

Universität Ulm
Abteilung für Physiologische Chemie
Leiter: Prof. Dr. Thomas Wirth

**Untersuchungen zu Struktur und Funktion
des RelB-Proteins, einer Untereinheit des
Transkriptionsfaktors NF- κ B**

D i s s e r t a t i o n

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

vorgelegt von

Harald Jakob Maier
aus Heidenheim an der Brenz

Ulm, 2004

Amtierender Dekan Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

Erster Berichterstatter Prof. Dr. Thomas Wirth

Zweiter Berichterstatter PD Dr. Christoph Weber

Tag der Promotion 18. November 2004

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Regulation der Genexpression	1
1.2 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B	1
1.3 Signalwege von NF- κ B	6
1.4 Mechanismen der konstitutiven NF- κ B-Aktivität	9
1.5 NF- κ B/Rel-Proteine in Drosophila	12
1.6 Zielsetzung	13
2 MATERIAL UND METHODIK	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	16
2.1.2 Puffer	18
2.1.3 Zellen und Bakterien	18
2.1.4 Molekularbiologische Materialien	18
2.1.5 Sonstiges	20
2.2 DNS-Techniken	23
2.2.1 Allgemeine DNS-Techniken	23
2.2.2 Klonierung von DNS	24
2.2.3 Präparation von DNS	26
2.2.4 Mutagenese von DNS	29
2.2.5 Sequenzierung von Plasmiden	30
2.3 Zelluläre Techniken	31
2.3.1 Allgemeine Zellkultur	31
2.3.2 Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Suspensionszellen	32
2.3.3 Transfektionsexperimente in eukaryotischen Zellen	33
2.4 Protein-Techniken	35
2.4.1 Proteinextrakte und Proteinquantifizierung	35
2.4.2 Immunoblot	38
2.4.3 Immunpräzipitation	39
2.4.4 Gelretardationsanalyse	40

3	ERGEBNISSE	43
3.1	Untersuchung von FLAG-RelB Wt und FLAG-RelB S368A	43
3.1.1	Selektion geeigneter Transfektanten	43
3.1.2	Subzelluläre Lokalisation	44
3.1.3	DNS-Bindung	45
3.1.4	Transkriptionelle Aktivität	45
3.1.5	Dimerisierung mit p50	47
3.1.6	Klonierung und Sequenzierung der FLAG-Konstrukte	47
3.2	Untersuchung von RelB Wt, RelB S368A und RelB S368E	51
3.2.1	Mutagenese von RelB	51
3.2.2	Transiente Transfektionsexperimente	52
3.2.3	Etablierung stabiler S107-Transfektanten	54
3.2.4	Subzelluläre Lokalisation	55
3.2.5	Transkriptionelle Aktivität	56
3.2.6	DNS-Bindung	58
3.2.7	Dimerisierung	61
3.2.8	Einfluss von RelB auf die NF- κ B2-Expression	63
4	DISKUSSION	66
4.1	Kernimport von RelB und konstitutive NF- κ B-Aktivität	66
4.2	Dimerisierung von RelB	67
4.3	κ B-spezifische DNS-Bindung und transkriptionelle Aktivität	71
4.4	Interdependenzen zwischen RelB und NF- κ B2	76
4.5	RelB, NF- κ B2 und der alternative Weg der NF- κ B-Aktivierung	79
4.6	Schlussfolgerung	81
5	ZUSAMMENFASSUNG	83
5.1	Deutsche Zusammenfassung	83
5.2	English Summary	85
6	LITERATURVERZEICHNIS	87
	DANKSAGUNG	96

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. Allgemeine Abkürzungen

α -	anti-
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor
BAFF-R	B-Zell-aktivierender Faktor-Rezeptor
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Differenzierungsantigen (<i>Cluster of differentiation</i>)
CD40L	CD40-Ligand
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kalbsintestinum (<i>calf intestine phosphatase</i>)
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DD	Todesdomäne (<i>death domain</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemolumineszenz (<i>enhanced chemoluminescence</i>)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GRR	Glycin-reiche Region
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HTLV	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus
Ig	Immunglobulin

I κ B	Inhibitorisches κ B-Protein
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharid
LT- β	Lymphotoxin- β
LT- β R	Lymphotoxin- β -Rezeptor
LZ	Leucin-Reißverschluss (<i>leucine zipper</i>)
NEMO	NF- κ B-essentieller Modulator
NES	Nukleäres Exportsignal
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NIK	NF- κ B-induzierende Kinase
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NP-40	Nonidet P 40, Nonylphenylpolyethylenglykol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly (dI/dC)	Poly-desoxyinosin / Poly-desoxycytosin
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SRR	Serin-reiche Region
TAD	Transaktivierungsdomäne
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
Wt	Wildtyp

B. Physikalische Einheiten

A	Ampère
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
Da	Dalton
F	Farad
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
M	molar (mol/l)
min	Minute
mol	Mol
Ω	Ohm
s	Sekunde
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
U	Enzymeinheiten (<i>unit</i>)
V	Volt

C. Präfixe physikalischer Einheiten

k	Kilo (10^3)
m	Milli (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
p	Pico (10^{-12})

D. Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
Nicht näher bezeichnete Aminosäure		X

E. Organische Basen und Nukleotide

A	Adenin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
C	Cytosin
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
d	Desoxy-
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
G	Guanin
N	Nicht näher definierte organische Base (Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin)
NTP	Nicht näher definiertes Nucleosid-5'-triphosphat
R	Purinbase (Adenin oder Guanin)
T	Thymin
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
Y	Pyrimidinbase (Cytosin oder Thymin)

1 EINLEITUNG

1.1 Regulation der Genexpression

Die Regulation der Genexpression ist ein für alle Lebewesen elementarer Vorgang. Da alle Zellen eines Organismus prinzipiell über die gleiche genetische Ausstattung verfügen, entsteht die Vielfalt der Zelltypen erst dadurch, dass in jeder einzelnen Zelle nur ein bestimmter Teil des Genoms auch tatsächlich aktiv ist. Je nach Differenzierung der Zelle sind bestimmte Gene an-, andere hingegen abgeschaltet; folglich kommen in der einzelnen Zelle nur bestimmte Proteine überhaupt vor. Des weiteren exprimiert auch ein bestimmter Zelltyp nicht zu jeder Zeit die gleichen Gene. Je nach inneren und äußeren Umständen kann es nötig werden, die Genexpression an die veränderten Bedingungen anzupassen. Eine präzise und umfassende Regulation der Genexpression ist also eine Notwendigkeit für alle Zellen.

Zur differentiellen Genexpression tragen die Transkriptionsfaktoren bei. Dies sind spezialisierte Proteine, die an spezifische regulatorische Stellen der DNS binden und so die Transkription abhängiger Gene beeinflussen können. Für die Regulation der Transkriptionsaktivität sind auch sogenannte epigenetische Mechanismen von Bedeutung, insbesondere die Modifikation von DNS durch Methylierung und von Chromatin durch Methylierung, Acetylierung und Phosphorylierung. Die Genexpression kann also bereits sehr vielfältig auf der Ebene der Transkription reguliert werden. Jedoch ist auch auf den anderen Stufen des Informationstransfers von der DNS über die RNS zum Protein eine Regulation möglich.

1.2 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

1.2.1 Biomedizinische Bedeutung von NF- κ B

Ursprünglich wurde der Transkriptionsfaktor NF- κ B (Nukleärer Faktor κ B) als ein im Zellkern reifer B-Lymphozyten vorhandenes Protein beschrieben, das an ein DNS-Motiv im

Enhancer des Gens für die κ -Kette der Immunglobuline bindet (SEN und BALTIMORE 1986). Es wurde jedoch bald deutlich, dass NF- κ B in fast jedem Zelltyp in inaktivem, induzierbarem Zustand vorkommt und eine erstaunliche Vielfalt von Genen, nach derzeitigem Wissensstand über 180 an der Zahl, beeinflusst, darunter viele Zytokine und Adhäsionsmoleküle (GARG und AGGARWAL 2002).

NF- κ B ist von zentraler Bedeutung bei der Regulation der angeborenen Immunantwort im Rahmen von Infektionen, bei Entzündungsvorgängen und ganz allgemein bei der zellulären Antwort auf Stress, sei er biologischer, physikalischer oder chemischer Natur. All diese Situationen erfordern eine schnelle und umfassende Änderung der Genexpression; eine Aufgabe, für die NF- κ B aufgrund der Besonderheiten seiner Regulation gut geeignet ist. Allgemein und vereinfachend ausgedrückt, fördert NF- κ B das Überleben von Zellen; er stimuliert die Differenzierung und Proliferation und besitzt eine proinflammatorische und anti-apoptotische Wirkung. Als Beispiel für eine wichtige Immunreaktion sei die Akute-Phase-Reaktion genannt, deren Signalwege zu einem großen Teil in der Aktivierung von NF- κ B konvergieren. Eine wichtige Aufgabe erfüllen NF- κ B/Rel-Proteine darüber hinaus auch bei der Entwicklung von Organismen, insbesondere – aber nicht nur – bei der Entwicklung des Immunsystems (KARIN und BEN-NERIAH 2000; KARIN und LIN 2002).

Aus medizinischer Sicht ist die Wirkung von NF- κ B oft zweischneidig. Neben der Beteiligung an erwünschten, den Organismus schützenden Immunreaktionen ist NF- κ B auch oft mitverantwortlich für unerwünschte oder überschießende Entzündungen. Die zentrale Rolle von NF- κ B bei Entzündungsvorgängen erklärt, warum NF- κ B bei so verschiedenen Erkrankungen wie akuter Pankreatitis, rheumatoider Arthritis, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen oder systemischen Entzündungszuständen wie der Sepsis von großer Bedeutung ist. Seine proliferationsfördernden und anti-apoptotischen Wirkungen erklären, warum die Dysregulation von NF- κ B häufig in Zusammenhang mit malignen Tumoren, insbesondere Lymphomen, gebracht wird. NF- κ B wirkt auch bei der Bekämpfung von Viren mit, indem er die Expression von Interferon steigert; andererseits nutzen bestimmte Viren, vor allem HIV-1 und HTLV-1, die Signalwege von NF- κ B aus, um sich selbst zu vermehren. In letzter Zeit mehren sich die Hinweise, dass durch die Erforschung von NF- κ B auch Krankheiten aus dem neurodegenerativen Spektrum besser verstanden werden können

(RAYET und GÉLINAS 1999; KARIN und BEN-NERIAH 2000; DIXIT und MAK 2002; GILMORE et al. 2002).

Die Bedeutung von NF- κ B erstreckt sich also auf viele Felder der Medizin. Dabei hat die Beschäftigung mit NF- κ B nicht mehr nur theoretischen Charakter. Die klinische Relevanz zeigt sich unter anderem darin, dass NF- κ B inzwischen zu einer wichtigen Zielsubstanz der Medikamentenentwicklung geworden ist (GARG und AGGARWAL 2002).

1.2.2 Struktur von NF- κ B

Mit NF- κ B wird eine Familie dimerer Transkriptionsfaktoren bezeichnet, von der in Säugetieren bisher fünf Mitglieder haben identifiziert werden können: p50/p105 (NF- κ B1) und p52/p100 (NF- κ B2), sowie die Rel-Proteine RelA (p65), RelB und c-Rel. Die drei Rel-Proteine werden direkt als reife Proteine synthetisiert, während p50 und p52 durch Proteolyse aus ihren Vorläufern p105 bzw. p100 hergestellt werden. Ein Kennzeichen aller Familienmitglieder ist die etwa 300 Aminosäuren umfassende Rel-Homologie-Domäne (RHD), die verantwortlich ist für die Interaktion mit anderen Proteinen, die Bindung an DNS und die Kerntranslokation (GHOSH et al. 1998).

Charakteristisch für die gesamte Proteinfamilie und Voraussetzung für ihre Funktionalität ist die Fähigkeit zur Dimerisierung; dabei können sich grundsätzlich entweder Homodimere zwischen zwei gleichen oder Heterodimere zwischen zwei unterschiedlichen Partnern formieren. Heterodimere bilden sich bevorzugt zwischen p50 oder p52 und einem der drei Rel-Proteine, die im Gegensatz zu ersteren in ihrem C-Terminus über Transaktivierungsdomänen verfügen. Homodimere aus p50 oder p52 haben in Ermangelung einer Transaktivierungsdomäne eine inhibitorische Wirkung auf die Transkription von DNS.

Die Konsensus-Sequenz der DNS-Bindungsstelle von NF- κ B besteht aus zehn Basenpaaren ($5'$ GGGRNNYYCC $3'$). Leichte Variationen in dieser Sequenz ziehen Änderungen in der Affinität von NF- κ B zu den Bindungsstellen der verschiedenen Zielgene nach sich. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit einer Feinregulation, die noch einmal erweitert wird durch die Tatsache, dass die Affinität auch von den am Aufbau des jeweiligen NF- κ B-Dimers beteiligten Untereinheiten abhängt. Die Expression der verschiedenen Untereinheiten von

NF- κ B wiederum unterscheidet sich je nach Zelltyp und Entwicklungsstadium (GHOSH et al. 1998).

Die NF- κ B/Rel-Proteinfamilie existiert nicht nur in Säugetieren. Auch in *Drosophila melanogaster* sind drei Mitglieder der Proteinfamilie bekannt, die Dorsal, Dif und Relish genannt werden. Einen Überblick über die Mitglieder der NF- κ B/Rel-Proteinfamilie in Säugern und in *Drosophila* gibt *Abb. 1* (S. 5). Dabei ist auch die Familie der I κ B-Proteine dargestellt, die für die Regulation von NF- κ B von grundlegender Bedeutung ist.

1.2.3 Regulation von NF- κ B

Zu den Besonderheiten von NF- κ B gehört die schnelle Induzierbarkeit. Der Grund hierfür liegt darin, dass NF- κ B im wesentlichen über die subzelluläre Lokalisation reguliert wird, einen Vorgang, der keine neue, zeitraubende Proteinsynthese erfordert. Als essentiell für die Regulation von NF- κ B hat sich der aktive Transport des Proteins zwischen Zytosol und Zellkern erwiesen. Dieser erfolgt über den Kernporenkomplex und erfordert nukleäre Lokalisationssignale (NLS), die aus kurzen, charakteristischen Aminosäuresequenzen innerhalb eines Proteins bestehen.

In den meisten Zelltypen werden die NF- κ B-Proteine im unstimulierten Zustand durch inhibitorische κ B-Proteine (I κ B-Proteine) im Zytoplasma zurückgehalten. Ein wesentlicher Mechanismus hierfür ist die Maskierung der NLS von NF- κ B durch die I κ B-Proteine. Auf ein Signal hin kommt es zur Degradation von I κ B und zur Freisetzung von NF- κ B; die NLS von NF- κ B, zuvor durch I κ B maskiert, kann nun ihre Wirkung entfalten und führt zum nukleären Import von NF- κ B. Im Zellkern kann NF- κ B dann an DNS binden und die Gentranskription aktivieren. Dieser Mechanismus bildet seit ihren Anfängen das zentrale Dogma der NF- κ B-Forschung (BÄUERLE und BALTIMORE 1988).

Die für die Regulation von NF- κ B so bedeutsame I κ B-Familie besteht aus den Proteinen I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ und Bcl-3, außerdem können in mancherlei Hinsicht auch p105 und p100, die Vorläuferproteine von p50 und p52, dazu gezählt werden. Auch in *Drosophila* ist ein I κ B-Protein bekannt, das Cactus genannt wird (*Abb. 1*, S. 5).

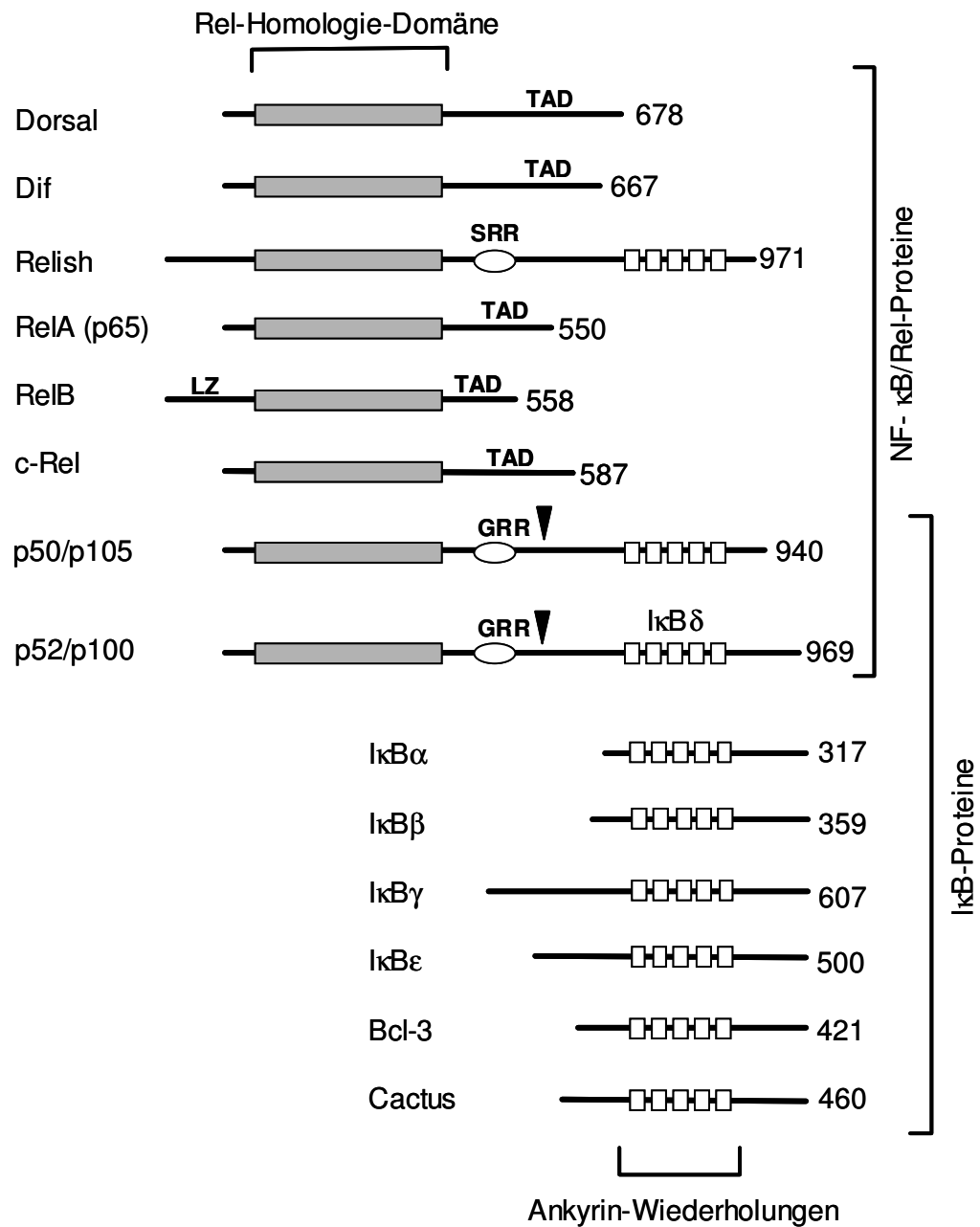


Abb. 1. Die Proteinfamilien NF-κB/Rel und IκB. Oben sind die NF-κB/Rel-Proteine aus Drosophila (Dorsal, Dif, Relish) und aus Säugetieren (RelA, RelB, c-Rel, p50/p105, p52/p100) dargestellt, unten die IκB-Proteine aus Säugetieren (IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε, Bcl-3) und aus Drosophila (Cactus). Die Proteine p105 und p100 können an der mit einem Pfeil bezeichneten Stelle gespalten werden, wobei aus den N-terminalen Spaltungsprodukten p50 und p52 entstehen. Der C-Terminus von p52/p100 wird auch als IκBδ bezeichnet. SRR: Serin-reiche Region, GRR: Glycin-reiche Region, TAD: Transaktivierungsdomäne, LZ: Leucin-Reißverschluss (nach GHOSH et al. 1998).

Kennzeichen der I κ B-Proteine und für ihre inhibitorische Wirkung verantwortlich ist eine Domäne von Ankyrin-Wiederholungen, welche die Interaktion mit der Rel-Homologie-Domäne der NF- κ B/Rel-Proteine vermittelt. Auch die C-terminalen Hälften von p105 und p100, die bei der Herstellung der reifen Proteine p50 bzw. p52 abgespalten werden, weisen diese charakteristische Domäne auf; der C-Terminus von p100 wird deshalb auch I κ B δ genannt. Im Sinne einer negativen Rückkopplung sind die Gene mancher I κ B-Proteine (z.B. I κ B α und p100) Zielgene von NF- κ B (KARIN und BEN-NERIAH 2000).

Neuere Untersuchungen haben die Vorstellungen von der Funktionsweise der I κ B-Proteine, insbesondere von I κ B α und p100, präzisiert und teilweise relativiert. So sind die I κ B-Proteine nicht auf das Zytoplasma beschränkt, sondern können in den Zellkern gelangen, wo sie an NF- κ B-Proteine binden und diese in das Zytoplasma zurücktransportieren (ARENZANA-SEISDEDOS et al. 1997). Von besonderer Bedeutung für die subzelluläre Lokalisation von I κ B α und p100 sind dabei im N-Terminus der Proteine gelegene nukleäre Exportsequenzen (NES; JOHNSON et al. 1999; HUANG et al. 2000; SOLAN et al. 2002). In diesem Sinne ist die ganz überwiegend zytoplasmatische Lokalisation der NF- κ B-Proteine in unstimulierten, nicht-lymphatischen Zellen nicht als statisch anzusehen, sondern als das Ergebnis eines dynamischen Gleichgewichtes zwischen nukleärem Import und Export (CARLOTTI et al. 2000).

1.3 Signalwege von NF- κ B

NF- κ B kann durch eine Vielzahl an Stimuli induziert werden. Insgesamt lassen sich all diese Stimuli am besten dadurch charakterisieren, dass sie eine Adaptation der Zelle an Stress im weitesten Sinne erfordern. Zu den wichtigsten Stimuli zählen inflammatorische Zytokine wie zum Beispiel TNF- α und IL-1, Bakterien (vor allem bakterielle Endotoxine wie Lipopolysaccharid) und Viren. Auch physikalischer (UV-Strahlung), oxidativer (Wasserstoffperoxid) und physiologischer Stress (Ischämie) können NF- κ B induzieren (KARIN und BEN-NERIAH 2000).

Die Forschungen der letzten Jahre haben zur Charakterisierung zweier ganz unterschiedlicher NF- κ B-Signalwege geführt, die sich strukturell und in ihrer physiologischen Rolle deutlich voneinander abheben (*Abb. 2*; DIXIT und MAK 2002; GHOSH und KARIN 2002; POMERANTZ und BALTIMORE 2002).

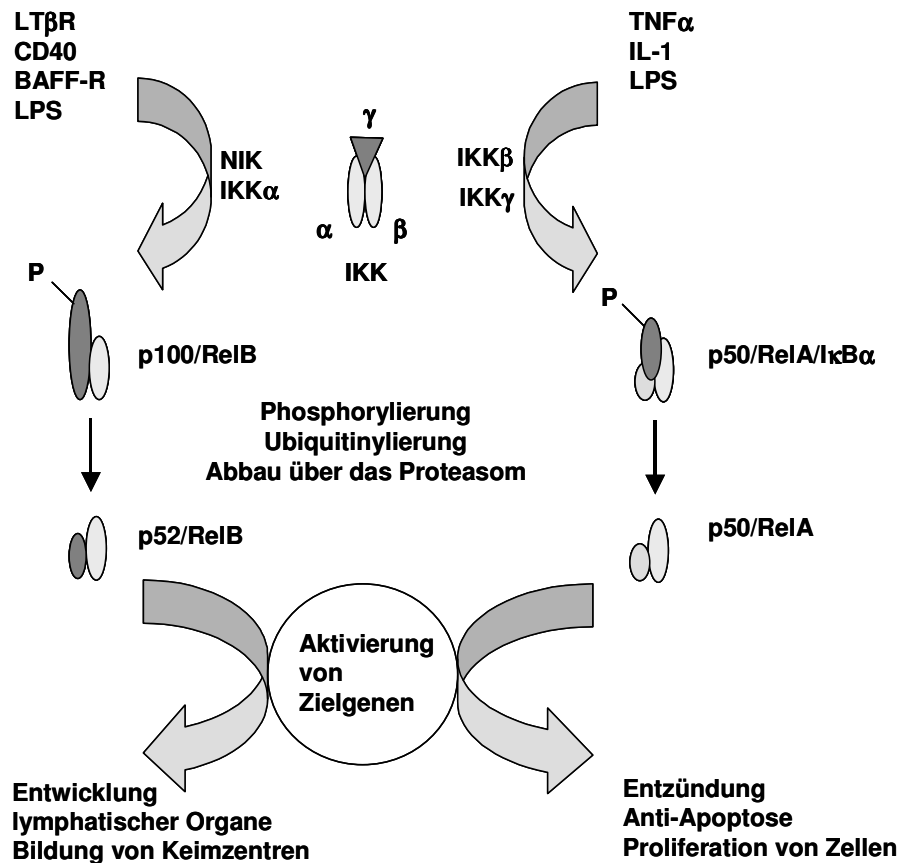


Abb. 2. Einfaches Modell der NF- κ B-Aktivierung. Rechts ist der klassische, links der alternative Signalweg dargestellt. Der klassische Signalweg kann über $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und LPS induziert werden und führt über $\text{IKK}\beta/\gamma$ zur Aktivierung von p50/RelA -Heterodimeren und schließlich zur Transkription von Zielgenen, die mit Entzündung, Anti-Apoptose und Zellproliferation in Zusammenhang stehen. Der alternative Signalweg kann über $\text{LT}\beta\text{R}$, CD40, BAFF-R und LPS aktiviert werden und führt über NIK/ $\text{IKK}\alpha$ zur Prozessierung von p100; nachfolgend gelangen unter anderem p52/RelB -Heterodimere in den Zellkern und aktivieren Gene, die mit der Entwicklung lymphatischer Organe in Zusammenhang stehen (nach GHOSH und KARIN 2002).

1.3.1 Der klassische Signalweg

Schon lange bekannt und gut charakterisiert ist der Signalweg, an dem TNF- α als Stimulus, I κ B α als Inhibitor-Protein und p50/RelA als klassisches NF- κ B-Dimer beteiligt sind. In den meisten Zelltypen führt die Stimulation nach mehreren Zwischenschritten zu einer Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes (IKK). Dieser Serin/Threonin-Kinase-Komplex, bestehend aus den katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β und der regulatorischen Untereinheit IKK γ (auch NEMO genannt), phosphoryliert I κ B α an Serin-32 und Serin-36; hierfür sind IKK β und IKK γ unerlässlich, nicht jedoch IKK α . Daraufhin wird NF- κ B-gebundenes I κ B α polyubiquitinyliert und über das Proteasom degradiert, was zur Freisetzung der NF- κ B-Proteine und zur Demaskierung ihres nukleären Lokalisationssignals führt. Auf diese Weise kann NF- κ B – in diesem Signalweg vor allem das p50/RelA-Heterodimer – in den Kern translozieren, an spezifische DNS-Motive binden und die Gentranskription aktivieren. Dieser Signalweg scheint essentiell zu sein für die schnelle Aktivierung von NF- κ B im Rahmen von zellulärem Stress, Entzündungen und Infektionen (GHOSH und KARIN 2002).

1.3.2 Der alternative Signalweg

Der alternative Signalweg ist erst in jüngster Zeit charakterisiert worden; die Erkenntnisse darüber befinden sich derzeit noch stark im Fluss (DIXIT und MAK 2002; GHOSH und KARIN 2002; POMERANTZ und BALTIMORE 2002). An diesem Signalweg ist IKK α statt der für den kanonischen Signalweg essentiellen IKK β - und IKK γ -Untereinheiten beteiligt, und er wird nicht über I κ B α , sondern über p100 vermittelt, das dabei zu p52 prozessiert wird. Die Prozessierung von p100 wird durch die NF- κ B-induzierende Kinase (NIK) positiv reguliert, wobei NIK wahrscheinlich nicht direkt auf p100, sondern indirekt über Aktivierung von IKK α wirken dürfte (SENFLEBEN et al. 2001; XIAO et al. 2001). Im Gegensatz zum klassischen erfordert der alternative Signalweg *de novo*-Proteinsynthese. Zu seinen Aktivatoren gehören die Ligation des Lymphotoxin- β -Rezeptors (LT- β R) und des BAFF-Rezeptors, ebenso wie über CD40L und LPS laufende Signale (CLAUDIO et al. 2002; COOPE et al. 2002; DEJARDIN et al. 2002; KAYAGAKI et al. 2002). Der alternative Signalweg wird in

Zusammenhang gebracht mit der Entstehung der charakteristischen Architektur der lymphatischen Organe, insbesondere der Herausbildung von Keimzentren (SENFLEBEN et al. 2001; GHOSH und KARIN 2002).

