorylierung an Ser536 zu einer Dissoziation eines Korepressors führen, der die Bindung von TAFII31 kompetiert oder sterisch inhibiert.

Für p65 war bisher nur ein Korepressor beschrieben worden, der an der TAD von p65 bindet und damit als potentieller Inhibitor für eine TAFII31-Interaktion in Frage kam. Es handelte sich hierbei um AES (Tetsuka *et al.*, 2000). AES wurde ebenfalls in einer *in-vitro*-Translation mit ³⁵S-L-Methionin markiert und in einem äquimolaren Konzentrationsverhältnis mit dem Wildtyp von p65 und den Mutanten S536A und S536D im GST-Bindungsassay eingesetzt. Aufgrund des bekannten Methionin-Gehaltes beider Proteine (sechs in AES, zehn in p65), konnte anhand der densitometrischen Auswertung der Bandenintensitäten näherungsweise ein äquimolares Verhältnis eingestellt werden. Die Ergebnisse der GST-Bindungsassays mit AES sind in Abb. 3.13 B gezeigt: Tatsächlich vermindert sich bei Zusatz von AES der an GST-TAFII31 gebundene Anteil des Wildtypes von p65. Die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten aus zwei Ansätzen ergab, dass nach Zugabe von AES nur noch 64,3% der Menge, die ohne Zugabe des Korepressor an GST-TAFII31 binden, mit TAFII31 interagieren. Ein solcher inhibitorischer Effekt ist bei den Mutanten S536D und S536A nicht feststellbar. Demnach scheint AES *in-vitro* die Bindung von p65 an TAFII31 in äquimolaren Mengen etwas zu blockieren, während die Mutanten S536A und S536D diesbezüglich weniger hemmbar sind.

Dieser Befund konnte in Reporteragen-Untersuchungen (Abb 3.14) mit p65-defizienten MEF-Zellen bestätigt werden. Unter dem Einfluss des Repressors AES aktiviert p65-WT (rel. Induktion = 4,43) den IL-8-Promotor deutlich schwächer als die phosphomimetische Mutante S536D (rel. Induktion = 12,46). Die S536D-Mutante ist somit weniger sensitiv gegenüber einer Hemmung durch AES als der WT von p65. Die AES-abhängige Repression der p65-Aktivität wird durch eine zusätzliche Koexpression mit TAFII31 teilweise wieder kompensiert. Dabei steigt die relative Induktion des WT auf 16,23 und die der S536D-Mutante auf 20,78.

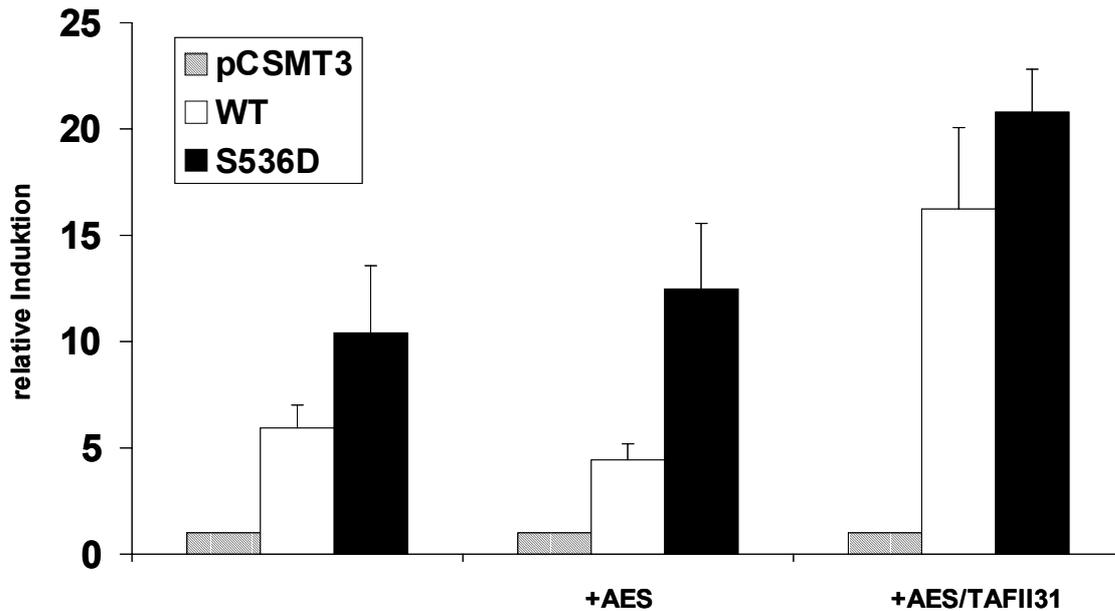


Abb. 3.14: Untersuchungen zur Interaktion zwischen p65, AES und TAFII31 mit Reporter-gen-Assays

p65^{-/-}-MEF-Zellen wurden bei einer Konfluenz von ungefähr 70% mit Expressionsplasmiden für p65-WT, p65-S536D (0,3µg), AES-(His)₆ (1,5µg) und HA-TAFII31 (1,5 µg) nach der Lipofektionsmethode transient transfiziert. Als Reporter-gen-Konstrukte wurden die Plasmide IL-8-Prom.-luc (IL-8-Promotor, 0,25 µg) und β-Galaktosidase (1 µg) verwendet. Der DNA-Gehalt wurde mit dem Plasmid pCS3MT(Träger-DNA) auf insgesamt 4,55 µg erhöht. Am nächsten Tag erfolgten die Zellyse und Messung der Reporter-gen-Aktivitäten. Es sind hierbei die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten mit dem Standardfehler des Mittelwertes gezeigt. pCSMT3: Kontrollansatz (ohne p65-Konstrukte).

3.4 Bestimmung neuer Phosphorylierungsstellen von p65 durch Peptid-Arrays

Zu Beginn der Arbeiten waren nur drei Phosphorylierungsstellen für p65 beschrieben worden: Ser276 (Zhong *et al.*, 1997), Ser529 (Wang *et al.*, 1998) und Ser536 (Sakurai *et al.*, 1999). Daher sollten mit Verwendung von Peptid-Arrays neue putative Phosphorylierungsstellen in p65 identifiziert werden. Diese Peptid-Arrays enthalten dabei die gewünschte Aminosäure-Sequenz des zu untersuchenden Proteins in Form linearer Peptide mit einer Sequenzlänge von 15 Aminosäuren, die N-terminal kovalent an einer Cellulose-Membran als Trägermatrix immobilisiert sind. Je 5 nmol Peptid sind dabei in Reihen und Spalten auf der Cellulose-membran in kleinen Kreisen mit einem Durchmesser von 3 mm aufgetragen (*Spots*). Der Sequenzbereich der Peptide wird dabei von dem ersten *Spot* zum nächsten *Spot* um drei

Aminosäuren zum C-Terminus verschoben, so dass durch die Sequenzüberlappungen zum einen eine gewisse Redundanz sichergestellt wird und zum anderen durch die Positionsverschiebung der Aminosäuren sterische Parameter wie z.B. Zugänglichkeit der Aminosäuren so wenig wie möglich inhibierend wirken. Der erste *Spot* enthält somit Peptide mit der Aminosäuresequenz 1-15, der zweite die Peptide mit den Aminosäuren 3-18 usw. Alle verwendeten Peptid-Arrays wurden freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Dr. Ronald Frank, AG Molekulare Erkennung, GBF, Braunschweig, hergestellt.

3.4.1 Bestimmung der Substratspezifität der Kinasen 1 bis 3 mit Peptid-Arrays

Da noch keine experimentellen Erfahrungen im Umgang mit Peptid-Arrays in der Arbeitsgruppe vorhanden waren, wurde zunächst die Eignung dieses Verfahrens für die Fragestellung geprüft. Um wichtige Informationen über experimentelle Parameter zu erhalten, wurden zunächst Tests mit den in der Anionenaustauschromatographie partiell aufgereinigten p65-Kinasen Kinase 1, Kinase 2 und Kinase 3 (s. 3.1) durchgeführt. Diese eigneten sich sehr gut als Teststandards, da die jeweilige Substratspezifität dieser Kinasen bereits in einem anderen Kinaseassay bestimmt worden war. In Abb. 3.15 sind die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt: Der erste Versuch wurde mit Fraktion 14, der die Kinase 3 enthielt, durchgeführt. Dabei wurde ein Reaktionsansatz mit Fraktion 14 mit einem Peptid-Array, der die Aminosäuresequenz des C-terminalen p65-Fragmentes von AS 354 bis AS 551 enthielt, in einem Reaktionsvolumen von 6 ml 30 min bei 30° C im Hybridisierungsröhrchen inkubiert. Es wurden 100 μCi γ -³²P-ATP eingesetzt, die finale Konzentration von ATP betrug 20 μM . Alle weiteren Parameter waren mit denen der anderen Kinaseassays identisch (s. Material und Methoden). In der erhaltenen Autoradiographie (Abb. 3.15 A) weisen mehrere Bereiche von *Spots* eine signifikante Intensität auf, die über der des Hintergrundes lag, auf. Besonders deutlich ist dies bei den *Spots* in den Bereichen B4-B7, C6-C10 und C15-C22, wobei im Bereich C13-C25 sich Peptide befanden, die verschiedene Sequenzausschnitte aus dem Bereich von AS 516 bis AS 551 enthielten und bei denen alle Serine ab Serin-529 in verschiedenen Kombinationen durch Alanine ausgetauscht worden waren (s. Tabelle 3.1). Kinase 3 phosphoryliert an Ser529 und sollte daher die Peptide in den *Spots* C6 bis C9 phosphorylieren, da Ser529 hier vorhanden ist. Allerdings können sich je nach Lage von Ser529 z.B. aus sterischen Gründen die kinetischen Parameter ändern. Die größten Intensitäten waren in den *Spots* C8 bis C10 feststellbar. Das C6-Peptid enthielt Ser529 und zeigte eine schwache Intensität, die *Spots* C7 bis C9 enthielten sowohl Ser529 und Ser536, während das Peptid in C10 nur Ser536 enthielt. Da sich der *Peak* von Kinase 2 mit dem des

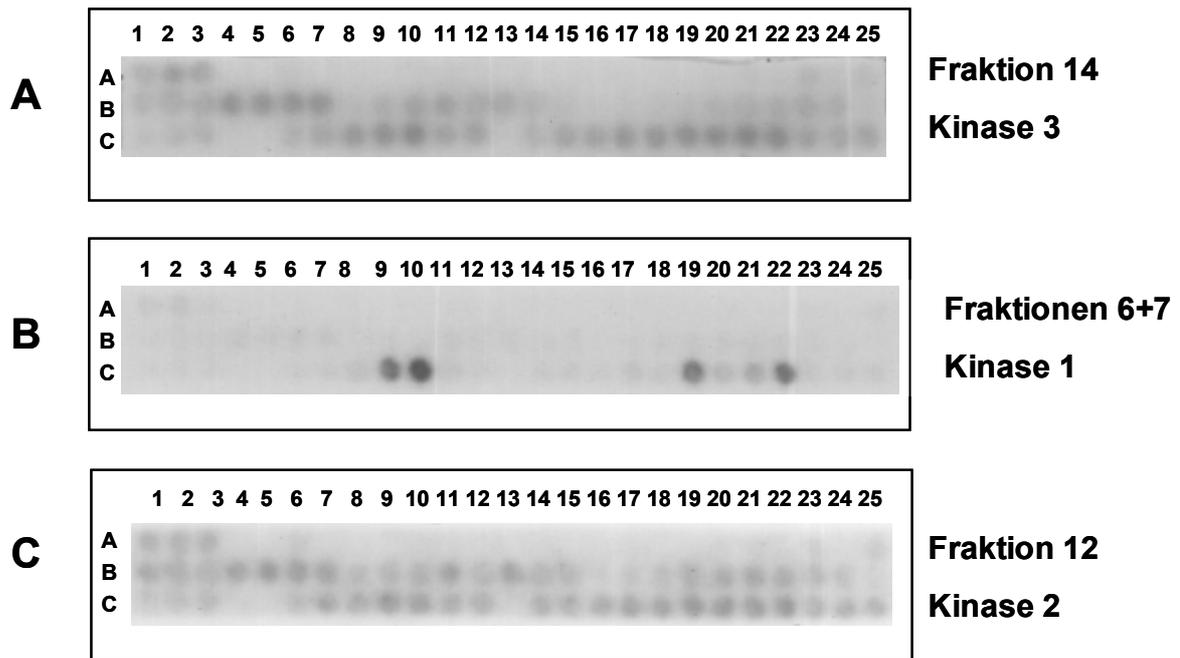


Abb. 3.15: Bestimmung der Substratspezifitäten der Kinasen 1-3 mit Peptid-Arrays

Peptid-Arrays, die den Sequenzbereich von p65 von AS 354-551 enthielten, wurden mit den in der Anionenaustauschchromatographie (s. Abb. 3.2) getrennten Kinasen 3 (A), 1 (B) und 2 (C) in dieser Reihenfolge inkubiert (Fraktionen 14, 6+7, 12). In A wurden 100 μCi $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP und 20 μM nicht-markiertes ATP, in B und C 200 μCi $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP und 10 μM nicht-markiertes ATP und somit die vierfache spezifische Aktivität wie in A verwendet.

Spot	AS-Pos.-Anfang	AS-Sequenz	AS-Pos.-Ende
C6	519	GAPGLPNGLLSGDED	533
C7	522	GLPNGLLSGDEDFSS	536
C8	525	NGLLSGDEDFSSIAD	539
C9	528	LSGDEDFSSIAD MDF	542
C10	531	DEDFSSIAD MDFSAL	545
C13	516	APLGAPGLPNGLLAG	530
C14	519	GAPGLPNGLLAGDED	533
C15	519	GLPNGLLAGDEDFSS	533
C16	519	GLPNGLLSGDEDFSA	533
C17	525	NGLLAGDEDFSSIAD	539
C18	525	NGLLSGDEDFSAIAD	539
C19	528	LAGDEDFSSIAD MDF	542
C20	528	LSGDEDFSAIAD MDF	542
C21	531	DEDFSAIAD MDFSAL	545
C22	531	DEDFSSIAD MDFAAL	545
C23	534	FSAIAD MDFSALLSQ	548
C24	534	FSSIAD MDFAALLAQ	548
C25	537	IAD MDFAALLAQISS	551

Tab. 3.1: Aminosäure-Sequenzen des Peptid-Arrays von C6-C25

Aufgeführt sind die Aminosäure-Sequenzen der Peptide in den Spots C6-C25 des in Abb. 3.15 gezeigten Peptid-Arrays mit der AS-Position des korrespondierenden Sequenzbeginns und -endes in p65.

Peaks von Kinase 3 überlappte, war in diesem Reaktionsansatz auch noch ein Teil von Kinase 2 vorhanden, wie man an der Ser536-Phosphorylierung von *Spot* C10 deutlich sieht. Es ist daher schwierig die jeweiligen Anteile der beiden Kinasen an der detektierten Phosphorylierung in diesen Bereichen genau von einander abzugrenzen. Das Ausbleiben einer Phosphorylierung in Peptid C13, das eine S529A-Mutation enthielt, und bei dem Ser536 nicht vorhanden war, belegt aber, dass ein Teil der gemessenen Intensitäten auf Ser529-Phosphorylierungen durch Kinase 3 zurückzuführen sind, während der andere Teil wohl aus der Ser536-Phosphorylierung von Kinase 2 resultiert. Bemerkenswert sind auch die hohen Intensitäten in den *Spots* von B4-B7. Interessanterweise enthielten die *Spots* B4 und B5 überhaupt keine phosphorylierbaren Reste (zugehörige Sequenztabelle s. Anhang). Offenbar führte der hohe Proteingehalt in Fraktion 14 zu unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Phosphoproteinen oder Proteinen, die radioaktives Phosphat oder ATP binden. Aus diesem Grund wurde versucht das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, indem die Menge an γ - 32 P-ATP auf 200 μ Ci erhöht und die Menge an nicht radioaktiv-markierten ATP auf 10 μ M erniedrigt wurde. Dadurch wurde die spezifische Aktivität von γ - 32 P-ATP vervierfacht. Mit den so geänderten Bedingungen wurde dann ein neuer Peptidarray mit dem Pool aus den Fraktionen 6 und 7 (Kinase 1) inkubiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.15 B zu sehen: Die *Spots* C9 und C10 wurden sehr stark phosphoryliert. Wie der Ausfall der Phosphorylierung in den mutierten Kontroll-Peptiden in C20 und C21 zeigte, phosphoryliert Kinase 1 Ser536. Außerdem ist der Hintergrund der Celluloseacetatmembran deutlich schwächer geworden. Danach wurde ein Kinaseassay mit Kinase 2 (Fraktion 12) (s. Abb. 3.15 C) durchgeführt. Hier ähnelte das Ergebnis hinsichtlich der Intensitäten der einzelnen *Spots* im Bereich C6-C22 dem Ergebnis von dem *Array* 3.15 A, da in beiden Versuchen Kinase 2 vorhanden war. Auch hier war der unspezifische Hintergrund verglichen mit dem ersten Versuch deutlich geringer. Allerdings ist ein objektiver Vergleich zwischen den einzelnen Kinasen wegen der unterschiedlichen spezifischen Aktivität der Enzyme und dem unterschiedlichen Proteingehalt der einzelnen Fraktionen nicht möglich. Diese Ergebnisse bestätigten zumindest im Fall von Kinase 1 sehr deutlich die zuvor ermittelten Substratspezifitäten der Kinasen (Abb. 3.3).

3.4.2 Peptid-Array-Analyse von Phosphorylierungsstellen in p65

Mit den zuvor ermittelten experimentellen Parametern wurde nun ein Kinaseassay mit einem Peptid-Array, der die gesamte Aminosäure-Sequenz von p65 enthielt, durchgeführt. Für den Kinase-Assay wurde ein Ganzzellextrakt aus HelatTA-Zellen, die mit IL-1 α 10 min stimuliert worden waren, eingesetzt. Die IL-1 α -regulierte Kinaseaktivität wurde zuvor in einem Festphasen-Kinaseassay mit dem Fusionsprotein GSTp65₃₅₄₋₅₅₁ als Substrat überprüft (Abb. 3.16 A).

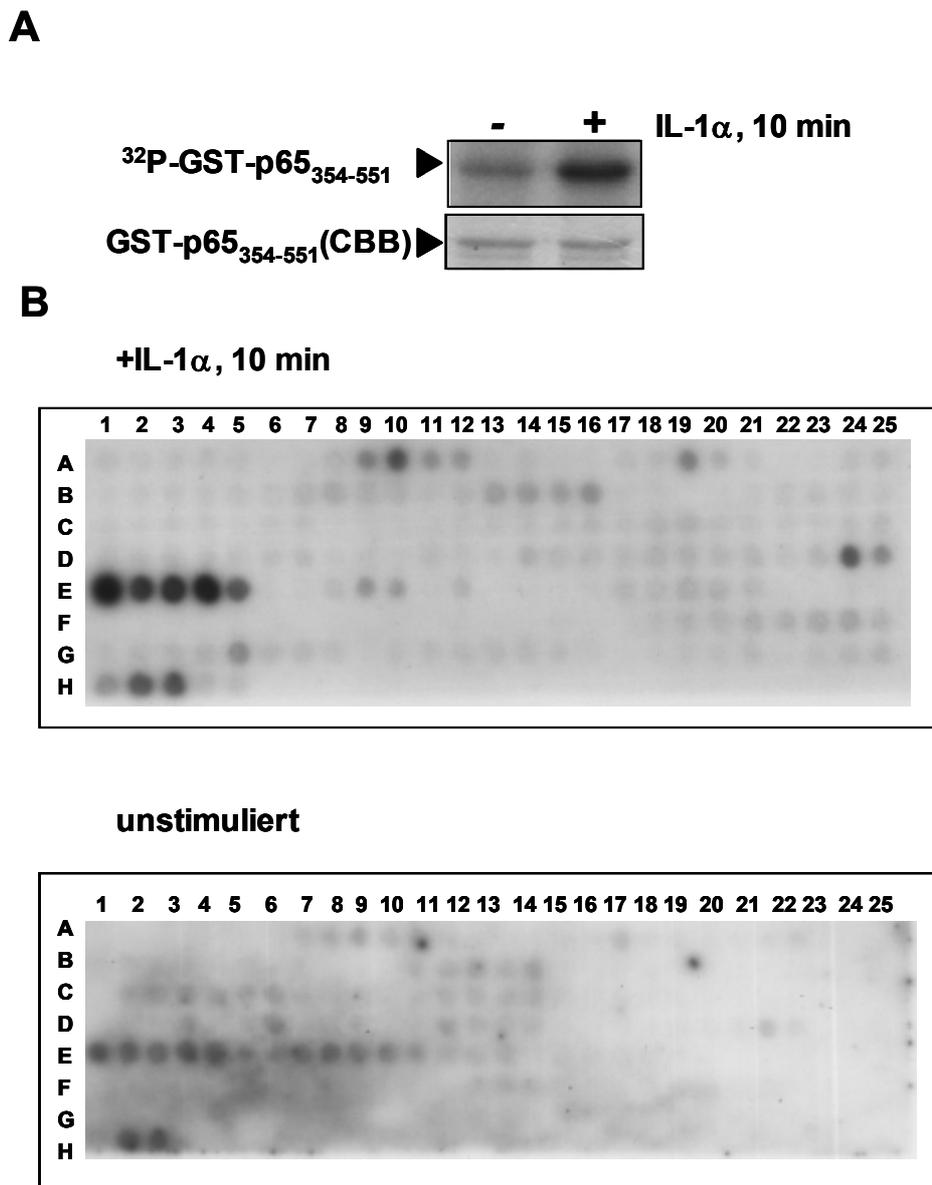


Abb. 3.16: Kinaseassay mit dem Peptid-Array (AS 1-551)

Ein Peptid-Array, der den gesamten Sequenzbereich von p65 (AS 1-551) umfasste, wurde mit einem Ganzzellextrakt (4,7 mg Protein) aus stimulierten HelatTA-Zellen (+ IL-1 α , 10 ng/ml) inkubiert (**B**). Die signalabhängige p65-spezifische Kinaseaktivität des Ganzzellextrakts war zuvor in einem Festphasen-Kinaseassay mit GST-p65₃₅₄₋₅₅₁ als Substrat getestet worden (**A**). Nach dem Kinaseassay mit den stimulierten Ganzzellextrakten wurde dieser Peptid-Array mit Alkaliner Phosphatase dephosphoryliert und für das Kontrollexperiment mit Ganzzellextrakten aus unstimulierten Zellen erneut eingesetzt.

Zur Verbesserung der Phosphorylierungsrate wurde die Inkubationstemperatur auf 45 min erhöht. Das Ergebnis von diesem Experiment ist in Abb 3.16 B gezeigt. Insgesamt wurden mehrere Bereiche benachbarter *Spots* in der Autoradiographie detektiert, die eine Intensität oberhalb des Hintergrundes aufwiesen: A9-A12, A19, B7-B8, B13-B16, C18-C19, D24-E5, E9-E10, F23-F24, G5 und H1-H3, wobei die Intensität im Bereich H1-H3 auf die Ser536-Phosphorylierung zurückzuführen war (Sequenzdaten s. Anhang).

Zu Kontrollzwecken wurde der Versuch mit einem Ganzzellextrakt aus unstimulierten HeLaTA-Zellen wiederholt. Da aus Kostengründen aber kein zweiter Peptid-Array zur Verfügung stand, wurde versucht, den gebrauchten Peptid-Array durch Behandlung mit Alkaliner Phosphatase zu dephosphorylieren. Obwohl die Dephosphorylierung nur unvollständig war, wurde der Peptid-Array dann für das Kontrollexperiment eingesetzt. Hier zeigte sich aber, dass dieses Experiment aufgrund vieler Unsicherheiten nicht auswertbar war (Abb. 3.16 B). U.a. ist in einigen Bereichen nach dem Kontrollexperiment der Hintergrund ungleichmäßig, was in dem ersten Experiment nicht der Fall ist. Zusätzlich treten im Bereich von E6-E12 neue *Spots* auf bzw. nehmen an Intensität zu. Fraglich ist aber, ob diese Effekte spezifisch für unstimulierte Zellen sind, oder ob dies Folge einer Beeinträchtigung des Peptid-Arrays im Rahmen der weiteren Behandlung war.

Um die erhaltenen Daten zu evaluieren, wurde nun ein weiterer Peptid-Array synthetisiert, auf dem sich die Peptide aus diesen *Spots* und die zugehörigen mutierten Referenzpeptide befanden. In diesen Referenzpeptiden waren alle Serine, Threonine und Tyrosine der zuvor bestimmten Peptide in verschiedenen Kombinationen durch Alanine oder im Fall von Tyrosinen durch Phenylalanine ausgetauscht worden, um den phosphorylierten Rest genau zu identifizieren (Sequenzdaten s. Anhang).

Sehr überraschend war, dass in nur zwei Bereichen die detektierte Intensität sich eindeutig auf die Serin- oder Threonin-Phosphorylierung zurückführen ließ. Es handelte sich dabei um die Bereiche B19-C2 und D19-D25. Die Aminosäuresequenzen dieser Peptide sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Wie man in Abb. 3.17 sieht, ist in den *Spots* im Bereich B19-C1 die Intensität immer signifikant schwächer, wo Threonin-308 durch ein Alanin ausgetauscht worden ist (T308A). Dies ist bei B22, B24 und C1 der Fall (s Tab. 3.2). Widersprüchlich ist allerdings, dass das Peptid in C2, das ebenfalls eine T308A-Mutation enthält, eine relativ hohe Intensität zeigt. Hierbei handelt es sich aber um die Doppelmutante T305A, T308A, bei der Threonin-305 mutiert wurde. Da aber in allen Peptiden, in denen Threonin-305 mutiert wurde (B21 und B25) die Intensität im Vergleich zum Wildtyp (B19) nicht abnimmt, kann eine Phosphorylierung von Thr305 mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden. Möglicherweise

führt die Doppelmutation in C2 zu einer verstärkten Bindung von radioaktiv-markierten Phosphat oder ATP, was so zu der erhöhten Intensität führt.

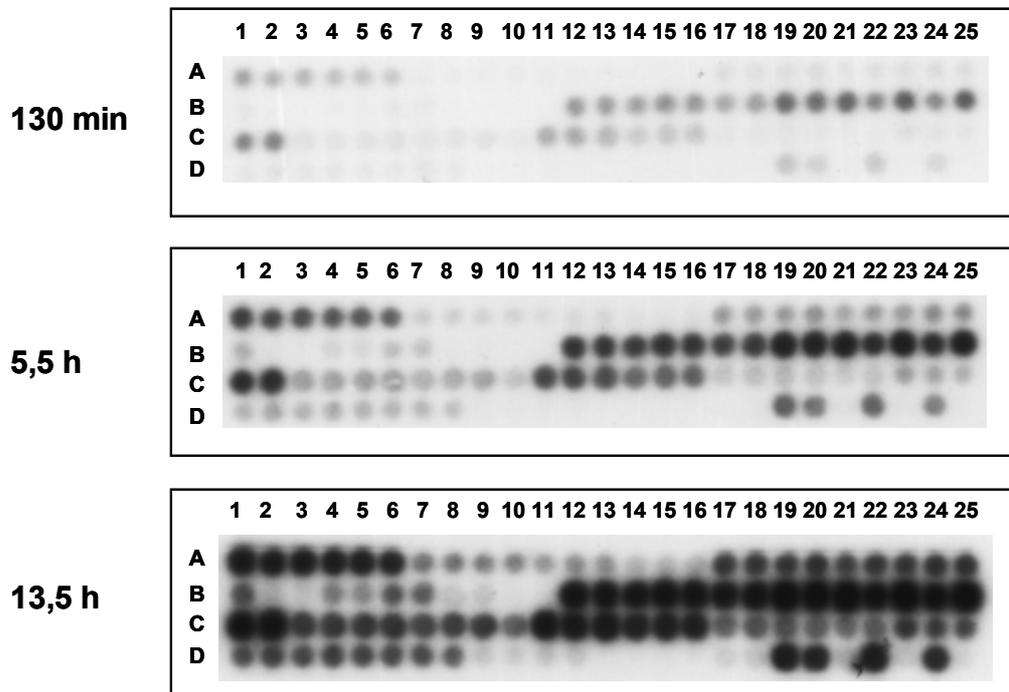


Abb. 3.17: Kinaseassay unter Verwendung eines Peptid-Arrays mit mutierten Referenzpeptiden

Zur weiteren Evaluierung der Daten, die im Peptid-Array (AS 1-551) (Abb. 3.16 B) erhalten wurden, wurde in einem weiteren Kinaseassay mit einem Ganzzellextrakt (4,7 mg Protein) aus stimulierten HeLaTA-Zellen (IL-1 α , 10 min) ein Peptid-Array verwendet, der die zuvor gefundenen Peptide mit den entsprechenden mutierten Peptiden enthielt. Bei diesen mutierten Peptiden waren in verschiedenen Permutationen alle Serine, Threonine und Tyrosine durch Alanine oder Phenylalanine ausgetauscht worden. Die regulierte Kinase-Aktivität war zuvor in einem Festphasen-Kinaseassay getestet worden (s. Abb. 3.1). Da die verschiedenen Peptid-Spots sich in der detektierten Intensität erheblich unterschieden, werden verschiedene Expositionen (130 min, 5,5 h, 13,5 h) gezeigt.