1.4 Mechanismen der konstitutiven NF- κ B-Aktivität

1.4.1 Induzierbare versus konstitutive NF- κ B-Aktivität

In den meisten Zelltypen liegt NF- κ B in inaktiver, aber induzierbarer Form im Zytoplasma vor. Nur in einigen wenigen Zelltypen, vor allem in reifen B-Zellen und in Plasmazellen, beobachtet man eine signalunabhängige, konstitutive NF- κ B-Aktivität. In diesen Zellen wird NF- κ B konstitutiv in den Kern transportiert, ein Phänomen, dessen genauere Mechanismen unklar sind. Während vorwiegend aus p50/RelA bestehende Heterodimere für die induzierbare NF- κ B-Aktivität verantwortlich sind, konnten RelB-enthaltende Komplexe mit der konstitutiven Aktivität in Verbindung gebracht werden. Die Bedeutung c-Rel-enthaltender Komplexe wird unterschiedlich beurteilt (LERNBECHER et al. 1993; DOBRZANSKI et al. 1994; WEIH et al. 1994). Die wichtige Rolle von RelB in diesem Zusammenhang wird durch zwei Befunde untermauert: Erstens ist die RelB-Expression in Geweben mit konstitutiver NF- κ B-Aktivität im Vergleich zu anderen Geweben deutlich erhöht. Zweitens werden RelB-enthaltende Komplexe aus Geweben mit konstitutiver NF- κ B-Aktivität in geringerem Maße durch I κ B α inhibiert als dies für RelB-enthaltende Komplexe aus anderen Geweben und für nicht-RelB-enthaltende Komplexe gilt (LERNBECHER et al. 1994).

Da *ikba* ein Zielgen von NF- κ B ist, kann seine Expression in Geweben mit konstitutiver NF- κ B-Aktivität induziert werden. Infolgedessen verschiebt sich die NF- κ B-Aktivität weiter zu Gunsten RelB-enthaltender Komplexe, da andere NF- κ B-Komplexe verstärkt durch I κ B α gehemmt werden (DOBRZANSKI et al. 1994). Andererseits wurde in Thymozyten gezeigt, dass die Überexpression von RelB im Gegensatz zur Überexpression von RelA I κ B α nicht zu induzieren vermag (WEIH, LIRA et al. 1996).

Wie die RelB-enhaltenden Komplexe in bestimmtem Gewebe der Hemmung durch $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ entgehen, ist unklar. Eine Möglichkeit bestünde in einer spezifischen posttranslationalen Modifikation von RelB, beschränkt auf Gewebe mit konstitutiver NF- κB -Aktivität (LERNBECHER et al. 1994). Während die Mechanismen der induzierbaren NF- κB -Aktivität zunehmend aufgeklärt werden, haben sich hinsichtlich der konstitutiven NF- κB -Aktivität in den letzten Jahren nur wenige neue Erkenntnisse ergeben. Zum Verständnis der Problematik ist ein genauerer Blick auf eine Untereinheit von NF- κB , nämlich RelB, unabdingbar.

1.4.2 RelB, eine Untereinheit von NF- κB

Im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der NF- κB /Rel-Familie weist das für die konstitutive NF- κB -Aktivität bedeutsame RelB, ein aus 558 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer Masse von etwa 60,3 kDa, einige Besonderheiten auf (*Abb. 3*).

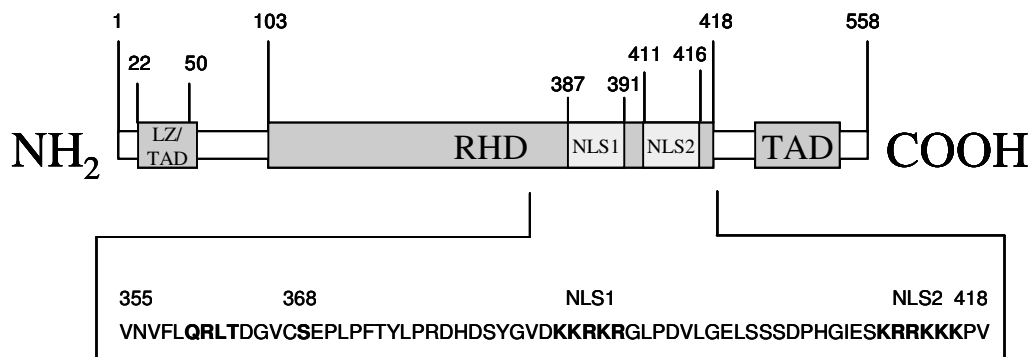


Abb. 3. Struktur von murinem RelB. RelB, ein aus 558 Aminosäuren bestehendes Protein (humanes RelB: 579 Aminosäuren) mit einer Masse von etwa 60,3 kDa, verfügt wie die anderen Mitglieder der NF- κB /Rel-Familie über die definierende Rel-Homologie-Domäne (RHD). Strukturelle Besonderheiten von RelB sind zwei Transaktivierungsdomänen (TAD), von denen eine in Form eines Leucin-Reißverschlusses (LZ) im N-Terminus und die andere im C-Terminus lokalisiert ist. Im C-terminalen Bereich der RHD fallen zwei nukleäre Lokalisationssignale (NLS) auf, deren nähere Umgebung mit Aminosäuresequenz dargestellt ist. In diesem Sequenzausschnitt sind fett hervorgehoben: eine Stelle von vier Aminosäuren, die bei RelB im Gegensatz zu RelA kein Phosphorylierungsziel der Proteinkinase A darstellt (AS 360-363); Serin 368, dessen Funktion in dieser Arbeit untersucht werden soll; schließlich die nukleären Lokalisationssignale 1 (NLS1, AS 387-391) und 2 (NLS2, AS 411-416).

RelB verfügt über zwei Transaktivierungsdomänen, von denen eine im C-, die andere im ungewöhnlich langen N-Terminus lokalisiert ist. Es kann im Gegensatz zu den anderen NF- κ B-Proteinen keine Homodimere bilden und ist bisherigen experimentellen Befunden zufolge nicht in der Lage, mit RelA oder c-Rel zu assoziieren (BOURS et al. 1994; RYSECK et al. 1992; DOBRZANSKI et al. 1993; DOBRZANSKI et al. 1994); dagegen kann es sowohl mit p50 als auch mit p52 dimerisieren und auf diese Weise die Transkription aktivieren. Die Rel-Homologie-Domäne von RelB enthält in ihrem C-terminalen Bereich zwei nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS), von denen sich in C-terminalen Deletionsexperimenten die NLS1 allein als ausreichend für den konstitutiven Kerntransport von RelB erwies: Ein RelB-Deletionsprotein, bestehend aus den N-terminalen Aminosäuren 1 bis 398, gelangte in ähnlichem Maße wie Wildtyp-RelB in den Zellkern (HOLZMANN 1999).

Im Gegensatz zum ubiquitären RelA wird RelB sehr viel selektiver, vor allem in B-Zellen und dendritischen Zellen, exprimiert; es kann in lymphatischen Organen wie Thymus (insbesondere im Mark), Lymphknoten und Milz (insbesondere in den periarteriellen Scheiden) nachgewiesen werden (CARRASCO et al. 1993, LERNBECHER et al. 1994, WEIH et al. 1994). Obwohl in viel geringeren Mengen als andere NF- κ B-Proteine liegt RelB in induzierbarer Form auch in einigen anderen Geweben vor; so wurde das Protein sogar zuerst in Fibroblasten entdeckt (RYSECK et al. 1992). Im Sinne einer positiven Rückkopplung ist das *relb*-Gen selbst Zielgen von NF- κ B (BREN et al. 2001).

Die wichtige Funktion von RelB im hämatopoetischen und Immunsystem ist mit Hilfe genetisch modifizierter Mäuse erhellt worden. Tiere mit homozygoter Inaktivierung von *relb* zeigen einen inflammatorischen Phänotyp mit T-Zell-abhängigen, multifokalen Entzündungen in mehreren Organen, eine myeloide Hyperplasie des Knochenmarkes mit verminderter Anzahl an erythroiden Vorläufern sowie eine Splenomegalie aufgrund extramedullärer Hämatopoese. Die zelluläre Immunität ist gestört, die Population der dendritischen Zellen des Thymus vermindert, die Entwicklung des Thymusmarks beeinträchtigt (BURKLY et al. 1995; WEIH et al. 1995; WEIH, DURHAM et al. 1996; WEIH et al. 2001). Von medizinischer Bedeutung sind außerdem T-Zell-abhängige Hautläsionen, die der atopischen Dermatitis beim Menschen ähneln (BARTON et al. 2000).

1.5 NF- κ B/Rel-Proteine in *Drosophila*

Die evolutionäre Konservierung von NF- κ B macht es möglich, wichtige Anregungen für die NF- κ B-Forschung in Säugetieren auch aus *Drosophila melanogaster* zu gewinnen. In *Drosophila* sind drei NF- κ B-Rel-Proteine bekannt: Dorsal, Dif und Relish (siehe auch *Abb. 1*, S. 5). Während Dif als Äquivalent der induzierbaren NF- κ B-Aktivität und Relish als Homolog von p100/p105 angesehen wird, ist Dorsal an einem Signalweg beteiligt, der die dorso-ventrale Polarität und die angeborene Immunantwort von *Drosophila* reguliert (GILLESPIE und WASSERMAN 1994; GOVIND 1999). Dieser Signalweg, der bemerkenswerte Homologien zu dem in Wirbeltieren bekannten, über den Interleukin-1-Rezeptor ausgelösten NF- κ B-Signalweg aufweist, beginnt mit der Aktivierung des Toll-Rezeptors. Das Signal wird über das Protein Tube und die Proteinkinase Pelle zu einem zytoplasmatischen Komplex aus dem Rel-Homolog Dorsal und dem I κ B-Homolog Cactus weitergeleitet. Nach Phosphorylierung und Degradation von Cactus wird Dorsal freigesetzt und transloziert in den Zellkern (BERGMANN et al. 1996). Dabei wird jedoch nicht nur Cactus, sondern auch Dorsal selbst phosphoryliert (WHALEN und STEWARD 1993; GILLESPIE und WASSERMAN 1994; LI et al. 1994). Auf diese Weise wird ein ventro-dorsaler Gradient nukleären Dorsal-Proteins etabliert, der die Polarität des Embryos bestimmt (ROTH et al. 1989; DRIER et al. 1999).

Zwar wird Dorsal an mehreren Serinresten phosphoryliert, doch ist die Phosphorylierung an Serin 317 für die Kerntranslokation entscheidend. Eine Punktmutation an dieser Position führt zu einem verminderten Kernimport von Dorsal und einem stark dorsalisierten Phänotyp des Embryos. Das mutierte Dorsal ist dabei immer noch in der Lage, mit Cactus zu interagieren, d.h. die Struktur des Proteins bleibt weitgehend intakt (DRIER et al. 1999).

Da dieser Serinrest in allen anderen bekannten NF- κ B/Rel-Proteinen konserviert ist, ist zu vermuten, dass die homologen Aminosäuren in anderen Proteinen ebenfalls eine wichtige Funktion erfüllen. Beim Vergleich zwischen Dorsal und den NF- κ B/Rel-Proteinen der Säugetiere wird außerdem deutlich, dass RelB in der Umgebung der entsprechenden Aminosäure die größte Sequenzhomologie zu Dorsal aufweist (*Abb. 4*, S. 13).

Dorsal	(300)	EPAKVFIQLRRPS	DGVT S	-EALPFEYVPMD	(329)
RelB	(351)	EPVTVNVFLQRLT	DGVC S	-EPLPFTYLPRDH	(380)
RelA	(264)	APVRVSMQLRRPS	DREL S	-EPMEFQYLPDTD	(293)
c-Rel	(257)	-PVTVKMQLRRPS	DQEV S	-ESMDFRYLPDEK	(286)
p50	(323)	KPASVVFVQLRRKS	DLET S	-EPKPFLYYPEIK	(352)
p52	(301)	RPVTVFLQLKRKR	GGDV S	-DSKQFTYYPLVE	(330)
Dif	(331)	QSVNVELKLVRPS	DGAT S	-APLPFEYYPNPE	(360)
Relish	(354)	RENVYIELIRPS	DDER S	-FPALPFRYKPRSV	(384)

Abb. 4. Evolutionäre Konservierung von Dorsal Serin 317 in anderen NF- κ B/Rel-Proteinen.

Aminosäuresequenz der unmittelbaren Umgebung von Dorsal Serin 317 im Vergleich zu anderen Rel-Proteinen aus *Drosophila* (Dif, Relish) und Säugetieren (RelB, RelA, c-Rel, p50, p52). Die konservierten Serinreste sind fett gedruckt. Man beachte, dass RelB in der Nachbarschaft des Serinrestes die ausgeprägteste Konservierung zu Dorsal manifestiert (durch Kasten hervorgehoben). Durch Unterstreichung hervorgehoben ist eine Sequenz von vier Aminosäuren, die der Konsensussequenz der Proteinkinase A (PKA) entspricht.

1.6 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll der konstitutive Kerntransport von RelB in B-Zellen untersucht und damit ein Beitrag zur Aufklärung der gewebespezifischen konstitutiven NF- κ B-Aktivität geleistet werden. Dabei liegt das Augenmerk insbesondere auf einer möglichen gewebespezifischen posttranslationalen Modifikation von RelB, die das Protein vor Inhibition durch I κ B α schützen und damit seinen Kerntransport erklären könnte. Da Serin 317 beim Kerntransport des Rel-homologen Proteins Dorsal in *Drosophila* eine besondere Rolle spielt, könnte die postulierte posttranslationale Modifikation von RelB in einer Phosphorylierung des homologen Aminosäurerestes (Serin 368) bestehen. In dieser Arbeit soll deshalb die Hypothese untersucht werden, ob die Phosphorylierung von Serin 368 die gewebespezifische konstitutive Kerntranslokation von RelB reguliert.

Um diese Frage zu klären, ist zu prüfen, wie sich ein Austausch von RelB Serin 368 durch andere Aminosäuren auf die Funktionen des Proteins, insbesondere den konstitutiven

Kerntransport, auswirkt. Der Austausch der Aminosäure soll mit Hilfe ortsspezifischer Mutagenese erreicht werden. Dabei wird auf DNS-Ebene ein Basentriplett so mutiert, dass die putativ phosphorylierte Aminosäure (Serin 368) durch Alanin ersetzt wird, also durch eine Aminosäure, die aufgrund ihrer chemischen Struktur nicht phosphoryliert werden kann. Zusätzlich soll in einer zweiten Mutagenese Serin 368 durch die Aminosäure Glutamat, deren negativ geladene Carboxylgruppe den Effekt einer Phosphatgruppe imitieren kann, ersetzt werden. Ist die Hypothese korrekt, sollte der Kerntransport der phosphoblockierenden Alanin-Mutante (RelB S368A) stark beeinträchtigt sein. Die phosphomimetische Glutamat-Mutante (RelB S368E) hingegen sollte konstitutiv in den Zellkern transportiert werden.

Als Modellsystem für die Expression und Untersuchung der Mutanten soll die S107-Zelllinie dienen. Diese leitet sich aus einem Plasmazytom der Maus, einem malignen Tumor aus Plasmazellen, her. In der Vergangenheit war schon gezeigt worden, dass sich S107-Zellen gut eignen, um die induzierbare und die konstitutive NF- κ B-Aktivität zu untersuchen. Die S107-Zelllinie weist einen noch nicht gänzlich aufgeklärten, die induzierbare und die konstitutive NF- κ B-Aktivität betreffenden Defekt auf. Die NF- κ B-Induktion durch einige Stimuli, z.B. Lipopolysaccharid, Phorbol-12-myristat-13-acetat, UV-Licht, Röntgenstrahlen und H₂O₂ ist gestört, während die Induktion durch andere Stimuli, z.B. TNF- α und die Phosphatase-Inhibitoren Okadainsäure und Calyculin A, intakt ist (BAUMANN et al. 1998).

Von Bedeutung für dieses Projekt ist aber vor allem die Tatsache, dass die S107-Zellen im Gegensatz zu anderen Plasmazellen über keine konstitutive NF- κ B-Aktivität verfügen und kein endogenes RelB exprimieren. Die anderen NF- κ B-Proteine werden in dieser Zelllinie – soweit untersucht – exprimiert, aber im Zytoplasma zurückgehalten. Durch ektope Expression von RelB ist es möglich, die defekte konstitutive NF- κ B-Aktivität wiederherzustellen, wobei p50/RelB-Komplexe im Kern auftreten. Als Indiz für die spezifische Bedeutung von RelB für die konstitutive NF- κ B-Aktivität mag gelten, dass sie durch ektope Expression von RelA nicht wiederhergestellt werden kann (KIRILLOV et al. 1996).

Die besonderen Eigenschaften der S107-Zellen ermöglichen es, das Verhalten von Wildtyp-RelB und der beiden Mutanten ungestört von endogenem RelB zu untersuchen. Nach einigen grundsätzlichen Voruntersuchungen sollen deshalb stabile S107-Transfektanten etabliert werden, die Wildtyp-RelB bzw. die beiden mutanten RelB-Formen exprimieren. Gemäß der vorgestellten Hypothese wird insbesondere zu analysieren sein, ob sich die

subzelluläre Lokalisation von Wildtyp-RelB und RelB S368A unterscheidet. Um die Funktion von Serin 368 im Gesamtprotein umfassend zu charakterisieren, soll überdies untersucht werden, ob die eingeführten Mutationen eventuell auch Störungen anderer wichtiger Funktionen von RelB, insbesondere der DNS-Bindung, der Transaktivierung und der Dimerisierung, verursachen.

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die folgenden Chemikalien und Reagenzien wurden verwendet:

Acrylamid	FCS (Fötales Kälberserum)
Agar	Ficoll 400
Agarose	Glycerol
Ammoniumpersulfat (APS)	Glycin
Borsäure	Hefeextrakt
Bromphenolblau	HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure)
BSA (Bovines Serumalbumin)	Kaliumacetat
Butanol	Kaliumchlorid
Casaminosäuren	Magermilchpulver
Cäsiumchlorid	Magnesiumchlorid
Chloroform	β -Mercaptoethanol
Coomassie Brillantblau	Methanol
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan)	Mowiol
DAPI (4,6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid)	Natriumacetat
Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; ^{32}P -dATP, ^{32}P -dCTP)	Natriumcarbonat
DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium)	Natriumchlorid
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Natriumdodecylsulfat (SDS)
DTT (Dithiothreitol)	Dinatriumhydrogenphosphat
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Natriumhydroxid
EGTA (Ethylenglykoltetraacetat)	NP-40 (Nonidet P 40, Nonylphenylpolyethylenglykol)
Ethanol	Paraformaldehyd
	Phenol

Phosphorsäure	Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Triton X-100
Poly (dI/dC) (Poly-desoxyinosin / Poly-desoxycytosin)	Trypanblau
2-Propanol	Trypton
Proteaseinhibitor-Tabletten (EDTA-frei)	Tween 20
Protein-A-Agarose	Wasser (HPLC-Grad)
Salzsäure	Xylencyanol
Stickstoff, flüssig	
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	

Die aufgelisteten Produkte wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Biosciences
AppliChem GmbH, Darmstadt
Calbiochem, La Jolla, USA
Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Difco, Detroit, USA
Gibco BRL / Life Technologies, Paisley, Schottland
Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Merck KGaA, Darmstadt
PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Roche Diagnostics
Roche Molecular Biochemicals (vorm. Boehringer Mannheim)
Serva, Heidelberg
Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Seelze)

2.1.2 Puffer

PBS pH 7.4	NaCl	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KCl	2,6 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
TBE	Tris-Base	0,1 M
	BH ₃ O ₃ (Borsäure)	0,1 M
	EDTA pH 8,0	2 mM
TE	Tris-HCl pH 7,5	10 mM
	EDTA pH 8,0	1 mM

2.1.3 Zellen und Bakterien

Zellen

Zelllinien	S107 (murine Plasmozytom-Zelllinie)
	S194 (murine Plasmozytom-Zelllinie)
	Jurkat-T-Zellen (human)

Bakterien

Bakterienstämme	E. coli DH5α
	E. coli XL-1

2.1.4 Molekularbiologische Materialien

Plasmide

Expressionsvektor für RelB (RelB MexNeo)

Expressionsvektoren für NF-κB-p50 und NF-κB-p52

Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg, bezogen.

Mutagene Oligonukleotide:

(RelB S368A-Mutation)	5'	GAT GGG GTG TGC GCC GAG CCG CTG CC	3'
	3'	GG CAG CGG CTC GGC GCA CAC CCC ATC	5'
(RelB S368E-Mutation)	5'	GAT GGG GTG TGC GAG GAG CCG CTG CC	3'
	3'	GG CAG CGG CTC CTC GCA CAC CCC ATC	5'

Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	Fa. Roche Molecular Biochemicals
Klenow-Polymerase	Fa. Stratagene
Restriktionsendonukleasen	Fa. Amersham Pharmacia Biotech
Ribonuklease A	Fa. Sigma
T4-DNS-Ligase	Fa. Roche Molecular Biochemicals

Antibiotika

Ampicillin (Ampicillin-Natriumsalz)
 Geneticin (G418)
 Penicillin-Streptomycin

Antikörper***Primäre Antikörper***

Polyklonale Kaninchen-Antikörper (Fa. Santa Cruz Biotechnology):

α -Bcl-3	sc-185
α -c-Rel	sc-71
α -I κ B α	sc-371
α -IKK α / β	sc-7607
α -NF- κ B-p50/p105	sc-114X
α -NF- κ B-p52/p100	sc-298X
α -RelA	sc-372
α -RelB	sc-226

Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (in der Abteilung hergestellt):

α -NF- κ B-p50/p105

Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Fa. Upstate Biotechnology)

α -NF- κ B-p52/p100 US 06-413

Sekundäre Antikörper

Immunoblot: Esel-anti-Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt (Fa. Jackson
ImmunoResearch Laboratories)

Immunfluoreszenz: Ziege-anti-Kaninchen, FITC-konjugiert (Fa. Dianova)

Größenstandards

Proteinmarker mit Banden bei 180, 116, 84, 58, 48.5, 36.5, 26.6 kD (Fa. Sigma)

Größenstandard für DNS (Fa. Gibco BRL)

Gebrauchsfertige Kits und Systeme

ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems)

BCA-Protein-Assay (Fa. Pierce / Perbio Science, Rockford, USA)

Dual-Luciferase Reporter Assay System (Fa. Promega, Madison, USA)

ECL-System (Fa. Amersham Biosciences)

QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Fa. Stratagene, La Jolla, USA)

NucleoSpin Extract (Fa. Macherey-Nagel GmbH, Düren)

Reinigungssystem für radioaktive Sonden (Reinigungssäulen: NucTrap Purification Columns;

Spritzen: B-D syringes with Luer Lok tips; Fa. Stratagene, La Jolla, USA)

2.1.5 Sonstiges

Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Fa. Menzel
Gel-Blotting-Papier	Fa. Schleicher und Schuell
Einfriereröhrchen (1,8 ml)	Fa. Nunc
Faltenfilter	Fa. Schleicher und Schuell
Fertigspritzen SubQ 26G	Fa. Becton Dickinson

Gewebekulturplatten (6, 24 und 96 Npfe)	Fa. Falcon
Glaspipetten	Fa. Brand
Kanlen	Fa. Braun Melsungen
Küvetten:	Fa. Hellma
Glas	
Plastik	Fa. Brand
Elektroporation	Fa. Bio-Rad
Objektträger	Fa. Menzel
Pipettenspitzen	Fa. Gilson
Quickseals (5 ml)	Fa. Beckman
Röntgenfilme	Fa. Fuji
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Fa. Eppendorf
Reinigungssäulen für amplifizierte DNS	Fa. Princeton Separations
Petrischalen (94 und 145 mm)	Fa. Falcon
PVDF-(Polyvinylidendifluorid-) Membran	Fa. Millipore
Spritzen	Fa. Braun Melsungen, Eppendorf, Ritter
Sterilfilter (0,45 μm)	Fa. Schleicher und Schuell
Zentrifugenbecher (250 ml)	Fa. Sorvall
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Fa. Falcon

Geräte

Brutschrank	Fa. Heraeus Instruments
Eismaschine	Fa. Scotsman
Elektroblotter	Fa. Bio-Rad; Fa. Owl Separation Systems
Elektroporator	Fa. Bio-Rad Laboratories
ELISA-Reader	Fa. Molecular Devices
Fettstift (Markierung von Objekttrgern)	Fa. Biogenex
Filmentwickler	Fa. Agfa
Kontaminationsmonitor	Fa. Berthold Technologies
Khlschrnke	Fa. Liebherr
Luminometer	Fa. Berthold Detection Systems
Magnetrhrer	Fa. IKA Labortechnik
Mikropipetten	Fa. Abimed

Mikroskope:	Lichtmikroskop	Fa. Leica
	Fluoreszenzmikroskop	Fa. Leica
PCR-Maschine		Fa. MWG Biotech
pH-Meter		Fa. Knick
Schüttler		Fa. Heidolph Instruments
Sequenzierer		Fa. Perkin Elmer
Spannungsgeräte		Fa. Desaga, Fa. Bio-Rad
Spektralphotometer		Fa. Amersham Pharmacia Biotech
Sterilbank		Fa. Heraeus Instruments
Stickstofftank für Zellen		Fa. Forma Scientific
Tiefkühltruhen:	-20 °C	Fa. Liebherr
	-80 °C	Fa. Heraeus Instruments
Überkopfröller		Fa. Heidolph Instruments
UV-Transilluminator		Fa. Heraeus Instruments
UV-Videosystem		Fa. Sony
Vakuum-Geltrockner		Fa. Hoefer / Fa. Amersham Pharmacia Biotech
Vakuum-Konzentrator		Fa. Bachofer
Vortexer		Fa. Scientific Industries
Waagen:	Analysenwaage	Fa. Sartorius
	Feinwaage	Fa. Scaltec
Wasserbad		Fa. GFL, B. Braun Melsungen
Zählkammer nach Neubauer		
Zentrifugen:	Biofuge pico	Fa. Heraeus Instruments
	Megafuge	Fa. Heraeus Instruments
	Großzentrifuge J2-21	Fa. Beckman Instruments
	Ultrazentrifuge XL-90	Fa. Beckman Instruments
Zytozentrifuge und Zubehör		Fa. Shandon

Elektronische Datenverarbeitung

Zur Gewinnung, Auswertung und Präsentation der hier vorgestellten Daten wurden Macintosh-Rechner der Fa. Apple und ein Scanner der Fa. Agfa verwendet. Dabei wurden u.a. folgende Programme benutzt:

ABI PRISM DNA Sequencing /	Lasergene Navigator
Gene Scan Analysis Software	Microsoft Office
Adobe Photoshop	Netscape Navigator
Endnote	Openlab
FotoLook	SOFTmax PRO

2.2 DNS-Techniken

2.2.1 Allgemeine DNS-Techniken

Zentrifugation von DNS

Die Zentrifugation von DNS erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, in einer Heraeus Biofuge bei 13 000 rpm und Raumtemperatur.

Phenol-Chloroform-Extraktion von DNS

Die wässrige DNS-Lösung wurde mit zwei Teilen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt und abzentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit zwei Teilen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der wässrige Überstand in ein neues Gefäß überführt und mit Ethanol gefällt.

Ethanolpräzipitation von DNS

Die wässrige DNS-Lösung wurde mit 0,1 Teil Ammoniumacetat (3 mol/l, Endkonzentration 0,3 mol/l) und mit 2,5 Teilen kalten Ethanols versetzt. Die DNS wurde über mindestens 30 min bei -20°C ausgefällt und anschließend zentrifugiert. Das DNS-Pellet wurde nach Abnahme des Überstandes mit Ethanol (80 %) gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet unter Zentrifugation im Vakuumkonzentrator getrocknet und schließlich in Wasser aufgenommen.

Konzentrationsbestimmung von DNS-Lösungen

Die Konzentration von DNS-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Gelelektrophorese von DNS

DNS-Fragmente wurden über ein Agarose-Gel (1 %) aufgetrennt. Zur Herstellung des Agarose-Gels wurde 1 g Agarose auf 100 ml TBE-Puffer gegeben. Nach Aufkochen wurden 3 bis 7 µl einer Ethidiumbromid-Lösung hinzugegeben (200 mg / ml). Das Gel wurde in geeignete Kammern gegossen und nach Polymerisation mit TBE-Puffer überschichtet. Für indikative Gele wurden 500 ng DNS, für präparative Gele 20 bis 40 µg DNS in DNS-Farbmarker aufgetragen. Bei einer Spannung von 100 bis 150 V über mehrere Stunden wurden die Fragmente nach ihrer Molekülgröße separiert und unter UV-Bestrahlung visualisiert. Ein ebenfalls aufgetragener Größenstandard mit Banden von 100 bis 12 000 bp ermöglichte hierbei eine Abschätzung der Molekülgröße.

Agarose-Gel	1 g Agarose	
	TBE ad 100 ml	
DNS-Farbmarker	Glycerin	15 %
	Ficoll 400	10 %
	EGTA	40 mM
	Xylencyanol	0,2 %
	Bromphenolblau	0,2 %

2.2.2 Klonierung von DNS

Indikativer Restriktionsverdau

Etwa 2 bis 4 µg DNS wurden mit dem gewünschten Restriktionsenzym (3 bis 5 U / µg DNS) und einem geeigneten Puffer in einem Volumen von insgesamt 50 µl gemischt. Bei DNS aus Mini-Präparationen wurde außerdem 1 µl Ribonuklease A hinzugefügt. Die Reaktion selbst

wurde bei 37 °C durchgeführt, entweder über einige Stunden oder über Nacht. Zur Analyse wurden 500 ng DNS auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

Präparativer Restriktionsverdau

Der präparative Verdau wurde analog dem indikativen durchgeführt; es wurden aber größere Mengen DNS (20 bis 40 µg) in einem größeren Volumen (200 µl) eingesetzt. Unter UV-Visualisierung wurden die gewünschten DNS-Banden ausgeschnitten und mit Hilfe eines Systems der Fa. Macherey-Nagel (NucleoSpin Extract) aufgearbeitet. Die aufgereinigte DNS wurde im folgenden mit Phenol-Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert.

Klenow-Reaktion

Die Klenow-Reaktion dient dazu, die nach einem Restriktionsverdau entstandenen überhängenden DNS-Enden aufzufüllen und auf diese Weise glatte Enden zu erhalten. Hierzu wurden dem Restriktionsansatz 4 mmol Desoxynukleotide (dNTP, ein Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 10 bis 15 U der Klenow-Polymerase hinzugefügt. Die Reaktion erfolgte über 30 min bei Raumtemperatur.

Dephosphorylierung von Vektor-Fragmenten

Diese Reaktion dient dazu, die Religation linearisierter Vektor-DNS zu verhindern und so die Integration eines gewünschten DNS-Fragmentes in einen Vektor effizienter zu gestalten. Die alkalische Phosphatase aus Kalbsintestinum (CIP) spaltet die terminalen Phosphatgruppen der Vektor-DNS ab. Die Reaktion wurde in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer in einem Volumen von 100 µl durchgeführt. Nach Zugabe von 1 µl CIP und Inkubation bei 37 °C über 15 min wurde nochmals 1 µl CIP hinzugegeben und zunächst bei 56 °C, dann bei 37 °C über jeweils 15 min inkubiert.

Ligation

Die zu integrierenden DNS-Fragmente wurden gegenüber dem Vektor in mindestens zweifachem Überschuss eingesetzt. Als Enzym wurde eine Ligase von Roche mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 20 µl bei einer Temperatur von 16 °C über Nacht durchgeführt. Ein Aliquot des Ligationsansatzes

wurde im folgenden entweder direkt oder nach Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation für eine Transformation verwendet.

2.2.3 Präparation von DNS

Bakterienkultur

LB-Medium	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	Natriumchlorid	10 g
	Wasser	ad 1 l

selektives LB-Medium: supplementiert mit Ampicillin (50 µg/ml)

LB-Platten	LB-Medium + 1,5 % Agar
------------	------------------------

SOC-Medium	Trypton	20 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	NaCl	0,5 g
	KCl (0,25 M)	10 ml
	MgCl ₂ (2 M)	5 ml
	Glucose (1 M)	20 ml
	Wasser	ad 1 l

Transformation

Es wurden sowohl elektro- als auch chemokompetente Bakterien verwendet. Die Bakterien wurden zunächst mit der einzuschleusenden Plasmid-DNS gemischt und über 30 min auf Eis inkubiert. Die chemokompetenten Bakterien (Stämme XL-1 und DH5α) wurden durch Hitzeschock (42 °C über 30 bis 90 s) und anschließende Inkubation auf Eis über 2 min transformiert, die elektrokompenten Bakterien (Stamm XL-1) durch Elektroporation (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω). Die Bakterien wurden anschließend in 0,5 bis 1 ml SOC- oder LB-Medium auf einem Schüttler inkubiert (1 h, 37 °C), bevor unterschiedliche Mengen dieses Ansatzes auf selektiven LB-Platten (mit Ampicillin, 50 µg/ml) ausplattiert wurden. Die Platten wurden über

Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, wobei nur solche Bakterien zu Kolonien heranwachsen konnten, welche über die auf der Plasmid-DNS kodierte Ampicillin-Resistenz verfügten. Die Kolonien konnten dann durch Mini-Präparation von DNS analysiert werden.

Retransformation

50 ng des zu vermehrenden Plasmids wurden durch Elektroporation (2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω) in elektrokompente Bakterien (XL-1) eingeschleust. Nach einer einstündigen Vorkultur bei 37 °C in 1 ml SOC-Medium wurde eine größere Menge LB-Medium (400 ml) angeimpft. Die Kultur erfolgte über Nacht in Gegenwart von Ampicillin (50 μ g / ml). Die vermehrte Plasmid-DNS konnte dann über eine Maxi-Präparation aus den Bakterien gewonnen werden.

Mini-Präparation von DNS

Die transformierten Bakterienkulturen für die Mini-Präparation wurden in 3 ml selektivem LB-Medium über Nacht herangezüchtet. Davon wurden 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden 100 μ l der Lösung 1 hinzugegeben. Nach Vortexen und Zugabe von 200 μ l der Lösung 2 wurden die Proben vorsichtig über Kopf geschwenkt; ebenso wurde nach Zugabe von 150 μ l der Lösung 3 verfahren. Nach Zentrifugation (13 000 rpm, 15 min) wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und nach Zugabe von 500 μ l Isopropanol geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation (13 000 rpm, 10 min) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen und ein letztes Mal abzentrifugiert (13 000 rpm, 3 min). Nach Lufttrocknung wurde die DNS in 100 μ l Wasser resuspendiert und mittels Restriktionsverdau analysiert.

Lösung 1	Glucose	50 mM
	Tris-HCl pH 8,0	25 mM
	EDTA pH 8,0	10 mM
Lösung 2	NaOH	0,2 N
	SDS	1 %

Lösung 3	Kaliumacetat	5 M
	Essigsäure	11,5 %

Maxi-Präparation von DNS

Die Kultur transformierter Bakterien wurde in einer Großzentrifuge (Beckman J2-21) abzentrifugiert (5 000 rpm, 10 min, 4 °C). Nach Lufttrocknung des Pellets und Zugabe von 7,5 ml Lösung 1 wurde gerührt, bis eine homogene Mischung entstand. Als nächstes wurden 15 ml Lösung 2 hinzugegeben; nach vorsichtigem Umrühren entstand so eine schleimige Masse, aus der nach Zugabe von 11,5 ml Lösung 3 eine weiße Masse ausfiel. All diese Schritte geschahen auf Eis; nach Zugabe der entsprechenden Lösung wurde jeweils für einige Minuten inkubiert.

Nach Zentrifugation (Beckman J2-21, 10 000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand durch Faltenfilter in Zentrifugenröhrchen (50 ml) filtriert. Daraufhin wurden die Röhrchen mit Isopropanol ad 50 ml aufgefüllt. Nach Schütteln, Inkubation (5 min, Raumtemperatur) und Zentrifugation (Heraeus Megafuge, 5000 rpm, 10 min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 4,1 ml TE-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 4,85 g Cäsiumchlorid und 200 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde noch einmal abzentrifugiert (Heraeus Megafuge, 5000 rpm, 10 min); der Überstand wurde in versiegelbare Zentrifugenröhrchen (Beckman Quick Seals) überführt.

Nach Ultrazentrifugation (Beckman XL-90, 60 000 rpm, mindestens 4 h; alternativ 55 000 rpm über Nacht, 20 °C) wurden eine obere (chromosomale DNS) und eine untere (Plasmid-DNS) Bande sichtbar. Diese wurde mit einer Spritze aufgesogen und ein zweites Mal in einer Cäsiumchlorid-Lösung (0,8 mg/ml in TE-Puffer) ultrazentrifugiert. Nach nochmaligem Abzug der Plasmidbande und Überführen in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) wurden 3,5 ml Wasser hinzugegeben. Nach Auffüllen mit n-Butanol und Ausschütteln wurde die obere, Ethidiumbromid-enthaltende alkoholische Phase verworfen; die untere, DNS-enthaltende wässrige Phase dagegen wurde erneut mit n-Butanol versetzt. Dieser Schritt wurde mindestens viermal wiederholt.

Schließlich wurde die gereinigte wässrige Lösung mit bei -20 °C gekühltem Ethanol versetzt, um die DNS auszufällen. Nach Inkubation (30 min, -20 °C) und Zentrifugation (Megafuge, 5 000 rpm, 10 min, ZT) wurde noch einmal in Ethanol (80 %) gewaschen, um noch vorhandenes Cäsiumchlorid zu entfernen. Schließlich wurde das Pellet nach erneuter Zentrifugation und Lufttrocknung in etwa 1 ml Wasser aufgenommen.

2.2.4 Mutagenese von DNS

Für die Mutagenese des Plasmids RelB MexNeo wurde ein von der Fa. Stratagene entwickeltes PCR-basiertes System verwendet. Das Prinzip besteht darin, dass Oligonukleotide, welche die gewünschte Mutation enthalten, als Startermoleküle in einer Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden. Um die nicht-mutierte DNS abzubauen, führt man einen Restriktionsverdau mit Dpn I durch. Dieses Restriktionsenzym schneidet die entsprechenden Erkennungsstellen nur dann, wenn diese methyliert sind. Während das ursprüngliche Plasmid methyliert ist und folglich abgebaut wird, bleibt die neu synthetisierte, nicht-methylierte DNS, welche die gewünschte Mutation aufweist, erhalten.

PCR-Ansatz:	Plasmid RelB MexNeo	10 ng
	5'-Startoligonukleotid	125 ng
	3'-Startoligonukleotid	125 ng
	dNTP-Mix	1 µl
	Reaktionspuffer (10x)	5 µl
	Quik Solution	3 µl
	Wasser	ad 50 µl

Dieser Ansatz wurde zunächst bei 95 °C für 1 min denaturiert. Dann erfolgten insgesamt 18 Zyklen folgender Art:

50 s, 95 °C	(Denaturierung)
50 s, 60 °C	(Anlagerung des Startoligonukleotids)
16 min, 68 °C	(Aktivität der DNS-Polymerase)

Nach 18 Zyklen wurde die Reaktion beendet (7 min bei 68 °C, dann Kühlung auf 4 °C).

Die PCR-Produkte wurden mit dem Restriktionsenzym Dpn I geschnitten. Dazu wurde jeder Ansatz mit 1 µl des Restriktionsenzym versetzt und 1 h lang bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden chemokompetente Bakterien (XL-10) mit den verschiedenen Reaktionsansätzen transformiert.

2.2.5 Sequenzierung von Plasmiden

Die Sequenzierung von Plasmiden wurde nach dem Protokoll der Fa. PE Biosystems in einem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer durchgeführt. Die Plasmid-DNS wurde zunächst Stück für Stück mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die 5'- und 3'-Startoligonukleotide (18 bis 21 bp) für die PCR wurden so gewählt, dass sie jeweils etwa 500 bis 600 bp der Plasmid-DNS einschlossen.

Reaktionsansatz:	Plasmid-DNS	400 ng
	Sequenzier-Mix	4 µl
	Startoligonukleotid	5 pmol
	Wasser (HPLC-Grad)	ad 10 µl

Dieser Ansatz wurde zunächst bei 96 °C für 2,5 min denaturiert. Dann folgten insgesamt 25 Zyklen folgender Art:

20 s, 96 °C	(Denaturierung)
20 s, 53 – 55 °C	(Anlagerung des Startoligonukleotids)
4 min, 60 °C	(Aktivität der DNS-Polymerase)

Nach 25 Zyklen wurde die Reaktion beendet (10 min bei 60 °C, dann Kühlung auf 4 °C). Die amplifizierte DNS wurde nun mit Hilfe spezieller Säulen (Centri-Sep Spin Columns, Princeton Separations) aufgereinigt. Die Säulen wurden mit 800 µl Wasser (HPLC-Grad) äquilibriert und nach 30 min Inkubation abzentrifugiert (Heraeus Biofuge, 3000 rpm, 2 min, ZT). Danach wurde das amplifizierte DNS-Fragment mittig auf das Gel der Säule pipettiert und über die Säule in ein Eppendorf-Gefäß zentrifugiert (Heraeus Biofuge, 3000 rpm, 2 min, ZT). Nach Vakuumtrocknen wurde die DNS in 20 µl Wasser (HPLC-Grad) aufgelöst, wovon 5 µl entnommen und in einem Sequenziergefäß mit 15 µl Wasser (HPLC-Grad) gemischt wurden. Die aufgereinigten DNS-Fragmente ließen sich dann im Sequenzierer analysieren.

2.3 Zelluläre Techniken

2.3.1 Allgemeine Zellkultur

Zentrifugation von Zellen

Die Zentrifugation der Zellen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in einer Heraeus Megafuge (900 – 1200 rpm, 4 min, Raumtemperatur).

Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien (B-Zelllinien S107 und S194, Jurkat-T-Zellen) sind Suspensionszellen und wurden in Petrischalen bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Je nach Zelldichte wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:3 bis 1:20 in frisches Medium umgesetzt.

S107 und S194-Zellen	DMEM, supplementiert mit	10 % FCS
		1 % Penicillin-Streptomycin
		0,1 % β -Mercaptoethanol
Jurkat-T-Zellen	DMEM, supplementiert mit	10 % FCS
		1 % Penicillin-Streptomycin

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen (etwa 10⁷) wurden durch Zentrifugation von ihrem Kulturmedium abgetrennt, in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und in Einfrierröhrchen überführt. Nach Inkubation auf Eis für etwa 30 min wurden die Zellen bei -80°C eingefroren und zur längeren Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff gegeben. Wenn die Zellen wieder in Kultur genommen werden sollten, wurden sie rasch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in Zentrifugenröhrchen (Falcon, 15 ml) überführt und mit Medium versetzt. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in frisches Medium aufgenommen und auf eine Petrischale ausgebracht.

Einfriermedium	DMEM	40 %
	FCS	50 %
	DMSO	10 %

Zählung von Zellen

Die Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Kammer gezählt. Hierzu wurden 10 μl der auszuzählenden Zellsuspension mit 10 μl Trypanblau versetzt, um die lebenden Zellen anzufärben, und in die mit einem Deckglas versehene Zählkammer verbracht. Mit Hilfe der Zählkreuze ließ sich so die Zellkonzentration in der Zellsuspension bestimmen.

2.3.2 Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Suspensionszellen

Etwa 10^4 bis 10^5 Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Hilfe einer Zytocentrifuge (500 rpm, 5 min) auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Fettstift umrandet. Dann wurden die Zellen mit einem Tropfen PBS / 4 % Paraformaldehyd über 15 min fixiert. Durch vorsichtiges Eintunken des Objektträgers in Bechergläser mit PBS wurden die fixierten Zellen dreimal gewaschen, bevor durch Zugabe eines Tropfens PBS / 5 % FCS / 0,5 % Triton X-100 unspezifische Bindungsstellen blockiert wurden. Nach Inkubation mit dem spezifischen Erstantikörper (1:100 bis 1:200 in PBS / 0,2 % Tween 20) über 30 min bei 37 °C wurden die Zellen dreimal mit PBS / 0,2 % Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem FITC-konjugierten Zweitantikörper (1:100 bis 1:200 in PBS / 0,2 % Tween 20) beträufelt und über 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde auf 60 °C erwärmtes Fixiermedium hinzugegeben. Nach Auflage eines Deckglases und Trocknung konnten die Präparate in einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

Das dem Fixiermedium beigemischte DAPI lagert sich in DNS ein und kann somit zur unspezifischen Kernfärbung verwendet werden; durch Anregung mit monochromatischem Licht der Wellenlänge $\lambda = 359 \text{ nm}$ leuchtet es blau auf ($\lambda = 461 \text{ nm}$). Die Lokalisation des spezifisch markierten Proteins ergibt sich bei Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 494 \text{ nm}$; hierbei emittiert das spezifisch gebundene FITC grünes Licht ($\lambda = 518 \text{ nm}$).

Fixiermedium	Mowiol	4,8 g
	Glycerol	12 g
	Wasser	12 ml
	0,2 M Tris pH 8,5	12 ml
	DABCO	1 g
	DAPI	50 μg

2.3.3 Transfektionsexperimente in eukaryotischen Zellen

Elektroporation

Etwa 10^7 Zellen wurden in 300 μ l Kulturmedium aufgenommen und in zur Elektroporation geeignete Küvetten überführt. Der entsprechende DNS-Ansatz mit einem Volumen von 20 μ l wurde hinzugegeben. Nach Mischen und kurzer Inkubation wurden die Zellen elektroporiert (975 μ F, 250 V, Bio-Rad Gene Pulser) und unmittelbar danach mit 1 ml Medium versetzt. Schließlich wurden die Zellen wieder in einer Petrischale mit 20 ml Medium ausgesät.

Stabile Transfektion

Um stabile Transfektanten herzustellen, wurden S107-Zellen mit 40 μ g des ursprünglichen oder der mutierten RelB MexNeo-Plasmide elektroporiert. Aus den so transfizierten Zellen wurden sowohl Massenkulturen als auch klonale Kulturen aus einzelnen Zellen angelegt. Die Massenkulturen wurden gewonnen, indem die transfizierten Zellen über mehrere Wochen in G418-haltigem Medium (2 mg / ml) gezüchtet wurden; auf diese Weise wurden diejenigen Zellen selektiert, die das RelB MexNeo-Plasmid mit der G418-Resistenz genomisch integriert hatten. Um Einzelzellklone zu erhalten, wurden auf Gewebekulturplatten (mit 96 Näpfen) Verdünnungsreihen der transfizierten Zellen ebenfalls in G418-haltigem Kulturmedium angelegt. So war es möglich, Zellklone zu identifizieren, die aus einer einzigen Zelle hervorgegangen waren. Diese wurden dann auf anderen Gewebekulturplatten (mit 24 bzw. 6 Näpfen) in immer größeren Mengen Kulturmedium aufgenommen und auf diese Weise vermehrt.

Bestimmung der Transkriptionsaktivität

Elektroporation mit Reportergenen

Um die κ B-spezifische Transkriptionsaktivität zu bestimmen, wurden die zu untersuchenden Zellen simultan mit 20 μ g eines NF- κ B-abhängigen Photinus-Luciferase-Reporters und 30 ng eines unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors stehenden Renilla-Luciferase-Reporters in einem Volumen von 20 μ l elektroporiert. Bei Kotransfektionen wurde demselben Transfektionsansatz die entsprechenden Plasmide beigelegt.

Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurde ein System der Fa. Promega (Dual-Luciferase Reporter Assay System) benutzt. 18 bis 20 h nach der Elektroporation wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden sie mit PBS gewaschen und nach Zentrifugation in 100 bis 200 µl Lysepuffer (Fa. Promega) aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 10 min und nach Zentrifugation (Heraeus Biofuge, 13 000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. In jedem dieser Überstände wurden dann im Luminometer unmittelbar nacheinander die Aktivitäten der Photinus-Luciferase und der Renilla-Luciferase bestimmt, nachdem ein spezieller, das Substrat des jeweiligen Enzyms enthaltender Puffer (Fa. Promega) hinzugefügt worden war. Für jede Messreihe waren Leerwerte für die Photinus- und die Renilla-Luciferase zu bestimmen, indem die Emission der Puffer ohne Zugabe der Zellextrakte gemessen wurde. Die relative κB-spezifische Aktivität wurde dann folgendermaßen berechnet:

$$\text{Induktionsfaktor} = (3 \times \kappa\text{B.luci} - \text{Leerwert}_{\text{Photinus}}) / (\text{Ubi.Renilla} - \text{Leerwert}_{\text{Renilla}})$$

Hintergrund zu dem benutzten Reportersystem

Der Photinus-Luciferase-Reporter (3xκB.luci) enthält drei Kopien des κB-Motivs oberhalb einer β-Globin-TATA-Box und ein aus dem Leuchtkäfer Photinus pyralis stammendes Gen, das für das Enzym Luciferase kodiert. Bindet NF-κB an das entsprechende DNS-Motiv, so wird das Enzym Luciferase exprimiert. Dieses katalysiert unter ATP-Verbrauch die Umsetzung von Luciferin; das hierbei entstehende Licht kann mit einem Luminometer bestimmt werden und stellt ein Maß für die NF-κB-spezifische transkriptionelle Aktivität dar.

Der Renilla-Luciferase-Reporter (Ubi.Renilla) steht unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors. Die Renilla-Luciferase (aus der Seefeder Renilla reniformis) setzt das Substrat Coelenterazin um, wobei ebenfalls Licht emittiert wird. Die luminometrische Bestimmung dieser Emission stellt eine interne Kontrolle dar und ermöglicht eine Abgleichung der Transfektionseffizienz in unterschiedlichen Versuchsansätzen, da der Ubiquitin-Promotor in allen Ansätzen die gleiche Aktivität aufweisen sollte.

Kontrolle durch parallele Transfektion von β-Glob TATA.luci

Für einige Messreihen wurde eine zusätzliche Kontrolle durchgeführt, um die κB-Spezifität noch zu erhöhen. Dafür wurde ein Luciferase-Reporter (β-Glob TATA.luci) eingesetzt, der

nur aus der β -Globin-TATA-Box und dem Gen für Photinus-Luciferase besteht, sich also vom oben beschriebenen Reporter durch das Fehlen der κ B-Motive unterscheidet. Simultan wurde dieser Ansatz mit dem unveränderten Renilla-Luciferase-Reporter transfiziert, um auch hier wieder die Transfektionseffizienz berücksichtigen zu können. Die Zellen, deren Transfektion mit β -Glob TATA.luci kontrolliert werden sollten, mussten also in zwei unabhängigen Ansätzen (3x κ B.luci und β -Glob TATA.luci), die jeweils noch eine simultane interne Kontrolle mit Renilla-Luciferase involvierten, transfiziert werden.

Der korrigierte κ B-spezifische Induktionsfaktor wurde in diesem Falle folgendermaßen berechnet:

$$\text{Korrig. Induktionsfaktor} = \frac{(3x \kappa B.luci - \text{Leerwert}_{\text{Photinus}}) / (\text{Ubi.Renilla1} - \text{Leerwert}_{\text{Renilla}})}{(\beta\text{-Glob TATA.luci} - \text{Leerwert}_{\text{Photinus}}) / (\text{Ubi.Renilla2} - \text{Leerwert}_{\text{Renilla}})}$$

2.4 Protein-Techniken

2.4.1 Proteinextrakte und Proteinquantifizierung

Proteinextrakte aus Suspensionszellen

Die Zellen wurden während der exponentiellen Wachstumsphase in Zentrifugenröhrchen (Falcon, 50 ml) überführt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 20 ml kaltem PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert, in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Im folgenden wurde, je nach Art der zu gewinnenden Extrakte, verschieden verfahren.

Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (13 000 rpm, 20 s, Raumtemperatur) und nach Abnahme des Überstandes mit 3 Teilen Puffer C versetzt. Der vollständige Aufschluss der Zellen wurde erreicht durch Vortexen und dreimaliges Schockfrieren in flüssigem Stickstoff und nachfolgendem Auftauen.

Zur Gewinnung von Kern- und Zytoplasma-Extrakten hingegen wurde wie folgt verfahren: Nach Zentrifugation (5 000 rpm, 5 min, c) wurde das Pellet in 3 – 5 Teilen Puffer A aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Nachdem die Zellen durch 20maliges Aufziehen in sterilen Spritzen (26G, SubQ) lysiert worden waren, wurden die Kerne pelletiert

(3000 rpm, 10 min, 4°C). Der daraus gewonnene Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit Glycerol bis zu einer Endkonzentration von 10 % versetzt. Das Kernpellet dagegen wurde zur Erhöhung der Reinheit zweimal mit Dignam A gewaschen und zur Extraktion der Kernproteine mit 2 Teilen Dignam C inkubiert (1 h auf Eis, wobei währenddessen durch Vortexen auf gute Durchmischung geachtet wurde).

Zur Herstellung von für die Immunpräzipitation geeigneten Gesamtzelextrakten wurden die Zellen pelletiert (3 000 rpm, 5 min, 4°C) und in einem speziellen Lysepuffer über 10 min inkubiert. Zur vollständigen Lyse wurden die Proben mehrfach kräftig durchmischt.

Alle so erhaltenen Proteinextrakte wurden durch Zentrifugation (13 000 rpm, 10 min, 4°C) von unerwünschten Bestandteilen befreit, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C aufbewahrt.

Puffer A (Dignam)	HEPES pH 7,9	10 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	KCl	10 mM
	DTT	1 mM
	PMSF	1 mM
	Proteaseinhibitoren	1 Tbl. auf 10 ml
Puffer C (Dignam)	HEPES pH 7,9	20 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	NaCl	0,42 M
	EDTA	0,2 mM
	Glycerol	25 %
	DTT	1 mM
	PMSF	1 mM
	Proteaseinhibitoren	1 Tbl. auf 10 ml
Lysepuffer für Extrakte zur Immunpräzipitation	Tris-HCl pH 8,0	25 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	2 mM
	Glycerol	10 %

NP-40	1 %
DTT	1 mM
Proteaseinhibitoren	1 Tbl. auf 10 ml

Proteinquantifizierung

BCA-Protein-Assay

Zur Proteinbestimmung wurde ein gebrauchsfertiges System nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieses Verfahren beruht auf der Tatsache, dass Cu^{2+} in Gegenwart von Protein zu Cu^{1+} reduziert wird; Bicinchoninsäure kann dann mit den einwertigen Kupferionen einen kolorimetrisch detektierbaren Chelatkomplex bilden.

Jeweils 1 μl der zu messenden Proteinextrakte wurde mit 150 mM NaCl auf ein Volumen von 100 μl aufgefüllt, bevor 1 ml des BCA-Reagenzes hinzugefügt wurden. Die Proben wurden dann im Wasserbad auf 60°C erhitzt (30 min) und nach Abkühlung in einem ELISA-Reader bei 562 nm vermessen. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden BSA-Standards mit Proteinkonzentrationen zwischen 0,5 und 20,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ herangezogen.

Methode nach Bradford

Hierzu wurde jeweils 1 μl der zu messenden Proteinextrakte mit 150 mM NaCl auf ein Volumen von 100 μl aufgefüllt, bevor 1 ml des Bradford-Reagenzes hinzugefügt wurden. Nach Durchmischung und kurzer Inkubation wurde mittels Photometrie bei 595 nm die optische Dichte bestimmt. Die Konzentrationen der Proteinextrakte wurde über eine Eichkurve ermittelt, zu deren Erstellung BSA-Standards mit Proteinkonzentrationen zwischen 0,5 und 20,0 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ verwendet wurden.

Bradford-Reagenz	Coomassie Brilliantblau	100 mg
	Ethanol	50 ml
	Phosphorsäure 85 %	100 ml
	Wasser	ad 1 l

2.4.2 Immunoblot

Die Proteinextrakte (50 – 100 µg Protein gelöst in ca. 30 µl) wurden mit Laemmli-Ladepuffer (4x) bis zu einer Endkonzentration von 25 % versetzt und bei 95°C denaturiert. Danach wurden die Extrakte auf ein Polyacrylamid-Gel, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel, aufgetragen und durch Anlegen einer Spannung (je nach Gelgröße 40 – 80 V) über Nacht aufgetrennt. Das Gel wurde in Transferpuffer inkubiert und elektrophoretisch auf eine zuvor in Methanol aktivierte und in Transferpuffer äquilibrierte PVDF-Membran geblottet.

Diese Membran wurde in einem nächsten Schritt dreimal in PBS / 0,2 % Tween 20 gewaschen, bevor sie zur Abdeckung unspezifischer Bindungen in Blockmilch geschwenkt wurde (1 h, Raumtemperatur, wie alle folgenden Inkubationen). Nach der Inkubation in mit spezifischem Antikörper versetzter Blockmilch wurde die Membran dreimal in PBS / 0,2 % Tween 20 gewaschen, erneut in Blockmilch inkubiert und danach mit in Blockmilch gelöstem, Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper versetzt. Schließlich wurde die Membran wiederum dreimal mit PBS / 0,2 % Tween 20 gewaschen und mit ECL-Reagenz nach Angaben des Herstellers behandelt. Zur Detektion der Proteinbanden wurde die Membran einem Röntgenfilm exponiert.

Wenn die Antikörper wieder von der Membran abgelöst werden sollten, wurde die Membran über 20 min bei 56 °C in Stripping-Puffer inkubiert und danach in PBS / 0,2 % Tween 20 gewaschen. Danach war eine erneute Antikörperinkubation möglich.

Trenngel (10%)	Acrylamid (40 %)	11,25 ml
	TRIS 1,5M pH8,8	11,25 ml
	Wasser	21,7 ml
	SDS 20%	450 µl
	APS 10%	400 µl
	TEMED	30 µl
Sammelgel (5%)	Acrylamid (40 %)	2,5 ml
	TRIS 0,5M pH6,8	5,1 ml
	Wasser	12,3 ml
	SDS 20%	100 µl

	APS 10%	400 µl
	TEMED	27 µl
Ladepuffer Laemmli (4x)	Tris 2M pH 6,8	12,5 ml
	SDS	10 g
	Glycerin	13 ml
	Bromphenolblau	1 Spatelspitze
	Wasser	ad 50 ml
	unmittelbar vor Gebrauch:	
	β-Mercaptoethanol	5 %
Laufpuffer Laemmli	Tris	12,1 g
	Glycin	57,6 g
	SDS 20%	20 ml
	Wasser	ad 4 l
Transferpuffer	Tris	5,8 g
	Glycin	2,9 g
	SDS 20%	1,85 ml (0.037%)
	Methanol	200 ml
	Wasser	ad 1 l
Stripping-Puffer	SDS	2 %
	Tris-HCl pH 6,8	62,5 mM
	β-Mercaptoethanol	100 mM

2.4.3 Immunpräzipitation

Von den speziell für die Immunpräzipitation hergestellten Extrakten (s.o.) wurden 500 bis 1000 µg Protein verwendet, gelöst in einem Volumen von etwa 750 µl. Alle im folgenden erwähnten Zentrifugationsschritte erfolgten, wenn nicht anders vermerkt, unter gleichen

Bedingungen (Heraeus Biofuge, 2500 rpm, 1 min, 4°C). Zunächst wurden die für die Immunpräzipitation benötigten Perlchen aus Protein A-Agarose zweimal mit Lysepuffer gewaschen. Um unspezifisch an Protein A-Agarose bindende Proteine auszufällen, wurden 20 µl der Perlchen zu den Proteinextrakten hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte im Überkopfröller (1 h, 4°C). Nach Abzentrifugation wurden dem Überstand 5 µg spezifischen Antikörpers hinzugefügt; die Inkubation erfolgte wiederum im Überkopfröller (3 h, 4°C). In einem nächsten Schritt wurden die Proben mit 50 µl Protein A-Agarose versetzt, um die spezifischen Antikörper-Protein-Komplexe auszufällen (1 h, 4°C, im Überkopfröller). Schließlich wurde die Agarose zusammen mit denjenigen Proteinen abzentrifugiert, die über den spezifischen Antikörper an das Agarose-gekoppelte Protein A gebunden hatten. Das so erhaltene Pellet wurde jeweils zweimal mit Lysepuffer und mit PBS gewaschen. Um das Protein zu denaturieren und auf diese Weise die Agarose abzutrennen, wurde 1 Teil Laemmli-Puffer (2x) hinzugegeben, auf 95°C (10 min) erhitzt und abzentrifugiert (13 000 rpm, 10 min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde als Immunpräzipitat bezeichnet und im Immunoblot analysiert.