Im Bereich von D19-D25 wurden alle Peptid-Spots, bei denen Serin-468 durch Mutation entfernt wurde (D21, D23 und D25) (s. Tab. 3.2) nicht mehr phosphoryliert, woraus zu folgern ist, dass Serin-468 eine potentielle Phosphorylierungsstelle in p65 sein könnte. Alle anderen detektierten Intensitäten konnten durch Vergleich mit den mutierten Referenzpeptiden nicht eindeutig einer Serin-, Threonin oder Tyrosin-Phosphorylierung zugeordnet werden. Ein Beispiel hierfür ist der Bereich A1-A6 (Wildtyp-Sequenz in A1: KQRGMRFYKCEGRS): Die Peptid-Spots mit den mutierten Referenzpeptiden in A2-A5 zeigten dabei vergleichbare Intensitäten, so dass eine Phosphorylierung ausgeschlossen werden konnte.

In anderen Fällen erschwerten sichtbare Intensitätsunterschiede zwischen Peptid-Spots, die die gleiche Mutation, aber sich durch eine Verschiebung im Sequenzbereich oder durch eine weitere Mutation unterschieden, die eindeutige Zuordnung. Auffällig war, dass die Intensitäten in denjenigen Peptid-Spots besonders hoch war, wo die Peptide einen großen

Anteil an basischen Aminosäuren enthielten, wie z.B. im Falle des Bereiches A1-A6. Dies führte zu der Annahme, dass diese Peptide aufgrund ihrer hohen positiven Ladung unspezifisch γ - ^{32}P -ATP binden. Es wurde daher versucht, diese unspezifische Bindung durch mehrmaliges Waschen in 2 M NaCl und 10 mM ATP zu entfernen, was aber nicht gelang.

Spot	AS-Pos.-Anfang	AS-Sequenz	AS-Pos.-Ende	Mutation
B19	301	KRKRTYETFKSIMKK	315	WT
B20	301	KRKRTFETFKSIMKK	315	Y306F
B21	301	KRKRAYETFKSIMKK	315	T305A
B22	301	KRKRTYEAFKSIMKK	315	T308A
B23	301	KRKRTYETFKAIMKK	315	S311A
B24	301	KRKRAFEAFKAIMKK	315	vollständig
B25	301	KRKRAYETFKAIMKK	315	T305A, S311A
C1	301	KRKRTYEAFKAIMKK	315	T308A, S311A
C2	301	KRKRAYEAFKSIMKK	315	T305A, S308AA
D19	463	FTDLASVDNSEFQQL	477	WT
D20	463	FADLASVDNSEFQQL	477	T464A
D21	463	FTDLAAVDNSEFQQL	477	S468A
D22	463	FTDLASVDNAEFQQL	477	S472A
D23	463	FADLAAVDNSEFQQL	477	T464A, S468A
D24	463	FADLASVDNAEFQQL	477	T464A, S472A
D25	463	FTDLAAVDNAEFQQL	477	S468A, S472A, S478A

Tab. 3.2: Aminosäure-Sequenzen der Peptide in den Bereichen B19-C2 und D19-D25

Die Tabelle enthält die Aminosäure-Sequenzen der Peptide (Wildtyp und Mutationen) in den Spots B19-C2 und D19-D25 des in Abb. 3.17 gezeigten Peptid-Array mit der AS-Position des korrespondierenden Sequenzbeginns und -endes in p65.

3.4.3 Analyse der Lösungsmittelzugänglichkeit von Ser281, Thr308 und Ser468

Die im Peptid-Array erhaltenen Daten über die putativen Phosphorylierungsstellen Thr308 und Ser468 zeigen zunächst nur, dass Peptide mit diesen Sequenzen von einem Zellextrakt phosphoryliert werden können. Sie geben keine Informationen darüber, ob die Phosphorylierung von Thr308 und Ser468 in p65 strukturell überhaupt möglich ist. Da die Peptide im Array in anderen Konformationen als die entsprechenden Sequenzen im Protein vorliegen können, ist es möglich, dass die Struktur des nativen Proteins die Phosphorylierungen nicht zulässt. Ein notwendiges Kriterium dafür, dass es sich bei den beiden Aminosäuren um Phosphorylierungsstellen handelt, ist, dass sie an der Proteinoberfläche liegen und so für Proteinkinasen zugänglich sind. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass eine Aminosäure phosphoryliert werden kann, wenn sie zu sehr im Inneren des Proteins liegt, außer es kommt durch induzierte Konformationsumwandlungen zu einer veränderten Orientierung. Mit Kenntnis der Lösungsmittelzugänglichkeit lässt sich also beurteilen, ob eine Kinase überhaupt eine Aminosäure phosphorylieren kann. Anhand von Strukturdaten, z.B. aus Röntgenkristallstrukturanalysen, kann die Lösungsmittelzugänglichkeit (engl. *solvent-accessibility*) einer Aminosäure in einer bestimmten Struktur

berechnet werden. Hierzu wird der sogenannte Connolly-Algorithmus (Connolly, 1983) angewandt: Dabei werden alle Atome als kompakte Kugeln mit einem Radius, der gleich dem jeweiligen Van-der-Waals-Radius ist, behandelt. Die Zugänglichkeit zu dem Lösungsmittel Wasser wird berechnet, indem der Algorithmus das Überrollen einer Kugel (Modell für das Wassermolekül) mit dem Radius 1,4 Å, was dem Bindungsabstand der OH-Bindung in Wasser entspricht, simuliert. Die hierbei vom Mittelpunkt dieser Kugel beschriebenen Fläche ist als Lösungsmittelzugänglichkeit definiert. Dieser Wert wird nun mit der theoretischen Lösungsmittelzugänglichkeit der Aminosäure X in dem Referenzpeptid Gly-X-Gly in der aufgefalteten Konformation normalisiert. Mit dem Molekülmodellierungsprogramm WHAT IF (Vriend *et al.*, 1990), dessen Funktionen teilweise auch über das Internet angeboten werden (www.cmbi.kun.nl/wiw-cgi; Stand Januar 2004), kann näherungsweise diese Connolly-Oberfläche berechnet werden. Mit dieser Methode ließ sich die relative Lösungsmittelzugänglichkeit von Thr308 bestimmen. Zusätzlich wurde die relative Lösungsmittelzugänglichkeit von Ser281, der homologen Aminosäure in p65 zum Serin-317 in Dorsal (s. Einleitung) bestimmt, da die Alanin-Mutante S281A dieser Aminosäure zusammen mit den Mutanten von Thr308 (T308A) und Ser468 (S468A) charakterisiert wurde. Die berechneten Werte für die Lösungsmittelzugänglichkeit der Aminosäuren Ser281 und Thr308 sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Aminosäure	PDB	Beschreibung	rel. Lösungsmittelzugänglichkeit (%)	Referenz
Ser281	1IKN	I κ B α (h)-p65(m)-p50(m)-Komplex	1,79	Huxford <i>et al.</i> , 1998
Ser281	1MY5	p65(m)-Homodimerkomplex	1,12	Huxford <i>et al.</i> , 2002
Ser281	1VKX	p50(m)-p65(m)-Komplex mit κ B-Immunoglobulin-DNA-Sequenz	2,45	Chen <i>et al.</i> , 1998
Ser281	1LE5	p50(m)-p65(m)-Komplex mit κ B-IFN- β -DNA-Sequenz	1,99	Berkowitz <i>et al.</i> , 2002
Ser281	1NFI	I κ B α (h)-p65(h)-p50(h)-Komplex	1,68	Jacobs <i>et al.</i> , 1998
Ser281	1OY3	I κ B β (m)-p65(m)-p50(m)-Komplex	2,31	Malek <i>et al.</i> , 2003
Thr 308	1OY3	I κ B β (m)-p65(m)-p50(m)-Komplex	23,54	Malek <i>et al.</i> , 2003

Tab. 3.3: Berechnung der Lösungsmittelzugänglichkeit der Aminosäuren Ser281 und Thr308

Aufgeführt sind die berechneten Werte der relativen Lösungsmittelzugänglichkeit von Ser281 und Thr308. Zur Berechnung wurden dabei die oben, kurz beschriebenen Röntgenkristallstrukturen, die mit dem angegebenen Dateinamen in der Protein-Datenbank Brookhaven (PDB) geführt werden, verwendet. (m: murin, h: human). Aufgrund der hohen Homologien sind Unterschiede zwischen den humanen und murinen Formen vernachlässigbar.

Für die Berechnung der Lösungsmittelzugänglichkeit wurden dabei die in Tab. 3.3 aufgeführten Strukturdateien verwendet. Hierbei zeigte sich, dass Ser281 eine sehr geringe Lösungsmittelzugänglichkeit im Bereich von 1,12-2,45% aufweist und offensichtlich tief im Proteininneren liegt. Eine Phosphorylierung an dieser Position erscheint daher sehr unwahrscheinlich, ist allerdings nicht ganz ausgeschlossen, sofern es zu

Konformationsänderungen kommt. Der berechnete Wert für die rel. Lösungsmittelzugänglichkeit von Thr308 beträgt 23,54%, so dass eine Phosphorylierung hier sehr gut möglich ist. Zum Vergleich: Die als Phosphorylierungsstelle sehr gut charakterisierte Aminosäure Ser276 hat in den Strukturen 1IKN und 1VKX, wo keine Maskierung durch I κ B vorliegt, eine rel. Lösungsmittelzugänglichkeit von 16,59% bzw. 26,42%.

Da es bis heute keine Strukturdaten für den Bereich von p65, der Ser468 enthält, gibt und eine Berechnung der rel. Lösungsmittelzugänglichkeit daher nicht möglich war, wurde versucht anhand eines Hydrophobizitätsprofils nach der Methode von Kyte&Doolittle festzustellen, ob Ser468 an der Proteinoberfläche liegt. Bei dieser Methode wird für ein bestimmtes Sequenzintervall der Mittelwert der Hydrophobizität gebildet. Jeder Aminosäure ist nach ihrer Hydrophobizität ein bestimmter Wert zugeordnet. Hydrophobe Aminosäure haben positive Werte, hydrophile Aminosäuren negative Werte. Diese Methode erlaubt es, stark hydrophobe Bereiche, die in der Regel im Proteininneren liegen, zu erkennen.

In Abb. 3.18 ist der Verlauf des über 9 AS gemittelten Hydrophobizitätsindex von p65 dargestellt, der nach der Methode von Kyte&Doolittle (Kyte&Doolittle, 1982) mit dem im Internet angebotenen Dienst Protscale (www.expasy.org/tmp/pscale, Stand Januar 2004) berechnet wurde.

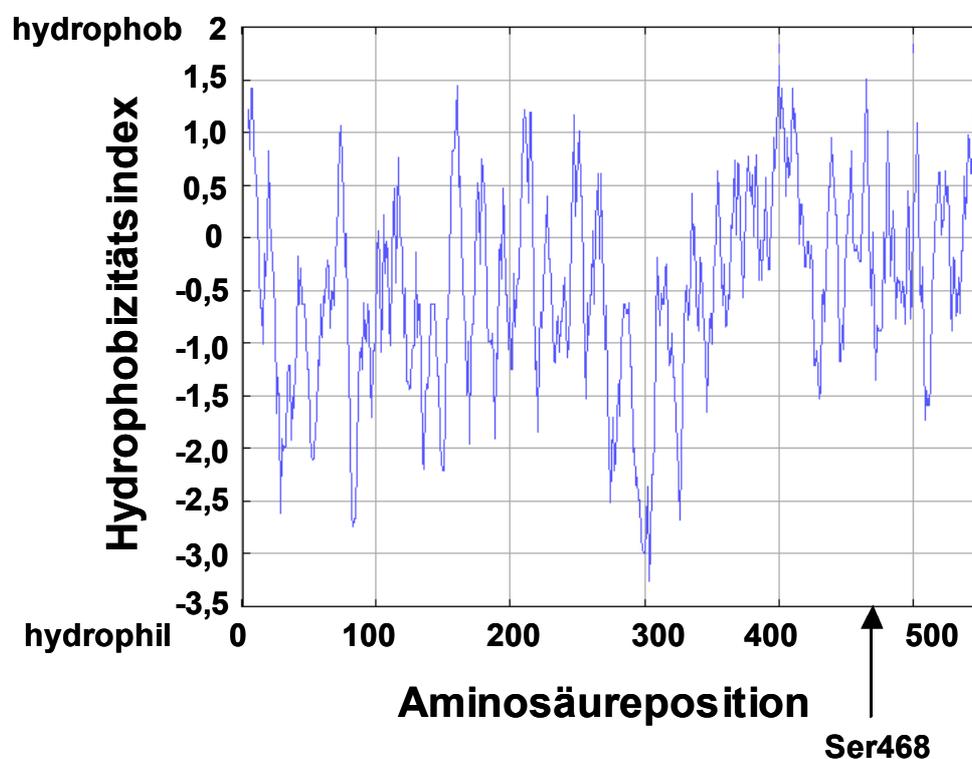


Abb. 3.18: Hydrophobizitätsprofil der AS-Sequenz von p65

Dargestellt ist der Verlauf des über neun Aminosäuren gemittelten Hydrophobizitätsindex entlang der Aminosäuresequenz von p65 nach der Methode von Kyte&Doolittle (Kyte&Doolittle, 1982).

Ser468 weist hierbei eine Hydrophobizität von -0,333 auf. Die Umgebung von Ser468 liegt dabei zwischen einem lokalen Maximum und einem lokalen Minimum der Hydrophobizitätskurve. Ser468 liegt demzufolge eher in einer polaren Region, die wahrscheinlich an der Proteinoberfläche liegt.

3.4.4 Festphasen-Kinaseassays mit T308A- und S468A-Mutanten von p65

Mit Threonin-308 und Serin-468 konnten durch die *Peptid-Arrays* zwei noch nicht beschriebene, potentielle Phosphorylierungsstellen in p65 bestimmt werden. Weil aus Kostengründen ein Kontrollversuch mit einem neusynthetisierten *Peptid-Array* mit Extrakten aus unstimulierten Zellen nicht möglich war und ein Kontrollversuch mit einem gebrauchten *Peptid-Array* zu keinen verwertbaren Ergebnissen führte (s. Abb. 3.16 B), war nicht bekannt, ob diese Stellen IL-1 α -abhängig phosphoryliert werden. Um diese Fragen zu klären, und um die Daten der *Peptid-Arrays* zu reproduzieren, wurden Festphasen-Kinaseassays mit Ganzzellextrakten von HelatTA-Zellen, die 10 min mit IL-1 α stimuliert worden waren, durchgeführt. Als Substrate wurden für die Analyse der Ser468-Phosphorylierung die Fusionsproteine GST-p65₃₅₄₋₅₅₁-Wildtyp mit den zugehörigen Mutanten S529A/S536A, S468A und S529A/S536A/S468A verwendet.

Für die Analyse der Phosphorylierung an Thr308 wurde das GST-Fusionsprotein GST-p65₂₈₅₋₄₇₀ und die zugehörige Mutante T308A eingesetzt. Wegen der größeren Aussagekraft wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 3.19 aufgeführt: Wie der Vergleich zwischen dem Wildtyp GST-p65₃₅₄₋₅₅₁ und der Doppelmutante S529A/S536A zeigt (Abb. 3.19A), nahm die regulierte Phosphorylierung deutlich ab. Eine Mutation an Ser468 hingegen bewirkte keinen messbaren Effekt. Die Dreifach-Mutante S529A/S536A/S468A zeigte ebenfalls eine leichte Abnahme der detektierten IL-1 α -regulierten Phosphorylierung im Vergleich zur Wildtyp-Form. Überraschend ist aber, dass die Dreifach-Mutante sogar eine noch höhere Phosphorylierung aufweist, als die Doppelmutante. Möglicherweise beeinflussen die Mutationen die Kinetik anderer Phosphorylierungen. Diese Resultate zeigen, dass die Phosphorylierung an Ser536 und eventuell an Ser529 einen großen Anteil an der Gesamt-Phosphorylierung des C-Terminus von p65 haben, während die putative Phosphorylierungsstelle an Ser468 unter diesen Bedingungen keinen messbaren Einfluß auf die Gesamtphosphorylierung hatte. Außerdem kann man aus diesen Resultaten folgern, dass es neben den Phosphorylierungsstellen Ser536, Ser529 und der putativen Stelle Ser468 noch weitere IL-1 α -regulierte Phosphorylierungsstellen geben könnte, wie das Ergebnis der Dreifach-Mutante zeigt. Eine IL-1 α -abhängige Phosphorylierung von Thr308 konnte so

ebenfalls nicht festgestellt werden, da auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen der Phosphorylierung des Wildtyp-Substrates und der Mutante T308A bestand (Abb. 3.19 B), allerdings nahm die Phosphorylierung des Substrates auch hier nach Stimulation zu, was auf eine regulierte Phosphorylierung in p65 im Bereich von AS 285 bis AS 470 hinweist. Insgesamt war aber die regulierte Phosphorylierung von GST-p65₂₈₅₋₄₇₀ *in-vitro* geringer als die von GST-p65₃₅₄₋₅₅₁.

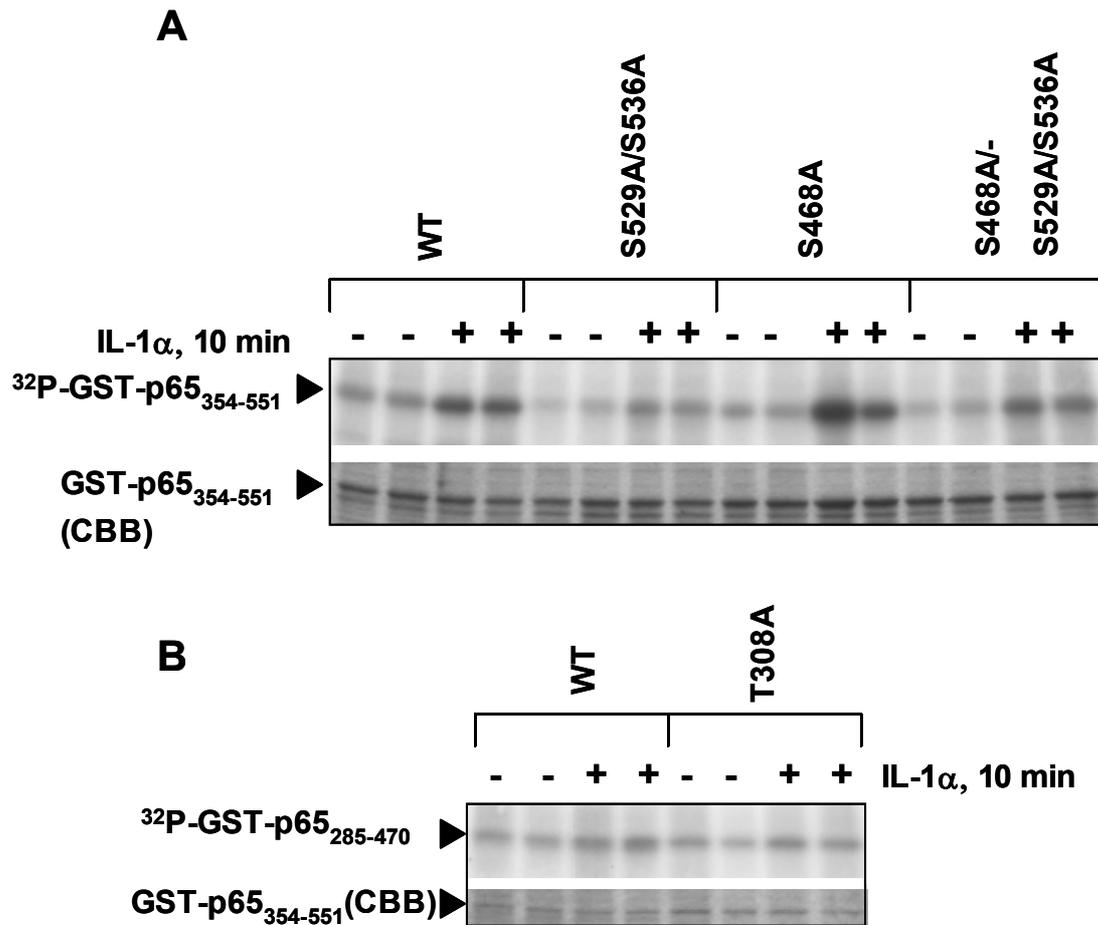


Abb. 3.19: Festphasen-Kinaseassays mit verschiedenen T308A- und S468A-Mutanten

Mit den Fusionsproteinen GST-p65₃₅₄₋₅₅₁-WT, -S529A/S536A, -S468A, -S468A/S529A/S468A und GST-p65₂₈₅₋₄₇₀-WT, -T308A als Substrate wurden Festphasen-Kinaseassays durchgeführt. Eingesetzt wurden hierbei Ganzzellextrakte (50 μ g Protein) aus unstimulierten und IL-1 α -stimulierten HeLaTA-Zellen (10 ng/ml, 10 min). Um die Aussagekraft zu verbessern, wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.4.5 Analyse der DNA-Bindung der Mutanten S281A, T308A und S468A

Um zu überprüfen, ob die Mutationen S281A, T308A und S468A die DNA-Bindung beeinflussen, wurden diese Mutanten zusammen mit dem Wildtyp in Retikulozyten-Lysaten *in-vitro*-translatiert (s. Input-Kontrolle im Westernblot Abb. 3.20) und für EMSA-Analysen mit dem NF- κ B-Konsensus-Motiv eingesetzt (Abb. 3.20).

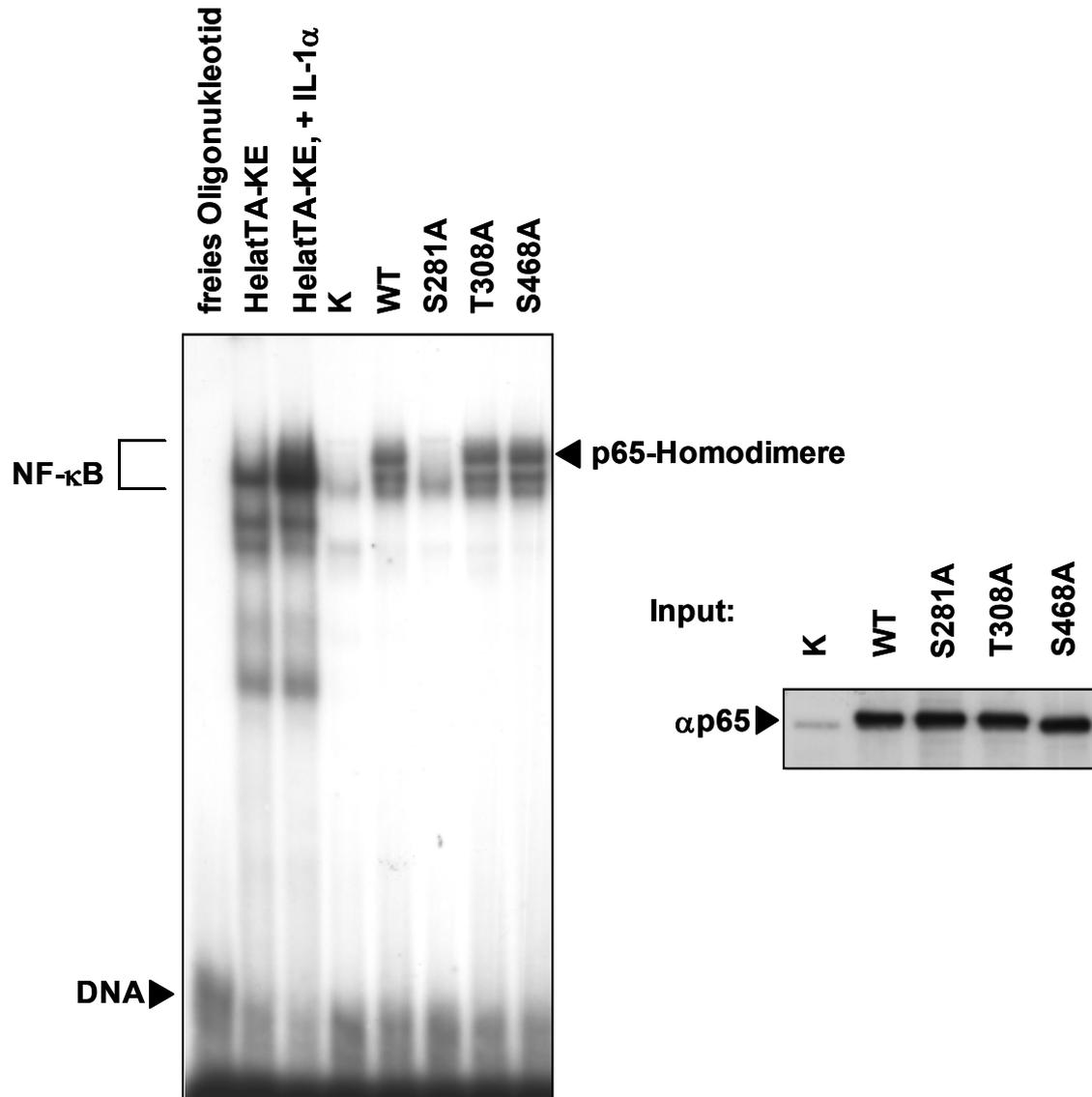


Abb. 3.20: Untersuchungen zur DNA-Bindung der Mutanten S281A, T308A und S468A

Die Bindung an das NF- κ B-Konsensusmotiv der Mutanten S281A, T308A und S468A wurde im EMSA untersucht. Hierzu wurden die Mutanten in Retikulozytenlysaten *in-vitro*-translatiert und je 1,5 μ l des *in-vitro*-Translationsansatzes für die DNA-Bindungsreaktion eingesetzt (s. Inputkontrolle von je 1 μ l Translationsansatz im Westernblot). Zum besseren Vergleich wurden zusätzlich Reaktionsansätze mit Kernextrakten (KE) (10 μ g Protein) aus unstimulierten und stimulierten HelatTA-Zellen (IL-1 α , 10 ng/ml) aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und autoradiographiert.

Neben einem Retikulozyten-Ansatz ohne Translationsprodukt wurden HelatTA-Kernextrakte aus unstimulierten und IL-1 α -stimulierten Zellen zu Kontrollzwecken getestet. Es wurden bei den *in-vitro*-Translationsprodukten zwei p65-spezifische und eine unspezifische Bande detektiert, wie der Vergleich mit dem Kontrollansatz zeigt. Die detektierten NF- κ B-Komplexe

der Translationsprodukte enthielten dabei p65-Homodimere und wiesen daher eine etwas geringere elektrophoretische Mobilität auf als die NF- κ B-Bande in den Kernextrakten, da diese vermutlich auch noch NF- κ B-Komplexe mit einer anderen Zusammensetzung (z.B. p65-p50-Heterodimere) enthielten. Das Auftreten zweier p65-spezifischer Banden kann möglicherweise durch den Zerfall von DNA-Protein-Komplexen während der Elektrophorese oder durch Interaktionen mit Proteinen aus dem Retikulozyten-Lysat erklärt werden. Ein Einfluss der Mutationen in Thr308 und Ser468 konnte, wie der Vergleich mit dem Wildtyp zeigt, nicht festgestellt werden. Sehr deutlich dagegen ist der Unterschied bei der Mutante S281A: Eine p65-spezifische Bande ist kaum zu sehen.