2.4.4 Gelretardationsanalyse

Radioaktive Markierung von DNS-Sonden

Die für Gelretardationsanalysen benötigten DNS-Sonden für κB (die Konsensus-Sequenz des Ig-κ-Enhancers enthaltend) und Sp1 (⁵ATTCGA TCG GGG CGG GGC GAG C³) wurden mittels der Klenow-Reaktion radioaktiv markiert. Dabei werden überhängende DNS-Enden mit radioaktiven ³²P-Nukleotiden aufgefüllt.

Klenow-Reaktion für κB-Sonde: (1h bei RT)	κB-Sonde (10 ng/µl)	3 µl
	dNTP (0,5 mM, ohne dATP)	2,5 µl
	³² P-α-dATP (10 µCi/µl)	5 µl
	Exo (-) Klenow-Enzym (5 U/µl)	3 µl
	Reaktionspuffer (10x)	5 µl
	Wasser	ad 50 µl

Klenow-Reaktion für Sp1-Sonde:	Sp1-Sonde (10 ng/ μ l)	1 μ l
(1h bei RT)	dNTP (0,5 mM, ohne dCTP)	2,5 μ l
	32 P- α -dCTP (10 μ Ci/ μ l)	5 μ l
	Exo (-) Klenow-Enzym (5 U/ μ l)	3 μ l
	Reaktionspuffer (10x)	5 μ l
	Wasser	ad 50 μ l

Um nicht eingebaute radioaktive Nukleotide von den markierten Sonden zu entfernen, wurden Reinigungssäulen (Stratagene NucTrap) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Säulen wurden zunächst mit 70 μ l STE-Puffer äquilibriert, bevor der mit 20 μ l STE-Puffer auf 70 μ l aufgefüllte radioaktive Reaktionsansatz durch die Säulen in ein Eppendorf-Gefäß gepresst wurde. Anschließend wurde mit 70 μ l STE-Puffer nachgespült. Der so aufgereinigten radioaktiven Sonde wurde 1 μ l entnommen, um über einen Tscherenkow-Zähler die Aktivität zu bestimmen.

STE-Puffer	NaCl	100 mM
	Tris-HCl (pH 7.5)	20 mM
	EDTA	10 mM

Bindungsreaktion

Für Gelretardationsanalysen (EMSA, electrophoretic mobility shift assay) wurden sowohl Gesamtzellextrakte als auch Kern- und Zytoplasma-Extrakte verwendet. Die Bindungsreaktion, bei der sich Komplexe zwischen Proteinen und der radioaktiv markierten DNS-Sonde bilden, wurde über 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt.

Bindungsreaktion	Proteinextrakt	2,5 – 6 μ g
	32 P-markierte DNS-Sonde	1 μ l
	poly dI/dC (2 μ g / μ l)	1 μ l
	BSA (2 mg / ml)	1 μ l
	5 x Bindungspuffer	3,4 μ l
	H ₂ O	ad 20 μ l

5x Bindungspuffer	HEPES	100 mM
	KCl	250 mM
	EDTA	5 mM
	Ficoll	20 %
	unmittelbar vor Gebrauch:	
	DTT	5 mM

Natives Proteingel

Das native Polyacrylamid-Gel wurde zunächst in einem Vorlauf mit 0,5 x TBE als Laufpuffer äquilibriert (25 mA über 30 min). Die in der Bindungsreaktion erhaltenen Komplexe wurden aufgetragen und separiert (25 mA über ca. 3 h). Schließlich wurde das Gel in einem Vakuumtrockner bei 75°C getrocknet und einem Röntgenfilm exponiert.

Für Antikörpercharakterisierungen wurden Kernextrakte verwendet, die vor der Bindungsreaktion mit spezifischem Antikörper (ca. 1,5 µl) behandelt worden waren (30 min, Raumtemperatur).

Natives Proteingel	10x TBE	5 ml
	Acrylamid	12 ml
	ddH ₂ O	83 ml
	APS 10%	700 µl
	TEMED	70 µl

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung von FLAG-RelB Wt und FLAG-RelB S368A

Bei Übernahme des Projektes lagen bereits Einzelklone stabil transfizierter S107-Zellen vor, die murines, FLAG-markiertes RelB (FLAG-RelB Wt) bzw. FLAG-markiertes, an Position 368 von Serin nach Alanin mutiertes RelB (FLAG-RelB S368A) exprimierten.

3.1.1 Selektion geeigneter Transfektanten

Mit Hilfe von Immunoblots aus Gesamtzellextrakten wurde die Expression des transfizierten Proteins in den Einzelklonen bestimmt (*Abb. 5*). Vier Klone, die eine vergleichbar gute Expression zeigten (Wt2 FLAG, Wt20 FLAG, A9 FLAG und A44 FLAG), wurden in den folgenden Experimenten zusammen mit der parentalen S107-Zelllinie und der etablierten S107 RelB-Massenkultur untersucht. Die S107 RelB-Massenkultur bot sich als zusätzliche Kontrolle an, da sie mit einem anderen Konstrukt transfiziert und schon in vielerlei Hinsicht untersucht worden war (KIRILLOV et al.1996; BAUMANN et al. 1998).

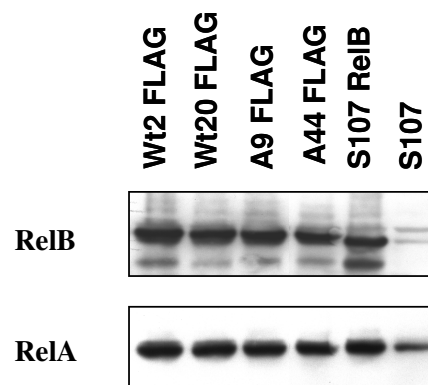


Abb. 5. Selektion geeigneter FLAG-Wt- und FLAG-A-Klone. Immunoblots mit Gesamtzellextrakten aus jeweils zwei FLAG-RelB Wt- (Wt2 und Wt20 FLAG) und FLAG-RelB S368A-Klonen (A9 und A44 FLAG) sowie aus einer mit RelB transfizierten Massenkultur von S107-Zellen (S107 RelB) und der parentalen S107-Zelllinie (S107). **Oben:** Immunoblot mit einem RelB-spezifischen Antikörper. **Unten:** Immunoblot mit einem RelA-spezifischen Antikörper als Ladungskontrolle.

3.1.2 Subzelluläre Lokalisation

Um zu analysieren, ob die S368A-Mutation den Kernimport von RelB beeinflusste, wurden zwei Verfahren angewendet. Zum einen wurden nukleäre und zytoplasmatische Extrakte aus den Zellen gewonnen und im RelB-spezifischen Immunoblot aufgetragen, zum anderen wurde die subzelluläre Lokalisation in vivo durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie dargestellt. Die Ergebnisse zeigten übereinstimmend, daß sich der Kernimport von FLAG-RelB Wt und FLAG-RelB S368A nicht unterschied. Im Immunoblot (*Abb. 6*) zeigte sich eine weitgehend gleichmäßige Verteilung von FLAG-RelB Wt und FLAG-RelB S368A zwischen Kern und Zytoplasma. Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnten sowohl FLAG-RelB Wt als auch FLAG-RelB S368A in gleichem Maße im Zellkern nachgewiesen werden (Daten aufgrund Computer-Diebstahls nicht mehr verfügbar).

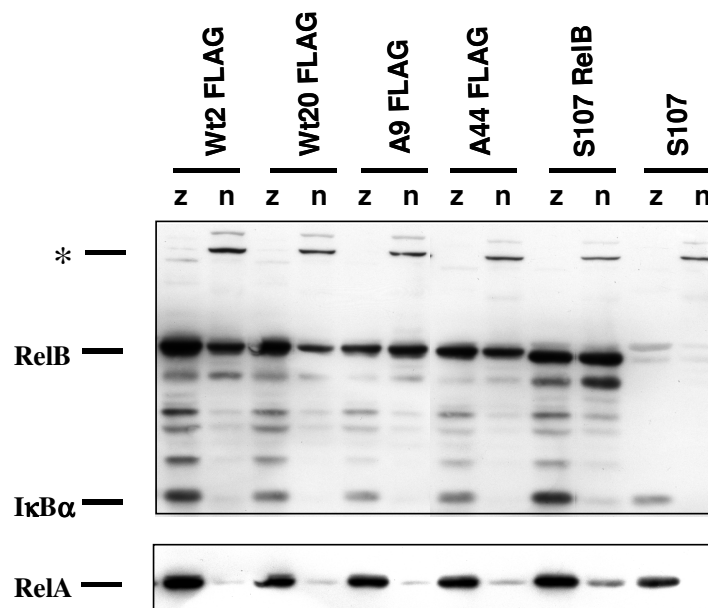


Abb. 6. Die subzelluläre Lokalisation von RelB Wt, FLAG-RelB Wt und FLAG-RelB S368A. Immunoblot mit zytoplasmatischen (z) und nukleären Extrakten (n) aus jeweils zwei FLAG-RelB Wt- (Wt2 FLAG und Wt20 FLAG) und FLAG-RelB S368A-Klonen (A9 FLAG und A44 FLAG) sowie aus einer mit RelB transfizierten Massenkultur aus S107-Zellen (S107 RelB) und der parentalen S107-Zelllinie (S107). **Oben:** Immunoblot gegen RelB und IκBα. Der Blot gegen das überwiegend zytoplasmatische Protein IκBα dient als Kontrolle für die Reinheit der Kernextrakte; hierzu sei auch auf die unspezifische, mit einem Asteriskus (*) markierte Bande hingewiesen, die ausschließlich im Kern auftritt. **Unten:** Kontroll-Immunoblot gegen RelA aus den gleichen Extrakten.

3.1.3 DNS-Bindung

Nachdem sich der Kernimport als nicht gestört erwiesen hatte, sollte die Mutante auf etwaige andere Defekte untersucht werden. Aus *Abb. 7* wird ersichtlich, daß die κ B-spezifische DNS-Bindungsaktivität der FLAG-RelB S368A exprimierenden Klone im Vergleich zu den FLAG-RelB Wt exprimierenden Klone stark reduziert war. Neben diesem Ergebnis fiel allerdings auch auf, daß die κ B-spezifische DNS-Bindungsaktivität der als Kontrolle eingesetzten S107 RelB-Massenkultur deutlich höher war als diejenige der FLAG-RelB Wt exprimierenden S107-Klone. Die S107-Zellen zeigten, wie erwartet, keine Bindungsaktivität.

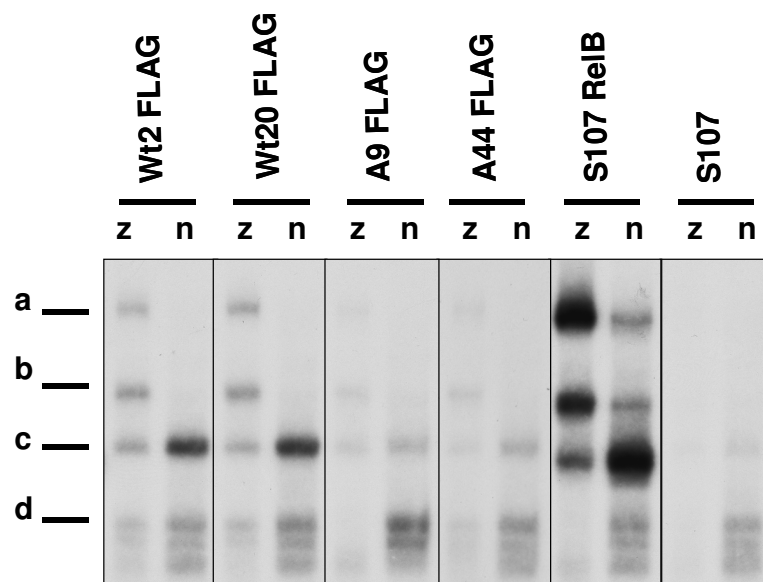


Abb. 7. Die κ B-spezifische DNS-Bindungsaktivität in den verschiedenen S107-Transfektanten. κ B-spezifische Gelretardationsanalyse mit zytoplasmatischen (z) und nukleären Extrakten (n) aus jeweils zwei FLAG-RelB Wt- (Wt2 FLAG und Wt20 FLAG) und FLAG-RelB S368A-Klonen (A9 FLAG und A44 FLAG) sowie aus einer mit RelB transfizierten Massenkultur aus S107-Zellen (S107 RelB) und der parentalen S107-Zelllinie (S107). Die κ B-spezifischen Komplexe sind mit (a), (b), (c) und (d) bezeichnet.

3.1.4 Transkriptionelle Aktivität

Durch transiente Transfektion mit einem κ B-abhängigen Luciferase-Reporter (3x κ B.luc) wurde die konstitutive κ B-spezifische Transkriptionsaktivität in den verschiedenen Zelllinien bestimmt (*Abb. 8*, S. 46). Die parentale S107-Zelllinie zeigte eine sehr geringe Aktivität

(4,8fach relativ zu der Aktivität eines parallel transfizierten gleichartigen Reporters ohne die κ B-Motive (β -Glob TATA.luc)). Im Vergleich dazu war die Aktivität der FLAG-RelB Wt-Zellen deutlich gesteigert (22,3 Einheiten), während die Aktivität der FLAG-RelB S368A-Zellen kaum erhöht war (6,8 Einheiten) und damit nicht einmal ein Drittel des Aktivitätsniveaus der FLAG-RelB Wt-Zellen erreichte (*Abb. 8 A*).

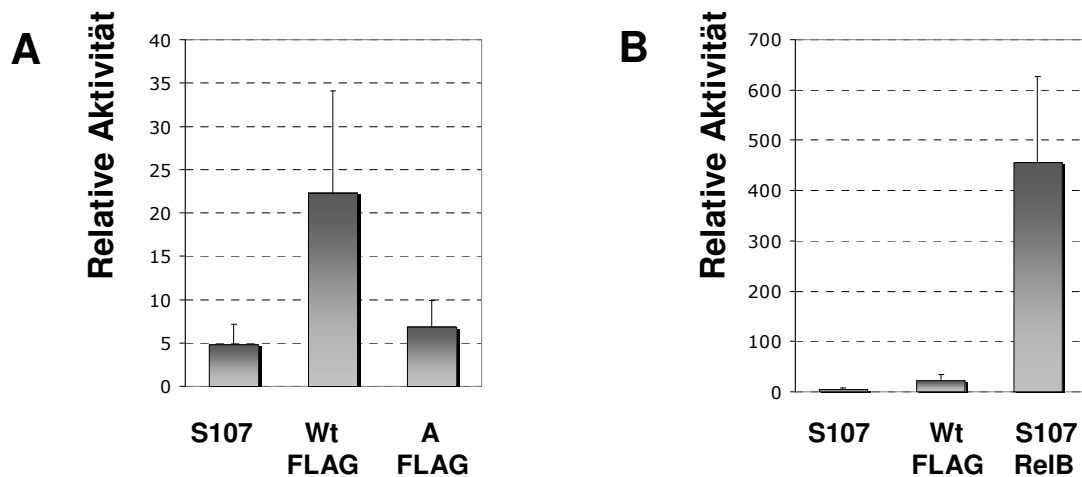


Abb. 8. Die konstitutive κ B-spezifische Transkriptionsaktivität in den parentalen S107-Zellen, in S107-RelB-Zellen, FLAG-A-Klonen und FLAG-Wt-Klonen. Die parentale S107-Zelllinie (S107), eine stabil mit Wildtyp-RelB transfizierte S107-Massenkultur (S107 RelB) sowie mehrere FLAG-Wt-Klone (Wt FLAG) und FLAG-A-Klone (A FLAG) wurden, wie in *Material und Methodik* erläutert, transient mit einem κ B-abhängigen Luciferase-Reporter (3x κ B.luc) transfiziert. Die Luciferase-Aktivität ist relativ angegeben zu der Aktivität eines parallel transfizierten gleichartigen Reporters ohne die κ B-Motive (β -Glob TATA.luc). Die Transfektionseffizienz ist durch parallele Transfektion eines unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors stehenden Renilla-Luciferase-Reporters abgeglichen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Wenn mit diesem Ergebnis auch ein signifikanter Unterschied zwischen den FLAG-RelB Wt- und den FLAG-RelB S368A-Zellen deutlich wurde, so war die absolute Aktivierung der FLAG-RelB Wt-Zellen dennoch eher gering. Dieser Eindruck bestätigte sich beim Vergleich mit der in S107 RelB-Zellen beobachteten Aktivierung, die gegenüber S107-Zellen um das 95fache und gegenüber S107 FLAG-RelB Wt-Zellen um das 20fache gesteigert war (456 versus 4,8 bzw. 22,3 Einheiten; *Abb. 8 B*). Da der einzige Unterschied zwischen den FLAG-RelB Wt-Zellen und den S107 RelB-Zellen in der FLAG-Markierung bestehen sollte und im Idealfall ein gleiches Verhalten zu fordern gewesen wäre, musste dieses Ergebnis als Hinweis auf ein methodisches Problem gewertet werden.

3.1.5 Dimerisierung mit p50

Angesichts der deutlichen Reduktion der DNS-Bindung und der transkriptionellen Aktivität beider FLAG-Proteine war zu klären, inwieweit diese Proteine überhaupt noch in der Lage waren, mit ihren Partnern aus der NF- κ B/Rel-Familie zu dimerisieren. In der Immunpräzipitation (*Abb. 9*) wurde ein ausgeprägter Defekt beider FLAG-Proteine – also sowohl von FLAG-RelB Wt als auch von FLAG-RelB S368A – im Vergleich zu Wildtyp-RelB offenbar: FLAG-RelB Wt assoziierte nur schlecht mit p50, FLAG-RelB S368A überhaupt nicht. Wildtyp-RelB aus den S107 RelB-Zellen dagegen ließ sich sehr gut mit einem p50-spezifischen Antikörper präzipitieren.

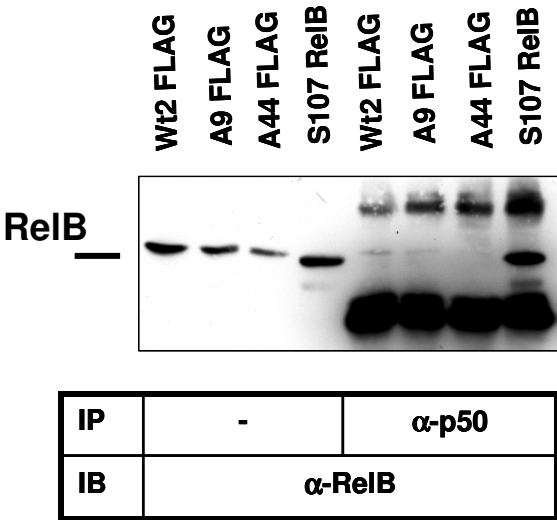


Abb. 9. Die Dimerisierung mit p50 von RelB, FLAG-RelB Wt und FLAG-RelB S368A. Dargestellt ist ein RelB-spezifischer Immunoblot (IB). Aufgetragen sind Zellextrakte (linke vier Spuren) bzw. p50-spezifische Immunpräzipitate (IP, rechte vier Spuren) aus einem FLAG-RelB Wt exprimierenden Klon (Wt2 FLAG), zwei FLAG-RelB S368A exprimierenden Klonen (A9 FLAG und A44 FLAG) sowie einer Wildtyp-RelB exprimierenden Massenkultur (S107 RelB).

3.1.6 Klonierung und Sequenzierung der FLAG-Konstrukte

Um isoliert und verlässlich die Auswirkungen der S368A-Mutation von RelB untersuchen zu können, wäre zu fordern gewesen, dass sich FLAG-RelB Wt wie das Wildtyp-Protein verhält. Da die FLAG-Markierung als möglicher Grund für die beobachteten Inkonsistenzen in Frage kam, sollte sie von den beiden Proteinen entfernt werden. Hierzu wurden

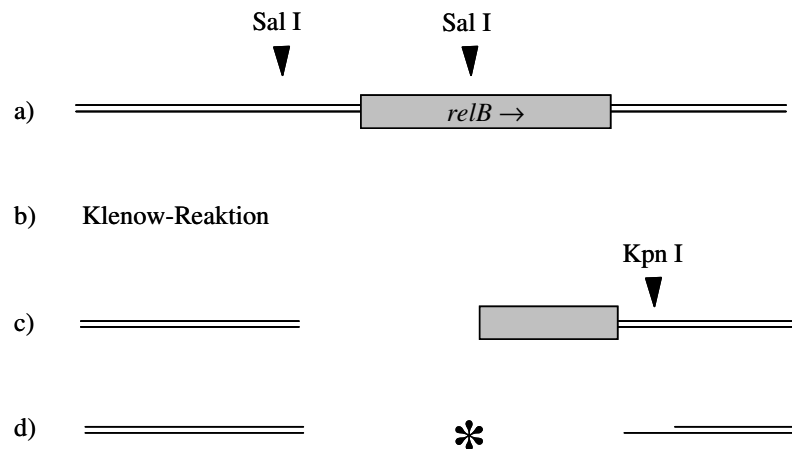
Klonierungsexperimente durchgeführt, die in *Abb. 10* (S. 49) und *Abb. 11* (S. 50) näher beschrieben sind.

Das entscheidende Ergebnis erbrachte jedoch die Sequenzierung der FLAG-RelB-Konstrukte. Dabei zeigten sowohl FLAG-RelB Wt als auch FLAG-RelB S368A drei Abweichungen von murinem RelB:

- 1) V51D: Das Basentriplett GTC an den Positionen 151-153 war ausgetauscht durch das Basentriplett GAC. Dadurch war an Position 51 des Proteins Valin durch Asparaginsäure ersetzt.
- 2) P111L: Das Basentriplett CCA an den Positionen 331-333 war ausgetauscht durch das Basentriplett CTA. Dadurch war an Position 111 des Proteins Prolin durch Leucin ersetzt.
- 3) Q142L: Das Basentriplett CAG an den Positionen 424-426 war ausgetauscht durch das Basentriplett CTG. Dadurch war an Position 142 des Proteins Glutamin durch Leucin ersetzt.

Korrekterweise nur im S368A-RelB kodierenden Plasmid konnte die S368A-Mutation nachgewiesen werden (die also den einzigen Unterschied zwischen FLAG-markiertem Wildtyp-RelB und FLAG-markiertem S368A-RelB darstellte). Aufgrund des beschriebenen Sachverhaltes schien jedoch die Aussagekraft weiterer Experimente abgeschwächt, so dass die Arbeiten mit den FLAG-RelB-Konstrukten eingestellt wurden. Stattdessen sollte das Projekt mit neuen Konstrukten fortgeführt werden.

Aufnehmender Vektor (RelB MexNeo)



Zu inserierendes Fragment

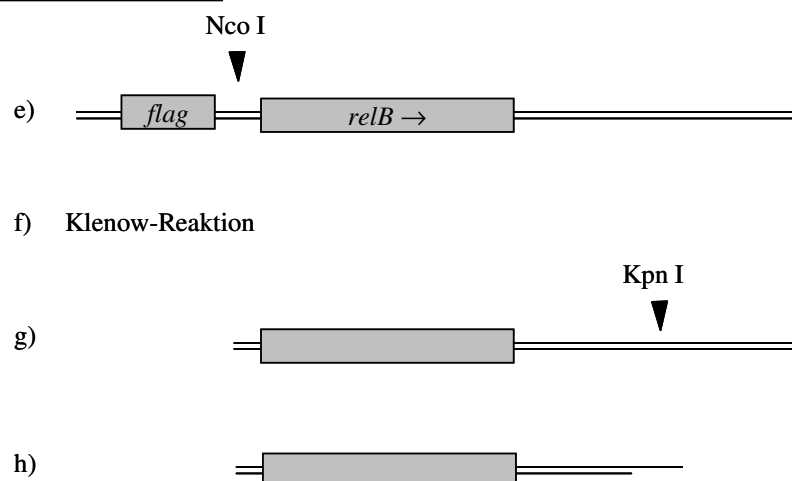


Abb. 10. Die Klonierungsstrategie zur Entfernung der FLAG-Markierung von RelB im Überblick. (a-d) Vorbereitung des aufnehmenden Vektors (RelB MexNeo). Durch Restriktionsverdau mit Sal I (a), nachfolgender Klenow-Reaktion zum Auffüllen der überhängenden Enden (b) und anschließendem Restriktionsverdau mit Kpn I (c) wird RelB aus dem Vektor MexNeo entfernt. Dabei wird der Vektor linearisiert, wobei er an einem Ende glatt geschnitten ist und am anderen Ende einen durch Kpn I-Schnitt hinterlassenen Überhang aufweist (d). **(e-h)** Vorbereitung des zu inserierenden Fragmentes (RelB S368A bzw. Wildtyp-RelB als Kontrolle). Durch Restriktionsverdau mit Nco I wird an dem zirkulären Vektor ein Schnitt zwischen dem FLAG- und dem RelB-kodierenden Plasmidabschnitt gesetzt (e); die entstehenden überhängenden Enden werden durch die Klenow-Reaktion aufgefüllt (f). Durch Restriktionsverdau mit Kpn I (g) entsteht ein Fragment, welches *relB* enthält, nicht jedoch den FLAG-kodierenden Abschnitt (h); es kann über eine Ligationsreaktion durch sein glattes und sein durch Kpn I-Schnitt produziertes überhängendes Ende in den vorbereiteten Vektor (d) an der mit einem Asteriskus (*) bezeichneten Stelle eingefügt werden.

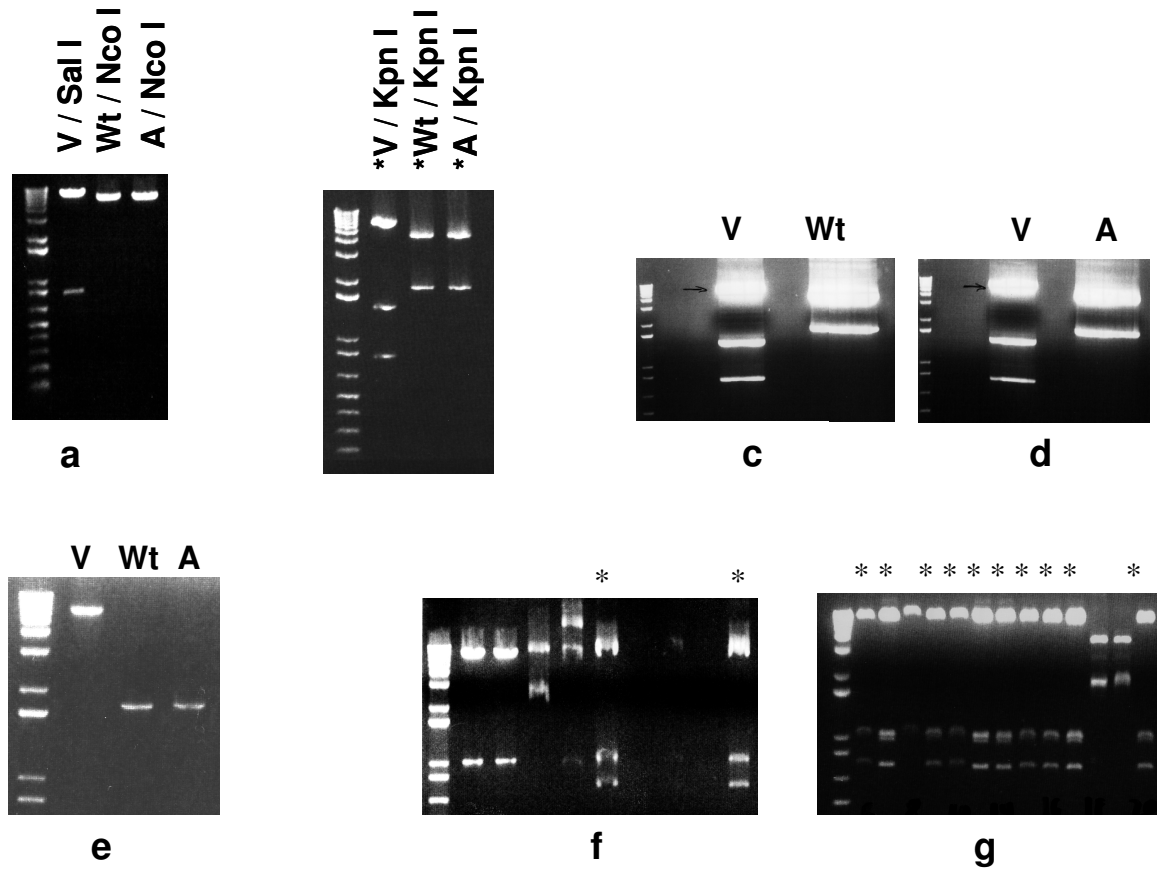


Abb. 11. Die Entfernung der FLAG-Markierung von RelB. Dargestellt sind Agarose-Gele mit durch Ethidiumbromid visualisierten DNS-Fragmenten, links wurde jeweils ein Größenmarker aufgetragen.

(a) Restriktionsverdau des aufnehmenden Vektors (RelB MexNeo) mit Sal I und der beiden das jeweilige zu inserierende Fragment liefernden Vektoren (V: Vektor; Wt: FLAG-RelB Wt RelB MexNeo; A: FLAG-RelB S368A MexNeo) mit Nco I. Während aus dem aufnehmenden Vektor ein Fragment ausfiel, wurden die beiden das Fragment liefernde Vektoren lediglich linearisiert.

(b) Der so modifizierte aufnehmende Vektor (*V) wurde mit Kpn I geschnitten, wodurch ein zweites Fragment ausfiel. Durch Restriktionsverdau der linearisierten Vektoren (*Wt und *A) fiel nun auch hier jeweils ein Fragment aus.

(c,d) Nun wurden, jeweils getrennt für Wildtyp-RelB (c) und RelB S368A (d), präparative Gele mit den erzeugten DNS-Fragmenten (V, Wt und A) gefahren und die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten.

(e) In einem als Kontrolle gefahrenen Gel erkennt man, dass korrekterweise der aufnehmende Vektor (V) und die beiden Fragmente (Wt: RelB Wt-Fragment, A: RelB S368A-Fragment) ausgeschnitten wurden.

(f,g) Nach Ligation, Transformation in Bakterien und Mini-DNS-Präparation wurde ein Restriktionsverdau mit Sal I durchgeführt. Die mit Asteriskus bezeichneten Bakterienklone trugen das korrekte Plasmid in sich.

3.2 Untersuchung von RelB Wt, RelB S368A und RelB S368E

Da die mit den FLAG-Konstrukten erhaltenen Ergebnisse sehr interessant aber in ihrer Aussagekraft beeinträchtigt schienen, sollte das Projekt mit neuen Konstrukten weitergeführt werden. Dazu wurde auf das ursprüngliche RelB-Plasmid zurückgegriffen, dessen Sequenz nicht von murinem RelB abwich und somit nicht die Problematik der FLAG-Konstrukte aufwies.

3.2.1 Mutagenese von RelB

Das RelB-Expressionsplasmid RelB MexNeo wurde an dem für Serin 368 kodierenden Basentriplett so mutiert, dass auf Proteinebene der Serinrest gegen einen Alanin- bzw. einen Glutamatrest ausgetauscht wurde (*Abb. 12*).

RelB

1081 / 361

CGG	CTC	ACG	GAT	GGG	GTG	TGC	AGC	GAG	CCG
R	L	T	D	G	V	C	S	E	P

RelB S368A

1081 / 361

CGG	CTC	ACG	GAT	GGG	GTG	TGC	GCC	GAG	CCG
R	L	T	D	G	V	C	A	E	P

RelB S368E

1081 / 361

CGG	CTC	ACG	GAT	GGG	GTG	TGC	GAG	GAG	CCG
R	L	T	D	G	V	C	E	E	P

Abb. 12. Ortsspezifische Mutagenese von RelB. Das Basentriplett AGC an den Positionen 1102-1104 des Gens *relb* (kodierend für Serin (S) 368 des Proteins) wurde in GCC bzw. GAG mutiert (kodierend für Alanin (A) bzw. Glutaminsäure (E)). Die entsprechenden Basentriplets und Aminosäuren sind fett hervorgehoben. Auf der linken Seite ist zur Orientierung die Numerierung der Basen und Aminosäuren angegeben.

Die RelB-kodierenden Bereiche der beiden mutierten Plasmide wurden ebenso wie derjenige des ursprünglichen RelB-Plasmids vollständig sequenziert, um die eingefügten Mutationen zu bestätigen und die Unversehrtheit der restlichen Sequenz zu gewährleisten. Unter Verwendung der für Aminosäuren gebräuchlichen Abkürzungen wurde die phosphoblockierende Alanin-Mutante RelB S368A und die phosphomimetische Glutamat-Mutante RelB S368E genannt.

3.2.2 Transiente Transfektionsexperimente

Mit den mutierten Plasmiden wurden transiente Transfektionsexperimente durchgeführt, um zu überprüfen, ob die in RelB eingeführten Mutationen die Funktion des Gesamtproteins beeinflussten. Die Experimente wurden in S107-Zellen und in Jurkat-T-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden transient mit Wildtyp-RelB (Wt), RelB S368A (A) bzw. RelB S368E (E) und jeweils einem κ B-abhängigen Luciferase-Reporter transfiziert. Die Aktivität des Reportergens diente dabei als ein Maß für die κ B-spezifische Transkriptionsaktivität.

κ B-spezifische Transkriptionsaktivität in S107-Zellen

S107-Zellen, die lediglich mit einem Leervektor und dem κ B-Reporter transfiziert wurden, zeigten eine sehr schwache konstitutive NF- κ B-Aktivität. Durch Transfektion von Wildtyp-RelB wurde diese auf das 15fache erhöht, während die Transfektion von RelB S368A nur in einer deutlich geringeren Steigerung (3,2fach) der Aktivität resultierte. Die Genaktivierung durch das transfizierte RelB S368E fiel noch schwächer aus (1,8fach). Letzteres Ergebnis war unerwartet, weil RelB S368E gemäß der Ausgangshypothese durch Einführung einer phosphomimetischen Mutation konstitutiv hätte aktiv sein sollen. Insgesamt wurde deutlich, dass die an Position 368 mutierten Proteine in ihrer Funktion schwer gestört waren (*Abb. 13*, S. 53).

κ B-spezifische Transkriptionsaktivität in Jurkat-T-Zellen

In Übereinstimmung mit den bei den S107-Zellen erhaltenen Ergebnisse zeigten auch Jurkat-T-Zellen auf Transfektion mit RelB S368A eine beträchtlich niedrigere NF- κ B-Aktivität (4,7fach) als bei Transfektion mit Wildtyp-RelB (19,8fach). Wieder manifestierten die mit RelB S368E transfizierten Zellen die niedrigste Aktivierung (1,6fach). Offenbar waren die Beobachtungen also nicht spezifisch für B-Zellen, sondern auch in anderen Zelllinien reproduzierbar (*Abb. 13*).

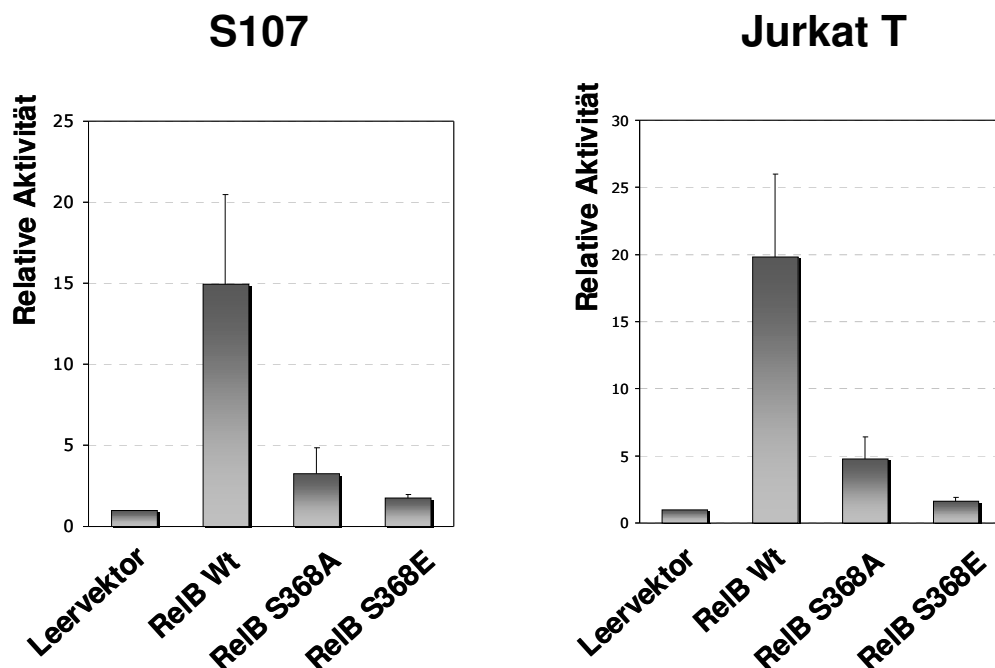


Abb. 13. κ B-abhängige transkriptionelle Aktivität in transient mit RelB, RelB S368A bzw. RelB S368E transfizierten S107- und Jurkat-T-Zellen. S107-Zellen (links) und Jurkat-T-Zellen (rechts) wurden mit Leervektor, Wildtyp-RelB (RelB Wt), RelB S368A oder RelB S368E, jeweils zusammen mit einem κ B-abhängigen Reporter (3x κ B.luc) transfiziert wie in *Material und Methodik* beschrieben. Die Luciferase-Aktivität der mit Leervektor transfizierten Zellen wurde willkürlich gleich 1 gesetzt; alle anderen Aktivitäten sind relativ dazu angegeben. Die Transfektionseffizienz ist durch parallele Transfektion eines unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors stehenden Renilla-Luciferase-Reporters abgeglichen. Die Aktivitäten sind Mittelwerte aus jeweils mindestens drei unabhängigen Versuchen; die Standardabweichung ist durch den Fehlerbalken gekennzeichnet.

3.2.3 Etablierung stabiler S107-Transfektanten

Die an Position 368 von RelB eingeführten Punktmutationen hatten also beträchtliche funktionelle Konsequenzen für das Gesamtprotein: Die Fähigkeit der Mutanten, die Transkription zu aktivieren, war deutlich eingeschränkt. Dieser Befund wäre mit einer gestörten Kerntranslokation, aber auch mit vielen anderen Defekten der Mutanten vereinbar.

Um diesen Sachverhalt näher erforschen zu können, wurden S107-Zellen hergestellt, welche die verschiedenen RelB-Mutanten stabil exprimierten. Die S107-Zellen wurden mit den verschiedenen Expressionsplasmiden durch Elektroporation transfiziert und in G418-haltigem Medium selektiert. Gemäß der exprimierten RelB-Form (Wildtyp-RelB, RelB S368A, RelB S368E) wurden die Zellen als S107 Wt-, A- und E-Zellen bezeichnet. Aus den so erhaltenen Massenkulturen wurden über Aussaat in Gewebekulturplatten Einzelklone herangezchtet. Einzelklone, die im Immunoblot eine ähnlich starke Expression des transfizierten Proteins zeigten, wurden für weitere Analysen herangezogen (*Abb. 14*). Dabei verhielten sich die Massenkulturen und die untersuchten Einzelklone ähnlich, so dass die Darstellung im wesentlichen auf jeweils einen als repräsentativ erachteten Zellklon und teilweise die Massenkulturen beschränkt werden soll.

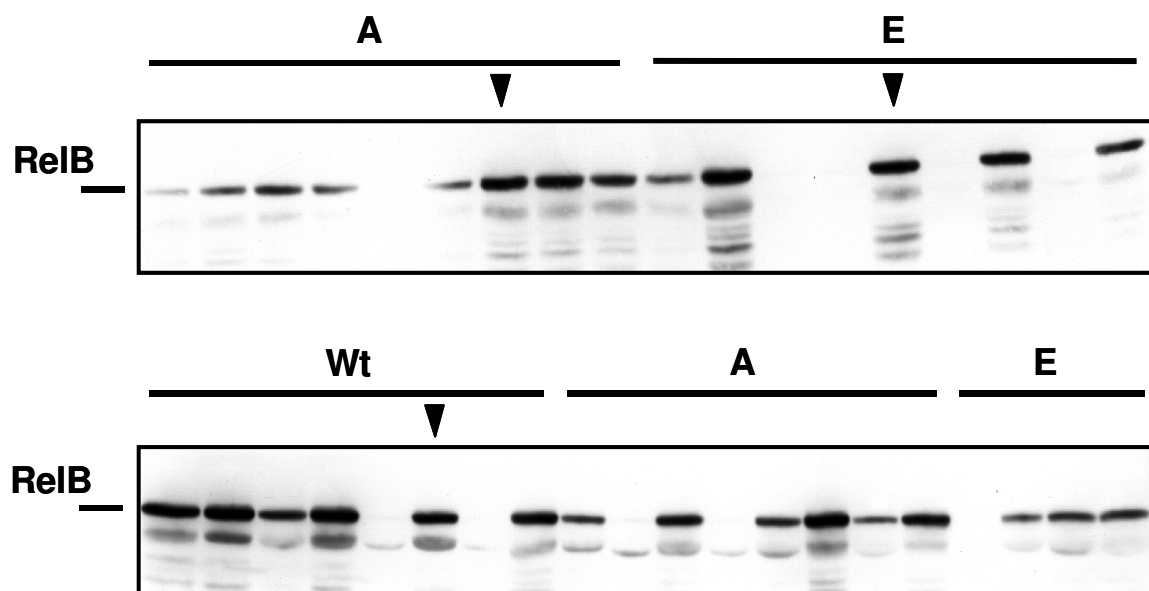


Abb. 14. Selektion geeigneter Klone. Gesamtzellextrakte aus verschiedenen Einzelzellklonen, die mit RelB Wt (Wt), RelB S368A (A) bzw. RelB S368E (E) transfiziert wurden, sind in einem RelB-spezifischen Immunoblot aufgetragen. Die weitere Darstellung soll sich auf die mit einem Pfeil bezeichneten Klone beschränken.

3.2.4 Subzelluläre Lokalisation

Ausgehend von der Hypothese, dass Serin 368 eine kritische Rolle beim Kernimport von RelB spielt, sollte zunächst die subzelluläre Lokalisation der Mutanten untersucht werden. Kern- und Zytoplasma-Extrakte der S107 Wt-, A- und E-Zellen wurden im RelB-spezifischen Immunoblot aufgetragen. Wie in *Abb. 15* dargestellt, war die Kern/Zytoplasma-Verteilung weder bei der A- noch bei der E-Mutante verändert: Sowohl RelB als auch die beiden Mutanten waren fast gleichmäßig zwischen Kern und Zytoplasma verteilt. Auch die Stabilität des Proteins erschien durch die Mutation nicht beeinträchtigt. Die Qualität der Kernextrakte wurde durch Detektion der zytoplasmatischen Proteine RelA und IKK α/β kontrolliert.

Entsprechende Resultate wurden auch *in vivo* durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie erhalten (Daten aufgrund Computerdiebstahls nicht mehr verfügbar).

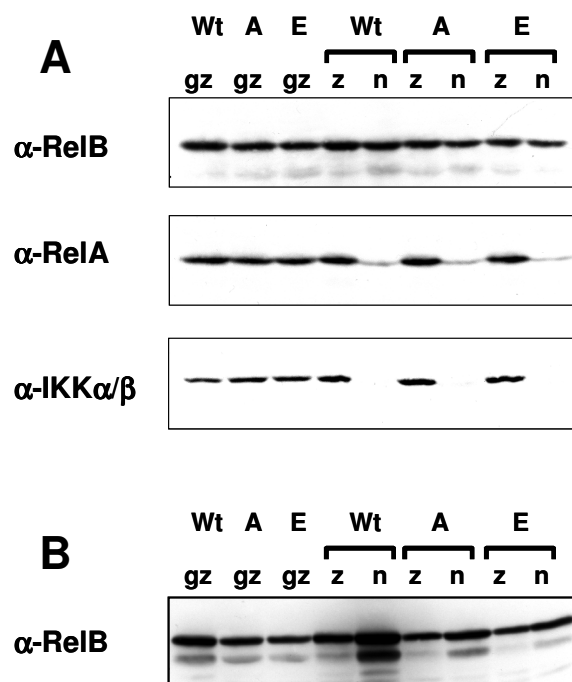


Abb. 15. Subzelluläre Lokalisation von RelB, RelB S368A und RelB S368E. **A.** Immunoblots mit Gesamtzell- (gz), Zytoplasma- (z) und Kernextrakten (n) aus den S107 Wt-, A- und E-Klonen wurden mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt. *Oben:* Die RelB-Expression der drei repräsentativen Klone. Sowohl Wildtyp-RelB als auch RelB S368A und RelB S368E sind gleichmäßig zwischen Zytoplasma und Kern verteilt. *Mitte, unten:* Die Qualität der Kernextrakte wurde durch Immunoblots mit Antikörpern gegen zwei zytoplasmatische Proteine (RelA und IKK α/β) kontrolliert. **B.** Das entsprechende Experiment mit Extrakten aus den Wt-, A- und E-Massenkulturen (Kontrollen nicht gezeigt).

Die Hypothese über die Rolle von Serin 368 beim Kernimport von RelB erwies sich damit als unzutreffend. Da die Kerntranslokation und die Proteinstabilität der Mutanten offensichtlich nicht gestört waren, galt es, andere Ursachen für die in den transienten Transfektionsexperimenten konstatierte mangelhafte transkriptionelle Aktivierung zu finden. In Betracht hierfür kamen ein Defekt der Transaktivierung selbst oder eine Störung von Funktionen, die ähnlich der Kerntranslokation der Transaktivierung vorgeschaltet und für diese notwendig sind, vor allem eine intakte DNS-Bindung und nicht zuletzt eine effektive Dimerisierungsfähigkeit des Proteins.

3.2.5 Transkriptionelle Aktivität

Konstitutive NF- κ B-Aktivität

Zunächst sollte, anknüpfend an die bereits geschilderten transienten Transfektionsexperimente, die transkriptionelle Aktivität in den stabil transfizierten Zelllinien näher charakterisiert werden. Die parentale S107-Zelllinie sowie die S107 Wt-, A- und E-Zellen wurden parallel mit einem κ B-abhängigen Luciferase-Reporter (3x κ B.luc) und dem gleichen Reporter ohne die κ B-Motive (β -Glob TATA.luc) transfiziert. Die κ B-abhängige Transkription war im Wt-Klon im Vergleich zur parentalen Zelllinie über 90fach erhöht (430,9 versus 4,7), in den A- und E-Klonen dagegen nur 7- bzw. 6fach (33,9 bzw. 26,1, siehe *Abb. 16 A*, S. 57). Entsprechende Experimente in den Massenkulturen ergaben ähnliche Resultate. Damit bestätigte sich der in den transienten Transfektionsexperimenten erhobene Befund.

NF- κ B-Aktivität bei Überexpression von p50 bzw. p52

Aus früheren Arbeiten war bereits bekannt gewesen, dass die Aktivität von Wildtyp-RelB durch Kotransfektion eines p50-Expressionsvektors gesteigert werden kann (KIRILLOV et al. 1996). Transfizierte man den Wt- und den A-Klon mit einem p50-Expressionsvektor, nahm die κ B-abhängige Transkriptionsaktivität stark zu: Im Wt-Klon wurde die Aktivität auf das 6,6fache, im A-Klon auf das über 70fache im Vergleich zur Transfektion mit Leervektor gesteigert (*Abb. 16 B*, S. 57). Damit erreichten der Wt- und der A-Klon vergleichbare absolute Aktivitätsniveaus (655 bzw. 601). Offenbar konnte also der Defekt des A-Klons durch transiente Überexpression von p50 größtenteils kompensiert werden.

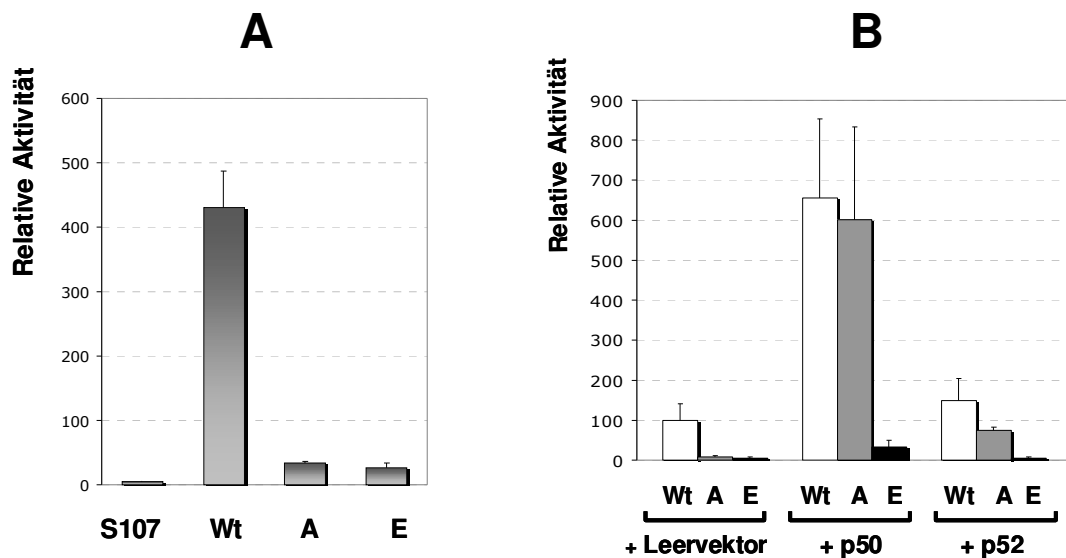


Abb. 16. κ B-abhängige transkriptionelle Aktivität in den parentalen S107-Zellen und den stabilen S107-Transfektanten. **A.** Die parentale S107-Zelllinie sowie die stabilen Wt-, A- und E-Klone wurden, wie in *Material und Methodik* erläutert, transient mit einem κ B-abhängigen Reporter (3x κ B.luc) transfiziert. Die Luciferase-Aktivität ist relativ angegeben zu der Aktivität eines parallel transfizierten gleichartigen Reporters ohne die κ B-Motive (β -Glob TATA.luc). **B.** Die drei Klone (S107 Wt, A und E) wurden transient mit Leervektor, mit einem p50- oder mit einem p52-Expressionsvektor transfiziert, jeweils zusammen mit 3x κ B.luc. Der Wert für den mit Leervektor transfizierten Wt-Klon wurde willkürlich gleich 100 gesetzt; alle anderen Aktivitäten sind relativ dazu angegeben. In allen Experimenten ist die Transfektionseffizienz durch parallele Transfektion eines unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors stehenden Renilla-Luciferase-Reporters abgeglichen. Es sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt; die Standardabweichung ist durch einen Fehlerbalken gekennzeichnet.

Der Defekt des E-Klons ließ sich nicht auf diese Weise ausgleichen; hier gelang zwar eine Steigerung auf das 6,8fache des Wertes bei Transfektion des Leervektors, der absolute Wert blieb jedoch gering (33,3).

Mit der Transfektion eines p52-Expressionsvektors ließen sich sowohl die S107 Wt- als auch die A-Zellen weniger effizient stimulieren (1,5- bzw. 8,9fach gegenüber Transfektion mit Leervektor); die Werte für den E-Klon blieben sogar auf dem Ausgangswert. Einschränkung sei darauf hinweisen, dass es möglicherweise nicht gelang, p52 so effizient zu exprimieren wie dies für p50 der Fall war. Diese Tatsache könnte sehr wohl für die Unterschiede im Hinblick auf die unterschiedliche Aktivierung durch p52 und p50 verantwortlich sein. Davon unberührt ist jedoch der Befund, dass sich A- und E-Klon in diesen Experimenten auffallend unterschiedlich verhielten.

3.2.6 DNS-Bindung

κ B-spezifische DNS-Bindungsaktivität in der einfachen Gelretardationsanalyse

Mit Hilfe der Gelretardationsanalyse sollte untersucht werden, inwieweit der eindrucksvolle Defekt der transkriptionellen Aktivierung als sekundär, als Folge einer mangelnden DNS-Bindung einzuordnen war. Die in diesen Experimenten verwendete DNS-Sonde bestand aus der κ B-Konsensus-Sequenz des murinen Ig- κ -Enhancers, für die NF- κ B eine hohe Affinität hat.

Die κ B-spezifische DNS-Bindungsaktivität war in Gesamtzell-, nukleären und zytoplasmatischen Extrakten aus A-Zellen deutlich reduziert im Vergleich zu den entsprechenden Extrakten aus den Wt-Zellen, in den E-Zellen war sie sogar fast ganz aufgehoben. Die zur Kontrolle angefertigte Sp1-spezifische Analyse erbrachte dagegen gleiche DNS-Bindungsaktivitäten (*Abb. 17*).

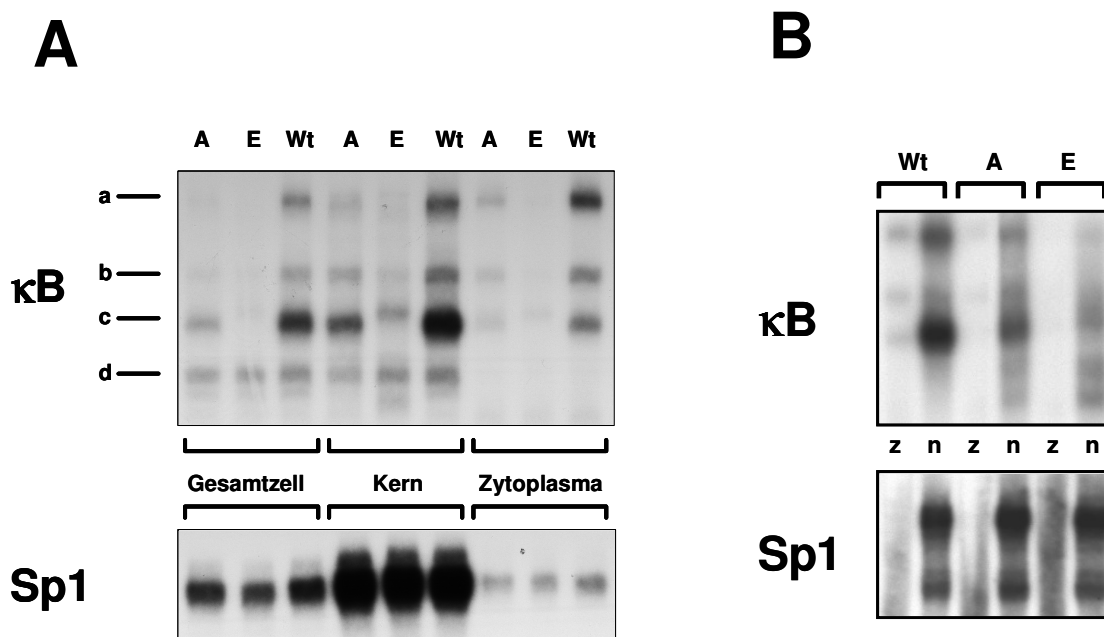


Abb. 17. κ B-spezifische DNS-Bindungsaktivität in den S107 A-, E- und Wt-Zellen.

A. Gelretardationsanalyse mit Gesamtzell-, nukleären und zytoplasmatischen Extrakten aus S107 Wt-, A- und E-Klonen mit einer κ B- (oben) bzw. Sp1-spezifischen Sonde (unten). Die κ B-spezifischen Komplexe sind mit (a), (b), (c) und (d) bezeichnet. Die Retardationsanalyse mit einer für den Transkriptionsfaktor Sp1 spezifischen Sonde dient als Kontrolle.

B. Das entsprechende Experiment mit den S107 Wt-, A- und E-Massenkulturen. Aufgetragen sind zytoplasmatische (z) und nukleäre (n) Extrakte.

Im einzelnen konnten vier aus verschiedenen Untereinheiten bestehende κ B-spezifische Komplexe (mit a, b, c und d bezeichnet) detektiert werden. Komplex (c), die Hauptkomponente der DNS-Bindungsaktivität, war deutlich angereichert in den Kernextrakten und auffallend reduziert in den A- und E-Klonen. Von dem Hauptbestandteil von (c) ließ sich bei genauer Betrachtung eine kleinere, langsamer wandernde Bande abgrenzen, die in den Mutanten nicht reduziert war. Die Komplexe (a) und (b), zu gleichen Teilen in nukleären und zytoplasmatischen Extrakten vorkommend, waren ebenfalls vermindert in den A- und E-Klonen. Komplex (d) konnte in vergleichbaren Mengen in Gesamtzell- und nukleären Extrakten aller Klone gefunden werden, während er in der zytoplasmatischen Fraktion nicht vorkam.

Zusammensetzung der κ B-spezifischen DNS-Bindungsaktivität

Die Zusammensetzung der vier beschriebenen DNS-bindenden Komplexe (a, b, c, und d) sollte in antikörperspezifischen Gelretardationsanalysen geklärt werden (*Abb. 18*). Hierzu wurden Kernextrakte aus den Wt-, A- und E-Klonen und spezifische Antikörper gegen verschiedene NF- κ B/Rel-Proteine verwendet.