Nach diesen Daten bindet bei vergleichbaren Proteinmengen die S281A-Mutante von p65 nicht mehr an DNA, während die Mutanten T308A und S468A eine vergleichbare Bindungsaffinität wie der Wildtyp besitzen.

3.4.6 Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität und Kerntranslokation der Mutanten S281A, T308A und S468A

Der Einfluss der Mutationen S281A, T308A und S468A auf die transkriptionelle Aktivität von p65 wurde darauf im Reporteragen-Assay mit dem Reporteragen-Plasmid NF- κ B₃luc in HelatTA-Zellen näher untersucht. Dabei zeigten alle Mutanten eine starke IL-1 α -abhängige Aktivität (Abb. 3.21 A). Die Mutanten S281A (rel. Induktion = 12,24), T308A (rel. Induktion = 13,77) und S468A (rel. Induktion = 13,03) zeigten nur eine geringfügige Abnahme in der induzierten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (rel. Induktion = 14,08). Zusätzlich konnte bereits bei allen Mutanten eine konstitutive transkriptionelle Aktivität festgestellt werden. Ein signifikanter, inhibitorischer oder auch aktivierender Einfluss dieser Mutationen konnte in HelatTA-Zellen somit nicht gemessen werden. Hierbei muss aber berücksichtigt werden, dass diese Zellen endogenes p65 exprimieren. Dies könnte erklären, warum die Überexpression der mutierten Proteine keinen starken Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität ausübt. Aufgrund der drastisch verminderten DNA-Bindungsaffinität (Abb. 3.20) der S281A-Mutante wäre zumindest bei dieser Mutante ein größerer funktioneller Effekt *in-vivo* zu erwarten gewesen. Aufgrund der Nähe von Thr308 und Ser281 zu der Kernlokalisierungssequenz von p65 (AS 301-304) wurde im Folgenden anhand von Westernblots überprüft, ob Phosphorylierungen an diesen Positionen die nukleäre Translokation von p65 regulieren. Bisher gibt es in der Literatur keine Daten, nach denen der Kerntransport von p65 unabhängig von der Degradation von I κ B reguliert wird, obwohl die S317A-Mutante des *Drosophila* Homologons Dorsal zu einer Hemmung der nukleären Translokation führt (Drier *et al.*, 1999).

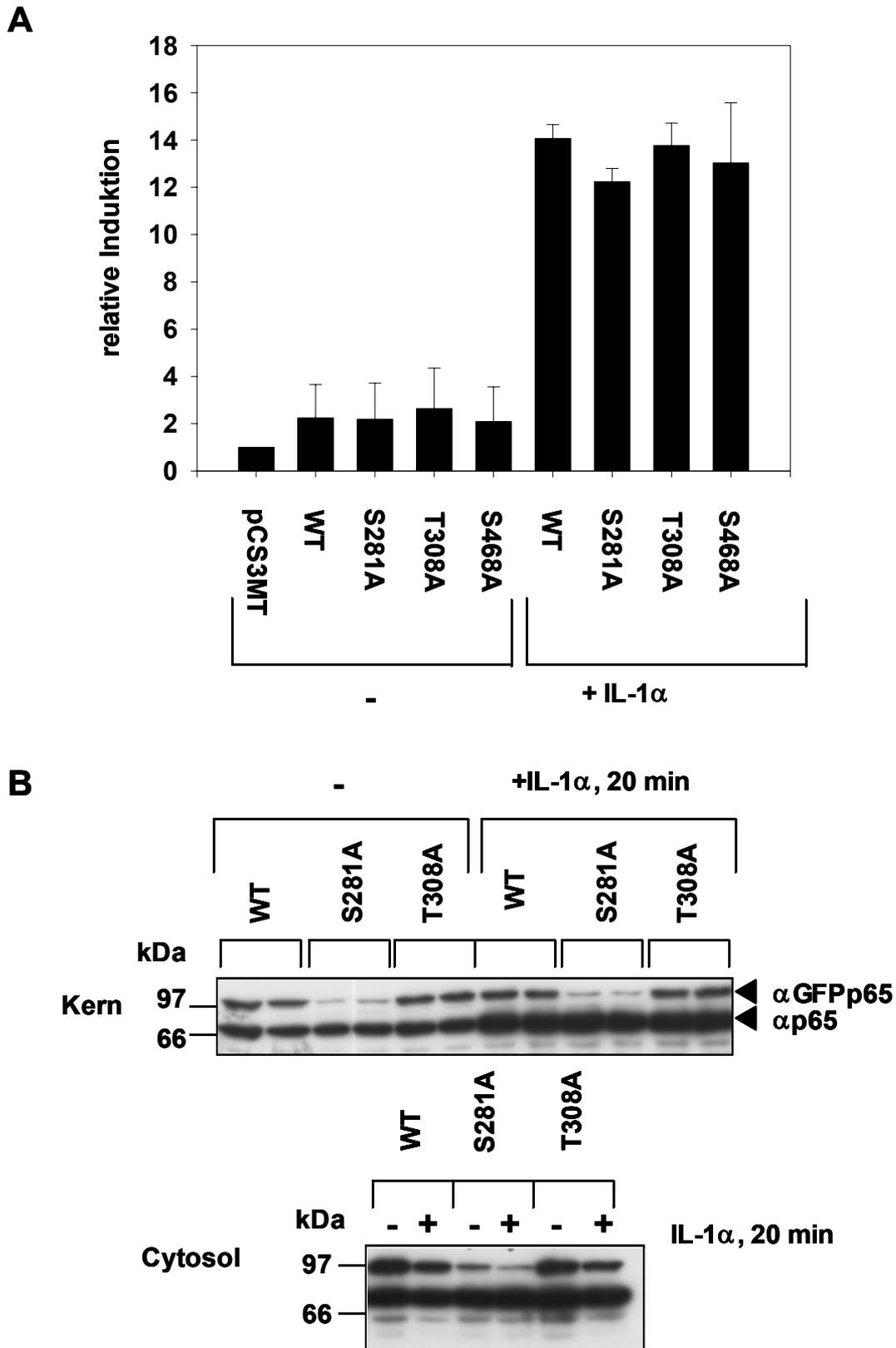


Abb. 3.21: Analyse der IL-1 α -abhängige Reporter-gen-Aktivität und der Kerntranslokation der Mutanten S281A, T308A und S468A in HelatTA-Zellen

A: HelatTA-Zellen wurden in Sechs-Lochplatten (4×10^5 pro Loch) ausgesät und mit je $0,1 \mu\text{g}$ Expressionsplasmid für p65-WT und die Mutanten S281A, T308A und S468A sowie für β -Galaktosidase transient transfiziert. Als Reporter-gen-Plasmid fungierte NF- $\kappa\text{B}_3\text{luc}$ ($0,25 \mu\text{g}$). Die Gesamtmenge an DNA wurde mit Träger-DNA (Plasmid pCS3MT) auf $3,75 \mu\text{g}$ aufgefüllt. Am folgenden

(Fortsetzung s. nächste Seite)

Tag erfolgten nach IL-1 α -Stimulation (10 ng/ml, 4 h), die Zellyse und die Reporter-genaktivitätsmessungen. Dargestellt sind die Werte für die relative Induktion aus zwei unabhängigen Messungen mit dem Standardfehler des Mittelwertes. **B:** 3,15x10⁶ HeLaTA-Zellen wurden in T75-Flaschen ausgesät und am folgenden Tag mit den Expressionsplasmiden für folgende Proteine transient transfiziert: GFP-p65-WT/-S281A,-T308A (0,85 μ g) und 20,4 μ g pCS3MT-Vektor (Träger-DNA). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit IL-1 α stimuliert (10 ng/ml, 20 min) und lysiert. Die erhaltenen Kernextrakte und cytosolischen Fraktionen (70 μ g Protein) wurden dann im Westernblot mit einem Antikörper gegen p65 (α p65/ α GFP65) analysiert. Bei dem Westernblot in A (Kernextrakte) wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Darum wurde in ein Fusionsprotein aus GFP und p65 die zu S317A-Dorsal homologe Mutation S281A und die Mutation T308A eingeführt. Die Verwendung eines GFP-Fusionsproteins ermöglicht, das Verhalten der p65- Mutanten unabhängig vom endogenen p65 zu analysieren, vorausgesetzt der GFP-Teil beeinträchtigt nicht die Funktion von p65. Diese Expressionsplasmide wurden dann in HeLaTA-Zellen transient transfiziert und die IL-1 α -abhängige nukleäre Translokation dieser Mutanten wurde im Westernblot gemessen (Abb. 3.21 B). Hierbei ergab sich, dass kein signifikanter Unterschied in der nukleären Translokation zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen festzustellen war. Die Bandenintensität von GFP-p65-Wildtyp in den Kernextrakten aus unstimulierten Zellen ist ungefähr gleich mit der aus den Extrakten stimulierter Zellen. Auch bei den Mutanten S281A und T308A ist kein signifikanter Unterschied diesbezüglich feststellbar. Auffällig ist aber, dass die Expressionseffizienz der S281A-Mutante, wie man an der schwachen Bandenintensität sehen kann, sehr gering war. Dieses Ergebnis konnte mehrmals reproduziert werden. Sehr gut ist in Abb. 3.21 B hingegen eine IL-1 α -abhängige Kerntranslokation des endogenen p65 zu erkennen. Dies belegt, dass unter den gewählten Stimulationsbedingungen eine induzierte Kerntranslokation durchaus detektierbar ist. Tatsächlich zeigen, wie man in dem Westernblot der cytosolischen Fraktion in Abb. 3.21 B erkennen kann, auch die GFP-Fusionsproteine eine regulierte Abnahme im Cytosol, wobei die detektierten Intensitäten der Mutante S281A wiederum wesentlich kleiner ist. Der signalinduzierte Transport scheint aber kaum die nukleäre Konzentration der Mutanten zu beeinflussen. Offenbar kommt es durch die Überexpression der GFPp65-Mutanten zu einer Übersättigung von Faktoren wie z.B. I κ B, die p65 normalerweise im Cytosol zurückhalten, was zu einer massiven konstitutiven nukleären Translokation der Mutanten führt. Die im Westernblot festgestellte konstitutive Translokation könnte die konstitutive transkriptionelle Aktivität der Mutanten im Reporter-gen-Assay erklären. Um aussagekräftigere Daten über die transkriptionelle Aktivität der Mutanten zu erhalten, wurden p65-defiziente MEF-Zellen transfiziert, da diese Zellen kein endogenes p65

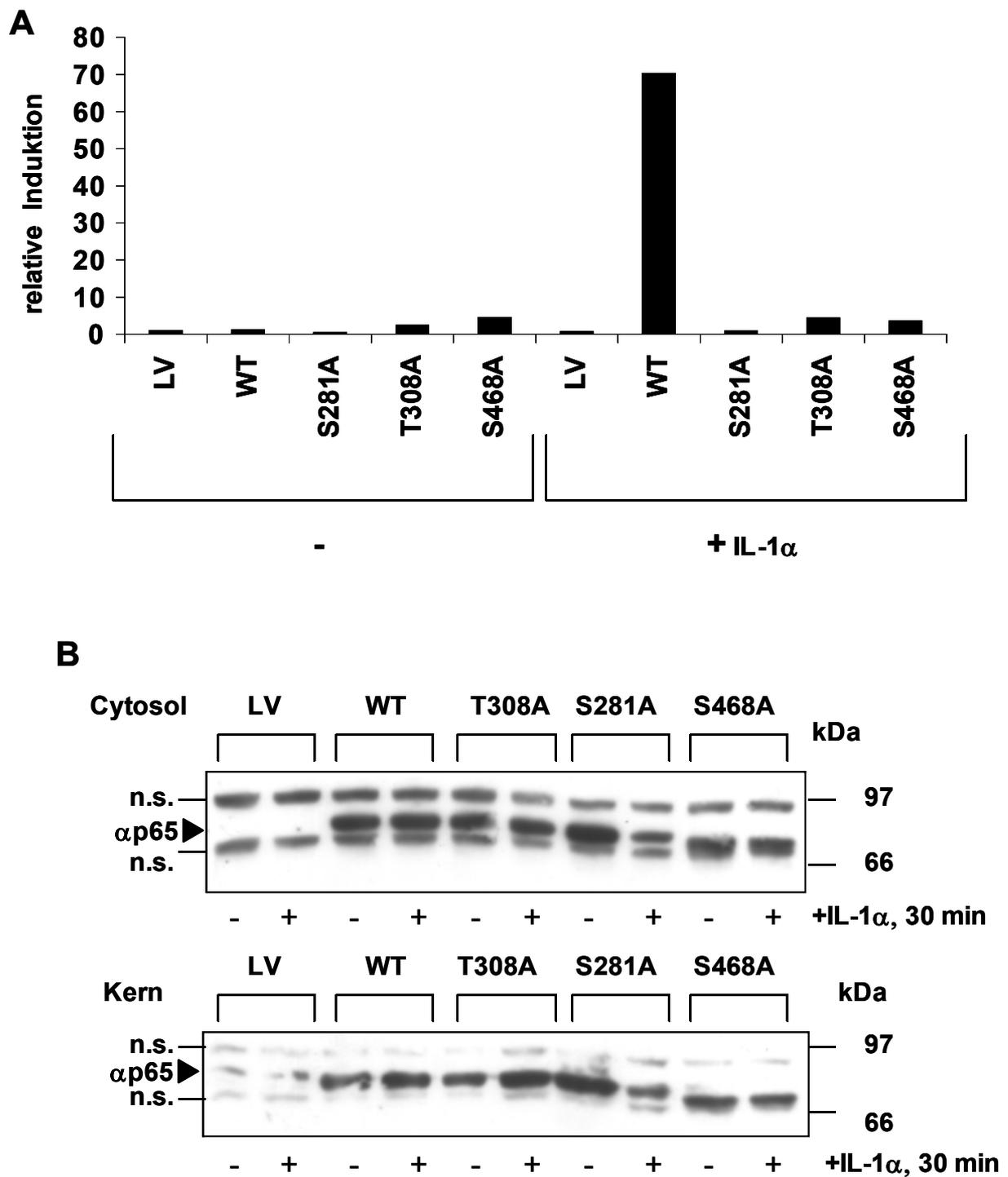


Abb. 3.22: Analyse der IL-1 α -abhängigen Reporter-gen-Aktivität und der Kerntranslokation der Mutanten S281A, T308A und S468A in p65-defizienten MEF-Zellen

A: p65-defiziente MEF-Zellen wurden in Sechs-Lochplatten ausgesät und bei einer Konfluenz von ungefähr 70% mit Expressionsplasmiden für p65-WT oder -Mutanten (0,3 μ g) sowie mit den Reporter-gen-plasmiden IL-8 Prom.-luc (IL-8-Promotor) (0,25 μ g) und β -Gal. (0,5 μ g) transient transfiziert (Lipofektionsmethode). Die Gesamt-DNA-Menge wurde mit dem Plasmid pCS3MT auf 3,75 μ g aufgefüllt. Am nächsten Tag erfolgten die Stimulation mit IL-1 α (10 ng/ml, 4 h), die Zellyse und die Messung der Reporter-gen-Aktivität.

B: p65-defiziente MEF-Zellen wurden in Sechs-Lochplatten ausgesät und bei einer Konfluenz von ungefähr 70% mit Expressionsplasmiden für p65-WT bzw. -Mutanten (0,5 μ g) und mit dem Plasmid pCS3MT (0,5 μ g) nach der Lipofektionsmethode transient transfiziert. Am nächsten Tag erfolgten die Stimulation mit IL-1 α (10 ng/ml, 30 min) und die Präparation der Kernextrakte und der cytosolischen Fraktionen. Für den Westernblot mit α p65 wurden je 100 μ g Gesamtprotein pro Ansatz verwendet. Abk.: LV: Leervektor (= Kontrolle nur mit pCS3MT), n.s.: nicht-spezifisch.

mehr enthalten. Zudem hatte dies den Vorteil, dass in diesem Zelltyp keine Fusionsproteine eingesetzt werden mussten. Denn es konnte aufgrund der vorherigen Experimente nicht ausgeschlossen werden, dass der GFP-Teil in den Fusionsprotein die p65-spezifische Funktion beeinflusste. In einem ersten Experiment (Abb. 3.22) konnten im Gegensatz zu den Experimenten in den HeLaTA-Zellen deutliche Effekte festgestellt werden.

Alle drei Mutanten zeigen eine drastische Reduktion der IL-1 α -abhängigen NF- κ B-Aktivität. Da es im zeitlichen Rahmens dieser Arbeit nicht mehr möglich war, Wiederholungen dieses Experimentes durchzuführen, ist dieses Resultat aber mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Auch in den p65-defizienten MEF-Zellen ist bereits eine konstitutive nukleäre Translokation feststellbar, die sich nach Stimulation nicht mehr ändert. Interessant ist hierbei, dass, anders als in HeLaTA-Zellen, die S281A-Mutante ähnlich stark exprimiert wurde wie der Wildtyp. In den IL-1 α -stimulierten Fraktionen war die Menge der exprimierten S281A-Mutante aber etwas vermindert, obwohl vergleichbare Proteinmengen aufgetragen worden sind (s. nicht-spezifische Banden).

3.4.7 Molekülmodellierung der homologen Mutanten p65-S281A und Dorsal-S317A

Die S281A-Mutante von p65 wurde, wie die Westernblots in Abb. 3.21 zeigten, nur sehr schwach exprimiert. Außerdem verlor p65 durch diese Mutation die Fähigkeit, an DNA zu binden (s. EMSA-Experiment, Abb. 3.20). Diese Befunde könnten durch eine Destabilisierung infolge des Serin-Alanin-Austausches erklärt werden. Da mittlerweile mehrere Strukturdaten von p65 vorlagen, wurde versucht, die S281A-Mutante zu modellieren (s. Material und Methoden). Weil diese Mutation die DNA-Bindung von p65 stark beeinträchtigte, wurde die gelöste Röntgenkristallstruktur eines Heterodimers, bestehend aus p50 und p65, das an der Interferon β - κ B-Erkennungssequenz bindet (Berkowitz *et al.*, 2002; 1LE5.PDB), für die Modellierung herangezogen. Mit dem Proteinmodellierungsprogramm DEEP VIEW v3.7 wurde Ser281 in p65 durch Alanin ausgetauscht. Für Alanin wurde dabei das am besten bewertete Rotamer ausgewählt. Im Anschluss wurde eine lokale Energieminimierung (Kraftfeld: GROMOS96 (van Gunsteren *et al.*, 1996), Algorithmus: *steepest descent*, 20 Zyklen) durchgeführt, um das Proteinmodell relaxieren zu lassen. Im Anschluss erfolgte die Berechnung der Wasserstoffbrückenbindungen und die Analyse des Moleküls. In Abb. 3.23 ist der Bereich um Ser281 im Wildtyp bzw. der Bereich um Ala281 in der Mutante dargestellt:

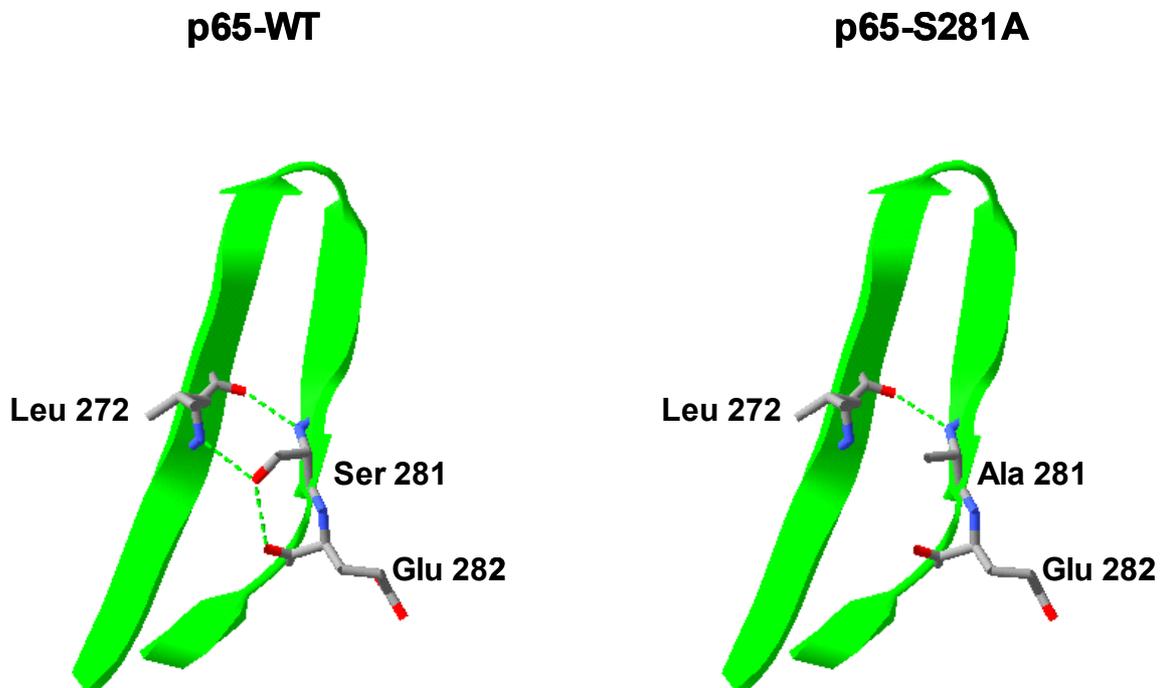


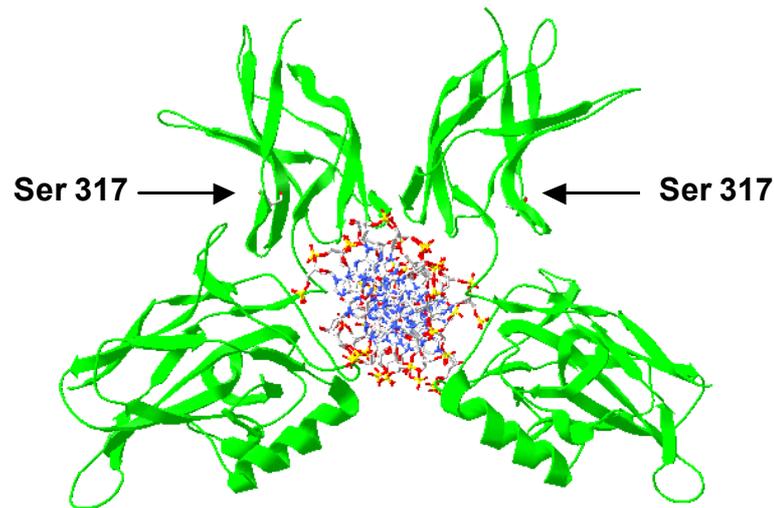
Abb. 3.23: Strukturmodell von p65 im Bereich um S281

Es ist der Bereich um Ser281 in p65 in der Struktur (1LE5.PDB) vor und nach Austausch durch Alanin dargestellt. Das Peptidrückgrat ist in der Bänder-Darstellung (grün) dargestellt. Die Aminosäuren in Position 272, 281 und 282 werden in der Stabmodell-Form abgebildet (grau: Kohlenstoff, Blau: Stickstoff, Rot: Sauerstoff). Grün-gestrichelte Linie: Wasserstoffbrückenbindung.

Die AS-Position 281 von p65 ist in einer β -Faltblatt-Struktur zweier anti-parallel verlaufender Stränge lokalisiert. Die Hydroxy-Funktion von S281 kann dabei zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden: Zum einen kann sie als Akzeptor für eine Bindung zwischen der NH-Funktion von Leucin-272 auf dem gegenüberliegenden Strang fungieren. Zum anderen kann Serin-281 als Donor eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Carbonylfunktion von C_{α} von Glutamat-282 ausbilden (Wasserstoffatome werden in Abb. 3.23 nicht gezeigt, da in den Strukturdaten aus Röntgenkristallstrukturanalysen in der Regel keine genauen Informationen über Wasserstoffatome vorliegen). Demnach könnte Ser281 zur strukturellen Stabilität dieser Region maßgeblich beitragen, indem es das Ende des einen Faltblattstranges mit dem gegenüberliegenden Faltblattstrang verbrückt. Die Entfernung dieser Wasserstoffbrückenbindungen durch einen Alanin-Austausch könnte daher diese Struktur destabilisieren, wie Abb. 3.23 illustriert, oder sogar zu einer veränderten Faltung führen. Um festzustellen, ob dieser Befund auch auf das homologe Protein Dorsal übertragbar ist, wurde ein Strukturmodell von Dorsal im Bereich von AS 47–327 generiert. Als Strukturvorlagen diente hierfür die gelöste Röntgenkristallstruktur eines Homodimers von Gambif1 (Cramer *et al.*, 1999; 1bvo.PDB), gebunden an der Dorsal-Bindungsstelle in dem *Drosophila Gen zen* (Sequenzidentität: 74,86%). Bei Gambif1 handelt es sich um das Dorsal-Homologon aus der Stechmücke *Anopholes Gambiae*. Für den C-terminalen Bereich wurde die Struktur des humanen c-rel-Proteins (Huang, D.B. *et al.*, 2001; 1gji.PDB), ebenfalls gebunden an DNA (Sequenzidentität: 47,16%), verwendet (Alignment der verwendeten Sequenzen: s. Anhang). Die modellierte Struktur des Dorsal₄₇₋₃₂₇-Monomers zeigte nach einer Prüfung mit dem Strukturevaluierungsprogramm WHAT CHECK (Hooft *et al.*, 1996) keine offensichtlichen Strukturanomalien auf. Alle geprüften stereochemischen Parameter (u.a. Bindungslängen, -winkel) lagen in akzeptablen Bereichen. Besonders hervorzuheben ist, dass der für die Qualität des Peptid-Rückgrates wichtige Ramachandra-Z-Wert mit $-2,632$ zufriedenstellend war. Auch bezüglich der Seitenkettenkonformation (χ^1/χ^2 -Z-Wert: 1,147) zeigte das Modell eine gute Qualität. Durch Superposition von zwei Dorsal-Monomeren mit den an DNA-gebundenen Gambif1-Monomeren wurde dann der Dorsal-Homodimer-DNA-Komplex gebildet. Eine iterative Anpassung resultierte in einem RMSD-Wert (Wurzel der mittleren, quadratischen Abweichung, engl. *root mean square deviation*) von 0,74 Å im Vergleich zum Gambif1-Komplex. Die räumliche Orientierung der hochkonservierten Aminosäuren in Gambif, die Kontakte zur DNA ausbildeten, entsprach im hohen Maße der der Aminosäuren in Dorsal. Mit dem Programm WHAT IF (Vriend, 1990) wurde dann die Lösungsmittelzugänglichkeit von Ser317 berechnet. Der errechnete Wert

betrug hierfür 1,22%. Danach liegt Ser317 tief im Protein-Inneren, ähnlich wie Ser281 in p65 (s. Tab. 3.3).

A



B

Dorsal-WT

Dorsal-S317A

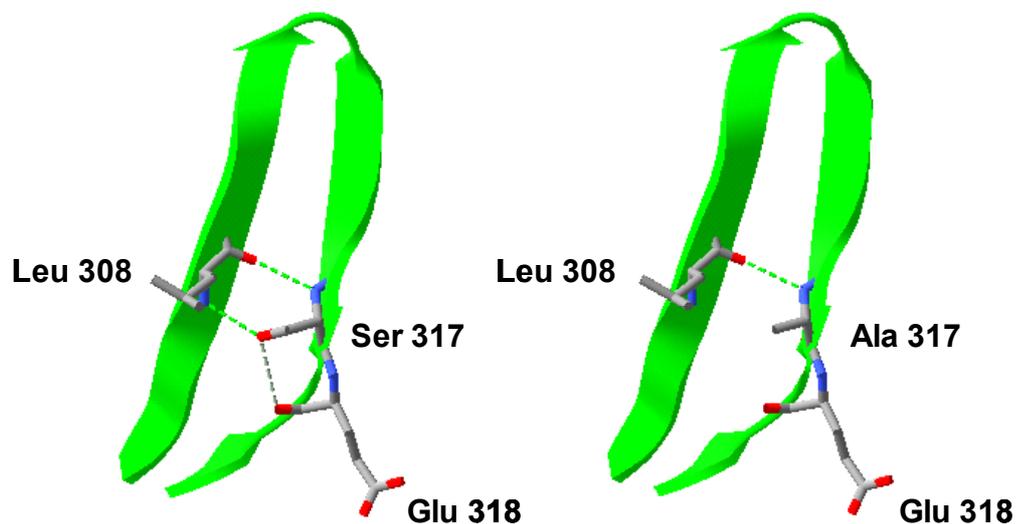


Abb. 3.24: Strukturmodell von Dorsal₄₇₋₃₂₇

A: Durch Homologiemodellierung wurde mit den Strukturdaten 1bvo.PDB (Gambif-DNA-Komplex) und 1gji.PDB (c-rel-DNA-Komplex) ein Strukturmodell von einem Dorsal₄₇₋₃₂₇-Homodimer, gebunden an der Dorsal-Erkennungssequenz im *zen*-gen, erstellt. Das Peptidrückgrat der Dorsal-Monomere ist in der Bänder-Darstellung (grün) abgebildet. Die DNA ist in der Stabmodell-Form dargestellt (grau: Kohlenstoff, blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff).

B: Region um Position 317 im WT und in der S317A-Mutante. Das Peptidrückgrat wurde in der Bänder-Form (grün), die Aminosäuren in Position 308, 317 und 318 in der Stabmodell-Form abgebildet. Grün-gestrichelte Linie: Wasserstoffbrückenbindung.

Das Modell des an DNA-gebundenem Dorsal-Komplexes ist Abb. 3.24 A gezeigt. Sehr gut ist die für alle Rel-Proteine typische schmetterlingsartige Struktur zu erkennen. Serin-317 liegt wie Serin-281 in p65 in einer β -Faltblattstruktur in der C-terminal gelegenen

Dimersierungsdomäne. Dieser Bereich ist dabei nicht direkt an intermolekularen Kontakten zur DNA oder zu dem anderen Monomer beteiligt.

Die Modellierung von der S317A-Mutation, die homolog zur S281A-Mutation in p65 ist, führte zu einem vergleichbaren Ergebnis (s. Abb. 3.24 B). Auch hier eliminiert der Austausch von Serin durch Alanin die beiden Wasserstoffbrücken im Dreieck zwischen der NH-Funktion von Leucin-308 (entspricht Leucin-272 in p65), Serin-317 (entspricht Serin-281 in p65) und Glutamat-318 (entspricht Glutamat-282 in p65). Dieses Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk scheint in Rel-Proteinen hochkonserviert zu sein und könnte somit von großer Bedeutung für die Stabilität dieser Faltblatt-Struktur sein.

4. Diskussion

Einleitung

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation der NF- κ B-Untereinheit p65 durch Phosphorylierungen näher zu untersuchen. Ein grundsätzliches Problem bei der Erforschung von mehrfach-phosphorylierten Proteinen wie p65 ist die selektive Analyse dieser Phosphorylierungen in Bezug auf die jeweiligen Signalwege und die biologische Funktion. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden mehrere experimentelle Strategien parallel verfolgt, um einzelne Phosphorylierungsstellen und die daran beteiligten Proteinkinasen selektiv zu untersuchen.

Nach ersten Literaturdaten und den hier vorgestellten und im Folgenden diskutierten Befunden nimmt die Phosphorylierung an Serin-536 eine zentrale Rolle bei der Regulation der Aktivität von NF- κ B ein. Die experimentelle Voraussetzung für die selektive Charakterisierung dieser Phosphorylierung war die Verfügbarkeit eines phospho-spezifischen Antikörpers gegen diese Phosphorylierungsstelle. Denn erst mit diesem Antikörper war es möglich, die physiologisch relevanten Regulationsmechanismen an Serin-536 zu detektieren. Dies illustriert die große Bedeutung von phospho-spezifischen Antikörpern bei der Untersuchung mehrfach-phosphorylierter Proteine. Mit dieser Vorgehensweise konnte der Einfluss der Kinase IKK, sowie weiterer verschiedener Signalwege und Stimuli auf die Serin-536-Phosphorylierung untersucht werden. Im Anschluss erfolgte dann die funktionelle Charakterisierung dieser Phosphorylierung *in-vitro* und *in-vivo*.

Ein weitere, wichtige Frage bezüglich der phosphorylierungsabhängigen Regulation von NF- κ B war, ob noch andere Phosphorylierungsstellen die Aktivität von NF- κ B maßgeblich beeinflussen. Zur Bearbeitung dieser Frage wurde ein Peptid-Array in einem *in-vitro*-Kinaseassay eingesetzt. Die funktionelle Bedeutung der so ermittelten putativen Phosphorylierungsstellen Threonin-308 und Serin-468 wurde in den beschriebenen Experimenten eingehender untersucht, was im zweiten Teil der folgenden Diskussion eingehender behandelt wird.

4.1 Chromatographische Trennung und primäre Charakterisierung von p65-TAD-Kinasen

Von besonderem Interesse war es zunächst, neue Proteinkinasen zu identifizieren, die die Transaktivierungsdomäne (TAD) von p65 phosphorylieren. Mit der zu diesem Zweck durchgeführten Anionenaustauschchromatographie konnten drei unterscheidbare Kinase-Aktivitäten in HelatTA-Ganzzellextrakten getrennt werden, die die TAD von p65 *in-vitro* phosphorylieren (Abb. 3.2): Kinase 1 und Kinase 2 phosphorylieren IL-1 α -abhängig Ser536 und Kinase 3 phosphoryliert Ser529 (Abb. 3.3). Eine signifikante IL-1 α -abhängige Regulation der Aktivität konnte für Kinase 3 nicht festgestellt werden. Diese Ergebnisse lagen in Übereinstimmung mit den bereits publizierten Daten, wonach Casein-Kinase II (Abk.: CKII oder CK2) Ser529 phosphoryliert (Wang *et al.*, 1998) und IKK β Ser536 (Sakurai *et al.*, 1999, 2003; Kishore *et al.*, 2003) phosphoryliert.

Die weitere Analyse mit Westernblots führte zu dem interessanten Befund, dass Kinase 1 nicht identisch mit den bereits bekannten, Ser536 phosphorylierenden Kinasen IKK β und TBK1 (Fujita *et al.*, 2003; Kishore *et al.*, 2003) war. Kinase 2 koeluiert hingegen mit dem Maximum der Aktivität mit dem Maximum der Bandenintensität von IKK α und - β im Westernblot.

Eingehende Studien zur genauen Zusammensetzung der Kernstruktur des IKK-Komplexes in Hefe hatten ergeben, dass die katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β sowohl in der heterodimeren Form als auch in der homodimeren Form vorliegen können (Miller *et al.*, 2001), was im Einklang mit der Beobachtung steht, dass IKK α in den gleichen Fraktionen wie IKK β nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.2). Nach diesen Daten zeigen IKK-Komplexe mit der Kern-Zusammensetzung $\gamma_4\alpha\beta$ ein ähnliches Elutionsverhalten wie die jeweiligen Komplexe mit der homodimeren Zusammensetzung $\gamma_4\alpha_2$ bzw. $\gamma_4\beta_2$.

Aufgrund der Resultate aus den Westernblots und der gefundenen Substratspezifität, handelt es sich sehr wahrscheinlich bei Kinase 2 um IKK. Für einen hinreichenden Identitätsbeweis ist allerdings z.B. eine Immundepletion von IKK d.h. der Nachweis der spezifischen Verminderung der Aktivität von Kinase 2 mit einer Immunpräzipitation erforderlich oder zum Vergleich die gleiche Versuchsdurchführung mit Ganzzellextrakten aus IKK-defizienten Zellen.

Da Kinase 3 Ser529 phosphoryliert, handelt es sich dabei wahrscheinlich um Casein-Kinase II. Kinase 3 zeigte dabei keine signifikante Regulation ihrer Aktivität durch IL-1 α , wobei eine exakte Beurteilung diesbezüglich erschwert war, da im Bereich von *Peak 3*/Kinase 3 ein

sehr großer Anteil von Proteinen eluierte, deren Phosphorylierungsstatus sich signalabhängig verändert. Dadurch veränderte sich auch das Elutionsverhalten diverser Phosphoproteine, die einen unspezifischen Signalhintergrund in der SDS-PAGE nach einem Kinase-Assay erzeugten, und daher einen direkten Vergleich, insbesondere in Fraktion 15 mitunter erschwerten (Abb. 3.3). In Fraktion 14 hingegen konnte nie ein IL-1 α -abhängiger Unterschied in der Aktivität von Kinase 3 festgestellt werden.

Die Bedeutung der Ser529-Phosphorylierung durch Casein-Kinase II ist noch unklar. Einerseits wurde gezeigt, dass für die volle transkriptionelle Aktivität in MEF-Zellen diese Phosphorylierung wichtig ist und dass die spezifische Hemmung von CKII mit dem Inhibitor PD144795 die transkriptionelle Aktivität nach TNF α -Stimulation in HeLa-Zellen hemmt (Wang *et al.*, 1998, 2000). Andererseits zeigte eine S529A-Mutante in einem GAL-p65-Konstrukt nach TNF α -Stimulation in L929sA-Zellen keine Effekte (Vermeulen *et al.*, 2003). Hinzu kommt, dass die Regulation von CKII noch sehr unerforscht ist. So gibt es mehrere Berichte, wonach die CKII-Aktivität konstitutiv ist (Tuazon *et al.*, 1991; Pinna *et al.*, 1990) während nach den Ergebnissen anderer Studien eine Regulation durch die Wachstumsfaktoren IGF-1 (Klarlund *et al.*, 1988) und EGF (Ackerman, 1989) erfolgen kann.

Bird *et al.* stellten eine geringfügige Aktivitätszunahme nach IL-1 β -Stimulation fest, wenn CKII aus HepG2-Zelllysaten immunpräzipitiert wurde, jedoch nicht nach Fraktionierung durch eine Anionenaustausch-Chromatographie (Bird *et al.*, 1997). Eine mögliche Erklärung für die beschriebene TNF α -induzierte Ser529-Phosphorylierung ist daher, dass das I κ B-Protein Ser529 maskiert und erst dessen signalabhängige Degradation die Phosphorylierung durch CKII erlaubt, ohne dass dabei CKII reguliert wird (Wang *et al.*, 2000).

In den vorgestellten Kinaseassays (Abb. 3.3) konnte eine leichte Hemmung der Ser536-Phosphorylierung durch Kinase 1 und Kinase 2 infolge der S529A-Mutation im Substrat beobachtet werden. Dies könnte ein Hinweis auf eine Regulation der Ser536-Phosphorylierung durch die Phosphorylierung an Ser529 sein. Andererseits zeigten Messungen der Kinetik mit Peptiden, die den Bereich 522-540 von p65 enthielten, dass rekombinante IKK β ein Peptid mit einer S529A-Mutation ähnlich effektiv an Ser536 phosphoryliert wie das Wildtyp-Peptid (Kishore *et al.*, 2003). Da aber das eingesetzte Substrat GST-p65₃₅₄₋₅₅₁ eine komplexere Struktur haben könnte, ist fraglich, ob die Ergebnisse miteinander vergleichbar sind. Zumindest ist grundsätzlich denkbar, dass benachbarte Phosphorylierungen sich, auch in kooperativer Weise, beeinflussen können (Holmberg *et al.*, 2002).

4.2 Charakterisierung der Ser536-Phosphorylierung

4.2.1 Charakterisierung der IKK-unabhängigen Ser536-Phosphorylierung

Durch Anionenaustauschchromatographie wurde mit Kinase 1 eine weitere, noch nicht identifizierte Kinaseaktivität, die zumindest *in-vitro* Ser536 phosphoryliert, entdeckt (Abb. 3.2, 3.3). Gegen Ende der experimentellen Arbeiten zu diesem Projekt wurde beschrieben, dass Ser536 durch TBK1 phosphoryliert wird (Kishore *et al.*, 2003, Fujita *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Daten war es erforderlich, den Einfluss von IKK, die bis vor kurzem als einzige Ser536-Kinase näher charakterisiert worden war, und den anderer Kinasen auf diese Phosphorylierung näher zu untersuchen.

Die IL-1 α - und TNF α -induzierte Ser536-Phosphorylierung scheint nicht von MEK1 bzw. dem ERK1/2-Signalweg sowie vom JNK-Signalweg abhängig zu sein, wie die Verwendung der Inhibitoren PD98059 und SP600125 (Abb. 3.4) zeigte. Eine Beteiligung von p38 α - und p38 β kann ebenfalls ausgeschlossen werden. Hierbei ist anzumerken, dass nach den Ergebnissen von Madrid *et al.* der p38-Signalweg in Abhängigkeit von IKK NF- κ B aktiviert (Madrid *et al.*, 2001). Nach einer anderen Studie könnte dieser aktivierende Einfluss des p38-Signalweges aber auf die Phosphorylierung von Serin-276 in p65 durch MSK-1, die ein Ziel des p38-Signalweges ist, erklärt werden (Vermeulen *et al.*, 2003).

Schwieriger ist der Einfluss der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) zu beurteilen. Die IL-1 α - und TNF α -abhängige Ser536-Phosphorylierung wurde durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin nicht gehemmt, während die durch PMA und Ionomycin-hervorgerufene Ser536-Phosphorylierung signifikant blockiert wurde. Die Funktion von PI3K bei der NF- κ B-Aktivierung ist bis heute umstritten: Es wurde berichtet, dass die Proteinkinase Akt/PKB, die durch Inositol-1,4,5-triphosphat (InosP₃), dem Reaktionsprodukt von PI3K, aktiviert wird, den IKK-Komplex bzw. IKK β aktiviert (Madrid *et al.*, 2000, 2001). Nach einer anderen Studie erfordert die NF- κ B-Aktivierung durch Akt/PKB die Proteinkinase GSK3 β (Hoefflich *et al.*, 2000). Eine Erklärung dafür, dass nur die PMA/Ionomycin-induzierte Phosphorylierung gehemmt wurde (Abb. 3.4), könnte ein funktioneller Synergismus zwischen dem PI3K- und PKC-Signalweg sein, da InosP₃ zu einer Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum führt und so klassische PKC-Isoenzyme, die durch Ca²⁺ und/oder Diacylglycerol oder Phorbolster reguliert werden, aktiviert. Gestützt wird diese Vermutung durch einen Bericht, wonach für die Akt/PKB-abhängige NF- κ B-Aktivierung PMA erforderlich war (Kane *et al.*, 1999). Da aber auch mit dem Ca²⁺-spezifischen Ionophor Ionomycin die PMA-abhängige Ser536-Phosphorylierung durch Wortmannin stark

unterdrückt wurde, kann ausgeschlossen werden, dass der aktivierende Einfluss des PI3K-Signalweges allein auf eine Ca^{2+} -Freisetzung zurückzuführen ist. Kontrovers diskutiert wird hierbei, ob TNF- α -Stimulation Akt/PKB-abhängig IKK aktiviert (Ozes *et al.*, 1999; Delhase *et al.*, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine IL-1 α - oder TNF- α -abhängige Aktivierung von Akt/PKB ebenfalls nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Nach einer kürzlich veröffentlichten Studie wird nur IKK α über PKB/Akt aktiviert, so dass zelltyp-abhängige Unterschiede im Expressionsverhältnis zwischen IKK α und IKK β die widersprüchliche Datenlage erklären könnten (Gustin *et al.*, 2004).

Eine interessante Beobachtung stellt die Aktivierung von IKK (Abb. 3.4, 3.5) durch MG132 dar. Bei MG132 handelt es sich um ein Peptid-Aldehyd, das die 26S-Untereinheit des Proteasoms inhibiert. Das Ubiquitin-Proteasom stellt wegen der signalabhängigen Ubiquitinylierung und Degradation des I κ B-Proteins eine essentielle Komponente im NF- κ B-Signalweg dar. Zusätzlich ist es an der limitierten Proteolyse von p105 und p100, den Vorläufer-Molekülen von p50 und p52 beteiligt (Palombella *et al.*, 1994; Orian *et al.*, 1995). Mehrere Studien zeigten, dass der Einsatz von MG132 wegen der gehemmten I κ B-Proteolyse die nukleäre Translokation und transkriptionelle Aktivität von NF- κ B hemmt (Rock *et al.*, 1994; Fiedler, *et al.*, 1998; Nasuhara *et al.*, 1999). Die Hemmung der I κ B-Proteolyse führte bereits nach 30 min Behandlungsdauer mit MG132 zu einer signifikanten IKK-Aktivierung und Ser536-Phosphorylierung. Aufgrund dieses relativ kurzen Zeitraums können Regulationsmechanismen auf Ebene der Genexpression eher ausgeschlossen werden. Denkbar ist, dass die Akkumulation des Reaktionsproduktes der IKK-Reaktion, phospho-I κ B, durch nicht weiter bekannte Rückkopplungsmechanismen IKK aktiviert. So wurde festgestellt dass der C-Terminus von I κ B offenbar über einen allosterischen Mechanismus die katalytische Aktivität von IKK erhöht (Burke *et al.*, 1998). Auf der anderen Seite führt die Hemmung des Proteasoms zu einer Akkumulation vieler geschädigter oder ungefalteter Proteine und zur Störung anderer vom Ubiquitin-Proteasom abhängiger Signalwege, was die Zelle in einen allgemeinen Stresszustand versetzen könnte. Es wurde berichtet, dass MG132 die Stresskinasen JNK und p38 (Meriin *et al.*, 1998; Nakayama *et al.*, 2001) sowie die MAP-Kinasen p42 und p44 (Hashimoto *et al.*, 2000) aktiviert. Deshalb ist sehr wahrscheinlich, dass infolge der Proteasom-Inhibition mehrere Effekte, die aus einem Stresszustand resultieren oder spezifisch den IKK-Reaktionsweg betreffen, additiv zusammenwirken und IKK aktivieren.

Eine starke Evidenz für eine IKK-unabhängige Ser536-Phosphorylierung konnte auch durch die siRNA-vermittelte Suppression der katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β

gefunden werden. (Abb. 3.6). Verglichen mit den Kontrollen war die IL-1 α -regulierte Ser536-Phosphorylierung in denjenigen Zellen, die mit siRNA gegen IKK α und - β behandelt worden waren, kaum reduziert. Sehr wichtig war dabei, dass unspezifische Effekte durch die Verwendung von siRNA (s. Kontrolle mit siRNA gegen Luziferase) nicht beobachtet wurden, denn es war berichtet worden, dass virale dsRNA eine Aktivierung von IKK auslösen könne (Chu *et al.*, 1999). Unterstützt wurden die Daten aus den siRNA-Experimenten durch die gleichzeitige Überexpression dominant-negativer IKK α - und IKK β -Formen (Abb. 3.7). Auch unter dem Einfluss dieser Mutanten konnte keine signifikante Hemmung der konstitutiven wie signalabhängigen Ser536-Phosphorylierung erzielt werden, obwohl beide Mutanten dominant-negative Effekte bezüglich der Phosphorylierung von I κ B und der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B in unstimulierten Zellen zeigten. Dies kann zumindest als ein Indiz dafür gewertet werden, dass ein Teil der Ser536-Phosphorylierung unabhängig vom IKK-Signalweg zu sein scheint. Auf der anderen Seite nahm die konstitutive Phosphorylierung bei der Überexpression der dominant-negativen Formen sogar zu. Noch komplexer scheinen die Wechselwirkungen zwischen p65, IKK und I κ B zu sein, da hier verschiedene Regulationsmechanismen wie z.B. die p65-abhängige Induktion der I κ B-Expression oder enzymkinetische und sterische Effekte sich überlagern. Die Überexpression sowohl des I κ B α -Wildtypes als auch der I κ B α -Mutante, bei der die IKK-Phosphorylierungsstellen mutiert worden waren, hemmte die konstitutive Ser536-Phosphorylierung, gleichermaßen stark, obwohl das Expressionsniveau des Wildtypes aufgrund der proteolytischen Degradation wesentlich geringer war. Eine Erklärung könnte sein, dass das I κ B α -Protein, ähnlich wie im Fall der Phosphorylierung an Ser529, Ser536 maskiert und so dessen Phosphorylierung verhindert. Des Weiteren führte die Überexpression der I κ B α -Mutante zu einer Aktivierung der IKK-Aktivität, wie die Zunahme der I κ B α -Phosphorylierung zeigte. Diese könnte ebenfalls durch eine Regulation der katalytischen Aktivität von IKK durch den C-Terminus von I κ B α zurückzuführen sein, ähnlich wie im Fall der MG132-induzierten IKK-Aktivität. Die Überexpression der WT-Formen von IKK α und - β führte hingegen zu einer ähnlichen Verminderung der transkriptionellen Aktivität nach Stimulation, wie sie nach Überexpression der dominant-negativen Mutanten festgestellt werden konnte. Eine Erklärung könnte sein, dass die Menge endogener Kofaktoren wie z.B. IKK γ hier limitierend wirkt und somit eine Überexpression der Wildtyp-Formen bezüglich der Bildung aktiver Enzymkomplexe zu dominant-negativen Effekten führen kann. Ein dominant-negativer-Effekt könnte auch als Erklärung für die beobachtete Verminderung der IL-1 α -induzierten NF- κ B-Aktivierung durch die GFP-p65-Überexpression in Erwägung gezogen werden.

Durch die Inhibitionsexperimente (Abb. 3.8) mit der Substanz SC-514 konnte die physiologische Relevanz der IKK-unabhängigen Ser536-Phosphorylierung weiter untermauert werden. In diesem Zusammenhang ist sehr wichtig, dass nach den Ergebnissen mehrerer Studien die IKK-abhängige Ser536-Phosphorylierung ausschließlich auf die Untereinheit IKK β zurückzuführen ist: So führte die Überexpression der IKK β -Untereinheit zu einer wesentlich stärkeren Phosphorylierung von p65 als die Überexpression von IKK α (Sakurai *et al.*, 2003) und nur rekombinante IKK β phosphorylierte Ser536 in einem Peptid mit einer signifikanten katalytischen Effizienz, rekombinante IKK α hingegen nicht (Kishore *et al.*, 2003). Nach diesen Daten sollte der selektive IKK β -Inhibitor die IKK-abhängige Ser536-Phosphorylierung vollständig blockieren. Auch die Zytokin-induzierte I κ B α -Phosphorylierung scheint zum überwiegenden Teil auf die katalytische Aktivität von IKK β zurückzugehen, da die TNF/IL-1-induzierte I κ B α -Phosphorylierung in IKK β -defizienten MEF-Zellen fast vollständig gehemmt war, nicht aber in IKK α -defizienten Zellen (Sizemore *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 1999). Vergleichende kinetische Messungen zeigten, dass IKK β wesentlich effizienter I κ B α phosphoryliert (Burke *et al.*, 1998). Danach trägt IKK α kaum zur IL-1/TNF-abhängigen I κ B-Phosphorylierung bei und somit ist die I κ B α -Phosphorylierung ein aussagekräftiger Indikator für die IKK β -Aktivität. Die Verwendung von SC-514 führte zu einer fast vollständigen Inhibition der IKK β -Aktivität, wie an der Hemmung der I κ B α -Phosphorylierung erkennbar war, während die Ser536-Phosphorylierung zwar erkennbar abnahm, aber nicht in dem Maße wie die I κ B-Phosphorylierung. Deshalb tragen in einem nicht unbedeutenden Ausmaß andere Proteinkinasen, wie z.B. Kinase 1 oder TBK1 zu der signalabhängigen Phosphorylierung von Ser536 bei.

Unklar ist in diesem Zusammenhang die Rolle der Proteinkinase TBK1 (TANK-binding-Kinase 1). TBK1 bindet TANK (I-TRAF), ein assoziierter Faktor des TNF-Rezeptors (*TNF-Receptor-associated factors*), der vermutlich den TNF-Rezeptor über die TRAF-Proteine mit dem IKK-Signalweg funktionell verbindet. TBK1 weist im N-terminalen Bereich von AS 9-353 eine Sequenzidentität von 27% und eine Homologie von 45% zu IKK α und IKK β auf (Pomerantz *et al.*, 1999). TBK1 phosphoryliert in rekombinanter Form Ser536 in einem Peptid mit der Sequenz der TAD von p65 (Kishore *et al.*, 2003). Weiter wurde durch Aufreinigung in einer Gelfiltrations-Säule gezeigt, dass TBK1 Bestandteil eines hochmolekularen Komplexes mit einer Größe von ungefähr 600 kDa ist und TNF α -reguliert Ser536 in dem Substrat GST-p65₃₅₄₋₅₅₁ phosphorylieren kann (Fujita *et al.*, 2003). In TBK1-defizienten Mausembryonen konnte eine starke Leberdegeneration beobachtet werden und die

isolierten embryonalen Fibroblasten zeigten eine gesteigerte TNF α -induzierte Apoptose. Dies korrelierte mit einer stark reduzierten transkriptionellen Aktivität von NF- κ B. Die regulierte I κ B-Degradation und die DNA-Bindung von NF- κ B waren hingegen unverändert, so dass TBK1 offenbar ausschließlich an der Regulation der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B nach TNF α -Stimulation beteiligt ist (Bonnard *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass eine dominant-negative Form von TBK1 nicht in der Lage war, die NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit IL-1 α , TNF α und CD40 zu inhibieren (Pomerantz *et al.*, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die IL-1 α -abhängige NF- κ B-Aktivierung durch eine dominant-negative Mutante von TBK1 ebenfalls nicht gehemmt werden (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde berichtet, dass durch Suppression von NAPI, einem essentiellen Aktivator von TBK1, mittels siRNA nur die PMA und TNF- α -abhängige, nicht aber die IL-1 β -abhängige NF- κ B-Aktivierung gehemmt wurde (Fujita *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Daten ist nicht geklärt, ob TBK1 eine signifikante Rolle bei der IL-1 α -induzierten Aktivierung von NF- κ B hat und ob diese Proteinkinase in relevantem Ausmaß zu der IKK-unabhängigen Ser536-Phosphorylierung nach IL-1 α -Stimulation, wie sie in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, beiträgt. In der Anionenaustauschchromatographie überlappte der im Westernblot detektierte *Peak* von TBK1 teilweise mit der Aktivität von Kinase 2 (Abb. 3.2), so dass TBK1 möglicherweise auch IL-1 α -induziert p65 an Ser536 phosphorylieren könnte. In einem ersten Experiment im Rahmen dieser Arbeit, konnte TBK1 nach Überexpression durch IL-1 α aktiviert werden und nach Immunopräzipitation rekombinantes p65 phosphorylieren. Bei der Planung zukünftiger Experimente sollte daher auch eine potentielle Funktion von TBK1 als Ser536-phosphorylierende Kinase miteinbezogen werden. Ein denkbares Experimente wäre z.B. die Messung der Aktivität von Kinase 2 nach einer Suppression von TBK1 durch siRNAs.

Nach den in dieser Arbeit vorgelegten Daten existiert neben IKK β und TBK1 mit Kinase 1 eine weitere Proteinkinase, die zumindest *in-vitro* IL-1 α -abhängig Ser536 phosphoryliert. Ser536 scheint hierbei eine Schlüsselrolle bei der Regulation der transkriptionellen Aktivität von p65 einzunehmen. Da offenbar mehrere Kinasen diese Stelle phosphorylieren, könnte Ser536 als ein Konvergenzpunkt von verschiedenen Signalwegen und Stimuli fungieren, an dem die eingehenden Signale miteinander verrechnet werden (Signalintegration). Aus diesen Gründen ist die weitere Aufreinigung und Identifizierung von Kinase 1 durch andere chromatographischen Methoden (z.B. Kationenaustauschchromatographie, Hydrophobe Interaktionschromatographie, Affinitätschromatographie mit immobilisierter p65-TAD oder

ATP als Bindungspartner) von großer Bedeutung für die Bestimmung anderer Signalwege und Stimuli, die zu dieser Phosphorylierung beitragen.