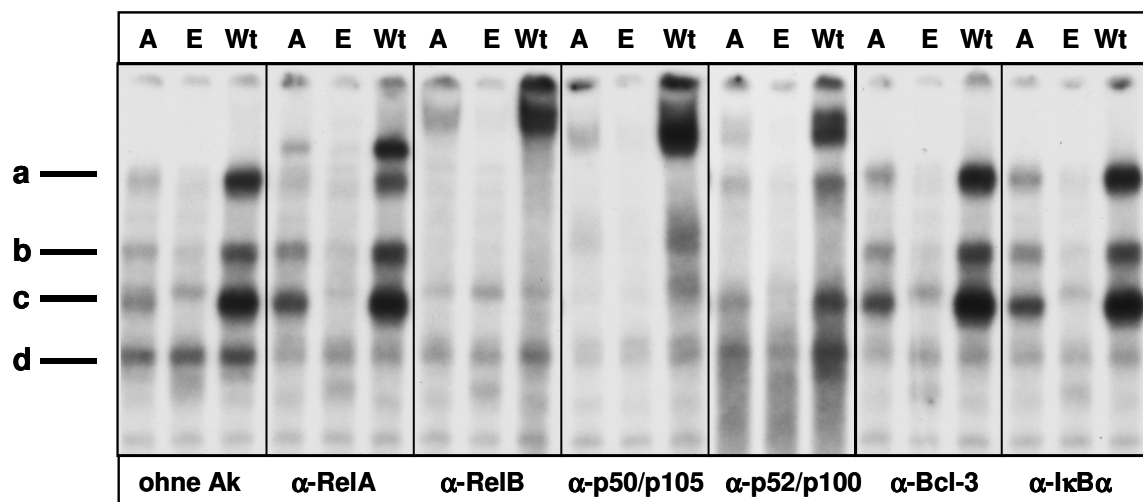


Abb. 18. Zusammensetzung der κ B-spezifischen DNS-Bindungsaktivität in S107 A-, E- und Wt-Klonen. Gelretardationsanalyse mit Kernextrakten aus den S107 A-, E- und Wt-Klonen mit einer κ B-spezifischen Sonde und den angegebenen Antikörpern. Als Kontrolle wurde die Analyse auch ohne Antikörper (Ak) und mit Antikörpern gegen die I κ B-Proteine I κ B α und Bcl-3 durchgeführt. Die κ B-spezifischen Komplexe sind mit (a), (b), (c) und (d) bezeichnet.

Während Komplex (a) durch einen RelA-spezifischen Antikörper beeinflusst wurde, traf dies für die anderen Komplexe nicht oder nur in geringem Maße zu. In Gegenwart eines RelB-spezifischen Antikörpers wurden die Komplexe (a), (b) und (c) fast komplett retardiert. Diese drei Komplexe wurden auch, zu einem unterschiedlichen Ausmaß, durch Antikörper gegen p50/p105 und p52/p100 beeinflusst. Komplex (a) wurde durch einen p50/p105-spezifischen Antikörper fast vollständig reduziert und zeigte sich weniger beeinflusst durch einen für p52/p100 spezifischen Antikörper, wohingegen sich dies bei Komplex (b) umgekehrt verhielt; dieser wurde durch einen p52/100-spezifischen Antikörper fast vollständig retardiert, zeigte sich aber weniger beeinflusst in Gegenwart eines spezifischen Antikörpers gegen p50/p105. Komplex (c) wurde stark retardiert durch einen p50/p105-spezifischen Antikörper und zeigte sich auch beeinflusst durch einen p52/100-spezifischen Antikörper. Der Komplex (c) weist bei genauer Betrachtung einen kleinen, langsamer wandernden Anteil auf, der sich vor allem durch Antikörper gegen RelA- und p50/p105 beeinflussen ließ, nicht jedoch durch einen RelB-Antikörper. Komplex (d) ließ sich durch keinen der verwendeten Antikörper beeinflussen.

Mit Antikörpern gegen c-Rel (nicht gezeigt), Bcl-3 und I κ B α war kein Effekt auf die verschiedenen Komplexe zu beobachten.

κ B-spezifische DNS-Bindungsaktivität bei Überexpression von p50

In weiteren Gelretardations-Experimenten wurden Extrakte aus zuvor transient transfizierten Zellen analysiert (*Abb. 19*, S. 61). Die transiente Transfektion der Wt- und A-Klone mit p50 resultierte in einer Zunahme des Komplexes (d) und auch des in den Mutanten reduzierten Komplexes (c). Im E-Klon war zwar ebenfalls eine Zunahme des Komplexes (d) zu registrieren; Komplex (c) konnte jedoch auch nach Transfektion mit p50 nicht detektiert werden. Während also Komplex (c) durch Überexpression von p50 in der A-Mutante teilweise rekonstituiert werden konnte, ließ sich der Defekt der E-Mutante nicht auf diese Weise ausgleichen. Die Kontrolle mit einer Sp1-spezifischen Sonde erbrachte gleiche Bindungsaktivitäten für alle Proben. Wie in der Diskussion zu erörtern sein wird, unterstützen diese Beobachtungen die Ergebnisse der bereits geschilderten Analysen der κ B-spezifischen Transkriptionsaktivität in den A- und E-Klonen bei Kotransfektion von p50.

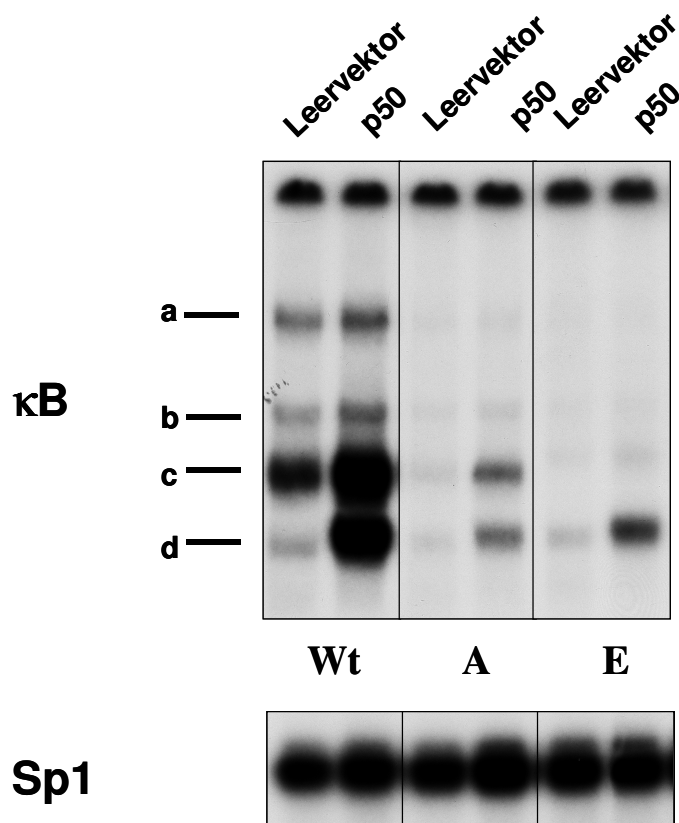


Abb. 19. κB -spezifische DNS-Bindung bei Koexpression von p50. Die Wt-, A- und E-Klone wurden transient mit einem p50-Expressionsvektor oder einem Leervektor transfiziert. Extrakte aus diesen Zellen wurden dann in einer Gelretardationsanalyse mit einer κB -spezifischen Sonde (oben) und einer Sp1-spezifischen Sonde (als Kontrolle, unten) untersucht. Die κB -spezifischen Komplexe sind mit (a), (b), (c) und (d) bezeichnet.

3.2.7 Dimerisierung

Bei der in den vorangehenden Experimenten beobachteten eingeschränkten DNS-Bindung der mutanten Proteine könnte es sich um einen primären, direkten Defekt handeln. Die mangelnde DNS-Bindung könnte jedoch auch Ausdruck einer mangelnden Dimerisierungsfähigkeit der Mutanten sein, da die Heterodimerisierung mit anderen Mitgliedern der NF- κB -Familie unabdingbare Voraussetzung zur DNS-Bindung ist. Der Klärung dieser Frage diente eine Reihe von Immunpräzipitationen mit Gesamtzellextrakten aus S107 Wt-, A- und E-Zellen.

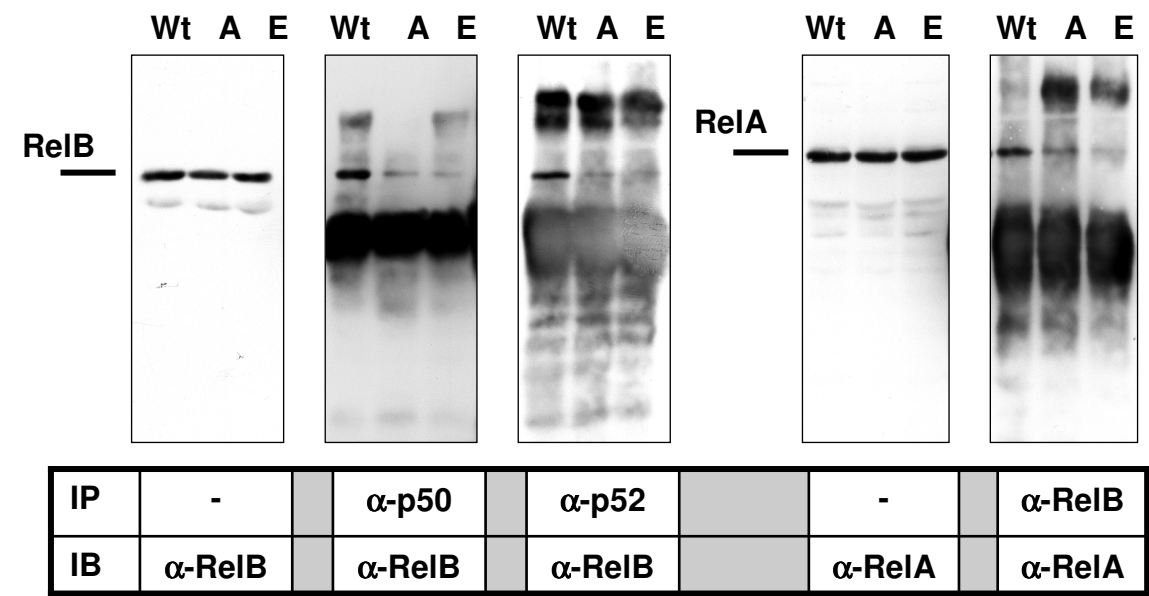


Abb. 20. Dimerisierung von RelB, RelB S368A und RelB S368E mit p50, p52 und RelA. Dargestellt sind Immunoblots (IB) gegen RelB (linke drei Kästen) und RelA (rechte zwei Kästen). Aufgetragen sind Gesamtzellextrakte aus S107 Wt-, A- und E-Klonen und aus den gleichen Extrakten gewonnene, p50-, p52- bzw. RelB-spezifische Immunpräzipitate (IP). Bei der großen Bande unterhalb der RelA- bzw. RelB-Proteine handelt es sich um die in der Immunpräzipitation verwendeten Immunglobuline.

Dimerisierung mit p50, p52 und RelA

Wildtyp-RelB konnte sowohl mit einem p50- als auch einem p52-spezifischen Antikörper präzipitiert werden. Überraschenderweise gelang es auch, RelA mit einem RelB-spezifischen Antikörper auszufällen (*Abb. 20*). Die an Position 368 eingeführte Punktmutation beeinträchtigte die Dimerisierungsfähigkeit von RelB gravierend. Sowohl die Interaktion von RelB S368A als auch von RelB S368E mit p50 und p52 war stark gestört. Auch die Kopräzipitation von RelA und RelB war beeinträchtigt für die Mutanten, für RelB S368A jedoch weniger ausgeprägt als für RelB S368E.

Dimerisierung mit p100 und p105

Um die Immunpräzipitations-Studien zu vervollständigen, wurden die Dimerisierungseigenschaften von RelB und der RelB-Mutanten gegenüber den Vorläuferproteinen p105 und p100 bestimmt. In den Wt-Zellen konnte p100 mit einem

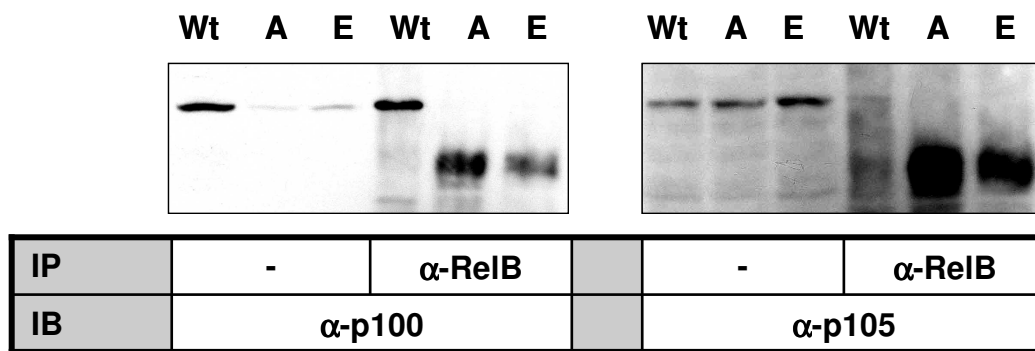


Abb. 21. Die Dimerisierungseigenschaften von RelB, RelB S368A und RelB S368E gegenüber p100 und p105. Dargestellt sind Immunoblots (IB) gegen p100 (linker Kasten) und gegen p105 (rechter Kasten). Aufgetragen wurden auf die linken drei Spuren eines jeden Kastens Gesamtzellextrakte aus den drei Klonen Wt, A und E, auf den rechten drei jeweils RelB-spezifische Immunpräzipitate (IP).

RelB-spezifischen Antikörper sehr gut präzipitiert werden, während dies für p105 nur in äußerst geringem Maße gelang (*Abb. 21*). Die mutantes RelB exprimierenden A- und E-Zellen zeigten überraschenderweise eine sehr viel schwächere Expression von p100 im Vergleich zu den S107 Wt-Zellen, so dass die Dimerisierungseigenschaften der Mutanten bezüglich p100 nicht beurteilbar waren. Eine Dimerisierung der Mutanten mit p105 war nicht nachweisbar, wobei zu berücksichtigen ist, dass ja auch schon die Interaktion zwischen Wildtyp-RelB und p105 nur sehr schwach ausgeprägt war.

3.2.8 Einfluss von RelB auf die NF- κ B2-Expression

Angeichts der im Vergleich zu den Wt-Zellen drastisch reduzierten p100-Expression der S107 A- und E-Zellen sollte nun auch die Expression von p52/p100 und p50/p105 in der parentalen S107-Zelllinie, in den S107 Wt-, A- und E-Klonen sowie in zwei bereits etablierten, Wildtyp-RelA bzw. Wildtyp-RelB exprimierenden S107-Massenkulturen untersucht werden (*Abb. 22*, S. 64).

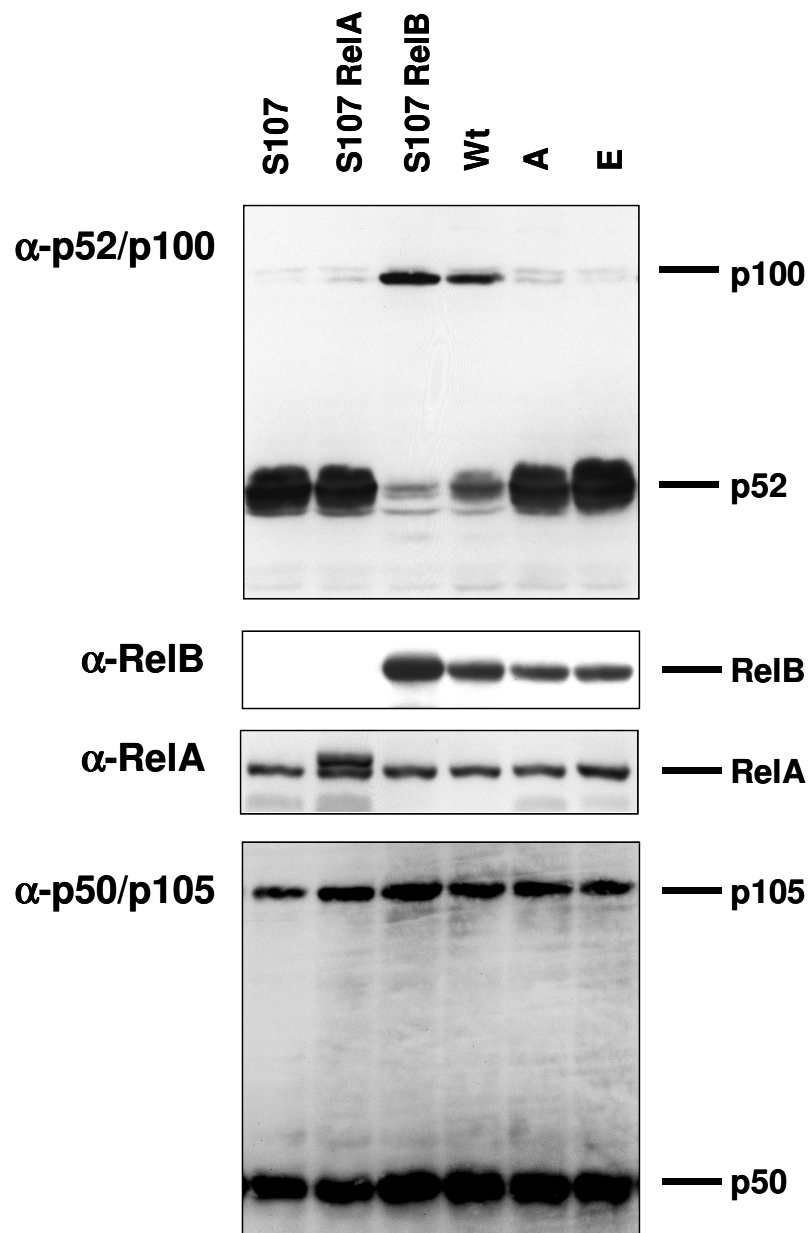


Abb. 22. RelB und Stabilität von p100. Immunoblots mit Gesamtzellextrakten aus der parentalen S107-Zelllinie und verschiedenen stabilen Transfektanten. Die S107 RelA- und die S107 RelB-Zelllinien sind stabil mit RelA bzw. RelB transfizierte Massenkulturen; in den drei rechten Spuren sind jeweils die Ergebnisse der drei Klone (Wt, A und E) gezeigt. Dargestellt sind Immunoblots mit Antikörpern gegen p52/p100 (oben), RelB und RelA (Mitte) und p50/p105 (unten). Das ektop exprimierte RelA in den S107 RelA-Zellen ist an der langsameren Wanderungs- geschwindigkeit im Vergleich zu endogenem RelA zu erkennen.

Während die parentalen, RelB-defizienten S107-Zellen und die mutantes RelB exprimierenden S107 A- und E-Klone p100 nur sehr schwach, p52 dagegen stark exprimierten, fanden sich in den mit funktionellem RelB transfizierten Zellen (S107 RelB-Massenkultur und Wt-Klon) eine starke Expression von p100 und eine reduzierte Expression von p52. Der RelB exprimierende Einzelklon (Wt) zeigte dabei eine im Vergleich zur RelB-exprimierenden Massenkultur weniger stark ausgeprägte Umkehrung der p52/p100-Expression. Diese beiden Proben unterschieden sich auch im RelB-Gehalt in dem Sinne, dass der Einzelklon auch eine weniger starke RelB-Expression als die Massenkultur zeigte. Es scheint also, dass die Expression funktionellen RelB-Proteins (S107 RelB und Wt-Klon), nicht jedoch der Mutanten (A- und E-Klon), das in der parentalen S107-Zelllinie beobachtete Verhältnis von p52 und p100 umzukehren vermag.

Bei stabil mit RelA transfizierten (aber RelB-defizienten) S107-Zellen (S107 RelA) wurde dieser Effekt nicht gefunden; die S107 RelA-Zellen verhielten sich in dieser Hinsicht wie die parentalen S107-Zellen. Die Expression von p50 und p105 zeigte ebenfalls keine Abhängigkeiten dieser Art, sondern war in allen untersuchten Zellen ähnlich.

4 DISKUSSION

4.1 Kernimport von RelB und konstitutive NF- κ B-Aktivität

Einen Beitrag zur Aufklärung der in reifen B-Lymphozyten beobachteten konstitutiven NF- κ B-Aktivität zu leisten war das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit. Aufgrund der besonderen Form der Aktivierung von NF- κ B galt es dabei in erster Linie zu erforschen, wie NF- κ B in B-Lymphozyten konstitutiv in den Kern transportiert wird. Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass RelB in lymphatischem Gewebe stärker als in anderen Geweben exprimiert wird und RelB-enthaltende Komplexe dieses Gewebes, nicht aber anderer Gewebe, weniger durch I κ B-Proteine gehemmt werden. Es war vorgeschlagen worden, dass dies erreicht werden könnte durch einen spezifisch in Gewebe mit konstitutiver κ B-Aktivität exprimierten Kofaktor oder durch eine spezifische posttranslationale Modifikation von RelB in diesem Gewebe (LERNBECHER et al. 1994).

In *Drosophila* war dann gezeigt worden, dass das Rel-Protein Dorsal durch eine Phosphorylierung posttranslational modifiziert wird und daraufhin konstitutiv in den Zellkern transloziert (DRIER et al. 1999). Angesichts der starken evolutionären Konservierung des phosphorylierten Aminosäurerestes (Serin 317) auch bei Säugetieren lag es nahe, eine ähnliche Funktion für den homologen Aminosäurerest in RelB (Serin 368) und in dessen Phosphorylierung die für RelB postulierte posttranslationale Modifikation zu vermuten.

In dieser Arbeit wurden die S107-Zellen als Modellsystem verwendet, weil sie kein endogenes RelB exprimieren und so die Möglichkeit bestand, mutantes RelB ektop zu exprimieren und ungestört vom endogenen Protein zu untersuchen. Von RelB wurden eine Alanin-Mutante (RelB S368A) erzeugt, um eine potentielle Phosphorylierungsstelle zu beseitigen, und eine Glutamat-Mutante (RelB S368E), um den Effekt einer Phosphorylierung zu imitieren. Gemäß der vorgestellten Hypothese hätte der Kerntransport von RelB S368A blockiert sein müssen, während für RelB S368E ein konstitutiver Kerntransport zu erwarten gewesen wäre. Diese Vermutungen erwiesen sich jedoch als nicht zutreffend.

In dieser Arbeit ist gezeigt worden, dass es keinen Zusammenhang zwischen Serin 368 und dem Kerntransport von RelB gibt. Sowohl die Untersuchung nukleärer und

zytoplasmatischer Extrakte im Immunoblot als auch die Immunfluoreszenz-Mikroskopie lieferten hier eindeutige Ergebnisse: Die RelB-Mutanten unterscheiden sich in ihrer subzellulären Lokalisation nicht von Wildtyp-RelB.

Es muss bis auf weiteres unklar bleiben, ob andere Modifikationen des in lymphatischem Gewebe exprimierten RelB-Proteins dessen besonderes Verhalten erklären. Von Interesse könnte die Tatsache sein, dass RelB im Gegensatz zu RelA (und auch c-Rel und p50) keine Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase A (PKA) besitzt (siehe dazu auch *Abb. 3* und *Abb. 4*, S. 10 bzw. S. 13). Während die Sequenz von RelA an dieser Stelle (R R P S) der Kinase-Konsensussequenz von PKA (R R X S/T) entspricht, ist bei RelB der erste Argininrest (R) durch einen Glutaminrest (Q) ersetzt (Q R L T). Es ist eine offene Frage, ob diese Besonderheit von RelB in Zusammenhang mit dessen Funktion bei der konstitutiven NF- κ B-Aktivität zu bringen ist.

Möglicherweise spielen jedoch auch ganz andere Mechanismen eine Rolle. Hier sei insbesondere auf die Bedeutung von p100 für die subzelluläre Lokalisation von RelB verwiesen, die noch eingehender zu diskutieren sein wird (SOLAN et al. 2002).

4.2 Dimerisierung von RelB

Die vorliegende Arbeit hat einige neue Erkenntnisse zu den Dimerisierungseigenschaften von RelB erbracht. Die Dimerisierung der NF- κ B/Rel-Proteine wird über die Rel-Homologie-Domäne vermittelt, die bei RelB die Aminosäuren 103 bis 418 umfasst (RYSECK et al. 1992). Bis jetzt ist eine Kristallstruktur von RelB-Heterodimeren nicht verfügbar; Informationen über die Struktur der Dimerisierungsdomäne von RelB können aber aus Mutagenese-Studien und den Kristallstrukturen homologer Proteine gezogen werden.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen RelB und den anderen Mitgliedern der NF- κ B/Rel-Familie besteht unter anderem in dem langen N-Terminus von RelB, der als Besonderheit einen Leucin-Reißverschluss aufweist (Aminosäuren 22 bis 50; RYSECK et al. 1992). Dieser ist notwendig für die volle Transaktivierungsfähigkeit des Proteins (DOBZANSKI et al. 1993), nicht aber für die Dimerisierung, zumindest für diejenige mit p50. Stattdessen wird dafür der C-terminale Teil der Rel-Homologie-Domäne (zwischen

Aminosäuren 264 und 379), in dem auch Serin 368 liegt, als wesentlich beschrieben (RYSECK et al. 1995). Dieses Ergebnis deckt sich mit der Analyse der Kristallstruktur der Dimerisierungsdomäne der homologen Proteine p50 und RelA (HUANG et al. 1997; CHEN et al. 1998).

4.2.1 Die kritische Funktion von Serin 368 bei der Dimerisierung von RelB

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass Serin 368 kritisch für die Dimerisierung von RelB ist. Dies betrifft die Assoziationen mit allen untersuchten Partnern von RelB (p50, p52, p105, RelA; p100 nicht eindeutig beurteilbar). Weder ein Alaninrest (RelB S368A) noch ein Glutamatrest (RelB S368E) können die Funktion von Serin 368 übernehmen.

Die zu Serin 368 homologen Aminosäurereste in p50 (Serin 340) und RelA (Serin 281) liegen in α -helikalen Domänen, die nicht direkt zu den Dimer- und DNS-Kontaktstellen beitragen (HUANG et al. 1997; CHEN et al. 1998). Dies schließt eine wichtige Funktion bei der Dimerisierung jedoch keineswegs aus. So ist in Weiterführung der vorliegenden Arbeit die Funktion von RelA Serin 281 ebenfalls durch Mutagenese untersucht worden; dabei wurde RelA Serin 281 durch Alanin bzw. Glutamat ersetzt. Es zeigte sich, dass RelA Serin 281 ganz ähnlich wie RelB Serin 368 eine essentielle Rolle bei der Dimerisierung des Proteins spielt. Während für Wildtyp-RelA eine starke DNS-Bindung und transkriptionelle Aktivität nachgewiesen werden konnte, waren diese für RelA S281A und RelA S281E fast vollständig aufgehoben (MAIER et al. 2003). Die Mutation des in direkter Nachbarschaft zu RelB Serin 368 liegenden Cysteins 367 zu Alanin führt interessanterweise zu keinen wesentlichen Störungen der Dimerisierungseigenschaften von RelB (RYSECK et al. 1995).

Es wurde nicht untersucht, ob RelB Serin 368 und RelA Serin 281 tatsächlich phosphoryliert werden. Dass die Eigenschaften der NF- κ B/Rel-Proteine durch Phosphorylierung reguliert werden können, ist seit langem bekannt (NAUMANN und SCHEIDEREIT 1994; BALDWIN 1996; ZHONG et al. 1998; MARIENFELD et al. 2001). Eine interessante Frage wäre deshalb, ob die untersuchten Serinreste lediglich eine kritische Funktion für die Proteinstruktur besitzen, oder ob über ihre Phosphorylierung bestimmte Vorgänge, wie beispielsweise die Dimerisierung oder DNS-Bindung, reguliert werden.

Interessant ist der Vergleich mit der Rolle, welche die Phosphorylierung von RelA für die Assoziation mit anderen Proteinen und die transkriptionelle Aktivität spielt. ZHONG et al. (1998) konnten zeigen, dass die Phosphorylierung des in der RHD von RelA gelegenen Serins 276 durch die Proteinkinase A (PKA) die Interaktion mit dem Koaktivator CBP/p300 ermöglicht. Eine Konformationsänderung von RelA führt dabei zu einer Demaskierung der beiden für die Interaktion mit CBP verantwortlichen Domänen. Dieser Vorgang ist Voraussetzung für die effektive transkriptionelle Aktivität des Proteins. Angesichts des Verhaltens der Mutanten RelB S368E und RelA S281A, die den Effekt einer Phosphorylierung nachahmen, ist es entsprechend denkbar, dass die Phosphorylierung an dieser Stelle die Assoziation mit anderen Mitgliedern der NF- κ B/Rel-Familie negativ reguliert. Um dies eindeutig zu klären, werden allerdings weitere Experimente notwendig sein.

4.2.2 Dimerisierung der einzelnen RelB-Mutanten

Sowohl die Dimerisierung von RelB S368A als auch diejenige von RelB S368E sind schwer gestört. Ob darüber hinaus Unterschiede in den Dimerisierungseigenschaften zwischen den beiden Mutanten bestehen, lässt sich anhand der hier durchgeführten Immunpräzipitationen nicht sicher beurteilen. Zumindest die Assoziation mit RelA erscheint für RelB S368E jedoch stärker gestört als für RelB S368A.

Die Assoziation sowohl von FLAG-RelB Wt als auch von FLAG-RelB S368A mit p50 erwies sich als kompromittiert. Dies ist für beide Proteine auf die durch die Sequenzierung charakterisierten, unerwünschten Veränderungen gegenüber murinem RelB (V51D, P111L, Q142L) zurückzuführen, eventuell auch auf die FLAG-Markierung. FLAG-RelB S368A dimerisiert noch schlechter als FLAG-RelB Wt, was durch den zusätzlichen Effekt durch die S368A-Mutation zu erklären ist. Zu einem Teil dürfte dieser Effekt durch die anderen Veränderungen überlagert werden, weswegen er in diesen Experimenten nicht so eindrucksvoll zum Tragen kommt wie in den Experimenten mit nicht FLAG-markiertem RelB.

Von den unerwünschten Mutationen konnten zwei (V51D und Q142L) in einer Datenbank gefunden werden (Entrez Protein, Proteindatenbank der National Library of Medicine, USA; accession number AAB25493 bzw. AAH34523); letztlich bleiben die Auswirkungen dieser und vor allem der dritten Mutation (P111L), über die eine Suche nichts

erbrachte, ungewiss. Es ist wohl davon auszugehen, dass sie die Struktur des Proteins insgesamt und damit verschiedene seiner Funktionen mehr oder weniger stark beeinträchtigen, darunter auch die Dimerisierung.