4.2.2 Funktionelle Charakterisierung der Ser536-Phosphorylierung

Vor jeder weiterführenden funktionellen Charakterisierung einer Phosphorylierung in einem Transkriptionsfaktor ist zunächst zu klären, ob die phosphorylierte Form im Kern und in DNA-gebundener Form nachgewiesen werden kann. Zur Klärung dieser Frage wurden Westernblots von Kernextrakten, Chromatin-Immünpräzipitationen und EMSA-Experimente unter Verwendung des Antikörpers gegen pSer536p65 durchgeführt.

Die Konzentration von pSer536p65 nimmt nach IL-1 α -Stimulation im Kern zu und erreicht zwischen 12 und 30 min ihr Maximum. Dies geht einher mit einer Zunahme von pSer536p65 am IL-8-Promotor, die etwas verzögert bei ungefähr 30 min das Maximum erreicht (Abb. 3.10). Die Kinetik der Ser536-Phosphorylierung korreliert demnach mit der Aktivierungsphase von NF- κ B.

In der EMSA-Untersuchung konnte ebenfalls pSer536p65 nach TNF α - oder IL-1 α -Stimulation in DNA-gebundener Form nachgewiesen werden (Abb. 3.9 A). Allerdings wurden weniger NF- κ B-DNA-Komplexe durch Antikörper gegen pSer536p65 als durch Antikörper gegen p65 gebunden, wie die Ergebnisse der *supershift*-Ansätze zeigen. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte sein, dass nur ein geringer Teil von p65 in phosphorylierter Form vorliegt.

Die Ser536-Phosphorylierung beeinflusst aber offenbar nicht die DNA-Bindung, wie die Ergebnisse der EMSA-Untersuchung mit den *in-vitro*-translatierten Ser536-Mutanten zeigen (Abb. 3.9 B). Eine Beeinflussung der DNA-Bindung durch diese Phosphorylierung ist aufgrund der Position von Ser536 in der TAD von p65 ohnehin sehr unwahrscheinlich. So zeigten die phosphomimetischen Mutanten eine vergleichbare Affinität wie der WT. Phosphomimetischen Mutationen haben allerdings immer nur eine eingeschränkte Aussagekraft, da Aspartat oder Glutamat einfach negativ geladen sind, während eine Phosphatgruppe meistens zweifach negativ (je nach Protonierungszustand) geladen ist. Dennoch konnte in vielen Fällen mit phosphomimetischen Mutationen der Effekt einer Phosphorylierung erfolgreich imitiert werden. Ein Beispiel hierfür ist eine konstitutiv aktive GFP-MKK7-Mutante, bei der drei regulatorische Phosphorylierungsstellen durch Glutamate ausgetauscht wurden (Wolter *et al.*, 2001).

Ein interessanter Befund ist, dass die Kinetik der Ser536-Phosphorylierung von p65 nicht vollständig mit der Kinetik der p65-DNA-Bindung am IL-8-Promotor korreliert. So ist das

Maximum von pSer536p65 erst nach 30 min nach Stimulation erreicht, während die Menge des gebundenen p65 schon nach 10 min den maximalen Wert zeigt (Abb. 3.10 B). Eine mögliche Erklärung ist, dass am Promotor gebundenes p65 phosphoryliert wird. Dies wäre durchaus denkbar, da z.B. IKK im Kern nachgewiesen worden ist (Birbach *et al.*, 2002). Denkbar ist aber auch, dass in einer initialen Phase der Aktivierung von NF- κ B-p65 in größeren Mengen in den Kern transloziert und an den Promotor bindet und erst einige Minuten später durch pSer536p65 in größerem Umfang ausgetauscht wird. Diese feinen kinetischen Unterschiede müssen allerdings noch weiter aufgeklärt und mit alternativen Ansätzen reproduziert werden.

Nach 30 min Stimulation fällt der Anteil von pSer536p65 am IL-Promotor und im Kern wieder schnell ab. Als Phosphatase für die rasche Dephosphorylierung von pSer536p65 wurde PP2A identifiziert (Sakurai *et al.*, 2003). Andere Mechanismen für die schnelle Abnahme der phosphorylierten Form könnten zudem aber auch ein hoher *turnover* des Proteins oder die schnelle Inaktivierung der Ser536-phosphorylierenden Kinasen sein.

Wie anhand von Reporter-Gen-Assays (Abb. 3.11) gezeigt werden konnte, reguliert die Phosphorylierung an Ser536 die transkriptionelle Aktivität von p65 positiv. Die Ergebnisse früherer Versuche, bei denen neben dem Wildtyp nur p65-Konstrukte mit einer S536A-Mutation verwendet wurden, waren diesbezüglich nicht aussagekräftig, da auch die S536A-Mutante sehr häufig eine erhöhte transkriptionelle Aktivität zeigte (Daten nicht gezeigt). Die in der Literatur vorliegenden Daten sind bezüglich des Verhaltens der S536A-Mutation widersprüchlich. So wurde u.a. berichtet, dass eine S536A-Mutation die LPS-induzierte transkriptionelle Aktivität von NF- κ B hemmt (Yang *et al.*, 2003), während in anderen Studien keine Hemmung auf die NF- κ B-Aktivität durch die S536A-Mutation nach TNF α - oder IL-1 α -Stimulation festgestellt werden konnte (Vermeulen *et al.*, 2003; Okazaki *et al.*, 2002), obwohl durch beide Stimuli die Ser536-Phosphorylierung induziert wird.

Die Verwendung der phosphomimetischen Mutante S536D, die sich stark aktivierend verhielt, und der inhibitorischen S536N-Mutante führte aber zu eindeutigen Resultaten. Nach diesen Ergebnissen hat die Ser536-Phosphorylierung einen eindeutig aktivierenden Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von p65. Eine inhibitorische Funktion der Ser536-Phosphorylierung kann nach diesen Ergebnissen ausgeschlossen werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung an Ser536 die Interaktion mit dem Koaktivator TAFII31 beeinflusst (Abb 3.12). TAFII31 (auch TAFII32 genannt) gehört zu den TBP-assoziierten Faktoren (TAFs), die mit dem TATA-Box-bindenden Protein (TBP) den Multiprotein-Komplex TFIID, einem Bestandteil der basalen

Transkriptionsmaschinerie, bilden. TAFII31 bindet an einem kurzen amphipathischen Bindungsmotiv mit der Konsensussequenz FXXΦΦ (Phenylalanin, X: beliebige Aminosäure, Φ: hydrophobe Aminosäure), das eine α -helikale Sekundärstruktur annimmt (Choi *et al.*, 2000). Für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren mit einer sauren Transaktivierungsdomäne konnte eine Interaktion von TAFII31 mit dieser Domäne nachgewiesen werden, darunter p53, VP16 und NF- κ B-p65 (Thut *et al.*, 1995; Klemm *et al.*, 1995; Burley *et al.*, 1996). Für p65 konnte die TAFII31-Bindungsstelle auf den Bereich von AS 532–548 eingegrenzt werden, wobei in dieser Region zwei potentielle FXXΦΦ-Segmente liegen (s. Abb. 4.1A, s. S. 121). Wegen der höheren Wahrscheinlichkeit in der Sekundärstrukturvorhersage wurde für p65 der Bereich von AS 542 bis AS 546 (s. Abb. 4.1A) als Binderegion vorgeschlagen (Choi *et al.*, 2000). Ser536 befindet sich in dem ersten FXXΦΦ-Segment von AS 534-538. Schmitz *et al.* berichteten, dass nach den Sekundärstrukturvorhersagen mit den Methoden von Chou/Fasman (Chou & Fasman, 1978) und Garnier (Garnier *et al.*, 1978) dieses Segment ebenfalls in einer α -helikalen Konformation vorliegt. Zudem konnten sie anhand von CD-Spektroskopie zeigen, dass ein Peptid mit der TAD-Sequenz von AS 521-551 unter dem Einfluss eines dehydratisierenden organischen Lösungsmittel einen helikalen Anteil von bis zu 48% enthalten kann. Dies führte zu der Annahme, dass die TAD von p65 in einer hydrophoben Umgebung, wie sie nach Interaktion mit einem Bindungspartner entstehen könnte, eine α -Helix ausbildet (Schmitz *et al.*, 1994). Wegen des helikalen Anteils von 48% ist es sehr wohl denkbar, dass auch das erste Segment das TAFII31-Bindungsmotiv enthält.

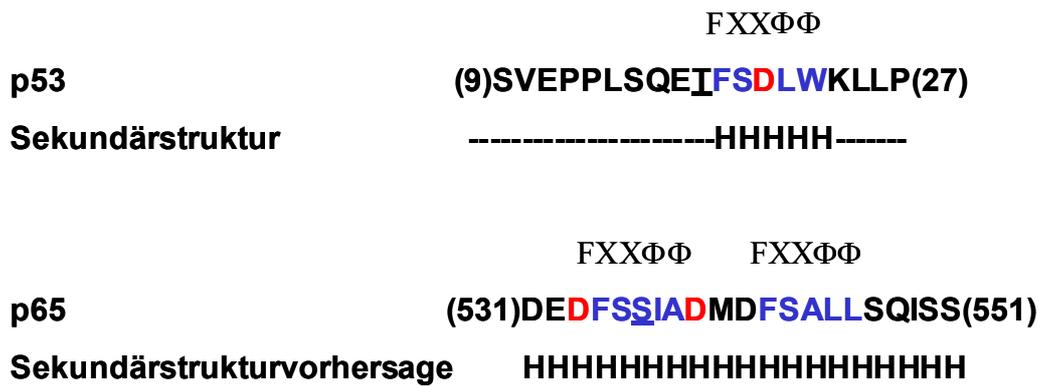
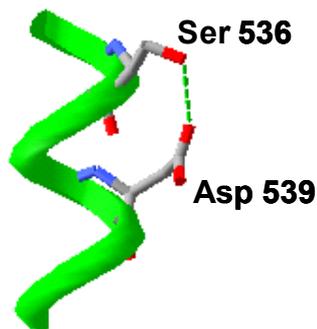
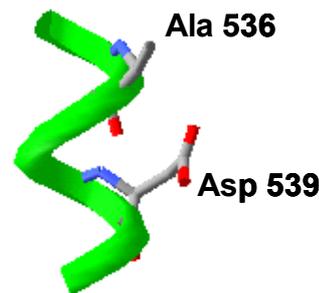
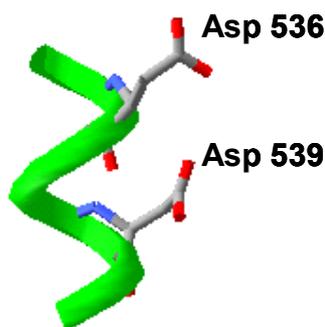
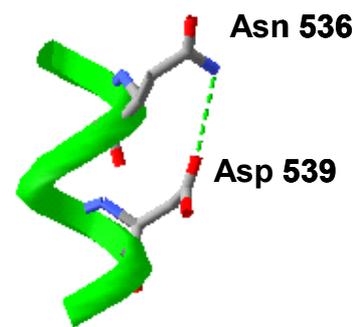
Unabhängig von der genauen Lage der TAFII31-Bindungsstelle scheint aber eine Phosphorylierung an Ser536 die TAFII31-Rekrutierung zu regulieren und so die transkriptionelle Aktivität von p65 zu steuern. Wie die Ergebnisse des GST-Bindungsassay (Abb. 3.13A) zeigen, beeinflusst die phosphomimetische Mutante S536D die TAFII31-Bindung nicht direkt, obwohl sie *in-vivo*, wie die Reporteragen-Assays (Abb. 3.12) zeigen, einen aktivierenden Effekt auf die transkriptionelle Aktivität aufweist. Im Falle von p53 überlappt das TAFII31-Bindungsmotiv mit der Bindungsregion für den transkriptionellen Korepressor Mdm2. Es konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung an Thr18 in p53 eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Thr18 und Asp21 in diesem α -helikalen Motiv eliminiert und somit die Mdm2-Bindung destabilisiert. Die Dissoziation von Mdm2 ermöglicht dann die Bindung von TAFII31 (Jabbur *et al.*, 2002).

Aufgrund der festgestellten Ähnlichkeiten zwischen p53 und p65 bezüglich einer Phosphorylierungsstelle in der Nähe eines TAFII31-Bindungsmotivs (s. Abb. 4.1 A) wurde

in der Literatur nach Korepressoren gesucht, die in der TAD von p65 binden. Bisher wurde mit AES nur ein Korepressor beschrieben, der an der TAD von p65 bindet (Tetsuka *et al.*, 1999). Tatsächlich bewirkt die phosphomimetische Mutation und somit wahrscheinlich auch die Phosphorylierung an Ser536, dass der Repressor AES die TAFII31-Bindung nicht mehr so stark blockieren kann (Abb. 3.13 B). In dem Reporteragen-Assay, der in Abb. 3.14 gezeigt wurde, reagiert die S536D-Mutante auf die AES-abhängige Repression nicht so sensitiv wie der WT. Außerdem kann die AES-abhängige Repression durch Überexpression von TAFII31 kompensiert werden. Daher scheinen TAFII31 und AES als Koaktivator und Korepressor auf die transkriptionelle Aktivität von p65 in einer antagonistischen Weise zu wirken.

AES (*amino-terminal enhancer of split*), ein Protein aus der Familie der Groucho-Korepressoren, wurde durch einen Two-Hybrid-Ansatz als Repressor von p65 gefunden. An der Interaktion mit AES ist hierbei der Bereich zwischen AS 471-521 in der TAD von p65 beteiligt (Tetsuka *et al.*, 1999). Somit liegt die Bindungsregion für AES zumindest sehr nahe an dem TAFII31-Bindungsmotiv, so dass die Bindung von AES die Interaktion mit TAFII31 beeinflussen könnte. Zudem ist nicht ausgeschlossen, dass noch andere Regionen neben den bereits bestimmten Bereich in p65 an der Interaktion mit AES beteiligt sein könnten. Unklar ist allerdings, ob AES die Interaktion zwischen TAFII31 und p65 sterisch inhibiert oder sogar mit TAFII31 um dieselbe Bindungsstelle kompetiert. Die Phosphorylierung an Ser536 könnte, wie das Verhalten der phosphomimetischen Mutante S536D zeigt, eine Konformationsänderung induzieren, was die Bindung von AES destabilisiert oder zumindest die TAFII31-Bindung ermöglicht.

Sehr interessant an der Position von Ser536 ist die große Analogie mit Thr18 in der TAD von p53. In der Nähe zu beiden Aminosäuren befindet sich im Abstand von drei Aminosäuren eine saure Aminosäure (Asp21 in p53, Asp533 und 539 in p65). Thr18 in p53 wird z.B. nach Strahlungseinwirkung phosphoryliert und diese Phosphorylierung führt zur Eliminierung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Asp21 und Thr18 im α -helikalen TAFII31-Bindungssegment, das gleichzeitig mit der Mdm2-Bindungsstelle überlappt. Die Entfernung dieser Wasserstoffbrückenbindung führt zur Dissoziation von Mdm2 und zur Bindung von TAFII31 (Jabbur *et al.*, 2002). An einem ähnlichen Mechanismus könnte die Phosphorylierung an Ser536 beteiligt sein, das sich sehr wahrscheinlich in einem α -helikalen Segment befindet. In einer α -helikalen Struktur (Ganghöhe 3,6 AS) stehen die Aminosäuren in +3- oder -3- Position fast senkrecht aufeinander und könnten Rotamere ausbilden, die die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen erlauben (Abb. 4.1 A u. B). Ser536 könnte daher durchaus in ähnlicher Weise wie Thr18 in p53 eine Wasserstoffbrückenbindung

A**B****WT****S536A****S536D****S536N****Abb. 4.1: Vergleich der Transaktivierungsdomänen von p53 und p65**

A: Gezeigt sind die Primärstrukturen der Transaktivierungsdomänen von p53 und p65. Zusätzlich ist die Sekundärstruktur von p53 in diesem Sequenzbereich in der gelösten Röntgenkristallstruktur eines Komplexes aus Mdm2 und der p53-TAD-Sequenz (Kussie *et al.*, 1996) aufgeführt (H: Helix). Für p65 sind die Ergebnisse von Sekundärstrukturvorhersagen dargestellt (Schmitz *et al.*, 1994). In beiden Sequenzen sind die Phosphorylierungsstellen unterstrichen, die (potentiellen) TAFII31-Bindungsmotive (FXXΦΦ) sind in blau und die sauren Aminosäuren in + und -3-Position in rot dargestellt. **B:** Der Sequenzbereich um Ser536 in der TAD von p65 wurde mit dem Molekülmodellierungsprogramm DEEP VIEW v3.7 (Guex *et al.*, 1997, 1999) als α -Helix modelliert. Im Anschluss wurden Rotamere von Ser536 und Asp539 erzeugt, die die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen ermöglichen. Zum Vergleich sind zusätzlich die Mutanten S536A, S536D und S536N abgebildet (das Peptidrückgrat ist in der Bänderdarstellung (grün), die Aminosäuren in der Stabmodell-Form (grau: Kohlenstoff, blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff) abgebildet. Grün gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen.

z.B. zu Asp539 (oder Asp533) ausbilden, was möglicherweise die Interaktion mit AES oder anderen Repressoren stabilisiert. In der hydrophoben Umgebung eines Bindungspartners würde eine solche interne Wasserstoffbrückenbindung energetisch von Vorteil sein, da diese Aminosäuren mit Wassermolekülen aufgrund der Maskierung durch den Bindungspartner keine externen Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können. Für Abb. 4.1 B wurde mit dem Molekülmodellierungsprogramm DEEP VIEW v3.7 (Guex *et al.*, 1997,1999) der Bereich um Ser536 als α -Helix dargestellt und manuell Rotamere erzeugt, bei denen sich eine Wasserstoffbrückenbindung ausbildet.

Auch die Substitution von Serin durch Alanin würde zur Eliminierung einer solchen Wasserstoffbrückenbindung führen (Abb. 4.1B), was die oft beobachtete transkriptionelle Aktivität der S536A-Mutante in den Reporter-gen-Assays (Abb. 3.11) erklären könnte. Außerdem war die Bindung der S536A-Mutante an GST-TAFII31 ebenfalls nicht sensitiv gegenüber einer Hemmung durch AES. Im Falle von p53 destabilisierte die T18A-Mutation tatsächlich die Bindung von Mdm2 und erhöhte leicht die transkriptionelle Aktivität von p53 (Jabbur *et al.*, 2002). Widersprüchlich hierzu ist aber die verminderte transkriptionelle Aktivität der S536A-Mutante bei Koexpression mit TAFII31 (Abb. 3.12). Möglich ist, dass der Austausch des hydrophilen Serins an Position 536 durch die hydrophobe Aminosäure Alanin auch noch andere Auswirkungen auf die Struktur der TAD von p65 hat.

Nach diesem Modell kann auch das inhibitorische Verhalten der S536N-Mutante in den Reporter-gen-Assays erklärt werden. Asparagin (N) kann wie Serin als Wasserstoffbrückendonator fungieren (Abb. 4.1 B). Asparagin kann jedoch nicht wie Serin signalabhängig phosphoryliert werden, so dass der Erhalt der Wasserstoffbrückenbindung den dominant-negativen Effekt nach Stimulation erklären könnte.

Nicht auszuschließen ist aber auch, dass Serin mit einer anderen Aminosäure, die sich nicht im helikalen Segment befindet, interagiert. Den Beweis, dass eine Wasserstoffbrückenbindung in der TAD von p65 einen inhibitorischen Effekt ausübt, können nur genaue strukturelle Untersuchungen erbringen. Das Verhalten der verschiedenen Ser536-Mutanten legt dies allerdings nahe. Neben der Eliminierung einer Wasserstoffbrückenbindung könnten aber auch noch elektrostatische Effekte infolge der Phosphorylierung von Ser536 zusätzlich eine Rolle spielen.

Die Reporter-gen-Untersuchungen zur Interaktion der p65-Mutanten mit AES und TAFII31 wurden in p65-defizienten MEF-Zellen durchgeführt. Somit wurde nur der Einfluss des überexprimierten Wildtypes und der phosphomimetischen Mutante auf die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B gemessen, was den Ergebnissen eine hohe Aussagekraft verleiht. Zur

weitere Verifizierung dieser Daten könnten Koimmunpräzipitationen durchgeführt werden oder auch vergleichende Experimente in IKK- α/β -defizienten Zellen, da in diesen Zellen die Ser536-Phosphorylierung vermindert ist und somit ein Effekt auf die Interaktion mit TAFII31 zu erwarten wäre.

Das Modell eines phosphorylierungsabhängigen Antagonismus zwischen AES und TAFII31 bei der Regulation der transkriptionellen Aktivität von p65, wie man aus den hier vorgestellten Daten und den in der Literatur verfügbaren Informationen ableiten kann, wird in Abb. 4.2 zusammenfassend illustriert: Die Proteinkinasen IKK β , TBK1 und die in dieser Arbeit gefundene Kinaseaktivität Kinase 1 phosphorylieren Ser536. Dadurch verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung der Komplexbildung von TAFII31 und p65, was die Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie möglich macht.

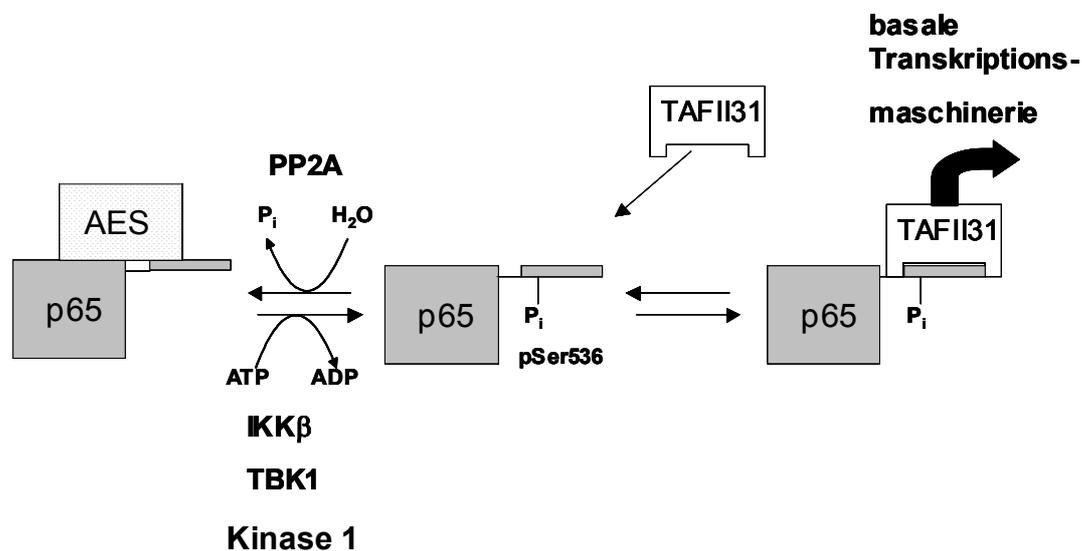


Abb. 4.2: Modell der transkriptionellen Aktivierung von p65 durch die Phosphorylierung an Ser536

Die Phosphorylierung an Ser536 in der TAD von p65 durch die Kinasen IKK β , TBK1 und Kinase 1 reduziert die Repression durch AES und erhöht die Rekrutierung des Koaktivators TAFII31, was zur Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie führt. Durch die Phosphatase PP2A erfolgt die Dephosphorylierung an dieser Stelle, was u.a. diesen Prozess umkehrt.

4.3 Bestimmung neuer Phosphorylierungsstellen von p65 durch Peptid-Arrays

Zu Beginn der Arbeiten waren mit Serin-276 (Zhong *et al.*, 1997), Serin-529 (Wang *et al.*, 1998) und Serin-536 (Sakurai *et al.*, 1999) nur drei Phosphorylierungsstellen in p65 identifiziert worden. Fraglich ist hierbei aber, ob sich die abzeichnende Komplexität der phosphorylierungsabhängigen Regulation von p65 alleine mit diesen Phosphorylierungsstellen umfassend erklären lässt. Da in der Literatur Daten vorliegen, die das Vorhandensein zusätzlicher Phosphorylierungsstellen belegen (Naumann *et al.*, 1994; Schmitz *et al.*, 1995; Anrather *et al.*, 1999) wurde im zweiten Teil dieser Arbeit versucht, durch Verwendung von Peptid-Arrays neue Phosphorylierungsstellen in p65 zu identifizieren.

Für die Phosphorylierungskartierung von Phosphoproteinen existieren mehrere Methoden. Denkbar ist die *in-vitro*- und *in-vivo*-Markierung mit ^{32}P -ATP und weitere Aufarbeitung der Phosphoproteinen mit konventionellen proteinanalytischen Verfahren (z.B. chemische oder enzymatische Spaltung, Phosphopeptid-Auftrennung mit Dünnschichtchromatographie oder HPLC gefolgt von einer Phosphoaminosäureanalyse oder Sequenzierung mit dem Edmann-Abbau). Nachteil dieser Methode ist, dass Phosphorylierungsstellen mit einer großen Dephosphorylierungsrate (*turnover*) schwierig nachzuweisen sind. Erschwerend kann auch die Identifikation und exakte Zuordnung von mehreren Phosphorylierungsstellen sein, wenn diese dicht zusammenliegen (Holmberg *et al.*, 2002). Ein vielversprechendes Potential für die Phosphorylierungskartierung von Phosphoproteinen haben Methoden der Massenspektrometrie, da diese eine hohe Sensitivität aufweisen. Die hierzu nötige instrumentelle Analytik stand aber bei Aufnahme der Arbeiten nicht zur Verfügung. Hinzu kommt, dass trotz methodischer Fortschritte in der Anreicherung von Phosphopeptiden, die Analyse regulatorischer Phosphorylierungen mit der Massenspektrometrie schwierig ist, da die signalabhängig-phosphorylierten Spezies eines Proteins oft nur einen geringen Anteil an der Gesamtmenge des Proteins ausmachen (Oda *et al.*, 2001).

Für die Identifizierung neuer Phosphorylierungsstellen wurden daher Peptid-Arrays, die den Sequenzbereich von p65 durch 15mere Peptide abdecken, eingesetzt. Im Gegensatz zu konventionellen proteinanalytischen Methoden erfordert diese Methode keine umfangreiche instrumentelle Analytik wie bei der Massenspektrometrie und sie führt sehr schnell zu Ergebnissen. Mit dieser Methode wurden die neuen, putativen Phosphorylierungsstellen Thr308 und Ser468 entdeckt (Abb. 3.16, Abb. 3.17). Die Eignung des Verfahrens für die Fragestellung konnte dabei mit den partiell-aufgereinigten Kinasen 1-3 evaluiert werden. Dabei konnten die zuvor in Festphasen-Kinaseassays bestimmten Substratspezifitäten für

alle drei Kinasen bestätigt werden, wobei die Qualität des Ergebnisses stark von der spezifischen Aktivität der Kinase, den katalytischen Eigenschaften und von dem Anteil anderer Proteine oder Substanzen abhing. Für Kinase 1 konnte sehr deutlich Ser536 als Phosphorylierungsstelle mit dieser Methode identifiziert werden, bei den Kinasen 2 und 3 zeigten die Peptid-*Spots* mit den jeweiligen Phosphorylierungsstellen Ser536 und Ser529 ebenfalls eine signifikante Intensität, allerdings zeigten auch noch andere Peptid-*Spots* eine deutliche Intensität, was die eindeutige Bestimmung erschwerte (Abb. 3.15). Dies kann auf eine geringere spezifische Aktivität beider Enzyme oder deren katalytischen Eigenschaften zurückzuführen sein, da die detektierte Phosphorylierung nicht allzu stark war. Störend war, dass viele Peptid-*Spots* relativ hohe Intensitäten aufwiesen, ohne dass dies auf Phosphorylierungen von Serinen, Threoninen oder Tyrosinen zurückzuführen war. Obwohl jeder *Array* vor der Exposition einer stringenten Waschprozedur u.a. mit einem stark proteindenaturierenden Puffer (8 M Harnstoff, 1% (w/v) SDS, 0,5% (v/v) β -Mercaptoethanol) unterzogen wurde, wurde von vielen Peptid-*Spots* radioaktives Material gebunden. Insbesondere sehr stark basische Peptide zeigten vermutlich aufgrund ionischer Wechselwirkungen eine sehr hohe Affinität zu γ - ^{32}P -ATP oder Phosphat und dies führte so trotz sehr stringenter Waschschrte mit hochkonzentrierten ATP- und Kochsalzlösungen zu falsch-positiven Ergebnissen, wie das Kontrollexperiment mit den mutierten Referenzpeptiden zeigte. Zusätzlich scheinen aber auch endogene Proteine, Peptide oder niedermolekulare Substanzen, die während der Kinasereaktionen phosphoryliert werden oder nicht-kovalent radioaktives ATP/Phosphat binden, hoch affin mit den Peptiden in den *Spots* zu interagieren. So können die unspezifischen Signale in den Peptid-*Array*-Experimenten der Kinasen 2 und 3 nicht alleine auf die Bindung von ^{32}P -ATP/-Phosphat zurückgeführt werden, da in dem Experiment mit Kinase 1 derartiges nicht beobachtet wurde.