4.2.3 Dimerisierung von RelB mit anderen Mitgliedern der NF- κ B-Familie

Von RelB ist bekannt, dass es mit p50, p52 und dem p52-Vorläufer p100 interagiert, während eine effiziente Dimerisierung mit RelA und c-Rel bis in die jüngste Zeit nicht beschrieben ist (RUBEN et al. 1992; RYSECK et al. 1992; BOURS et al. 1994; DOBRZANSKI et al. 1994; RYSECK et al. 1995; SOLAN et al. 2002). In dem in dieser Arbeit verwendeten experimentellen System konnte bestätigt werden, dass RelB vorzugsweise mit p100 und nur schwach mit p105 assoziiert. Die Ergebnisse der Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern legen außerdem die Existenz von Komplexen nahe, die sowohl RelA als auch RelB enthalten. Während anhand dieser Ergebnisse nicht entscheidbar ist, ob es sich hierbei um Dimere oder Komplexe aus mehr als zwei NF- κ B-Proteinen handelt, sind in einem anderen Labor während der Entstehung dieser Arbeit Hinweise auf eine direkte Assoziation von RelA und RelB gefunden worden (MARIENFELD et al. 2003). Die dort beschriebenen Komplexe binden jedoch nicht an DNS. Die Autoren schlagen vor, dass RelB eine inhibierende Funktion auf die NF- κ B-Aktivität ausübt, indem es RelA durch Dimerisierung inaktivieren kann, und zwar sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern.

4.2.4 Dimerisierung von RelB und Kerntransport

Durch die Beobachtung, dass der Kerntransport der RelB-Mutanten bei gestörten Dimerisierungsfähigkeiten intakt ist, wird allerdings auch noch eine andere Frage aufgeworfen: Auf welche Weise gelangt das mutierte RelB überhaupt in den Kern? Da RelB keine Homodimere bildet und die gesetzten Mutationen die Dimerisierung schwer beeinträchtigen, wäre zu vermuten, dass die RelB-Mutanten mittels ihrer NLS auch als Monomere aktiv und spezifisch über den Kernporenkomplex in den Zellkern transportiert werden können.

Allerdings gilt es auch festzuhalten, dass die Dimerisierung der Mutanten ja nicht unbedingt vollständig blockiert ist; möglicherweise reicht sie noch aus, um die subzelluläre Lokalisation des Proteins nicht zu beeinträchtigen.

4.3 κ B-spezifische DNS-Bindung und transkriptionelle Aktivität

Angeichts der unterschiedlich stark eingeschränkten Dimerisierungsfähigkeiten von RelB S368A, RelB S368E, FLAG-RelB S368A und auch FLAG-RelB Wt lässt sich die Störung der DNS-Bindung mindestens zu einem großen Teil als sekundären Effekt interpretieren, denn die Heterodimerisierung mit anderen Proteinen aus der NF- κ B/Rel-Familie ist Voraussetzung für die DNS-Bindung von RelB (RUBEN et al. 1992). Ebenso kann der eindrucksvolle Defekt in der Fähigkeit zur transkriptionellen Aktivierung im wesentlichen als Folge der mangelnden DNS-Bindung gedeutet werden.

Allerdings zeigten die verschiedenen Mutanten untereinander unterschiedlich stark ausgeprägte Defekte der DNS-Bindung. Zwar war auch die Dimerisierung unterschiedlich stark gestört, dennoch ist es nicht ausgeschlossen, dass die Mutationen auch direkt die DNS-Bindung und die transkriptionelle Aktivierung beeinflussen können.

4.3.1 DNS-Bindung von RelB S368A und RelB S368E

Die DNS-Bindung der RelB S368E-Mutanten erwies sich als signifikant stärker gestört als diejenige der RelB S368A-Mutanten. Kann diese Beobachtung als sekundär, als Folge einer im Vergleich zur A-Mutanten noch weiter eingeschränkten Dimerisierungsfähigkeit der E-Mutanten eingeordnet werden?

In der Immunpräzipitation ist nicht oder nur sehr schwierig nachzuweisen, ob sich die A- und die E-Mutanten in ihrer ohnehin stark reduzierten Dimerisierungsfähigkeit unterscheiden. Bei Überexpression von p50 ließen sich allerdings im Falle der A-Mutanten in der Gelretardationsanalyse DNS-bindende Komplexe nachweisen, die wahrscheinlich aus

p50/RelB-Dimeren bestehen; für die E-Mutante wurden keine derartigen Komplexe detektiert. Dafür kommen zwei Erklärungen in Betracht: Erstens könnte die Dimerisierungsfähigkeit von RelB S368E im Gegensatz zu RelB S368A so stark gestört sein, dass eine Bildung von Dimeren auch bei einem Überangebot an p50 nicht mehr möglich ist. Zweitens wäre es möglich, dass die E-Mutante unter diesen Bedingungen ebenso Dimere bildet wie die A-Mutante, diese aber deutlich stärker in der DNS-Bindung gestört und somit in der Gelretardationsanalyse nicht nachweisbar sind.

Das ähnliche Verhalten in der Immunpräzipitation mag zunächst für letztere Hypothese sprechen. Es ist aber auch denkbar, dass tatsächlich ein Unterschied im Dimerisierungsverhalten der beiden Mutanten besteht, dieser aber unter normalen Bedingungen nicht eindeutig zum Ausdruck kommt, sondern erst unter den besonderen Bedingungen eines Überangebotes des Dimerisierungspartners. Um diese Frage experimentell zu klären, könnte man Immunpräzipitationen unter p50-Überexpression durchführen und analysieren, ob unter diesen Bedingungen Unterschiede zwischen den Mutanten bestehen.

4.3.2 DNS-Bindung von FLAG-RelB Wt und FLAG-RelB S368A

Auch FLAG-RelB Wt und FLAG-RelB S368A unterschieden sich deutlich in der DNS-Bindung; die FLAG-RelB S368A-Mutante war in der Gelretardationsanalyse im Vergleich zu FLAG-RelB Wt noch deutlich mehr gestört. Dies muss auf dem einzigen Unterschied zwischen den beiden Varianten beruhen, nämlich der S368A-Mutation. Auch wenn die Unterschiede in der Dimerisierung der beiden Proteine weniger eindrucksvoll wirken, so könnten sie als Erklärung für das unterschiedliche DNS-Bindungsverhalten doch ausreichen. Ein direkter Effekt der S368A-Mutation auf die DNS-Bindung kann allerdings auch hier nicht definitiv ausgeschlossen werden.

Die Beobachtung, dass die DNS-Bindung beider FLAG-RelB-Proteine auch im Vergleich zu Wildtyp-RelB reduziert war, lässt sich auf jeden Fall hinreichend durch die mangelnde Dimerisierung der beiden Mutanten erklären.

4.3.3 Transkriptionelle Aktivität der einzelnen RelB-Mutanten

Diejenigen Proteine, die schlechter an DNS zu binden vermögen, können auch die Transkription schlechter aktivieren. Deshalb ist die schlechtere Transaktivierungsfähigkeit von RelB S368E gegenüber RelB S368A, von RelB S368A gegenüber Wildtyp-RelB, und diejenige von FLAG-RelB S368A gegenüber FLAG-RelB Wt relativ einfach zu erklären. Die beiden FLAG-Proteine wiesen in diesem Versuch aber einen dramatischen Defekt gegenüber Wildtyp-RelB auf, während die DNS-Bindung von FLAG-RelB Wt nur mäßig gegenüber Wildtyp-RelB beeinträchtigt war. Möglicherweise besteht hier also noch ein zusätzlicher Defekt in der Fähigkeit zur transkriptionellen Aktivierung. Bei RelB sind im Gegensatz zu den anderen NF- κ B-Proteinen sowohl eine N-terminale als auch eine C-terminale Domäne zu einer effektiven transkriptionellen Aktivierung notwendig (DOBRZANSKI et al. 1993). Die N-terminale FLAG-Markierung und die Mutationen, die ebenfalls im N-Terminus liegen, könnten hier durchaus die Funktion der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (Aminosäuren 22 – 51) stören.

Interessant ist wiederum die Betrachtung der zwischen der Alanin- (RelB S368A) und der Glutamat-Mutante (RelB S368E) bestehenden Unterschiede bei Kotransfektion von p50. Während sich der Defekt der A-Mutanten in transienten Transfektionsexperimenten durch Überexpression von p50 zu einem großen Teil kompensieren ließ, war dies bei der E-Mutante nicht möglich. Dieses Ergebnis bestätigt noch einmal den Befund aus der Analyse der DNS-Bindungsfähigkeit ebenfalls nach Kotransfektion von p50. RelB S368A ist offenbar unter bestimmten Umständen noch in der Lage, mit p50 zu dimerisieren, DNS zu binden und zu transaktivieren. Der Defekt von RelB S368E ist dagegen ausgeprägter: Entweder es kann überhaupt nicht mehr, auch nicht unter p50-Überexpression, mit p50 dimerisieren oder aber das gebildete Dimer ist nicht in der Lage, an DNS zu binden. Unklar bleibt, ob eine Phosphorylierung an dieser Stelle auch im physiologischen Kontext von Bedeutung ist, ähnlich der prominenten Rolle, die Serin 276 für RelA spielt (ZHONG et al. 1998). Der beobachtete Defekt in der Transaktivierungsfähigkeit der Mutanten ist demgegenüber als sekundär, wahrscheinlich als Folge der mangelnden Dimerisierung, einzuordnen.

4.3.4 Zusammensetzung der κ B-spezifischen DNS-Bindungsaktivität

In den nukleären Extrakten von S107-Zellen wurden vier κ B-spezifische DNS-bindende Komplexe gefunden und mit (a), (b), (c) und (d) bezeichnet. Die Beobachtung, dass die Banden (a), (b) und (c) in den S107 A- und E-Klonen zum Teil stark vermindert waren, bekräftigt die Annahme, dass all diese Komplexe RelB enthalten.

Komplex (c), die Hauptkomponente der DNS-Bindungsaktivität, besteht höchstwahrscheinlich aus RelB-enthaltenden Dimeren. Die Beobachtungen aus dieser Arbeit legen nahe, dass es sich dabei hauptsächlich um p50/RelB-Heterodimere, aber auch um p52/RelB-Heterodimere handelt. Die davon abzugrenzende langsamer wandernde Komponente von (c) dürfte aus p50/RelA-Heterodimeren bestehen.

Aus früheren Arbeiten ist bereits bekannt, dass Komplex (d) wahrscheinlich aus p50-Homodimeren besteht (KIRILLOV et al. 1996). Zwar konnte dieser Komplex in der vorliegenden Arbeit mit einem p50-spezifischen Antikörper nicht beeinflusst werden, doch ist aufgrund der überzeugenden Vorbefunde und der starken Zunahme dieses Komplexes unter p50-Überexpression dennoch davon auszugehen, dass es sich um p50-Homodimere handelt.

Obwohl die definitive Zusammensetzung der Banden (a) und (b) unklar bleibt, scheint es dennoch möglich, aus den dargelegten Experimente einige interessante Schlüsse zu ziehen. Da beide Komplexe mit einem RelB-spezifischen Antikörper beeinflusst werden konnten, ist anzunehmen, dass sie beide RelB enthalten. Komplex (a) scheint neben RelB auch RelA und vor allem p50/p105 zu enthalten, während Komplex (b) sich aus RelB und p52/p100 zusammensetzen scheint. Ihre langsame Wanderungsgeschwindigkeit im Vergleich zu den anderen Komplexen könnte darauf zurückzuführen sein, dass (a) und (b) nicht die reifen Proteine p50 bzw. p52, sondern vielmehr die größeren Vorläufer p100 bzw. p105 enthalten. Beide Komplexe zeigten sich jedenfalls nur wenig beeinflusst von der p50-Überexpression; ein Hinweis, dass p50 wohl nur eine untergeordnete Rolle bei ihrer Bildung zukommt.

Einen Überblick über die Bestandteile und die mögliche molekulare Organisation der detektierten κ B-spezifischen Komplexe gibt *Tab. 1* (S. 75).

Tab. 1. Bestandteile und mögliche molekulare Organisation der κ B-spezifischen Komplexe a, b, c und d im Überblick. Siehe dazu auch die entsprechenden Gelretardationsanalysen (*Abb. 18*, S. 59).

Komplex	Bestandteile	Mögliche molekulare Organisation
a	RelA, RelB, p50/p105, (p52/p100)	Trimere aus RelA, RelB, p105?
b	RelB, p52/p100, (p50/p105)	Trimere aus RelB, p50, p100?
c	1. RelB, p50, p52 2. RelA, p50, p52	1. p50/RelB- und p52/RelB-Heterodimere 2. p50/RelA- und p52/RelA-Heterodimere
d	p50	p50/p50-Homodimere

4.3.5 Zur Hypothese multimerer NF- κ B-Komplexe

Es ist denkbar, dass (a) und (b) aus mehr als zwei NF- κ B-Proteinen bestehen und mithin trimere oder gar tetramere Komplexe repräsentieren. Diese Hypothese ist vor allem von Bedeutung im Hinblick auf Bande (a), die ja sowohl RelA als auch RelB zu enthalten scheint. Unter dieser Annahme wäre es nicht notwendig, eine direkte Assoziation zwischen RelA und RelB zu postulieren, um die Zusammensetzung dieses Komplexes und die Koimmunpräzipitation von RelA und RelB zu erklären; die Assoziation könnte indirekt über ein anderes NF- κ B-Protein, vor allem p100 oder p105, zustande kommen. Diese Hypothese wäre im Einklang mit Experimenten anderer Arbeitsgruppen, die eine direkte Interaktion zwischen RelA und RelB nicht zeigen konnten (DOBZANSKI et al. 1994), und würde auch das Ergebnis der Immunpräzipitation hinreichend erklären.

Dass NF- κ B nicht nur in dimeren, sondern auch in trimeren Komplexen vorliegt, ist seit längerem bekannt: Dies trifft beispielsweise zu für die Assoziation mit I κ B-Proteinen, zu denen in diesem Zusammenhang auch p100 und p105 zu zählen sind. Jüngste Untersuchungen zeigen, dass diese multimeren, inhibierten NF- κ B-Komplexe nicht nur im Zytoplasma, sondern auch im Zellkern anzutreffen sind. So kann p100 auch im Zellkern komplexiert mit p50/RelB vorliegen und auf diese Weise seine hemmende Funktion ausüben (DERUDDER et al. 2003). Ob die in dieser Arbeit gefundenen Banden auf ähnliche Art und Weise erklärt werden können, ist aber unklar, wurden doch in dieser Arbeit eben gerade keine

inhibierten, sondern aktive, DNS-bindende Komplexe nachgewiesen. Auch erscheint im Lichte der neuesten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen eine direkte Interaktion zwischen RelA und RelB, wie bereits erläutert, durchaus möglich (MARIENFELD et al. 2003). Zur Klärung der widersprüchlichen Ergebnisse zu diesem Thema werden weitere Untersuchungen nötig sein.

4.4 Interdependenzen zwischen RelB und NF- κ B2

Zwischen RelB und NF- κ B2 p100 scheint eine wechselseitige Abhängigkeit zu bestehen. Es ist bekannt, dass p100 als Inhibitor von RelB wirken kann. In dieser Arbeit wurde nun aufgezeigt, dass RelB seinerseits eine stabilisierende Wirkung auf p100 haben kann, indem es dessen Prozessierung zu p52 hemmt.

4.4.1 p100 als Inhibitor von RelB

Der C-Terminus von p100, auch als I κ B δ bekannt, enthält eine Domäne von Ankyrin-Wiederholungen, was dem Protein über Interaktion mit der RHD der NF- κ B/Rel-Proteine eine I κ B-ähnliche Wirkung ermöglicht. So inhibiert p100 die transkriptionelle Aktivität von p52/RelB-Heterodimeren, indem es diese im Zytoplasma zurückhält (DOBRZANSKI et al. 1995). Neuere Untersuchungen haben diese Funktion präzisiert. Es wurde nachgewiesen, dass RelB im Zytosol vorwiegend mit p100 assoziiert ist. p100 ist aber nicht auf das Zytoplasma beschränkt: Der C-Terminus von p100 enthält ein nukleäres Export-Signal (NES), das für den effektiven Rücktransport von RelB aus dem Zellkern benötigt wird (SOLAN et al. 2002).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen unterstreichen diese Befunde. In der Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen RelB und p105 sehr schwach ist, ganz im Gegenteil zu der starken Affinität von RelB gegenüber p100. Was die reifen Proteine p50 und p52 betrifft, so ließen sich die bei den Vorläuferproteinen festgestellten Unterschiede in der Affinität gegenüber RelB nicht beobachten.

4.4.2 Die Prozessierung von p100 zu p52

Einer der Streitpunkte bei der Erforschung der Prozessierung von p100 zu p52 ist die Frage, ob diese ko- oder posttranslational erfolgt; als erwiesen kann lediglich gelten, dass sie am Proteasom stattfindet. Im Vergleich zur Erzeugung von p50 aus p105 – deren Mechanismus ebenfalls noch genauerer Klärung bedarf – ist die Produktion von p52 eher gering ausgeprägt; p100 kann also keineswegs als einfaches Vorläuferprotein von p52 angesehen werden. Und während die p50-Erzeugung im allgemeinen für ein konstitutives Ereignis gehalten wird, könnte es sich bei der p52-Erzeugung um einen regulierten Vorgang handeln (BETTS und NABEL 1996; HEUSCH et al. 1999; XIAO et al. 2001; GHOSH und KARIN 2002).

Bei der Prozessierung von p100 wird der C-Terminus spezifisch bis Alanin 405 abgebaut. Das Ende des Abbaus wird dabei durch eine weiter N-terminal gelegene Glycin-reiche Region (GRR) bestimmt und nicht durch das Sequenzmotiv am Abbauende selbst. Dieser kontrollierte Abbau kann, wie auch der Abbau von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, durch Proteasomeninhibitoren gehemmt werden, während die unspezifische Degradation von p100 dadurch nicht beeinflusst wird (BETTS und NABEL 1996).

HEUSCH et al. (1999) schlagen vor, dass p52 kotranslational erzeugt wird, weil sie gefunden haben, dass die p52-Erzeugung eine *de novo*-Proteinsynthese erfordert und kein p100 in voller Länge voraussetzt. In gleicher Weise argumentieren MORDMÜLLER et al. (2003): Auf Stimulation mit $\text{LT-}\beta\text{R}$ -Agonisten und mit LPS können sie eine p52-Erzeugung nachweisen, die ebenfalls *de novo*-Proteinsynthese erfordert. Demgegenüber konnten XIAO et al. (2001) zeigen, dass NIK die Prozessierung von p100 positiv reguliert. Die Autoren stellen anhand ihrer experimentellen Daten die Hypothese auf, dass die Prozessierung mindestens zum Teil posttranslational erfolgt.

4.4.3 RelB als Inhibitor der p100-Prozessierung

Das wohl interessanteste Ergebnis dieser Arbeit besteht in dem Befund, dass die Menge des in S107-Zellen vorhandenen NF- κB 2 p52/p100 stark von der RelB-Expression abhängig ist: Die RelB-defizienten S107-Zellen enthielten wenig p100 und viel p52; dieses Verhältnis ließ sich durch die Expression funktionellen RelB-Proteins umkehren. Eine Punktmutation an Position

368 in RelB, die wie gezeigt essentiell ist für die Dimerisierungseigenschaften des Proteins, reichte aus, um diesen Effekt verschwinden zu lassen.

Es ist bekannt, dass *nfkb2* ein Zielgen von NF- κ B ist (LIPTAY et al. 1994), eine Tatsache, welche auf simple Weise den erhöhten Gehalt an p100 in den S107 RelB-Zellen, deren konstitutive NF- κ B-Aktivität ja durch Transfektion von RelB wiederhergestellt worden war, erklären könnte. Der verminderte Gehalt an p52 lässt sich damit jedoch nicht begründen. In Weiterführung dieser Arbeit konnte inzwischen gezeigt werden, dass die Halbwertszeit von p100 in Gegenwart von RelB, nicht aber in Gegenwart der Mutanten, verlängert ist. Während die Halbwertszeit von p100 in S107 RelB Wt-Zellen etwa 8 h betrug, fiel sie in S107 RelB S368A-Zellen auf etwa 2 h (MAIER et al. 2003).

Als triviale Erklärung könnte man anführen, p100 werde durch Dimerisierung mit RelB lediglich vor unspezifischem Abbau geschützt, ähnlich der Beobachtung, dass mutiertes, nicht mehr zur Dimerisierung befähigtes p100 unspezifisch, unabhängig vom Proteasom, abgebaut wird (BETTS und NABEL 1996). Da in dieser Arbeit jedoch gezeigt werden konnte, dass die Expression von funktionellem RelB nicht nur p100 stabilisiert, sondern auch die p52-Erzeugung stark reduziert, scheidet diese Erklärung aus.

Da RelA – welches auch in der Lage ist, mit p100 zu dimerisieren – diese stabilisierende Funktion nicht übernehmen kann, handelt es sich offenbar um eine spezifische Abhängigkeit zwischen RelB und NF- κ B2 p52/p100. Es ist somit anzunehmen, dass RelB die Prozessierung von p100 zu p52 negativ reguliert. Zwischen p50 und p105 besteht im übrigen keine Abhängigkeit dieser Art, denn deren Expression verhielt sich in allen untersuchten Zelllinien ähnlich.

Es stellt sich die Frage, wie diese Befunde in einen größeren Zusammenhang eingeordnet werden könnten. Denkbar ist ein Modell, gemäß dem p100 in Abwesenheit von RelB in S107-Zellen konstitutiv zu p52 prozessiert wird. In Anwesenheit von RelB könnte dies verhindert werden, indem RelB mit p100 assoziiert und es so vor Prozessierung schützt. Die Assoziation wird hierbei vielleicht über die Ankyrin-Domänen von p100 und nicht über dessen RHD vermittelt. Dieser möglicherweise kotranslational ablaufende Vorgang könnte einen Vorrat an p100/RelB-Dimeren bereitstellen und dadurch Bedeutung für den alternativen NF- κ B-Signalweg haben.

4.5 RelB, NF- κ B2 und der alternative Weg der NF- κ B-Aktivierung

Diese neuen Erkenntnisse zur möglichen Regulation der p100-Erzeugung durch RelB könnten von besonderem Interesse für den jüngst charakterisierten alternativen Signalweg der NF- κ B-Aktivierung sein. XIAO et al. (2001) hatten gezeigt, dass ektope Überexpression von NIK die ortsspezifische Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Prozessierung von p100 stimuliert. Bald darauf wurde jedoch deutlich, dass NIK wahrscheinlich nicht direkt, sondern über Aktivierung von IKK α auf p100 wirkt, denn der Effekt von NIK auf die p100-Prozessierung erwies sich in Abwesenheit von IKK α als blockiert (SENFTLEBEN et al. 2001). Der über NIK und IKK α vermittelten p100-Prozessierung folgt schließlich die Aktivierung RelB-enthaltender Dimere, die, nun nicht mehr durch p100 inhibiert, im Zellkern an DNA binden und die Transkription beeinflussen können.

4.5.1 Aktivatoren des alternativen Signalweges

Die jüngsten Untersuchungen zum alternativen NF- κ B-Signalweg widmen sich in erster Linie seinen stromaufwärts liegenden Aktivatoren. Es wurde nachgewiesen, dass der alternative Signalweg in B-Lymphozyten über CD40 (COOPE et al. 2002) und den BAFF/BlyS-Rezeptor 3 (KAYAGAKI et al. 2002) aktiviert werden kann, in nicht-lymphatischen Zellen über den Lymphotoxin- β -Rezeptor (LT- β R; DEJARDIN et al. 2002).

CD40, dessen Ligand (CD40L = CD154) auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren und fördert die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten. Obwohl CD40 auch über den klassischen NF- κ B-Signalweg wirkt, liegt der Zusammenhang zwischen p100-Prozessierung und CD40 nahe, denn es ist schon lange bekannt, dass die Stimulation von Lymphozyten mit CD40 nicht nur zu einer schnellen Aktivierung von p50/RelA, sondern auch zu einer nukleären Akkumulation von RelB führt (BERBERICH et al. 1994; NEUMANN et al. 1996). In Würdigung der neuen Erkenntnisse lässt sich diese Akkumulation recht einfach erklären: CD40 induziert die Prozessierung von p100,

und deshalb kann RelB nicht mehr im Zytoplasma zurückgehalten werden (COOPE et al. 2002).

Der B-Zell-aktivierende Faktor (BAFF, BLyS) gehört ebenfalls zur TNF-Familie und ist kritisch für die Entwicklung und das Überleben peripherer B-Lymphozyten (GROSS et al. 2001; SCHIEMANN et al. 2001). BAFF bindet an den spezifischen BAFF-Rezeptor BR3 und stimuliert, abhängig von NIK, aber unabhängig von IKK γ , die Prozessierung von p100 zu p52 (CLAUDIO et al. 2002).

LT- β R wird nicht von Lymphozyten selbst, aber von stromalen Zellen lymphatischer Organe exprimiert, und spielt eine hervorragende Rolle für die Entwicklung und Organisation lymphatischen Gewebes. Über LT- β R werden sowohl der klassische als auch der alternative NF- κ B-Signalweg aktiviert (DEJARDIN et al. 2002). Dabei werden über den klassischen Weg IKK β/γ -abhängig p50/RelA-Dimere, über den alternativen Weg IKK α -abhängig jedoch p52/RelB-Dimere und überraschenderweise auch p50/RelB-Dimere aktiviert. Es wurden auch trimere NF- κ B-Komplexe nachgewiesen, die sowohl p50 und RelB als auch p100 enthalten, was die Aktivierung von p50/RelB-Dimeren über die p100-Prozessierung erklären könnte (MÜLLER und SIEBENLIST 2003; DERUDDER et al. 2003).

4.5.2 Physiologische Einordnung des alternativen Signalweges

Gemäß den hier vorgestellten Ergebnissen könnte der alternative Signalweg auch von der RelB-Expression abhängen. Es dürfte insbesondere vor dem Hintergrund der physiologischen Bedeutung dieses Signalweges von Interesse sein, dass die Expression von RelB während der Differenzierung von B-Lymphozyten ansteigt (LIOU et al. 1994; KISTLER et al. 1998).

Untersuchungen an genetisch modifizierten Mäusen und die Analyse natürlich vorkommender Mutanten haben sich ganz allgemein als hilfreich erwiesen, die Funktionen von NF- κ B aufzuklären (GERONDAKIS et al. 1999) und haben auch einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis des alternativen Signalwegs geleistet. Durch Untersuchungen an Mauschimären konnte die wichtige Rolle der am alternativen Signalweg beteiligten IKK α für die Reifung von B-Zellen und die Bildung sekundärer lymphatischer Organe demonstriert werden (KAISHO et al. 2001; SENFLEBEN et al. 2001). Das Krankheitsbild der Alymphoplasie bei Mäusen, das auf eine Punktmutation des Gens für NIK zurückgeht, und die komplette

NIK-Defizienz manifestieren sich ebenfalls mit schweren Störungen der Entwicklung primärer und sekundärer lymphatischer Organe (SHINKURA et al. 1999; YAMADA et al. 2000; YIN et al. 2001).

Auch bei RelB- und p52-Defizienz sind ähnliche histopathologische Veränderungen zu beobachten. Dies steht beispielsweise im Gegensatz zur p50-Defizienz, die lediglich eine funktionelle Störung der Immunantwort bewirkt, aber keine Störung der Architektur lymphatischer Organe nach sich zieht (SHA et al. 1995). Mäuse mit homozygoter Inaktivierung des *relb*-Locus zeigen neben einem inflammatorischen Phänotyp anatomische Defekte in sekundären lymphatischen Organen, z.B. ist die Entwicklung des Thymusmarks und der Peyerschen Plaques gestört (BURKLY et al. 1995; WEIH et al. 1995; WEIH et al. 2001; YILMAZ et al. 2003). Auch bei homozygoter Inaktivierung des *nfk2*-Gens, bei dem weder p100 noch p52 exprimiert werden, sind Defekte der Mikroarchitektur lymphatischer Organe zu konstatieren: Die Bildung von Keimzentren ist stark beeinträchtigt und die Entwicklung der Peyerschen Plaques ist, wie schon beim RelB-Knockout, gestört (CAAMAÑO et al. 1998; FRANZOSO et al. 1998; YILMAZ et al. 2003). Eine selektive Inaktivierung von p100 oder Mutationen in dessen C-terminalen Bereich bei erhaltenem p52 sind dagegen assoziiert mit verstärkter Zellproliferation und Karzinogenese (NERI et al 1991; ISHIKAWA et al 1997; KIM et al. 2000).

All diese Beispiele zeigen die Bedeutung des alternativen Signalweges für die Entwicklung und Mikroarchitektur des Immunsystems auf. Nicht zuletzt basiert der alternative Signalweg auf dem Zusammenspiel von RelB und NF- κ B2 p52/p100, dem mit dieser Arbeit möglicherweise eine neue, interessante Facette hat hinzugefügt werden können. Es wird allerdings noch zu zeigen sein, inwieweit der in S107-Zellen gefundene Mechanismus auch auf andere B-Zellen übertragbar ist und welche physiologische Bedeutung ihm zukommt.