Peptid-*Arrays* werden schon seit einiger Zeit für immunologische Fragestellungen (Epitop-, Paratop-Kartierungen) oder zur Charakterisierung linearer Bindungsstellen in Proteinen eingesetzt (Frank, 2002). Grundsätzlich ist die Peptid-*Array*-Methode zur Phosphorylierungskartierung von Proteinen geeignet, wie die Ergebnisse zeigen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass mit ihr ohne einen großen instrumentellen Aufwand sehr schnell potentielle Phosphorylierungsstellen ermittelt werden können. Die Nachteile dieser Peptid-*Array*-Methode sind die beschriebenen unspezifischen Bindungsreaktionen und die sehr hohen Synthesekosten der Peptid-*Arrays*, wodurch die Anzahl der Experimente limitiert ist.

Daher war es nicht möglich, festzustellen, ob die ermittelten Aminosäuren Thr308 und Ser468 reguliert phosphoryliert werden. Zusätzlich sind solche primären Ergebnisse immer mit einer

gewissen Unsicherheit behaftet, da die Phosphorylierung eines Peptides *in-vitro* nur eingeschränkt auf das gefaltete Protein *in-vivo* übertragbar ist. Denn das Peptid liegt sehr wahrscheinlich in einer anderen Konformation vor als der entsprechende Bereich im Protein und ist möglicherweise nicht für die Proteinkinase zugänglich. Mit einer Analyse der Lösungsmittelzugänglichkeit anhand von Strukturdaten oder Hydrophobizitätsprofilen, wie sie in dieser Arbeit für die putativen Phosphorylierungsstellen Thr308 und Ser468 durchgeführt wurde (Tab. 3.3 und Abb. 3.18), kann diese Problematik näher analysiert und die physiologische Relevanz dieser potentiellen Phosphorylierungsstellen besser vorhergesagt werden.

Auf der anderen Seite wird die Substratspezifität vieler Proteinkinasen zusätzlich zu der Aminosäure-Sequenz in direkter Umgebung der Phosphorylierungsstelle von anderen Kontaktstellen (*docking-sites*), die mit der Kinase interagieren und von der Phosphorylierungsstelle sehr weit entfernt liegen können, beeinflusst (Biondi *et al.*, 2003). In vielen Fällen aber werden Peptidsubstrate für eine Vielzahl von Proteinkinasen erfolgreich eingesetzt, so dass die Verwendung von Peptiden und Peptid-Arrays für die Identifizierung von Phosphorylierungsstellen gerechtfertigt ist.

Mit Festphasen-Kinaseassays wurde zunächst versucht, die primären Daten aus den Peptid-Array-Experimenten bezüglich der Phosphorylierung von Thr308 und Ser468 zu reproduzieren. Außerdem sollte festgestellt werden, ob diese Aminosäuren IL-1 α -abhängig phosphoryliert werden (Abb. 3.19). Aus Kostengründen war es nicht möglich, ein aussagekräftiges Peptid-Array-Experiment zur Kontrolle der in Abb. 3.16 und 3.17 vorgestellten Ergebnisse mit Extrakten aus unstimulierten Zellen durchzuführen. Daher ist nicht bekannt, inwieweit die ermittelten Aminosäuren reguliert oder konstitutiv phosphoryliert werden. Weder die T308A-Mutation noch die S468A-Mutation hatte einen nennenswerten Einfluss auf die Gesamtphosphorylierung der verwendeten Substratproteine. Eine denkbare Erklärung hierfür ist, dass die gewählten Stimulationsbedingungen (IL-1 α , 10 min) nicht den maximalen Stimulus für die entsprechenden Proteinkinasen darstellen und die Phosphorylierungen an diesen Positionen daher nicht reguliert waren oder aber dass gegenüber anderen stimulierten Phosphorylierungen, wie z.B. an Ser536, diese Phosphorylierungen nicht ins Gewicht fielen. Das Ausmaß der IL-1 α -abhängigen Phosphorylierung der S468A/S529A/S536A-Dreifachmutante war sogar stärker als in der Doppelmutante S529A/S536A. Als Ursache hierfür könnten strukturelle Effekte infolge der S468A-Mutation in Frage kommen, die die kinetischen Parameter des Substrates verändern. Ein interessanter Befund war, dass auch noch das Substratprotein mit der Dreifachmutation

S468A/S529A/S536A deutlich IL-1 α -reguliert phosphoryliert wurde. Demnach gibt es möglicherweise im C-terminalen Bereich neben den bekannten Phosphorylierungsstellen Ser529, Ser536 und der potentiellen Phosphorylierungsstelle Ser468 noch weitere Aminosäuren, die IL-1 α -reguliert phosphoryliert werden. Eine Beteiligung von Proteinkinase CaMK IV, die p65 an Ser535 phosphoryliert, an dieser IL-1 α -regulierten Phosphorylierung kann ausgeschlossen werden, da diese Kinase in HeLa-Zellen nicht exprimiert wird (Jang *et al.*, 2001; Bae *et al.*, 2003). Ein Grund dafür, dass in allen bisher durchgeführten Experimenten kein deutlicher Effekt auf die Phosphorylierung der Mutanten T308A und S468A festgestellt worden ist, könnte sein, dass die maximalen Stimuli für beide Phosphorylierungen nicht bestimmt werden konnten. Ein maximaler biologischer Effekt der Mutationen ist aber bei funktionellen Untersuchungen nur dann zu erwarten, wenn der Wildtyp maximal phosphoryliert ist. In nachfolgenden Untersuchungen muss daher zunächst untersucht werden, ob beide Aminosäuren *in-vivo* tatsächlich phosphoryliert werden und ob IL-1 α überhaupt die Phosphorylierung dieser Aminosäuren reguliert, oder ob andere Stimuli diese stärker induzieren. Phospho-spezifische Antikörper stellen hierbei ideale Werkzeuge zur Analyse der Stimulationsbedingungen dar, da hiermit selektiv die Induktion und Kinetik einer bestimmten Phosphorylierung analysiert werden kann.

4.4 Funktionelle Charakterisierung der Mutanten S281A, T308A und S468A

4.4.1 Funktionelle Charakterisierung der T308A-Mutante

Da Thr308 sehr nahe an der Kernlokalisierungssequenz von p65 (AS 301-304) liegt, könnte eine Phosphorylierung an Thr308 die Kerntranslokation beeinflussen (s. Abb. 4.3).

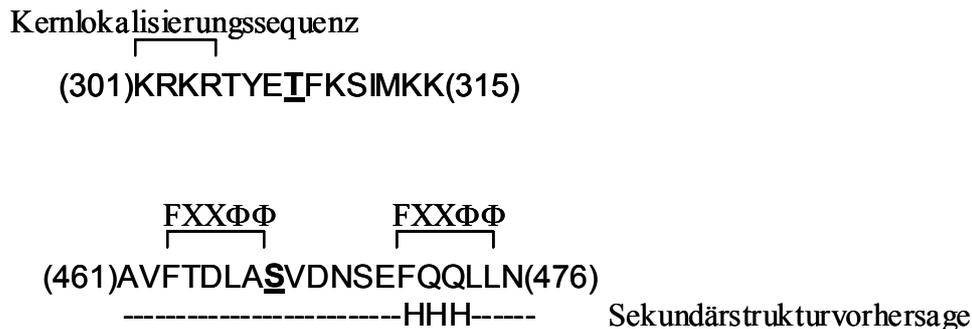


Abb. 4.3: Sequenzbereiche um Thr308 und Ser468

Thr308 und Ser468 wurden unterstrichen. Für den Sequenzbereich Ser468 ist das Ergebnis einer Sekundärstrukturanalyse mit JPred (Cuff *et al.*, 1998) dargestellt (H: α -Helix). FXX Φ Φ : putative TAFII31-Bindungsmotive.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente bezüglich einer Regulation der Kerntranslokation durch eine Phosphorylierung an Thr308 führten aber zu keinen aussagekräftigen Resultaten (Abb. 3.21): Nach Überexpression der T308A-Mutanten von p65 und GFP-p65 in p65-defizienten MEF-Zellen bzw. HeLaTA-Zellen konnten keine Unterschiede in der nukleären Translokation im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp (Abb. 3.21 B, Abb. 3.22 B) detektiert werden. Eine Regulation des Kerntransportes durch Phosphorylierungen wäre dann möglich, wenn die entsprechende Phosphorylierung zu veränderten Interaktionen mit Proteinen, die am Kerntransport von p65 beteiligt sind, führt. Denkbar wäre z.B. die Modulation der I κ B-Wechselwirkung oder der Interaktionen mit Proteinen der Kernporen und Karyophorinen wie Importin- α bzw. - β . Eine Überexpression der zu untersuchenden Proteine führt aber, wie hier gezeigt, zu überhöhten zellulären Konzentrationen, und dies könnte zu einer Übersättigung der Bindungsstellen dieser Interaktionspartner führen. Ein limitierender oder inhibierender Einfluss dieser Komponenten wäre dann nicht mehr feststellbar. Bei den überexprimierten p65-Formen könnte dies der Fall sein. So war ein Unterschied in der Kerntranslokation zwischen dem Wildtyp und der T308A-Mutante in der signalabhängigen Kerntranslokation nicht erkennbar. Dennoch war eine Abnahme beider Proteine im Cytosol feststellbar (Abb. 3.21 B). Um aussagekräftige Daten

über eine Regulation des Kerntransportes durch eine Phosphorylierung an Thr308 zu erhalten, ist eine Optimierung der Versuchsbedingungen erforderlich (z.B. Kinetikmessungen an einzelnen Zellen mit einer geringeren Expressionsrate von GFP-p65 oder die Hemmung der konstitutiv nukleären Translokation der überexprimierten p65-Formen durch eine Koexpression mit I κ B)

Bei einer Analyse der nukleären Translokation von p65-Mutanten kommt erschwerend hinzu, dass durch die Dimerisierung mit endogenen NF- κ B-Untereinheiten, der Effekt der Mutation vermindert werden könnte. Die Verwendung der p65-defizienten MEF-Zellen könnte, sofern nicht auch andere NF- κ B-Untereinheiten einen kompensierenden Einfluss haben, die Aussagekraft verbessern. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass aufgrund der festgestellten Limitationen der hier gezeigten Experimente eine phosphorylierungsabhängige Modulation der Kerntranslokation von p65 nicht festgestellt, aber auch nicht ausgeschlossen werden konnte. Um diesen Sachverhalt eingehender zu untersuchen, ist aber eine Optimierung der bisherigen Methode oder der Einsatz anderer Techniken erforderlich.

Neben einer Regulation des Kerntransportes könnte die Region um Thr308 auch die Transkription beeinflussen, da gezeigt wurde, dass eine Phosphorylierung an Ser311 durch PKC ζ die Interaktion mit dem Koaktivator CBP/p300 reguliert und damit die transkriptionelle Aktivität von p65 steuert (Duran *et al.*, 2003). Tatsächlich konnte in einem ersten Reporter-gen-Assay ein drastischer Effekt der T308A-Mutation auf die IL-1 α -abhängige transkriptionelle Aktivität von NF- κ B in p65-defizienten MEF-Zellen festgestellt werden. In HeLaTA-Zellen konnte hingegen keine Reduktion der transkriptionellen Aktivität dieser Mutante im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden (Abb. 3.21, 3.22). Diese Diskrepanz ist sehr wahrscheinlich auf den Einfluss des endogenen p65 zurückzuführen.

Ein direkter Effekt der Mutation T308A auf die DNA-Bindung *in-vitro* konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden, wie das EMSA-Experiment in Abb. 3.20 zeigte. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, dass Alanin-Mutationen nur eine eingeschränkte Aussagekraft haben, sofern die mutierten Proteine *in-vitro* translatiert werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und den Mutanten würde erst nach Expression und Stimulation *in-vivo* sichtbar werden, weil erst dann der Wildtyp in der phosphorylierten Form vorliegt. Alternativ könnte die Untersuchung mit phosphomimetischen Mutanten diese Ergebnisse vervollständigen. Eine andere Möglichkeit wäre, die Proteine *in-vitro* zu phosphorylieren. Doch hierzu müßte zuvor die entsprechende Proteinkinase identifiziert werden. Die Alanin-Mutanten könnten aber durchaus geeignet sein, um festzustellen, ob die entsprechenden Aminosäuren in Bereichen liegen, die die DNA-

Bindung beeinflussen. Eine Alanin-Mutante könnte sich in solchen Fällen sehr wohl sensitiv verhalten. Vor diesem Hintergrund scheint eine Phosphorylierung an Thr308 die DNA-Bindung von p65 nicht zu beeinflussen.

Da die in der Kernlokalisierungssequenz gelegenen Aminosäuren Lys 301, Arg 302, und Arg 304 auch an der Bindung von I κ B β an p65 beteiligt sind (Malek *et al.*, 2003), könnte eine Phosphorylierung an dem benachbarten Thr308 auch diesbezüglich einen Einfluß haben. In zukünftigen Untersuchungen könnte daher näher untersucht werden, ob eine Phosphorylierung an dieser Position die Bindung von CBP/p300, I κ B oder auch Karyophorinen reguliert. Essentiell für eine weitere funktionelle Untersuchung sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* ist die Identifizierung der an Thr308 phosphorylierenden Kinase. Die Kenntnis der zugehörigen Kinase und der damit verbundenen Signalwege und Stimuli würde es erlauben, selektiver Effekte infolge der T308A-Mutation zu untersuchen.

4.4.2 Funktionelle Charakterisierung der S468A-Mutante

Die funktionelle Charakterisierung der S468A-Mutante ergab, dass bezüglich Kerntranslokation und DNA-Bindungsaffinität kein Unterschied zur Wildtyp-Form festgestellt werden konnte (Abb. 3.22 B und Abb. 3.20). Demnach scheint eine Phosphorylierung an dieser Position, diesbezüglich keinen direkten Einfluß zu haben. Diese Aussage unterliegt aber den bereits hinsichtlich der T308A-Mutante ausführlich beschriebenen Einschränkungen. Eine Regulation der nukleären Translokation kann daher nicht ganz ausgeschlossen werden. Interessant hierbei ist, dass Ser468 in der Nähe zu einer putativen Kernexportsequenz (AS 436-445) liegt (Harhaj *et al.*, 1999) liegt. Eine Phosphorylierung an dieser Position könnte möglicherweise Effekte auf diese Kernexportsequenz ausüben. Wie im Falle von Thr308 sind für die abschließende Beurteilung einer möglichen Regulation des Kerntransportes durch Ser468 methodisch optimierte Experimente erforderlich.

Möglicherweise reguliert aber eine Phosphorylierung an Ser468 die IL-1 α -abhängige transkriptionelle Aktivität von p65, wie ein erstes Experiment mit p65^{-/-}-MEF-Zellen zeigte (Abb. 3.22 A). Besonders interessant dabei ist, dass Ser468 in der zweiten Transaktivierungsdomäne (TA2) von p65 liegt. Ser 468 liegt zwischen zwei Sequenzbereichen (AS 463-467 und AS 474-478), die das TAFII31-Bindungsmotiv FXX Φ Φ enthalten. Wie das Ergebnis einer Sekundärstrukturvorhersage mit dem Programm Jpred (Cuff *et al.*, 1998) zeigt, nimmt der Bereich von AS 474-478 sehr wahrscheinlich eine α -helikale Konformation ein und erfüllt somit die strukturelle Voraussetzung für ein

TAFII31-Bindungsmotiv (Abb. 4.3, s. S. 128). Es wurde berichtet, dass der Bereich von AS 442-470 von p65 für die starke transkriptionelle Aktivität von TA2 nach Stimulation mit PMA notwendig war und dies mit einer Phosphorylierung korrelierte (Schmitz *et al.*, 1995). Bei dieser Phosphorylierungsstelle könnte es sich sehr wahrscheinlich um Ser468 handeln, da in dieser Region mit Ser468 nur vier phosphorylierbare Aminosäuren vorhanden sind. In *in-vivo*-Kompetitionsexperimenten konkurrierten beide Transaktivierungsdomänen sowie die Transaktivierungsdomäne von VP16 offenbar um den gleichen Koaktivator (Schmitz *et al.*, 1991). Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem Koaktivator ebenfalls um TAFII31 handelt und dass Ser468 die Rekrutierung von TAFII31 in TA2 in ähnlicher Weise wie Ser536 in TA1 reguliert. Demnach könnte p65 zwei, voneinander unabhängige, durch Phosphorylierungen regulierte TAFII31-Bindungsmotive enthalten. Durch zwei Bindungsmotive, die möglicherweise durch verschiedene Signalwege reguliert werden, erhöht sich die Anzahl an möglichen Stimuli und Signalwegen, die zu einer transkriptionellen Aktivierung von p65 führen. Die verschiedenen Stimuli bzw. Signalwege aktivieren dann entweder TA1 (Ser536) oder TA2 (Ser468), doch bewirkt dies immer eine erhöhte TAFII31-Rekrutierung. Mit geeigneten p65-Konstrukten, die verschiedene Ser468-Mutanten enthalten, könnte die Interaktion zwischen TAFII31 und p65 in Abhängigkeit einer Phosphorylierung näher untersucht werden.

Interessant ist, dass es sich bei Ser468 um eine potentielle Phosphorylierungsstelle für GSK3 handelt, wie aus einer Vorhersage mit dem Programm NetPhos (Blom. *et al.*, 1999) hervorgeht. Hinzu kommt, dass GSK3 β den C-Terminus von p65 phosphorylieren kann (Schwabe *et al.*, 2002). Unklar ist dabei allerdings, ob eine Phosphorylierung an Ser468 durch GSK3 β eine Präphosphorylierung an der C-terminalen +4-Position erfordert, da dies in der Regel die katalytische Effizienz von GSK3 β um das hundert- bis tausendfache erhöht (Fiol *et al.*, 1987). In GSK3 β -defizienten Maus-Embryonen war außerdem die NF- κ B-Aktivierung stark vermindert (Hoeflich *et al.*, 2000), so dass GSK3 β für den NF- κ B-Signalweg durchaus eine wichtige Funktion auszuüben scheint.

4.4.2 Funktionelle Charakterisierung der S281A-Mutante

Von besonderem Interesse war auch die funktionelle Charakterisierung der Mutante von Ser281 in p65, die parallel mit den Mutanten T308A und S468A untersucht wurde, da die homologe Mutation in dem *Drosophila*-Protein Dorsal den Kerntransport beeinträchtigte (Drier *et al.*, 1999). Die Untersuchung der Mutante S281A führte zu dem Ergebnis, dass die Expression nach transienter Transfektion in HeLaTA-Zellen stark vermindert war (Abb. 3.21).

Ein geringfügiger nukleärer Kerntransport nach IL-1 α -Stimulation fand jedoch statt (s. Cytosole). In p65-defizienten MEF-Zellen war die Expression dieser Mutante aber der des Wildtypes vergleichbar, wobei in den IL-1 α -stimulierten Zellen die detektierte Proteinmenge etwas kleiner war. Eventuell ist diese Diskrepanz durch zelltyp-spezifische Faktoren erklärbar. Außerdem war die DNA-Bindung der S281A-Mutante und die transkriptionelle Aktivität in p65-defizienten MEF-Zellen drastisch vermindert (Abb. 3.20 und Abb. 3.22 A). Diese Ergebnisse deuten auf eine Destabilisierung von p65 durch diese Mutation hin. Während der Arbeiten an dieser Mutante erschien eine Studie (Maier *et al.*, 2003), in der nahezu die gleichen Resultate beschrieben wurden. Dort wurde berichtet, dass die Expression der S281A-Mutante in NIH 3T3-Zellen sehr gering war und in den Kernextrakten dieser transfizierten Zellen konnte ebenfalls keine DNA-Bindung mehr nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die transkriptionelle Aktivität dieser Mutante stark reduziert war. Außerdem wurde in der oben genannten Studie gezeigt, dass die phosphomimetische S281E-Mutante, bei der das Serin durch ein Glutamat ausgetauscht wurde, sich genauso wie die S281A-Mutation verhielt. Danach erscheint eine Phosphorylierung von Serin-281 sehr unwahrscheinlich. Die Analyse der erstellten Strukturmodelle (s. Abb. 3.23 und Abb. 3.24B) könnte hierfür eine Erklärung liefern. Serin-281 in p65 und das homologe Serin-317 in Dorsal könnten aufgrund der möglichen Beteiligung an einem Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk essentiell zur strukturellen Stabilität der Faltblattstruktur in der Dimerisierungsdomäne beitragen. Durch den Alanin-Austausch wird das Protein destabilisiert und wird nach Expression in einigen Säugerzelllinien vorzeitig degradiert. Die homologe S317A-Mutante von Dorsal führt in *Drosophila* zu einem verminderten nukleären Import und zu einer veränderten Morphogenese in Embryonen (Drier *et al.*, 1999). Dieser Funktionsverlust könnte ebenfalls durch einen Aktivitätsverlust infolge von Destabilisierung erklärbar sein. Fraglich ist vor diesem Hintergrund, ob Serin-317 in Dorsal überhaupt phosphoryliert wird. In der Originalpublikation, in der die Phosphorylierung von Serin-317 postuliert wurde, wurde berichtet, dass die S317A-Mutante im Westernblot eine veränderte elektrophoretische Mobilität verglichen mit dem Wildtyp zeigt. Ein direkter Nachweis einer Phosphorylierung von Serin-317 mit einem phosphospezifischen Antikörper oder durch einen Kinaseassay wurde aber nicht gezeigt (Drier *et al.*, 1999). Die in der Literatur und in dieser Arbeit beschriebenen Effekte einer S281A-Mutation in p65 bzw. der S317A-Mutation in Dorsal können deswegen auch durch eine Destabilisierung der Proteinstruktur erklärt werden. Auch wegen der geringen Lösungsmittelzugänglichkeit beider Aminosäuren (Serin-

281 in p65: 1,12–2,45%; Serin-317 in Dorsal: 1,22%) erscheint eine Phosphorylierung eher unwahrscheinlich.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

Die Aktivität der NF- κ B-Untereinheit p65 wird maßgeblich durch Phosphorylierungen reguliert. In dieser Arbeit konnte mittels Anionenaustauschchromatographie eine unbekannte Proteinkinase (Kinase 1) entdeckt werden, die IL-1 α -abhängig Serin-536 in p65 phosphoryliert. Bis zum jetzigen Zeitpunkt war nur IKK β in der Literatur als physiologisch relevante Kinase, die Serin-536 phosphoryliert, näher untersucht worden. Die aus diesem ersten Befund abgeleitete Hypothese, nach der andere Proteinkinasen wie z.B. Kinase 1 neben IKK β *in-vivo* einen wichtigen Anteil an der IL-1 α -induzierten Serin-536-Phosphorylierung haben, konnte durch mehrere Befunde untermauert werden. Alle verwendeten Methoden zur Hemmung der IKK β -Aktivität *in-vivo* (Suppression mit siRNA, Überexpression dominant-negativer Mutanten, Hemmung mit dem spezifischen Inhibitor SC-514) führten nur zu einer partiellen Hemmung der IL-1 α -abhängigen Serin-536-Phosphorylierung.

Darüberhinaus konnten in dieser Arbeit Daten präsentiert werden, die der Serin-536-Phosphorylierung eine aktivierende Funktion bezüglich der transkriptionellen Aktivität von p65 zuweisen. Nach den vorliegenden Daten konnte ein Modell postuliert werden, wonach eine Phosphorylierung an Serin-536 die Interaktion mit dem Korepressor AES inhibiert und dadurch die Bindung des Koaktivators TAFII31 ermöglicht. Dieser Mechanismus könnte somit die festgestellte Erhöhung der transkriptionellen Aktivität von p65 infolge einer Phosphorylierung an Serin-536 erklären.

Da nach den hier präsentierten Daten die Phosphorylierung an Serin-536 sehr wichtig für die transkriptionelle Aktivität ist, ist die Identifizierung aller Serin-536-phosphorylierenden Kinasen von besonderem Interesse. Die Identifizierung von Kinase 1 würde es ermöglichen, den genauen Anteil dieser Kinase an der Serin-536-Phosphorylierung *in-vivo* mit den gleichen Methoden, wie sie für IKK β verwendet wurden, für verschiedene Stimuli zu charakterisieren. Mit der beschriebenen Anionenaustauschchromatographie ist für eine weitere Aufreinigung von Kinase 1 die experimentelle Grundlage geschaffen worden. Noch ungeklärt ist, ob TBK1, die in der Literatur auch als Serin-536-phosphorylierende Kinase beschrieben wurde, einen physiologisch relevanten Einfluss auf diese Phosphorylierung hat. Bei zukünftigen Untersuchungen der induzierten Serin-536-Phosphorylierung sollte daher auch der Einfluss von TBK1 analysiert werden. Die induzierte Phosphorylierung an Serin-536 von p65 scheint, wie die Daten aus dieser Arbeit und die in der Literatur nahe legen, eine wichtige Rolle als Konvergenz- und Integrationspunkt bei der Regulation der NF- κ B-Aktivität zu spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem versucht, neue Phosphorylierungsstellen in p65 mit Hilfe eines Peptid-Arrays zu identifizieren. Hierbei konnten die zwei putativen Phosphorylierungsstellen Threonin-308 und Serin-468 ermittelt werden. Erste Untersuchungen zeigen, dass diese Phosphorylierungen die transkriptionelle Aktivität in Abhängigkeit von IL-1 α beeinflussen könnten. Allerdings muß dieser Befund noch durch weitere Experimente reproduziert werden. Unklar ist ebenfalls noch die genaue Kinetik dieser Phosphorylierungen. In Kinaseassays mit rekombinanten Substrat war es bisher nicht möglich eine signifikante Phosphorylierung an diesen Positionen selektiv zu messen, da p65 mehrfach phosphoryliert wird. Ideale Werkzeuge für die selektive Analyse von einzelnen Phosphorylierungen stellen phospho-spezifische Antikörper dar. So war die genaue, spezifische Charakterisierung der Serin-536-Phosphorylierung erst durch die Verfügbarkeit eines hochspezifischen Antikörpers für diese Phosphorylierung möglich. Mit Hilfe solcher Antikörper könnte es gelingen, die Stimuli, die zu einer maximalen Phosphorylierung an diesen Positionen führen, zu bestimmen. Damit wäre die experimentelle Grundlage für die Identifizierung der zugehörigen Kinasen und eine weitere funktionelle Analyse *in-vivo* gelegt. In der Literatur wurde berichtet, dass die Kinase GSK3 β p65 an einer unbekannt Position phosphoryliert. Da Serin-468 eine potentielle GSK3-Phosphorylierungsstelle darstellt, liegt es nahe, zunächst zu überprüfen, ob diese Kinase an Serin-468 phosphoryliert. Serin-468 liegt außerdem in der Nähe zu einem potentiellen Bindungsmotiv für den Koaktivator TAFII31. In nachfolgenden Untersuchungen sollte daher, ähnlich wie es im Rahmen dieser Arbeit für die Serin-536-Phosphorylierung geschehen ist, überprüft werden, ob eine Phosphorylierung von Serin-468 die Interaktion von p65 mit TAFII31 beeinflussen kann.

Schwierigkeiten bereitete die Analyse des Kerntransportes. Aufgrund der Überexpression zeigten sowohl die an den Phosphorylierungsstellen mutierten Proteine als auch die Wildtyp-Form bereits eine hohe konstitutive Kerntranslokation. Für eine genaue Analyse der Transportkinetik müssen daher die experimentellen Bedingungen (z.B. Koexpression mit I κ B-Protein) optimiert werden.

Ein weiterer wichtiger Befund dieser Arbeit stellt die festgestellte Instabilität einer Alanin-Mutante von Serin-281 in p65 dar. Dies stand in Übereinstimmung mit in der Literatur veröffentlichten Daten. Die genaue Analyse der Struktur von p65 und eines erstellten Strukturmodells des *Drosophila* Homologen Dorsal ergaben, dass Mutationen an den jeweiligen homologen Serinen die Tertiärstrukturen beider Proteine durch Eliminierung von Wasserstoffbrückenbindungen destabilisieren könnten. Die Hemmung des in einer Studie beschriebenen Kerntransportes durch die homologe Mutation in Dorsal könnte

möglicherweise dadurch erklärt werden. Die vorhergesagte Instabilität der S281A-Mutante in p65 und auch die der homologen Mutante in Dorsal könnte durch weitere Untersuchungen (Analyse der Proteinfaltung mit CD-Spektroskopie, Stabilitätsuntersuchungen mit Denaturierungsexperimenten usw.) überprüft werden. Abb. 5.1 fasst die bezüglich der phosphorylierungsabhängigen Regulation von p65 erhaltenen Befunde noch einmal zusammen.

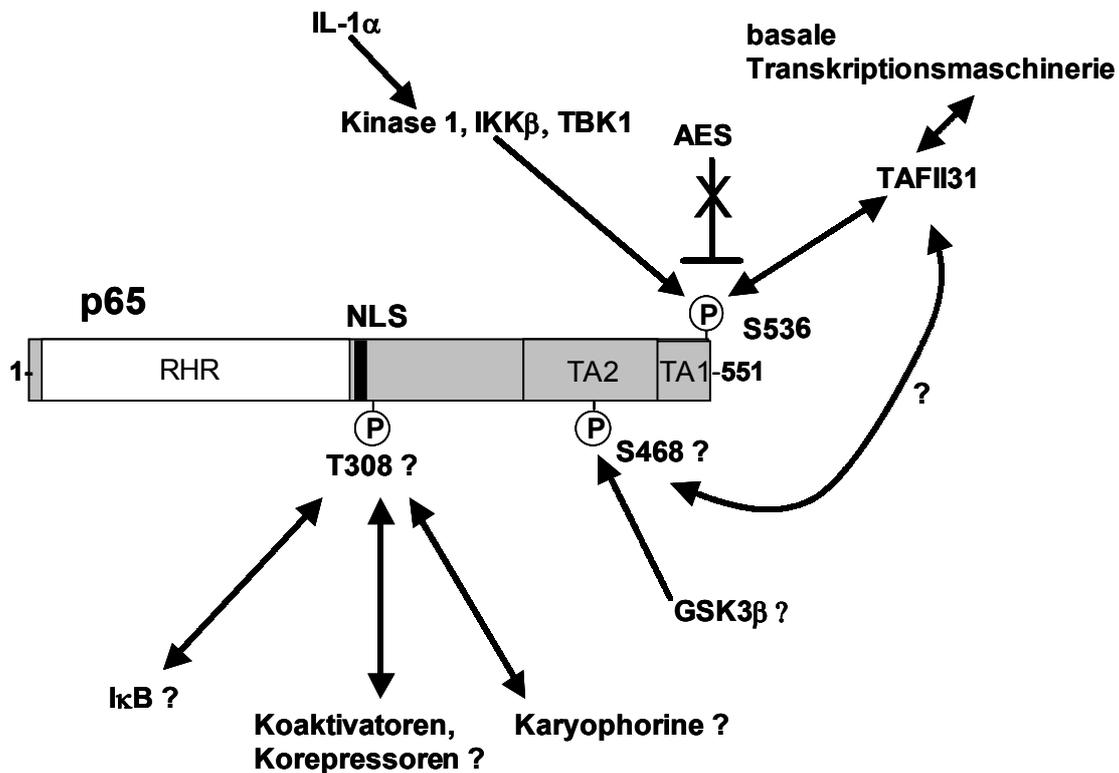


Abb. 5.1: Zusammenfassung der Befunde

Dargestellt sind alle im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Befunde bezüglich phosphorylierungsabhängiger Regulationsmechanismen von p65 und den daraus abgeleiteten Hypothesen (?). Neben IKKβ und TBK1 phosphoryliert Kinase 1 Serin-536, was die Interaktion mit AES und TAFII31 reguliert. Eine Phosphorylierung an Serin-468 (möglicherweise durch GSK3β) könnte ebenfalls die Interaktion mit TAFII31 beeinflussen. Eine Phosphorylierung an T308 könnte aufgrund der Position dieser Aminosäure die Interaktion mit IκB, Koaktivatoren/-repressoren oder Karyophorinen regulieren.

Abk.: RHR: Rel-Homologie-Region, NLS: Nukleäre Lokalisierungssequenz.

6. Anhang

6.1 Sequenzdaten der Peptid-Arrays

Bereich AS 354-551 mit mutierten Referenzpeptiden (Abb. 3.15):

Spot	AS-Pos.-Anfang	AS-Sequenz	AS-Pos.-Ende
A1	354	SLSTINYDEFPTMVF	368
A2	357	TINYDEFPTMVFPSPG	371
A3	360	YDEFPTMVFPSPGQIS	374
A4	363	FPTMVFPSPGQISQAS	377
A5	366	MVFPSPGQISQASALA	380
A6	369	PSGQISQASALAPAP	383
A7	372	QISQASALAPAPPQV	386
A8	375	QASALAPAPPQVLPQ	389
A9	378	ALAPAPPQVLPQAPA	392
A10	381	PAPPQVLPQAPAPAP	395
A11	384	PQVLPQAPAPAPAPA	398
A12	387	LPQAPAPAPAPAMVS	401
A13	390	APAPAPAPAMVSALA	404
A14	393	PAPAPAMVSALAQAP	407
A15	396	APAMVSALAQAPAPV	410
A16	399	MVSALAQAPAPVPVL	413
A17	402	ALAQAPAPVPVLAPG	416
A18	405	QAPAPVPVLAPGPPQ	419
A19	408	APVPVLAPGPPQAVA	422
A20	411	PVLAPGPPQAVAPPA	425
A21	414	APGPPQAVAPPAPKP	428
A22	417	PPQAVAPPAPKPTQA	431
A23	420	AVAPPAPKPTQAGEG	434
A24	423	PPAPKPTQAGEGTL	437
A25	426	PKPTQAGEGTLSEAL	440
B1	429	TQAGEGTLSEALLQL	443
B2	432	GEGTLSEALLQLQFD	446
B3	435	TLSEALLQLQFDDED	449
B4	438	EALLQLQFDDEDLGA	452
B5	441	LQLQFDDEDLGALLG	455
B6	444	QFDDEDLGALLGNST	458
B7	447	DEDLGALLGNSTDPA	461
B8	450	LGALLGNSTDPAVFT	464
B9	453	LLGNSTDPAVFTDLA	467
B10	456	NSTDPAVFTDLASVD	470
B11	459	DPAVFTDLASVDNSE	473
B12	462	VFTDLASVDNSEFQQ	476
B13	465	DLASVDNSEFQQLLN	479
B14	468	SVDNSEFQQLLNQGI	482
B15	471	NSEFQQLLNQGIPVA	485
B16	474	FQQLLNQGIPVAPHT	488
B17	477	LLNQGIPVAPHTTEP	491

B18	480	QGIPVAPHTTEPMLM	494
B19	483	PVAPHTTEPMLMEYP	497
B20	486	PHTTEPMLMEYPEAI	500
B21	489	TEPMLMEYPEAITRL	503
B22	492	MLMEYPEAITRLVTG	506
B23	495	EYPEAITRLVTGAQR	509
B24	498	EAITRLVTGAQRPPD	512
B25	501	TRLVTGAQRPPDPAP	515
C1	504	VTGAQRPPDPAPAPL	518
C2	507	AQRPPDPAPAPLGAP	521
C3	510	PPDPAPAPLGAPGLP	524
C4	513	PAPAPLGAPGLPNGL	527
C5	516	APLGAPGLPNGLLSG	530
C6	519	GAPGLPNGLLSGDED	533
C7	522	GLPNGLLSGDEDFSS	536
C8	525	NGLLSGDEDFSSIAD	539
C9	528	LSGDEDFSSIADMDF	542
C10	531	DEDFSSIADMDFSAL	545
C11	534	FSSIADMDFSALLSQ	548
C12	537	IADMDFSALLSQISS	551
C13	Referenzpep.	APLGAPGLPNGLLAG	Referenzpep.
C14	Referenzpep.	GAPGLPNGLLAGDED	Referenzpep.
C15	Referenzpep.	GLPNGLLAGDEDFSS	Referenzpep.
C16	Referenzpep.	GLPNGLLSGDEDFSA	Referenzpep.
C17	Referenzpep.	NGLLAGDEDFSSIAD	Referenzpep.
C18	Referenzpep.	NGLLSGDEDFSAIAD	Referenzpep.
C19	Referenzpep.	LAGDEDFSSIADMDF	Referenzpep.
C20	Referenzpep.	LSGDEDFSAIADMDF	Referenzpep.
C21	Referenzpep.	DEDFSAIADMDFSAL	Referenzpep.
C22	Referenzpep.	DEDFSSIADMDFSAAL	Referenzpep.
C23	Referenzpep.	FSAIADMDFSALLSQ	Referenzpep.
C24	Referenzpep.	FSSIADMDFSAALLAQ	Referenzpep.
C25	Referenzpep.	IADMDFSAALLAQISS	Referenzpep.

Bereich AS 1-551 (Abb. 3.16):

Spot	AS-Pos.-Anfang:	AS-Sequenz:	AS-Pos.-Ende:
A1	1	MDELFP LIFPAEPAQ	15
A2	4	LFPLIFPAEPAQASG	18
A3	7	LIFPAEPAQASGPYV	21
A4	10	PAEPAQASGPYVEII	24
A5	13	PAQASGPYVEII EQP	27
A6	16	ASGPYVEII EQPKQR	30
A7	19	PYVEII EQPKQRGMR	33
A8	22	EII EQPKQRGMRFRY	36
A9	25	EQPKQRGMRFRYKCE	39
A10	28	KQRGMRFRYKCEGRS	42
A11	31	GMRFRYKCEGRSAGS	45
A12	34	FRYKCEGRSAGSIPG	48
A13	37	KCEGRSAGSIPGERS	51
A14	40	GRSAGSIPGERSTDT	54
A15	43	AGSIPGERSTDTTKT	57

A16	46	IPGERSTDTTKTHPT	60
A17	49	ERSTDTTKTHPTIKI	63
A18	52	TDTTKTHPTIKINGY	66
A19	55	TKTHPTIKINGYTGP	69
A20	58	HPTIKINGYTGPDTV	72
A21	61	IKINGYTGPDTVRI	75
A22	64	NGYTGPDTVRI	78
A23	67	TGPDTVRI	81
A24	70	GTVRI	84
A25	73	RISLVT	87
B1	76	LVT	90
B2	79	KDPPHR	93
B3	82	PHR	96
B4	85	PHPHEL	99
B5	88	HELVGK	102
B6	91	VGKDCR	105
B7	94	DCRDGF	108
B8	97	DGFYEA	111
B9	100	YEAELC	114
B10	103	ELCPDR	117
B11	106	PDR	120
B12	109	CIHSFQ	123
B13	112	SFQNL	126
B14	115	NLGIQ	129
B15	118	IQCVK	132
B16	121	VKKRD	135
B17	124	RDLEQ	138
B18	127	EQAISQ	141
B19	130	ISQRIQ	144
B20	133	RIQTNN	147
B21	136	TNNNPF	150
B22	139	NPFQV	153
B23	142	QVPIE	156
B24	145	IEEQRG	159
B25	148	QRGDY	162
C1	151	DYDLN	165
C2	154	LNAVRL	168
C3	157	VRLCFQ	171
C4	160	CFQVTR	174
C5	163	VTVRDP	177
C6	166	RDPSGR	180
C7	169	SGRPLR	183
C8	172	PLRLPP	186
C9	175	LPPVLP	189
C10	178	VLPHPI	192
C11	181	HPIFDN	195
C12	184	FDNRAP	198
C13	187	RAPNTA	201
C14	190	NTAELK	204
C15	193	ELKICR	207
C16	196	ICRVNR	210

C17	199	VNRNSGSCLOGGDEIF	213
C18	202	NSGSCLOGGDEIFLLC	216
C19	205	SCLGGDEIFLLCDKV	219
C20	208	GGDEIFLLCDKVQKE	222
C21	211	EIFLLCDKVQKEDIE	225
C22	214	LLCDKVQKEDIEVYF	228
C23	217	DKVQKEDIEVYFTGP	231
C24	220	QKEDIEVYFTGPGWE	234
C25	223	DIEVYFTGPGWEARG	237
D1	226	VYFTGPGWEARGSFS	240
D2	229	TGPGWEARGSFSQAD	243
D3	232	GWEARGSFSQADVHR	246
D4	235	ARGSFSQADVHRQVA	249
D5	238	SFSQADVHRQVAIVF	252
D6	241	QADVHRQVAIVFRTP	255
D7	244	VHRQVAIVFRTPPYA	258
D8	247	QVAIVFRTPPYADPS	261
D9	250	IVFRTPPYADPSLQA	264
D10	253	RTPPYADPSLQAPVR	267
D11	256	PYADPSLQAPVRVSM	270
D12	259	DPSLQAPVRVSMQLR	273
D13	262	LQAPVRVSMQLRRPS	276
D14	265	PVRVSMQLRRPSDRE	279
D15	268	VSMQLRRPSDRELSE	282
D16	271	QLRRPSDRELSEPME	285
D17	274	RPSDRELSEPMEFQY	288
D18	277	DRELSEPMEFQYLPD	291
D19	280	LSEPMEFQYLPDTHD	294
D20	283	PMEFQYLPDTHDRHR	297
D21	286	FQYLPDTHDRHRIE	300
D22	289	LPDTHDRHRIEEKRK	303
D23	292	TDRHRIEEKRKRTY	306
D24	295	RHRIEEKRKRTYETF	309
D25	298	IEEKRKRTYETFKSI	312
E1	301	KRKRTYETFKSIMKK	315
E2	304	RTYETFKSIMKKSPF	318
E3	307	ETFKSIMKKSPFSGP	321
E4	310	KSIMKKSPFSGPTDP	324
E5	313	MKKSPFSGPTDPRPP	327
E6	316	SPFSGPTDPRPPRR	330
E7	319	SGPTDPRPPRRRIAV	333
E8	322	TDPRPPRRRIAVPSR	336
E9	325	RPPRRRIAVPSRSSA	339
E10	328	PRRIAVPSRSSASVP	342
E11	331	IAVPSRSSASVPKPA	345
E12	334	PSRSSASVPKAPQP	348
E13	337	SSASVPKAPQYPYF	351
E14	340	SVPKAPQYPYFPTSS	354
E15	343	KAPQYPYFPTSSLST	357
E16	346	PQYPYFPTSSLSTINY	360
E17	349	YPFTSSLSTINYDEF	363

E18	352	TSSLSTINYDEFPTM	366
E19	355	LSTINYDEFPTMVFP	369
E20	358	INYDEFPTMVFP SGQ	372
E21	361	DEFPTMVFP SGQISQ	375
E22	364	PTMVFP SGQISQASA	378
E23	367	VFPSGQISQASALAP	381
E24	370	SGQISQASALAPAPP	384
E25	373	ISQASALAPAPPQVL	387
F1	376	ASALAPAPPQVLPQA	390
F2	379	LAPAPPQVLPQAPAP	393
F3	382	APPQVLPQAPAPAPA	396
F4	385	QVLPQAPAPAPAPAM	399
F5	388	PQAPAPAPAPAMVSA	402
F6	391	PAPAPAPAMVSALAQ	405
F7	394	APAPAMVSALAQAPA	408
F8	397	PAMVSALAQAPAPVP	411
F9	400	VSALAQAPAPVPVLA	414
F10	403	LAQAPAPVPVLAPGP	417
F11	406	APAPVPVLAPGPPQA	420
F12	409	PVPVLAPGPPQAVAP	423
F13	412	VLAPGPPQAVAPPAP	426
F14	415	PGPPQAVAPPAPKPT	429
F15	418	PQAVAPPAPKPTQAG	432
F16	421	VAPPAPKPTQAGEGT	435
F17	424	PAPKPTQAGEGTLSE	438
F18	427	KPTQAGEGTLSEALL	441
F19	430	QAGEGTLSEALLQLQ	444
F20	433	EGTLSEALLQLQFDD	447
F21	436	LSEALLQLQFDDIDL	450
F22	439	ALLQLQFDDIDL GAL	453
F23	442	QLQFDDIDL GALLGN	456
F24	445	FDDEDL GALLGNSTD	459
F25	448	EDL GALLGNSTDP AV	462
G1	451	GALLGNSTDP AVFTD	465
G2	454	LGNSTDP AVFTDLAS	468
G3	457	STDP AVFTDLASVDN	471
G4	460	PAVFTDLASVDNSEF	474
G5	463	FTDLASVDNSEFQQL	477
G6	466	LASVDNSEFQQLLNQ	480
G7	469	VDNSEFQQLLNQGIP	483
G8	472	SEFQQLLNQGIPVAP	486
G9	475	QQLLNQGIPVAPHTT	489
G10	478	LNQGIPVAPHTTEPM	492
G11	481	GIPVAPHTTEPMLME	495
G12	484	VAPHTTEPMLMEYPE	498
G13	487	HTTEPMLMEYPEAIT	501
G14	490	EPMLMEYPEAITRLV	504
G15	493	LMEYPEAITRLVTGA	507
G16	496	YPEAITRLVTGAQRP	510
G17	499	AITRLVTGAQRPPDP	513
G18	502	RLVTGAQRPPDPAPA	516

G19	505	TGAQRPPDPAPAPLG	519
G20	508	QRPPDPAPAPLGAPG	522
G21	511	PDPAPAPLGAPGLPN	525
G22	514	APAPLGAPGLPNGLL	528
G23	517	PLGAPGLPNGLLSGD	531
G24	520	APGLPNGLLSGDEDF	534
G25	523	LPNGLLSGDEDFSSI	537
H1	526	GLLSGDEDFSSIADM	540
H2	529	SGDEDFSSIADMDFS	543
H3	532	EDFSSIADMDFSALL	546
H4	535	SSIADMDFSALLSQI	549
H5	538	IADMDFSALLSQISS	552

Peptid-Array mit mutierten Referenzpeptiden (Abb. 3.17):

Spot	AS-Pos.-Anfang	Sequenz	AS-Pos.-Ende	Mutation
A1	28	KQRGMRF RYKCEGRS	42	WT
A2	28	KQRGMRF RFKCEGRS	42	Y36F
A3	28	KQRGMRF RYKCEGRA	42	S42A
A4	28	KQRGMRF RFKCEGRA	42	Y36F, S42A
A5	28	KQRGMRF RFKCEGRS	42	Y36F
A6	28	KQRGMRF RFKCEGRA	42	vollständig
A7	34	FRYKCEGRSAGSIPG	48	WT
A8	34	FRYKCEGRAAGSIPG	48	S42A
A9	34	FRYKCEGRSAGAIPG	48	S45A
A10	34	FRYKCEGRAAGAIPG	48	S42A, S45A
A11	34	FRFKCEGRAAGSIPG	48	Y36F, S42A
A12	34	FRFKCEGRSAGAIPG	48	Y36F, S45A
A13	34	FRFKCEGRAAGAIPG	48	vollständig
A14	52	TDTTKTHPTIKINGY	66	WT
A15	52	TDTAKTHPTIKINGY	66	T55A
A16	52	TDTAKAHPTIKINGY	66	T55A, T57A
A17	55	TKTHPTIKINGYTGP	69	WT
A18	55	AKTHPTIKINGYTGP	69	T55A
A19	55	TKAHPTIKINGYTGP	69	T57A
A20	55	TKTHPAIKINGYTGP	69	T60A
A21	55	TKTHPTIKINGFTGP	69	Y66F
A22	55	TKTHPTIKINGYAGP	69	T67A
A23	55	AKTHPAIKINGYTGP	69	T55A, T60A
A24	55	TKAHPAIKINGYTGP	69	T57A, T60A
A25	55	TKTHPAIKINGYAGP	69	T60A, T67A
B1	55	AKAHPAIKINGFTGP	69	vollständig
B2	97	DGFYEAELCPDRCIH	111	WT
B3	97	DGFFEAELCPDRCIH	111	Y100F
B4	112	SFQNLGIQC VKKRDL	126	WT
B5	112	AFQNLGIQC VKKRDL	126	S112A
B6	121	VKKRDLEQAISQRIQ	135	WT
B7	121	VKKRDLEQAIAQRIQ	135	S131A
B8	202	NSGSCLGGDEIFLLC	216	WT
B9	202	NAGSCLGGDEIFLLC	216	S203A

B10	202	NSGACLGGEIFLLC	216	S205A
B11	202	NAGACLGGEIFLLC	216	S203A, S205A
B12	295	RHRIEEKRKRTYETF	309	WT
B13	295	RHRIEEKRKRAYETF	309	T305A
B14	295	RHRIEEKKRRTFETF	309	Y306F
B15	295	RHRIEEKRKRTYEAF	309	T308A
B16	295	RHRIEEKRKRAYEAF	309	T305A, T308A
B17	295	RHRIEEKRKRAFETF	309	T305A, Y306F
B18	295	RHRIEEKKRRTFEAF	309	Y306F, T308F
B19	301	KRKRTYETFKSIMKK	315	WT
B20	301	KRKRTFETFKSIMKK	315	Y306F
B21	301	KRKRAYETFKSIMKK	315	T305A
B22	301	KRKRTYEAFKSIMKK	315	T308A
B23	301	KRKRTYETFKAIMKK	315	S311A
B24	301	KRKRAFEAFKAIMKK	315	vollständig
B25	301	KRKRAYETFKAIMKK	315	T305A, S311A
C1	301	KRKRTYEAFKAIMKK	315	T308A, S311A
C2	301	KRKRAYEAFKSIMKK	315	T305A, T308A
C3	307	ETFKSIMKKSPFSGP	321	WT
C4	307	ETFKAIMKKSPFSGP	321	S311A
C5	307	ETFKSIMKKAPFSGP	321	S316A
C6	307	ETFKSIMKKSPFAGP	321	S319A
C7	307	ETFKAIMKKAPFSGP	321	S311A, S316A
C8	307	ETFKAIMKKSPFAGP	321	S311A, S319A
C9	307	ETFKSIMKKAPFAGP	321	S316A, S319A
C10	307	EAFKAIMKKAPFAGP	321	vollständig
C11	310	KSIMKKSPFSGPTDP	324	WT
C12	310	KSIMKKSPFSGPADP	324	T322A
C13	310	KSIMKKAPFAGPTDP	324	S316A, S319A
C14	310	KAIMKKSPFAGPTDP	324	S311A, S319A
C15	310	KAIMKKAPFAGPTDP	324	S311A, S316A
C16	310	KAIMKKAPFAGPADP	324	vollständig
C17	313	MKKSPFSGPTDPRPP	327	WT
C18	313	MKKSPFSGPADPRPP	327	T322A
C19	313	MKKSPFAGPADPRPP	327	S319A, T322A
C20	313	MKKAPFSGPADPRPP	327	S316A, T322A
C21	313	MKKAPFAGPTDPRPP	327	S316A, S319A
C22	313	MKKAPFAGPADPRPP	327	vollständig
C23	325	RPPRRIAVPSRSSA	339	WT
C24	325	RPPRRIAVPARSSA	339	S335A
C25	325	RPPRRIAVPARASA	339	S335A, S337A
D1	325	RPPRRIAVPARSAA	339	S335A, S338A
D2	325	RPPRRIAVPSRAAA	339	S337A, S338A
D3	328	PRRIAVPSRSSASVP	342	WT
D4	328	PRRIAVPSRSSAAVP	342	S340A
D5	328	PRRIAVPSRSAAAVP	342	S338A, S340A
D6	328	PRRIAVPSRASAAVP	342	S337A, S340A
D7	328	PRRIAVPSRAAASVP	342	S337A, S338A
D8	328	PRRIAVPARAAAAMP	342	vollständig
D9	445	FDDEDLGALLGNSTD	459	WT
D10	445	FDDEDLGALLGNATD	459	S457A

D11	445	FDDEDLGALLGNSAD	459	T458A
D12	445	FDDEDLGALLGNAAD	459	S457A, T458A
D13	448	EDLGALLGNSTDPAV	462	WT
D14	448	EDLGALLGNATDPAV	462	S457A
D15	448	EDLGALLGNSADPAV	462	T458A
D16	448	EDLGALLGNAADPAV	462	S457A, T458A
D17	460	PAVFTDLASVDNSEF	474	WT
D18	460	PAVFADLASVDNSEF	474	T464A
D19	463	FTDLASVDNSEFQQL	477	WT
D20	463	FADLASVDNSEFQQL	477	T464A
D21	463	FTDLAAVDNSEFQQL	477	S468A
D22	463	FTDLASVDNAEFQQL	477	S472A
D23	463	FADLAAVDNSEFQQL	477	T464A, S468A
D24	463	FADLASVDNAEFQQL	477	T464A, S472A
D25	463	FTDLAAVDNAEFQQL	477	S468A, S472A

6.2 Sequenzalignment von Dorsal, Gambif und c-rel für die Homologiemodellierung

Für die Homologiemodellierung von Dorsal₄₇₋₃₂₄ (Abschnitt 3.4.7) wurde folgendes Struktur-*Alignment* der Ketten A in den Dateien 1gji.PDB (c-rel) und 1bvo.PDB (Gambif) verwendet:

							PYUK
							PYIE
							PYVE
							**.
dorsal	51	ITEQPAGKAL	RFRYECEGRS	AGSIPGUNST	PENKTYPTIE	IUGYKGRAUV	
1gjiA	11	IFEQPRQRGM	RFRYKCEGRS	AGSIPGEHST	DNNKTFPSIQ	ILNYFGKVKI	
1bvoA	52	ITEQPHPKAL	RFRYECEGRS	AGSIPGUNT	AEQKTFPSIQ	UHGVRGRAUV	
		* **	...	**** *****	***** **.*.*.	. * * .
dorsal	101	UUSCUTKDTP	-YRPHPHNLU	GKEGCKKGVC	TLEINSETMR	AVFSNLGIQC	
1gjiA	61	RTTLUTKNEP	-YKPHPHDLU	GKD-CRDGY	EAEFGPERRU	LSFQNLGIQC	
1bvoA	102	UUSCUTKEGP	EHKPHPHNLU	GKEGCKKGVC	TVEINSTTMS	YTFNNLGIQC	
		. **.* *	..****.**	**.*.*	*. .	* *****	
dorsal	150	VKKKDIEAAL	KAREEIRUDP	FKTGFSHRFQ	-PSSIDLNSU	RLCFQVFMES	
1gjiA	109	VKKKDLKESI	SLRISKKINP	FNVPEEQLHN	-IDEYDLNVU	RLCFQAFL-P	
1bvoA	152	VKKKDVEEAL	RLRQEIRUDP	FRTG-FGHAK	EPGSIDLNAV	RLCFQVFL-E	
		*****. ..	* ...*	*	*** *	***** *	
dorsal	199	EQKGR-FTSP	LPPUUSEPIF	DKKA--MSDL	VICRLCSCSA	TVFGNTQIIL	
1gjiA	157	DEHGN-YTLA	LPPLISNPIY	DNRAPNTAEL	RICRUNKNCG	SUKGGDEIFI	
1bvoA	200	GQQRGRFTEP	LTPUUSDIIY	DKK			
		. * . *	* **.*.* *	*..			
dorsal	246	LCEKVAKEDI	SURFFEEKNG	QSUWEAFGDF	QHTDVHKQTA	ITFKTPRYHT	
1gjiA	206	LCDKUQKDDI	EURFULDN--	---WEAKGSF	SQADVHRQUA	IUFRTPPFLR	
1bvoA							
dorsal	296	LDITEPAKUF	IQLRRPSDGV	TSEALPFYU	PM		
1gjiA	251	-DITEPITUK	MLRRPSDQE	USEPMDFRYL	PD		
1bvoA							

*: Identität bei allen Sequenzen, -: Ähnlichkeit bei allen Sequenzen

7. Literatur

- Anrather J, Csizmadia V, Soares MP, Winkler H. Regulation of NF-kappaB RelA phosphorylation and transcriptional activity by p21(ras) and protein kinase Czeta in primary endo-thelial cells. *J Biol Chem.* 1999 May 7;274(19):13594-603.
- Appella E, Anderson CW. Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code. *Pathol Biol (Paris).* 2000 Apr;48(3):227-45.
- Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem.* 2001 May;268(10):2764-72.
- Bae JS, Jang MK, Hong S, An WG, Choi YH, Kim HD, Cheong J. Phosphorylation of NF-kappa B by calmodulin-dependent kinase IV activates anti-apoptotic gene expression. *Bio-chem Biophys Res Commun.* 2003 Jun 13;305(4):1094-8.
- Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest.* 2001 Feb;107(3):241-6.
- Barillas-Mury C, Charlesworth A, Gross I, Richman A, Hoffmann JA, Kafatos FC. Immune factor Gambif1, a new rel family member from the human malaria vector, *Anopheles gambiae*. *EMBO J.* 1996 Sep 2;15(17):4691-701.
- Bech-Otschir D, Kraft R, Huang X, Henklein P, Kapelari B, Pollmann C, Dubiel W. COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J.* 2001 Apr 2;20(7):1630-9.
- Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the Rel component of NF-kappa B. *Nature.* 1995 Jul 13;376(6536):167-70.
- Beraud C, Henzel WJ, Baeuerle PA. Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 19;96(2):429-34.
- Berkowitz B, Huang DB, Chen-Park FE, Sigler PB, Ghosh G. The x-ray crystal structure of the NF-kappa B p50.p65 heterodimer bound to the interferon beta -kappa B site. *J Biol Chem.* 2002 Jul 5;277(27):24694-700.
- Biondi RM, Nebreda AR. Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem J.* 2003 May 15;372(Pt 1):1-13.
- Birbach A, Gold P, Binder BR, Hofer E, de Martin R, Schmid JA. Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem.* 2002 Mar 29;277(13):10842-51.
- Bird TA, Schooley K, Dower SK, Hagen H, Virca GD. Activation of nuclear transcription factor NF-kappaB by interleukin-1 is accompanied by casein kinase II-mediated phosphorylation of the p65 subunit. *J Biol Chem.* 1997 Dec 19;272(51):32606-12.
- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol.* 1999 Dec 17;294(5):1351-62.
- Bonnard M, Mirtsos C, Suzuki S, Graham K, Huang J, Ng M, Itie A, Wakeham A, Shahinian A, Henzel WJ, Elia AJ, Shillinglaw W, Mak TW, Cao Z, Yeh WC. Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription. *EMBO J.* 2000 Sep 15;19(18):4976-85.
- Brooks BR, Bruccoleri RE., Olafson BD, States D J., Swaminathan S, Karplus M, CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J. Comp. Chem.* 1983, vol. 4, 187.
- Bryan RG, Li Y, Lai JH, Van M, Rice NR, Rich RR, Tan TH. Effect of CD28 signaltransduction on c-Rel in human peripheral blood T cells. *Mol Cell Biol.* 1994 Dec;14(12):7933-42.
- Burke JR, Miller KR, Wood MK, Meyers CA. The multisubunit IkappaB kinase complex shows random sequential kinetics and is activated by the C-terminal domain of IkappaB alpha. *J Biol Chem.* 1998 May 15;273(20):12041-6.