4.6 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Serin 368 des Proteins RelB im Gegensatz zum homologen Serin 317 des in *Drosophila* vorkommenden Proteins Dorsal nicht an der Regulation der Kerntranslokation des Proteins beteiligt ist. Stattdessen konnte nachgewiesen

werden, dass Serin 368 eine wesentliche Rolle für die Dimerisierung von RelB mit verschiedenen Partnern aus der Rel/NF- κ B-Familie spielt. Unklar ist, ob Serin 368 phosphoryliert wird und ob darüber möglicherweise die Dimerisierung von RelB reguliert wird. Im wesentlichen als Folge der mangelnden Dimerisierung sind auch die DNS-Bindung und die transkriptionelle Aktivierung der mutierten Proteine gestört. Darüber hinaus zeigt diese Arbeit, dass RelB eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung von NF- κ B2 p100 und bei der Regulation der Erzeugung von NF- κ B2 p52 spielt. Dieser Befund könnte von Bedeutung sein für den alternativen Signalweg der NF- κ B-Aktivierung. Es scheint vielversprechend, künftig die Rolle von RelB in diesem Zusammenhang genauer zu definieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Der dimere Transkriptionsfaktor NF- κ B (Nukleärer Faktor κ B) ist von zentraler Bedeutung bei der Regulation der Immunantwort, bei Entzündungsvorgängen und bei der Entwicklung des Immunsystems. Unter dem Namen NF- κ B werden bei Säugetieren die Proteine NF- κ B1 (p50 und sein Vorläufer p105), NF- κ B2 (p52 und sein Vorläufer p100), RelA, RelB und c-Rel zusammengefasst. Im unstimulierten Zustand wird NF- κ B durch inhibitorische κ B-Proteine (I κ B-Proteine) im Zytoplasma zurückgehalten. Auf ein Signal hin können die I κ B-Proteine durch die I κ B-Kinase (IKK), bestehend aus den Untereinheiten IKK α , IKK β und IKK γ , phosphoryliert und durch Ubiquitinylierung zum Abbau durch das Proteasom markiert werden. So werden NF- κ B-Dimere freigesetzt und translozieren in den Zellkern, wo sie durch Bindung an spezifische regulatorische Stellen der DNS die Gentranskription beeinflussen können. Während NF- κ B in Form von p50/RelA in den meisten Zellen in induzierbarem Zustand im Zytoplasma vorliegt, beobachtet man in reifen B-Zellen eine konstitutive Aktivität, die sich durch nukleäre, RelB-enhaltende Dimere auszeichnet. Diese sind weniger beeinflussbar durch I κ B-Proteine, was auf eine posttranslationale Modifikation von RelB, z.B. eine Phosphorylierung, zurückzuführen sein könnte.

In Drosophila sind die Rel-Proteine Dif, Dorsal und Relish bekannt. Dorsal wird im Rahmen eines Signalweges, der die dorso-ventrale Polarität des frühen Embryos determiniert, an Serin 317 phosphoryliert, ein Ereignis, das für den nukleären Import des Proteins kritisch ist. Angesichts der evolutionären Konservierung dieses Serinrestes sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob der homologe Serinrest in RelB (Serin 368) eine ähnliche Funktion für das Gesamtprotein erfüllt. Als Modellsystem wurde die murine Plasmozytom-Zelllinie S107 benutzt, die kein endogenes RelB exprimiert. Durch Transfektion wurden stabile S107-Zellklone hergestellt, die entweder Wildtyp-RelB oder mutantes RelB exprimierten. In den mutanten RelB-Formen war Serin 368 entweder durch Alanin (RelB S368A) oder Glutamat (RelB S368E) ersetzt, um einen phosphoblockierenden bzw. einen phosphomimetischen Effekt zu erzielen. Ähnliche Experimente wurden mit FLAG-markierten RelB-Mutanten durchgeführt.

Die Experimente ergaben, dass sich die subzelluläre Lokalisation der beiden Mutanten nicht von der von Wildtyp-RelB unterschied. RelB Serin 368 ist also für den Kernimport von RelB und damit für die konstitutive NF- κ B-Aktivität nicht notwendig. Stattdessen erwies sich Serin 368 als kritisch für die Dimerisierung von RelB mit allen untersuchten Partnern (p50, p52, p105, RelA), ähnlich dem ebenfalls durch Mutagenese untersuchten homologen Serinrest in RelA. Unklar ist, ob Serin 368 phosphoryliert und darüber möglicherweise die Dimerisierung von RelB reguliert wird. Als interessantes Detail erwies sich eine Koimmunpräzipitation von RelA und RelB. Im wesentlichen als Folge der mangelnden Dimerisierung waren die DNS-Bindung und die transkriptionelle Aktivierung von RelB S368A und stärker noch von RelB S368E beeinträchtigt. Die Zusammensetzung der vier κ B-spezifischen DNS-bindenden Komplexe wurde näher charakterisiert. Dabei wurden nukleäre Komplexe detektiert, die mehr als zwei NF- κ B-Proteine enthalten dürften.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von RelB, nicht jedoch der RelB-Mutanten, in S107-Zellen die p52-Expression stark reduziert und die Expression des p52-Vorläufers p100 stark erhöht. Durch ektope Expression von RelA ließ sich dieser Effekt nicht erzielen. Die Expression von p50 und dessen Vorläufer p105 zeigte sich ebenfalls unbeeinflusst. Weiterführende Untersuchungen haben ergeben, dass in S107-Zellen die Halbwertszeit von p100 in Gegenwart von RelB verlängert ist. Es ist deshalb anzunehmen, dass RelB eine stabilisierende Funktion für p100 hat und möglicherweise die Prozessierung von p100 zu p52 negativ reguliert.

Dieser Befund könnte von Bedeutung sein für den sogenannten alternativen Signalweg der NF- κ B-Aktivierung, der eine wichtige Rolle für die Entwicklung lymphatischer Organe spielt. An diesem Signalweg ist die NF- κ B-induzierende Kinase (NIK) beteiligt, die über Aktivierung von IKK α p100 phosphoryliert und so dessen Prozessierung zu p52 reguliert. Im Lichte der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse könnte dieser Vorgang von der RelB-Expression abhängen, die während der B-Zell-Differenzierung ansteigt. Eine genauere Definition der Rolle von RelB in diesem Zusammenhang scheint vielversprechend.

5.2 English Summary

The dimeric transcription factor NF- κ B (nuclear factor κ B) plays a pivotal role in the regulation of the immune response, in inflammatory processes, and in the development of the immune system. In mammals, NF- κ B consists of the proteins NF- κ B1 (p50 and its precursor p105), NF- κ B2 (p52 and its precursor p100), RelA, RelB, and c-Rel. When unstimulated, NF- κ B is retained in the cytoplasm by association with inhibitory κ B proteins (I κ B proteins). Upon a signal, the I κ B kinase (IKK), consisting of the subunits IKK α , IKK β , and IKK γ , can phosphorylate the I κ B proteins, marking them for ubiquitination and subsequent degradation by the proteasome. The NF- κ B dimers are released and can thus translocate to the nucleus, where they can influence gene transcription by binding to specific regulatory DNA sites. In most cells, an inducible form of NF- κ B, mainly consisting of the heterodimer p50/RelA, is present in the cytoplasm, but in mature B cells, a constitutive NF- κ B activity can be detected, which is characterized by nuclear, RelB-containing complexes. These complexes are less susceptible to inhibition by I κ B proteins, a fact which could possibly be due to a posttranslational modification of RelB, e.g. a phosphorylation event.

In *Drosophila*, there are three known NF- κ B/Rel family members called Dif, Dorsal, and Relish. In the course of a pathway determining the dorso-ventral polarity of the early embryo, Dorsal is phosphorylated at serine 317, an event which is critical for the nuclear import of the protein. Given the evolutionary conservation of this serine residue, the aim of this thesis was to analyze if the corresponding site in RelB, serine 368, had a similar function. The murine plasmacytoma cell line S107, which lacks endogenous RelB expression, was used as a model system. S107 cell clones stably expressing either wild type RelB or mutant RelB were generated. In the mutant forms, serine 368 was replaced by either alanine (RelB S368A) or glutamic acid (RelB S368E), in order to abolish the phosphorylation site or to mimic a phosphorylation event, respectively. Similar experiments were performed with FLAG-tagged RelB mutants.

The experiments revealed that the subcellular localization of both mutants was not different from that of wild type RelB. Thus, serine 368 is not necessary for nuclear import of RelB and constitutive NF- κ B activity. However, serine 368 could be shown to be critical for

RelB dimerization with all analyzed partner proteins (p50, p52, p105, and RelA), similar to the homologous residue in RelA (serine 281), which has also been analyzed by mutagenesis. It is unclear if serine 368 is phosphorylated and if the dimerization of RelB is regulated thereby. As an interesting detail of these studies, a co-immunoprecipitation of RelA and RelB could be detected. Essentially as a consequence of the defective dimerization, the DNA binding and transcriptional activity of RelB S368A and, even more severely, of RelB S368E, were impaired. The composition of the four κ B-specific DNA binding complexes was characterized in more detail and nuclear complexes which probably contain more than two NF- κ B proteins were detected.

Moreover, it could be shown that in S107 cells, expression of RelB, but not of RelB mutants, strongly reduces p52 expression and increases the expression of the p52 precursor protein p100. This effect was not observed upon ectopic RelA expression. The expression of p50 and its precursor p105 was also not affected. Additional experiments demonstrated that in S107 cells, the half-life of p100 is prolonged in the presence of RelB. Hence, RelB is hypothesized to have a stabilizing function for p100 and a negative regulatory effect on the processing of p100 to p52.

This finding could be of interest for the so-called alternative NF- κ B activation pathway, which plays an important role in the development of lymphatic organs. This pathway involves the NF- κ B inducing kinase (NIK), which phosphorylates p100 via activation of IKK α and thus regulates p100 processing to p52. In consideration of the experiments presented in this work, this process could depend on RelB expression, which increases during B cell differentiation. A more detailed definition of the role of RelB in this context seems to be very promising.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. **ARENZANA-SEISDEDOS, F., TURPIN, P., RODRIGUEZ, M., THOMAS, D., HAY, R. T., VIRELIZIER, J. L., DARGEMONT, C. (1997):**
Nuclear localization of I κ B α promotes active transport of NF- κ B from the nucleus to the cytoplasm.
J. Cell Sci. **110**, 369-378
2. **BALDWIN, A. S. (1996):**
The NF- κ B and I κ B Proteins: New discoveries and insights.
Annu. Rev. Immunol. **14**, 649-681
3. **BARTON, D., HOGENESCH, H., WEIH, F. (2000):**
Mice lacking the transcription factor RelB develop T cell-dependent skin lesions similar to human atopic dermatitis.
Eur. J. Immunol. **30**, 2323-2332
4. **BÄUERLE, P. A., BALTIMORE, D. (1988):**
Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF- κ B transcription factor.
Cell **53**, 211-217
5. **BAUMANN, B., KISTLER, B., KIRILLOV, A., BERGMAN, Y., WIRTH, T. (1998):**
The mutant plasmacytoma cell line S107 allows the identification of distinct pathways leading to NF- κ B activation.
J. Biol. Chem. **273**, 11448-11455
6. **BERBERICH, I., SHU, G. L., CLARK, E. A. (1994):**
Cross-linking of CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor- κ B.
J. Immunol. **153**, 4357- 4366
7. **BERGMANN, A., STEIN, D., GEISLER, R., HAGENMAIER, S., SCHMID, B., FERNANDEZ, N., SCHNELL, B., NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (1996):**
A gradient of cytoplasmic Cactus degradation establishes the nuclear localization gradient of the dorsal morphogen in *Drosophila*.
Mech. Dev. **60**, 109-123
8. **BETTS, J. C., NABEL, G. J. (1996):**
Differential regulation of NF- κ B2 (p100) processing and control by amino-terminal sequences.
Mol. Cell. Biol. **16**, 6363-6371
9. **BOURS V., AZARENKO, V., DEJARDIN, E., SIEBENLIST, U. (1994):**
Human RelB (I-Rel) functions as a κ B site-dependent transactivating member of the family of Rel-related proteins.
Oncogene **9**, 1699-1702

-
10. **BREN, G. D., SOLAN, N. J., MIYOSHI, H., PENNINGTON, K. N., POBST, L. J., PAYA, C. V. (2001):**
Transcription of the RelB gene is regulated by NF- κ B.
Oncogene **20**, 7722-7733
 11. **BURKLY, L., HESSION, C., OGATA, L., REILLY, C., MARCONI, L. A., OLSON, D., TIZARD, R., CATE, R., LO, D. (1995):**
Expression of RelB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells.
Nature **373**, 531 - 536
 12. **CAAMAÑO J. H., RIZZO, C. A., DURHAM, S. K., BARTON, D. S., RAVENTÓS-SUÁREZ, C., SNAPPER, C. M., BRAVO, R. (1998):**
Nuclear factor (NF)- κ B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses.
J. Exp. Med. **187**, 185-196
 13. **CARLOTTI, F., DOWER, S. K., QWARNSTROM, E. E. (2000):**
Dynamic shuttling of nuclear factor κ B between the nucleus and cytoplasm as a consequence of inhibitor dissociation.
J. Biol. Chem. **275**, 41028-41034
 14. **CARRASCO, D., RYSECK, R.-P., BRAVO, R. (1993):**
Expression of relB transcripts during lymphoid organ development: specific expression of in dendritic antigen-presenting cells.
Development **118**, 1221-1231
 15. **CHEN, F. E., HUANG, D. B., CHEN, Y. Q., GHOSH, G. (1998):**
Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- κ B bound to DNA.
Nature **391**, 410-413
 16. **CLAUDIO, E., BROWN, K., PARK, S., WANG, H., SIEBENLIST, U. (2002):**
BAFF-induced NEMO-independent processing of NF- κ B2 in maturing B cells.
Nat. Immunol. **3**, 958-965
 17. **COOPE, H. J., ATKINSON, P. G., HUHSE, B., BELICH, M., JANZEN, J., HOLMAN, M. J., KLAUS, G. G. B., JOHNSTON, L. H., LEY, S. C. (2002):**
CD40 regulates the processing of NF- κ B2 p100 to p52.
EMBO J. **21**, 5375-5385
 18. **DEJARDIN, E., DROIN, N. M., DELHASE, M., HAAS, E., CAO, Y., MAKRIS, C., LI, Z. W., KARIN, M., WARE, C. F., GREEN, D. R. (2002):**
The lymphotoxin- β receptor induces different patterns of gene expression via two NF- κ B pathways.
Immunity **17**, 525-535

-
19. **DERUDDER, E., DEJARDIN, E., PRITCHARD, L. L., GREEN, D. R., KORNER, M., BAUD, V. (2003):**
RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor- α and lymphotoxin- β receptor activation.
J. Biol. Chem. **278**, 23278-23284
 20. **DIXIT, V., MAK, T. W. (2002):**
NF- κ B signaling: Many roads lead to Madrid.
Cell **111**, 615-619
 21. **DOBZANSKI, P., RYSECK, R.-P., BRAVO, R. (1993):**
Both N- and C-terminal domains of RelB are required for full transactivation: role of the N-terminal leucine zipper-like motif.
Mol. Cell. Biol. **13**, 1572-1582
 22. **DOBZANSKI, P., RYSECK, R.-P., BRAVO, R. (1994):**
Differential interactions of Rel-NF- κ B complexes with I κ B α determine pools of constitutive and inducible NF- κ B activity.
EMBO J. **13**, 4608-4616
 23. **DOBZANSKI, P., RYSECK, R. P., BRAVO, R. (1995):**
Specific inhibition of RelB/p52 transcriptional activity by the C-terminal domain of p100.
Oncogene **10**, 1003-1007
 24. **DRIER, E. A., HUANG, L. H., STEWARD, R. (1999):**
Nuclear import of the Drosophila Rel protein Dorsal is regulated by phosphorylation.
Genes Dev. **13**, 556-568
 25. **FRANZOSO, G., CARLSON, L., POLJAK, L., SHORES, E. W., EPSTEIN, S., LEONARDI, A., GRINBERG, A., TRAN, T., SCHARTON-KERSTEN, T., ANVER, M., LOVE, P., BROWN, K., SIEBENLIST, U. (1998):**
Mice deficient in nuclear factor (NF)- κ B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture.
J. Exp. Med. **187**, 147-159.
 26. **GARG, A., AGGARWAL, B. B. (2002):**
Nuclear transcription factor- κ B as a target for cancer drug development.
Leukemia **16**, 1053-1068
 27. **GERONDAKIS, S., GROSSMANN, M., NAKAMURA, Y., POHL, T., GRUMONT, R. (1999):**
Genetic approaches in mice to understand Rel/NF- κ B and I κ B function: transgenics and knockouts.
Oncogene **18**, 6888-6895

-
28. **GHOSH, S., MAY, M. J., KOPP, E. B. (1998):**
NF- κ B and Rel Proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses.
Annu. Rev. Immunol. **16**, 225-260
29. **GHOSH, S., KARIN, M. (2002):**
Missing pieces in the NF- κ B puzzle.
Cell **109 Suppl.**, S81-96.
30. **GILLESPIE, S. K. H., WASSERMAN, S. A. (1994):**
Dorsal, a Drosophila Rel-like protein, is phosphorylated upon activation of the transmembrane protein Toll.
Mol.Cell.Biol. **14**, 3559-3568
31. **GILMORE, T., GAPUZAN, M. E., KALAITZIDIS, D., STARCZYNOWSKI, D. (2002):**
Rel/NF- κ B/I κ B signal transduction in the generation and treatment of human cancer.
Cancer Lett. **181**, 1-9
32. **GOVIND, S. (1999):**
Control of development and immunity by Rel transcription factors in Drosophila.
Oncogene **18**, 6875-6887
33. **GROSS, J. A., DILLON, S. R., MUDRI, S., JOHNSTON, J., LITTAU, A., ROQUE, R., RIXON, M., SCHOU, O., FOLEY, K. P., HAUGEN, H., McMILLEN, S., WAGGIE, K., SCHRECKHISE, R. W., SHOEMAKER, K., VU, T., MOORE, M., GROSSMAN, A., CLEGG, C. H. (2001):**
TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease: impaired B cell maturation in mice lacking BLyS.
Immunity **15**, 289-302
34. **HEUSCH, M., LIN, L., GELEZIUNAS, R., GREENE, W. C. (1999):**
The generation of nfkb2 p52: mechanism and efficiency.
Oncogene **18**, 6201-6208
35. **HOLZMANN, M. (1999):**
Untersuchung des Kerntransports des NF- κ B-RelB-Transkriptionsfaktors in B-Lymphozyten.
Med. Dissertation, Universität Würzburg.
36. **HUANG, D. B., HUXFORD, T., CHEN, Y. Q., GHOSH, G. (1997):**
The role of DNA in the mechanism of NF- κ B dimer formation: crystal structures of the dimerization domains of the p50 and p65 subunits.
Structure **5**, 1427-1436
37. **HUANG, T. T., KUDO, N., YOSHIDA, M., MIYAMOTO, S. (2000):**
A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I κ B α controls cytoplasmic localization of inactive NF- κ B/I κ B α complexes.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **97**, 1014-1019

-
38. **ISHIKAWA, H., CARRASCO, D., CLAUDIO, E., RYSECK, R., BRAVO, R. (1997):**
Gastric hyperplasia and increased proliferative responses of lymphocytes in mice lacking the COOH-terminal ankyrin domain of NF- κ B2.
J. Exp. Med. **186**, 999-1014
39. **JOHNSON, C., VAN ANTWERP, D., HOPE, T. J. (1999):**
An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of I κ B α .
EMBO J. **18**, 6682-6693
40. **KAISHO, T., TAKEDA, K., TSUJIMURA, T., KAWAI, T., NOMURA, F., TERADA, N., AKIRA, S. (2001):**
I κ B kinase α is essential for mature B cell development and function.
J. Exp. Med. **193**, 417-426
41. **KARIN, M., BEN-NERIAH, Y. (2000):**
Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity.
Annu. Rev. Immunol. **18**, 621-663
42. **KARIN, M., LIN, A. (2002):**
NF- κ B at the crossroads of life and death.
Nat. Immunol. **3**, 221-227.
43. **KAYAGAKI, N., YAN, M., SESHASAYEE, D., WANG, H., LEE, W., FRENCH, D. M., GREWAL, I. S., COCHRAN, A. G., GORDON, N. C., YIN, J., STAROVASNIK, M. A., DIXIT, V. M. (2002):**
BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF- κ B2.
Immunity **17**, 515-524
44. **KIM, K. E., GU, C., THAKUR, S., VIEIRA, E., LIN, J. C., RABSON, A. B. (2000):**
Transcriptional regulatory effects of lymphoma-associated NF κ B2/lyt10 protooncogenes.
Oncogene **19**, 1334-1345
45. **KIRILLOV, A., KISTLER, B., MOSTOSLAVSKY, R., CEDAR, H., WIRTH, T., BERGMAN, Y. (1996):**
A role for nuclear NF- κ B in B-cell-specific demethylation of the Ig κ locus.
Nat. Genet. **13**, 435-441
46. **KISTLER, B., ROLINK, A., MARIENFELD, R., NEUMANN, M., WIRTH, T. (1998):**
Induction of nuclear factor- κ B during primary B cell differentiation.
J. Immunol. **160**, 2308-2317
47. **LERNBECHER, T., MÜLLER, U., WIRTH, T. (1993):**
Distinct NF- κ B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation.
Nature **365**, 767-770

-
48. **LERNBECHER, T., KISTLER, B., WIRTH, T. (1994):**
Two distinct mechanisms contribute to the constitutive activation of RelB in lymphoid cells.
EMBO J. **13**, 4060-4069
49. **LIU, H.C., SHA, W. C., SCOTT, M. L., BALTIMORE, D. (1994):**
Sequential induction of NF- κ B/Rel family proteins during B-cell terminal differentiation.
Mol. Cell. Biol. **14**, 5349-5359
50. **LIPTAY, S., SCHMID, R. M., NABEL, E. G., NABEL, G. J. (1994):**
Transcriptional regulation of NF- κ B2: evidence for κ B-mediated positive and negative autoregulation.
Mol. Cell. Biol. **14**, 7695-7703
51. **MAIER, H. J., MARIENFELD, R., WIRTH, T., BAUMANN, B. (2003):**
Serin 368 is critical for RelB dimerization and p100 stabilization.
J. Biol. Chem. **278**, 39242 - 39250
52. **MARIENFELD, R., BERBERICH-SIEBELT, F., BERBERICH, I., DENK, A., SERFLING, E., NEUMANN, M. (2001):**
Signal-specific and phosphorylation-dependent RelB degradation: a potential mechanism of NF- κ B control.
Oncogene **20**, 8142-8147
53. **MARIENFELD, R., MAY, M.J., BERBERICH, I., SERFLING, E., GHOSH, S., NEUMANN, M. (2003):**
RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65.
J. Biol. Chem. **278**, 19852-19860
54. **MORDMÜLLER, B., KRAPPMANN, D., ESEN, M., WEGENER, E., SCHEIDEREIT, C. (2003):**
Lymphotoxin and lipopolysaccharide induce NF- κ B-p52 generation by a cotranslational mechanism.
EMBO Rep. **4**, 82-87
55. **MÜLLER, J. R., SIEBENLIST, U. (2003):**
Lymphotoxin β receptor induces sequential activation of distinct NF- κ B factors via separate signaling pathways.
J. Biol. Chem. **278**, 12006-12012
56. **NAUMANN, M., SCHEIDEREIT, C. (1994):**
Activation of NF- κ B in vivo is regulated by multiple phosphorylations.
EMBO J. **13**, 4597-4607

-
57. **NERI, A., CHANG, C. C., LOMBARDI, L., SALINA, M., CORRADINI, P., MAIOLO, A. T., CHAGANTI, R. S., DALLA, F. R. (1991):**
B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF- κ B p50.
Cell **67**, 1075-1087
58. **NEUMANN, M., WOHLLEBEN, G., CHUVPILLO, S., KISTLER, B., WIRTH, T., SERFLING, E., SCHIMPL, A. (1996):**
CD40, but not lipopolysaccharide and anti-IgM stimulation of primary B lymphocytes, leads to a persistent nuclear accumulation of RelB.
J. Immunol. **157**, 4862-4869
59. **POMERANTZ, J. L., BALTIMORE, D. (2002):**
Two pathways to NF- κ B.
Mol. Cell **10**, 693-695
60. **RAYET, B., GÉLINAS, C. (1999):**
Aberrant *rel/nfkb* genes and activity in human cancer.
Oncogene **18**, 6938-6947
61. **ROTH, S., STEIN, D., NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (1989):**
A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo.
Cell **59**, 1189-1202
62. **RUBEN, S. M., KLEMENT, J. F., COLEMAN, T. A., MAHER, M., CHEN, C.-H., ROSEN, C. A. (1992):**
I-Rel: a novel *rel*-related protein that inhibits NF- κ B transcriptional activity.
Genes Dev. **6**, 745-760
63. **RYSECK, R.-P., BULL, P., TAKAMIYA, M., BOURS, V., SIEBENLIST, U., DOBRZANSKI, P., BRAVO, R. (1992):**
RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF- κ B.
Mol. Cell. Biol. **12**, 674-684
64. **RYSECK, R.-P., NOVOTNY, J., BRAVO, R. (1995):**
Characterization of elements determining the dimerization properties of RelB and p50.
Mol. Cell. Biol. **15**, 3100-3109
65. **SCHIEMANN, B., GOMMERMAN, J. L., VORA, K., CACHERO, T. G., SHULGA-MORSKAYA, S., DOBLES, M., FREW, E., SCOTT, M. L. (2001):**
An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway.
Science **293**, 2012-2013.

-
66. **SEN, R., BALTIMORE, D. (1986):**
Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism.
Cell **47**, 921-928
67. **SENFTLEBEN, U., CAO, Y., XIAO, G., GRETEN, F. R., KRÄHN, G., BONIZZI, G., CHEN, Y., HU, Y., FONG, A., SUN, S. C., KARIN, M. (2001):**
Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway.
Science **293**, 1495-1499
68. **SHA, W. C., LIOU, H. C., TUOMANEN, E. I., BALTIMORE, D. (1995):**
Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses.
Cell **80**, 321-330.
69. **SHINKURA, R., KITADA K., MATSUDA, F., TASHIRO, K., IKUTA, K., SUZUKI, M., KOGISHI, K., SERIKAWA, T., HONJO, T. (1999):**
Alymphoplasia is caused by a point mutation in the mouse gene encoding NF- κ B-inducing kinase.
Nat. Genet. **22**, 74-77
70. **SOLAN, N. J., MIYOSHI, H., CARMONA, E. M., BREN, G. D., PAYA, C. V. (2002):**
RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100.
J. Biol. Chem. **277**, 1405-1418
71. **WEIH, D. S., YILMAZ, Z. B., WEIH, F. (2001):**
Essential role of RelB in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines.
J. Immunol. **167**, 1909-1919
72. **WEIH, F., CARRASCO, D., BRAVO, R. (1994):**
Constitutive and inducible Rel/NF- κ B activities in mouse thymus and spleen.
Oncogene **9**, 3289-3297.
73. **WEIH, F., CARRASCO, D., DURHAM, S. K., BARTON, D. S., RIZZO, C. A., RYSECK, R.-P., LIRA, S. A., BRAVO, R. (1995):**
Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF- κ B/Rel family.
Cell **80**, 331-340
74. **WEIH, F., DURHAM, S. K., BARTON, D. S., SHA, W. C., BALTIMORE, D., BRAVO, R. (1996):**
Both multiorgan inflammation and myeloid hyperplasia in RelB-deficient mice are T cell dependent.
J Immunol. **157**, 3974-3979.

-
75. **WEIH, F., LIRA, S. A., BRAVO, R. (1996):**
Overexpression of RelB in transgenic mice does not affect I κ B alpha levels: differential regulation of RelA and RelB by the inhibitor protein.
Oncogene **12**, 445-449.
76. **WEIH, F., WARR, G., YANG, H., BRAVO, R. (1997):**
Multifocal defects in immune responses in RelB-deficient mice.
J. Immunol. **158**, 5211-5218
77. **XIAO, G., HARHAJ, E. W., SUN, S. C. (2001):**
NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B2 p100.
Mol. Cell **7**, 401-409
78. **YAMADA T., MITANI, T., YORITA, K., UCHIDA, D., MATSUSHIMA, A. IWAMASA, K., FUJITA, S., MATSUMOTO, M. (2000):**
Abnormal immune function of hemopoietic cells from alymphoplasia (aly) mice, a natural strain with mutant NF- κ B-inducing kinase.
J. Immunol. **165**, 804-812
79. **YILMAZ, Z. B., WEIH, D. S., SIVAKUMAR, V., WEIH, F. (2003):**
RelB is required for Peyer's patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF.
EMBO J. **22**, 121-130
80. **YIN, L., WU, L., WESCHE, H., ARTHUR, C. D., WHITE, J. M., GOEDDEL, D. V., SCHREIBER, R. D. (2001):**
Defective lymphotoxin- β receptor-induced NF- κ B transcriptional activity in NIK-deficient mice.
Science **291**, 2162-2165
81. **ZHONG, H., VOLL, R. E., GHOSH, S. (1998):**
Phosphorylation of NF- κ B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300.
Mol. Cell **1**, 661-671

DANKSAGUNG

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben –

THOMAS WIRTH für die interessante Fragestellung und die Betreuung meiner Doktorarbeit,

BERND BAUMANN für die Betreuung und enge Begleitung des Projektes in allen Phasen
sowie für die Einarbeitung in Labormethoden,

DEN MITARBEITERN der Abteilung für Physiologische Chemie, insbesondere des Labors
Baumann, für die Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten und für zahlreiche
Diskussionen und Gespräche, und

MEINEN ELTERN, die mich während meiner gesamten Studienzeit unterstützt haben.