- Burkly L, Hession C, Ogata L, Reilly C, Marconi LA, Olson D, Tizard R, Cate R, Lo D. Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature*. 1995 Feb 9;373(6514):531-6.
- Burley SK, Roeder RG. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem*. 1996;65:769-99.
- Caamano JH, Rizzo CA, Durham SK, Barton DS, Raventos-Suarez C, Snapper CM, Bravo R. Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *J Exp Med*. 1998 Jan 19; 187(2):185-96.
- Carter AB, Knudtson KL, Monick MM, Hunninghake GW. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF-kappaB-dependent gene expression. The role of TATA-binding protein (TBP). *J Biol Chem*. 1999 Oct 22;274(43):30858-63.
- Chen FE, Huang DB, Chen YQ, Ghosh G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature*. 1998 Jan 22;391(6665):410-3.
- Cheng JD, Ryseck RP, Attar RM, Dambach D, Bravo R. Functional redundancy of the nuclear factor kappa B inhibitors I kappa Balpha and I kappa B beta. *J Exp Med*. 1998 Sep 21;188(6):1055-62.
- Chernov MV, Bean LJ, Lerner N, Stark GR. Regulation of ubiquitination and degradation of p53 in unstressed cells through C-terminal phosphorylation. *J Biol Chem*. 2001 Aug 24;276(34):31819-24.
- Choi Y, Asada S, Uesugi M. Divergent hTAFII31-binding motifs hidden in activation domains. *J Biol Chem*. 2000 May 26;275(21):15912-6.
- Chou PY, Fasman GD. Empirical predictions of protein conformation. *Annu Rev Biochem*. 1978;47:251-76.
- Chu WM, Ostertag D, Li ZW, Chang L, Chen Y, Hu Y, Williams B, Perrault J, Karin M. JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity*. 1999 Dec;11(6):721-31.
- Coleman TA, Kunsch C, Maher M, Ruben SM, Rosen CA. Acquisition of NFkB1-selective DNA binding by substitution of four amino acid residues from NFkB1 into RelA. *Mol Cell Biol*. 1993 Jul;13(7):3850-9.
- Connolly ML. Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids. *Science*. 1983 Aug 19;221(4612):709-13.
- Cramer P, Varrot A, Barillas-Mury C, Kafatos FC, Muller CW. Structure of the specificity domain of the Dorsal homologue Gambif1 bound to DNA. *Structure Fold Des*. 1999 Jul 15;7(7):841-52.
- Cuff JA, Clamp ME, Siddiqui AS, Finlay M, Barton GJ. JPred: a consensus secondary structure prediction server. *Bioinformatics*. 1998;14 (10):892-3.
- Delhase M, Li N, Karin M. Kinase regulation in inflammatory response. *Nature*. 2000 Jul 27;406(6794):367-8.
- DiDonato J, Mercurio F, Rosette C, Wu-Li J, Suyang H, Ghosh S, Karin M. Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol*. 1996 Apr;16(4):1295-304.
- DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature*. 1997 Aug 7;388(6642):548-54.
- Drier EA, Huang LH, Steward R. Nuclear import of the Drosophila Rel protein Dorsal is regulated by phosphorylation. *Genes Dev*. 1999 Mar 1;13(5):556-68.
- Duran A, Diaz-Meco MT, Moscat J. Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-kappaB transcriptional activation. *EMBO J*. 2003 Aug 1;22(15):3910-8.
- Fiedler MA, Wernke-Dollries K, Stark JM. Inhibition of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and IL-8 release in A549 cells with the proteasome inhibitor MG-132. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998 Aug;19(2):259-68.

- Fiol CJ, Mahrenholz AM, Wang Y, Roeske RW, Roach PJ. Formation of protein kinase re-cognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *J Biol Chem.* 1987 Oct 15;262(29):14042-8.
- Fognani C, Rondi R, Romano A, Blasi F. c-Rel-TD kinase: a serine/threonine kinase binding in vivo and in vitro c-Rel and phosphorylating its transactivation domain. *Oncogene.* 2000 Apr 27;19(18):2224-32.
- Frank R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports - principles and applications. *J Immunol Methods.* 2002 Sep 1;267(1):13-26.
- Fuchs SY, Tappin I, Ronai Z. Stability of the ATF2 transcription factor is regulated by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem.* 2000 Apr 28;275(17):12560-4.
- Fujita F, Taniguchi Y, Kato T, Narita Y, Furuya A, Ogawa T, Sakurai H, Joh T, Itoh M, Delhase M, Karin M, Nakanishi M. Identification of NAP1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling. *Mol Cell Biol.* 2003 Nov; 23(21):7780-93.
- Garnier J, Osguthorpe DJ, Robson B. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol Biol.* 1978 Mar 25;120(1):97-120.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-60.
- Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* 2002 Apr;109 Suppl:S81-96.
- Gilmore T, Gapuzan ME, Kalaitzidis D, Starczynowski D. Rel/NF-kappa B/I kappa B signal transduction in the generation and treatment of human cancer. *Cancer Lett.* 2002 Jul 8;181(1):1-9.
- Gonzalez GA, Montminy MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell.* 1989 Nov 17;59(4):675-80.
- Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jun 15;89(12):5547-51.
- Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 1997 Dec;18(15):2714-23.
- Guex N, Diemand A, Peitsch MC. Protein modelling for all. *Trends Biochem Sci.* 1999 Sep;24(9):364-7.
- Gustin JA, Ozes ON, Akca H, Pincheira R, Mayo LD, Li Q, Guzman JR, Korgaonkar CK, Donner DB. Cell type-specific expression of the IkappaB kinases determines the significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF-kappa B activation. *J Biol Chem.* 2004 Jan 16;279(3):1615-20.
- Harhaj EW, Sun SC. Regulation of RelA subcellular localization by a putative nuclear export signal and p50. *Mol Cell Biol.* 1999 Oct;19(10):7088-95.
- Hashimoto K, Guroff G, Katagiri Y. Delayed and sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase induced by proteasome inhibitors through p21(ras) in PC12 cells. *J Neurochem.* 2000 Jan;74(1):92-8.
- Hayashi T, Sekine T, Okamoto T. Identification of a new serine kinase that activates NF kappa B by direct phosphorylation. *J Biol Chem.* 1993 Dec 15;268(35):26790-5.
- Hehner SP, Hofmann TG, Ushmorov A, Dienz O, Wing-Lan Leung I, Lassam N, Scheidereit C, Droge W, Schmitz ML. Mixed-lineage kinase 3 delivers CD3/CD28-derived signals into the IkappaB kinase complex. *Mol Cell Biol.* 2000 Apr;20(7):2556-68.
- Heissmeyer V, Krappmann D, Wulczyn FG, Scheidereit C. NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes. *EMBO J.* 1999 Sep 1;18(17):4766-78.

- Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, Dorken B, Zenke M, Stein H, Scheidereit C. Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutiv signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med.* 2002 Sep 2;196(5):605-17.
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature.* 2000 Jul 6;406(6791):86-90.
- Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol.* 2002 Nov;72(5):847-55.
- Holmberg CI, Tran SE, Eriksson JE, Sistonen L. Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends Biochem Sci.* 2002 Dec;27(12):619-27.
- Hooft RW, Vriend G, Sander C, Abola EE. Errors in protein structures. *Nature.* 1996 May 23;381(6580):272.
- Hou S, Guan H, Ricciardi RP. Phosphorylation of serine 337 of NF-kappaB p50 is critical for DNA binding. *J Biol Chem.* 2003 Nov 14;278(46):45994-8.
- Hu Y, Baud V, Delhase M, Zhang P, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science.* 1999 Apr 9;284(5412):316-20.
- Huang DB, Chen YQ, Ruetsche M, Phelps CB, Ghosh G. X-ray crystal structure of proto-oncogene product c-Rel bound to the CD28 response element of IL-2. *Structure (Camb).* 2001 Aug;9(8):669-78.
- Huang TT, Miyamoto S. Postrepression activation of NF-kappaB requires the amino-terminal nuclear export signal specific to IkappaBalpha. *Mol Cell Biol.* 2001 Jul;21(14):4737-47.
- Huxford T, Huang DB, Malek S, Ghosh G. The crystal structure of the IkappaBalpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation. *Cell.* 1998 Dec 11;95(6):759-70.
- Huxford T, Mishler D, Phelps CB, Huang DB, Sengchanthalangsy LL, Reeves R, Hughes CA, Komives EA, Ghosh G. Solvent exposed non-contacting amino acids play a critical role in NF-kappaB/IkappaBalpha complex formation. *J Mol Biol.* 2002 Dec 6;324(4):587-97.
- Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, Pahl HL, Traenckner EB, Mueller-Dieckmann C, Farahifar D, Rossi B, Auberger P, Baeuerle PA, Peyron JF. Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha. *Cell.* 1996 Sep 6;86(5):787-98.
- Jabbur JR, Tabor AD, Cheng X, Wang H, Uesugi M, Lozano G, Zhang W. Mdm-2 binding and TAF(II)31 recruitment is regulated by hydrogen bond disruption between the p53 residues Thr18 and Asp21. *Oncogene.* 2002 Oct 10;21(46):7100-13.
- Jacobs MD, Harrison SC. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell.* 1998 Dec 11;95(6):749-58.
- Jang MK, Goo YH, Sohn YC, Kim YS, Lee SK, Kang H, Cheong J, Lee JW. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV stimulates nuclear factor-kappa B transactivation via phosphorylation of the p65 subunit. *J Biol Chem.* 2001 Jun 8;276(23):20005-10.
- Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol.* 1999 Jun 3;9(11):601-4.
- Kishi H, Nakagawa K, Matsumoto M, Suga M, Ando M, Taya Y, Yamaizumi M. Osmotic shock induces G1 arrest through p53 phosphorylation at Ser33 by activated p38MAPK with-out phosphorylation at Ser15 and Ser20. *J Biol Chem.* 2001 Oct 19;276(42):39115-22.

- Kishore N, Sommers C, Mathialagan S, Guzova J, Yao M, Hauser S, Huynh K, Bonar S, Mielke C, Albee L, Weier R, Graneto M, Hanau C, Perry T, Tripp CS. A selective IKK-2 inhibitor blocks NF-kappa B-dependent gene expression in interleukin-1 beta-stimulated synovial fibroblasts. *J Biol Chem*. 2003 Aug 29;278(35):32861-71.
- Klarlund JK, Czech MP. Insulin-like growth factor I and insulin rapidly increase casein kinase II activity in BALB/c 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*. 1988 Nov 5;263(31):15872-5.
- Klemm RD, Goodrich JA, Zhou S, Tjian R. Molecular cloning and expression of the 32-kDa subunit of human TFIID reveals interactions with VP16 and TFIIB that mediate transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 20;92(13):5788-92.
- Kontgen F, Grumont RJ, Strasser A, Metcalf D, Li R, Tarlinton D, Gerondakis S. Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev*. 1995 Aug 15;9(16):1965-77.
- Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gelinas C. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene*. 2003 Dec 8;22(56):8961-82.
- Kunsch C, Ruben SM, Rosen CA. Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1992 Oct;12(10):4412-21.
- Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich NP. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*. 1996 Nov 8;274(5289):948-53.
- Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*. 1982 May 5;157(1):105-32.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(259):680-5.
- Lallena MJ, Diaz-Meco MT, Bren G, Paya CV, Moscat J. Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar;19(3):2180-8.
- Leitges M, Sanz L, Martin P, Duran A, Braun U, Garcia JF, Camacho F, Diaz-Meco MT, Rennert PD, Moscat J. Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappa pathway. *Mol Cell*. 2001 Oct;8(4):771-80.
- Li CC, Korner M, Ferris DK, Chen E, Dai RM, Longo DL. NF-kappa B/Rel family members are physically associated phosphoproteins. *Biochem J*. 1994 Oct 15;303 (Pt 2):499-506.
- Li J, Peet GW, Balzarano D, Li X, Massa P, Barton RW, Marcu KB. Novel NEMO/IkappaB kinase and NF-kappa B target genes at the pre-B to immature B cell transition. *J Biol Chem*. 2001 May 25;276(21):18579-90.
- Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF, Verma IM. Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science*. 1999 Apr 9;284(5412):321-5.
- Li ZW, Chu W, Hu Y, Delhase M, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M. The IKK-beta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med*. 1999 Jun 7;189(11):1839-45.
- Ling L, Cao Z, Goeddel DV. NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 31;95(7):3792-7.
- Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene*. 2001 Apr 30;20(19):2476-89.
- Madrid LV, Wang CY, Guttridge DC, Schottelius AJ, Baldwin AS Jr, Mayo MW. Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol Cell Biol*. 2000 Mar;20(5):1626-38.

- Madrid LV, Mayo MW, Reuther JY, Baldwin AS Jr. Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem.* 2001 Jun 1;276(22):18934-40.
- Maier HJ, Marienfeld R, Wirth T, Baumann B. Critical role of RelB serine 368 for dimerization and p100 stabilization. *J Biol Chem.* 2003 Oct 3;278(40):39242-50.
- Malek S, Chen Y, Huxford T, Ghosh G. IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem.* 2001 Nov 30;276(48):45225-35.
- Malek S, Huang DB, Huxford T, Ghosh S, Ghosh G. X-ray crystal structure of an IkappaB-beta x NF-kappaB p65 homodimer complex. *J Biol Chem.* 2003 Jun 20;278(25):23094-100.
- Martin AG, Fresno M. Tumor necrosis factor-alpha activation of NF-kappa B requires the phosphorylation of Ser-471 in the transactivation domain of c-Rel. *J Biol Chem.* 2000 Aug 11;275(32):24383-91.
- Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Aug;2(8):599-609.
- Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science.* 1997 Oct 31;276(5339):860-6.
- Meriin AB, Gabai VL, Yaglom J, Shifrin VI, Sherman MY. Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. *J Biol Chem.* 1998 Mar 13;273(11):6373-9.
- Miller BS, Zandi E. Complete reconstitution of human IkappaB kinase (IKK) complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKKgamma on the complex activity in the absence of stimulation. *J Biol Chem.* 2001 Sep 28;276(39):36320-6.
- Nakayama K, Furusu A, Xu Q, Konta T, Kitamura M. Unexpected transcriptional induction of monocyte chemoattractant protein 1 by proteasome inhibition: involvement of the c-Jun N-terminal kinase-activator protein 1 pathway. *J Immunol.* 2001 Aug 1;167(3):1145-50.
- Naumann M, Scheidereit C. Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations. *EMBO J.* 1994 Oct 3;13(19):4597-607.
- Nasuhara Y, Adcock IM, Catley M, Barnes PJ, Newton R. Differential IkappaB kinase activation and IkappaBalpha degradation by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in human U937 monocytic cells. Evidence for additional regulatory steps in NFkappaB dependent transcription.
- Neumann M, Tsapos K, Scheppler JA, Ross J, Franza BR Jr. Identification of complex formation between two intracellular tyrosine kinase substrates: human c-Rel and the p105 precursor of p50 NF-kappa B. *Oncogene.* 1992 Nov;7(11):2095-104.
- Oda Y, Nagasu T, Chait BT. Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. *Nat Biotechnol.* 2001 Apr;19(4):379-82.
- Okazaki T, Sakon S, Sasazuki T, Sakurai H, Doi T, Yagita H, Okumura K, Nakano H. Phosphorylation of serine 276 is essential for p65 NF-kappaB subunit-dependent cellular responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jan 24;300(4):807-12.
- Orian A, Whiteside S, Israel A, Stancovski I, Schwartz AL, Ciechanover A. Ubiquitin-mediated processing of NF-kappa B transcriptional activator precursor p105. Reconstitution of a cell-free system and identification of the ubiquitin-carrier protein, E2, and a novel ubiquitin-protein ligase, E3, involved in conjugation. *J Biol Chem.* 1995 Sep 15;270(37):21707-14.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature.* 1999 Sep 2;401(6748):82-5.

- Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappaB1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell*. 1994 Sep 9;78(5):773-85.
- Papavassiliou AG, Chavrier C, Bohmann D. Phosphorylation state and DNA-binding activity of c-Jun depend on the intracellular concentration of binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Dec 1;89(23):11562-5.
- Pinna LA. Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation ? *Biochim Biophys Acta*. 1990 Sep 24;1054(3):267-84.
- Pomerantz JL, Baltimore D. NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *EMBO J*. 1999 Dec 1;18(23):6694-704.
- Reddy SA, Huang JH, Liao WS. Phosphatidylinositol 3-kinase as a mediator of TNF-induced NF-kappa B activation. *J Immunol*. 2000 Feb 1;164(3):1355-63.
- Rothwarf D.M, Karin M. The NF-kB Activation Pathway: A Paradigm in Information Transfer from Membrane to Nucleus
www.stke.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;1999/5/re1
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of pep-tides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 1994 Sep 9;78(5):761-71.
- Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W. IkappaB kinases phosphorylate NFkappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem*. 1999 Oct 22;274(43):30353-6.
- Sakurai H, Suzuki S, Kawasaki N, Nakano H, Okazaki T, Chino A, Doi T, Saiki I. Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *J Biol Chem*. 2003 Sep 19;278(38):36916-23.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463-7.
- Schmitz ML, Baeuerle PA. The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *EMBO J*. 1991 Dec;10(12):3805-17.
- Schmitz ML, dos Santos Silva MA, Altmann H, Czisch M, Holak TA, Baeuerle PA. Structural and functional analysis of the NF-kappa B p65 C terminus. An acidic and modular transactivation domain with the potential to adopt an alpha-helical conformation. *J Biol Chem*. 1994 Oct 14;269(41):25613-20.
- Schmitz ML, dos Santos Silva MA, Baeuerle PA. Transactivation domain 2 (TA2) of p65 NF-kappa B. Similarity to TA1 and phorbol ester-stimulated activity and phosphorylation in intact cells. *J Biol Chem*. 1995 Jun 30;270(26):15576-84.
- Schmitz ML, Bacher S, Kracht M. I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem Sci*. 2001 Mar;26(3):186-90.
- Schwabe RF, Brenner DA. Role of glycogen synthase kinase-3 in TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and apoptosis in hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Jul;283(1):G204-11.
- Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):321-30.
- Sears LE, Moran LS, Kissinger C, Creasey T, Perry-O'Keefe H, Roskey M, Sutherland E, Slatko BE. CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques*. 1992 Oct;13(4):626-33.
- Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappaB by a posttranslational mechanism. *Cell*. 1986 Dec 26;47(6):921-8.

- Sippl MJ. Calculation of conformational ensembles from potentials of mean force. An approach to the knowledge-based prediction of local structures in globular proteins. *J Mol Biol.* 1990 Jun 20;213(4):859-83.
- Sizemore N, Leung S, Stark GR. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit. *Mol Cell Biol.* 1999 Jul;19(7):4798-805.
- Sizemore N, Lerner N, Dombrowski N, Sakurai H, Stark GR. Distinct roles of the Ikappa B kinase alpha and beta subunits in liberating nuclear factor kappaB (NF-kappa B) from Ikappa B and in phosphorylating the p65 subunit of NF-kappa B. *J Biol Chem.* 2002 Feb 8;277(6):3863-9.
- Stavridi ES, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD. Substitutions that compromise the ionizing radiation-induced association of p53 with 14-3-3 proteins also compromise the ability of p53 to induce cell cycle arrest. *Cancer Res.* 2001 Oct 1;61(19):7030-3.
- Tanaka M, Fuentes ME, Yamaguchi K, Durnin MH, Dalrymple SA, Hardy KL, Goeddel DV. Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice.
- Tegethoff S, Behlke J, Scheidereit C. Tetrameric oligomerization of IkappaB kinase gamma (IKKgamma) is obligatory for IKK complex activity and NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol.* 2003 Mar;23(6):2029-41.
- Tetsuka T, Uranishi H, Imai H, Ono T, Sonta S, Takahashi N, Asamitsu K, Okamoto T. Inhibition of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by association with the amino-terminal enhancer of split, a Groucho-related protein lacking WD40 repeats. *J Biol Chem.* 2000 Feb 11;275(6):4383-90.
- Thut CJ, Chen JL, Klemm R, Tjian R. p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science.* 1995 Jan 6;267(5194):100-4.
- Tran K, Merika M, Thanos D. Distinct functional properties of IkappaB alpha and IkappaB beta. *Mol Cell Biol.* 1997 Sep;17(9):5386-99.
- Tuazon PT, Traugh JA. Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1991;23:123-64.
- Urban MB, Baeuerle PA. The role of the p50 and p65 subunits of NF-kappa B in the recognition of cognate sequences. *New Biol.* 1991 Mar;3(3):279-88.
- Uesugi M, Verdine GL. The alpha-helical FXXPhiPhi motif in p53: TAF interaction and discrimination by MDM2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Dec 21;96(26):14801-6.
- Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Fiers W, Haegeman G. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem.* 1998 Feb 6;273(6):3285-90.
- van Gunsteren WF., Billeter SR, Eising, A A, Hünenberger PH, Krüger, PK H C, Mark, A E, Scott, WRP. and Tironi, I G. Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide. vdf Hochschulverlag AG, Zürich, 1996.
- Vermeulen L, De Wilde G, Van Damme P, Vanden Berghe W, Haegeman G. Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J.* 2003 Mar 17;22(6):1313-24.
- Vousden KH. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Mar 14;1602(1):47-59
- Vriend G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph.* 1990 Mar;8(1):52-6, 29.
- Wang D, Baldwin AS Jr. Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J Biol Chem.* 1998 Nov 6;273(45):29411-6.

- Wang D, Westerheide SD, Hanson JL, Baldwin AS Jr. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J Biol Chem*. 2000 Oct 20;275(42):32592-7.
- Waterman MJ, Stavridi ES, Waterman JL, Halazonetis TD. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet*. 1998 Jun;19(2):175-8.
- Wesselborg S, Bauer MK, Vogt M, Schmitz ML, Schulze-Osthoff K. Activation of transcription factor NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by distinct and separate stress effector pathways. *J Biol Chem*. 1997 May 9;272(19):12422-9.
- Whitmarsh AJ, Davis RJ. Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell Mol Life Sci*. 2000 Aug;57(8-9):1172-83.
- Wolter S, Mushinski JF, Saboori AM, Resch K, Kracht M. Inducible expression of a constitutively active mutant of mitogen-activated protein kinase kinase 7 specifically activates c-JUN NH2-terminal protein kinase, alters expression of at least nine genes, and inhibits cell proliferation. *J Biol Chem*. 2002 Feb 1;277(5):3576-84.
- Yang F, Tang E, Guan K, Wang CY. IKK beta plays an essential role in the phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 induced by lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2003 Jun 1;170(11):5630-5.
- Zhang G, Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest*. 2001 Jan;107(1):13-9.
- Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell*. 1997 May 2;89(3):413-24.
- Zhong H, Voll RE, Ghosh S. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell*. 1998 Apr;1(5):661-71
- Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell*. 2002 Mar;9(3):625-36.
- Zhou A, Scoggin S, Gaynor RB, Williams NS. Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene*. 2003 Apr 3;22(13):2054-64.
- Zor T, Mayr BM, Dyson HJ, Montminy MR, Wright PE. Roles of phosphorylation and helix propensity in the binding of the KIX domain of CREB-binding protein by constitutive (c-Myb) and inducible (CREB) activators. *J Biol Chem*. 2002 Nov 1;277(44):42241-8.

Lebenslauf

Name: Holger Gerhard Buß

Anschrift: Tieckstr. 18
30625 Hannover

Telefon: 0511/553270

Geburtsdatum: 27. Juli 1973

Geburtsort: Aurich

Eltern: Gerhard Buß und Mariechen Buß, geb. Siebolds

Schulausbildung: 08/1980-07/1984 Grundschule Egels
08/1984-06/1986 Orientierungsstufe Egels
07/1986-05/1993 Gymnasium Ulricianum, Aurich
Abitur: 10.05.1993

Dienst: Zivildienst: 06/1993-12/1993 DJH Carolinensiel
01/1994-08/1994 Staatl. Amt für Wasser und Abfall,
Aurich, Labor für chem. Wasseranalytik

Studium: seit 10/1994 Studium der Biochemie an der Universität, Medizinischen
Hochschule und Tierärztlichen Hochschule Hannover

Diplomarbeit: 11/99-05/00, Inst. f. Reproduktionsmedizin,
Tierärztliche Hochschule Hannover,
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Töpfer-Petersen,
Thema der Diplomarbeit: Isolierung und primäre
Charakterisierung eines Eber-Spermatozoen-
Membranproteins

08/00-10/00: wissenschaftlicher Mitarbeiter,
IHF-GmbH, Hamburg

seit 11/00: wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe
von Prof. Dr. M. Kracht, Zentrum Pharmakologie der Medizinischen
Hochschule Hannover

Veröffentlichungen

Characterization of Protein Kinases targeting P65 NF- κ B Phosphorylation and Transactivation

H. Buss, L. Schmitz, A. Dörrie, K. Resch and M. Kracht

43. Frühjahrstreffen der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 12-14. März, 2002, Mainz