Fakultät für Naturwissenschaften
Universität Ulm

Die Rolle Lysin-spezifischer posttranslationaler Modifikationen für die Funktion des NF-κB-Faktors RelB

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
an der Fakultät für Naturwissenschaften
der Universität Ulm

vorgelegt von
Julia Ulrike Anna Leidner
aus Senden
Ulm, 2009

Dekan: Prof. Dr. Axel Groß

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Wirth
Institut für Physiologische Chemie
Universität Ulm

Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler
Institut für Allgemeine Zoologie und Endokrinologie
Universität Ulm

Tag der Promotion: 25.02.2010

Die Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden im Institut für Physiologische Chemie der Universität Ulm durchgeführt und von Herrn Juniorprofessor Dr. Ralf Marienfeld betreut.

Inhalt

1 EINLEITUNG 6

1.1 Strukturelle Charakteristika der NF-κB-Familie 6
1.2 Regulation der NF-κB-Aktivität 8
1.3 Signalwege der NF-κB-Aktivierung 9
1.3.1 Der klassische NF-κB-Signalweg 10
1.3.2 Der alternative NF-κB-Signalweg 11
1.4 Die NF-κB-Untereinheit RelB als transkriptioneller Regulator 12
1.5 Posttranslationale Modifikationen 13
1.5.1 Die Ubiquitinylierung als posttranslationale Modifikation 14
1.5.2 Posttranslationale Modifikation durch SUMOylierung 17
1.5.3 Funktionelle Regulation der NF-κB-Untereinheiten durch posttranslationale Modifikationen 19
1.6 Ziel der Arbeit 22

2 MATERIAL UND METHODEN 23

2.1 Material 23
2.1.1 Chemikalien und Reaktionssysteme 23
2.1.2 Verbrauchsmaterial 25
2.1.3 Geräte 25
2.1.4 Bakterien 26
2.1.5 Gewebekulturzellen 26
2.1.6 Nährmedien 26
2.1.7 Lösungen und Puffer 27
2.1.7.1 Allgemein verwendete Puffer 27
2.1.7.2 Gelelektrophorese 27
2.1.7.3 Lösungen und Puffer für Western Blot 27
2.1.7.4 Lösungen und Puffer für Gelretardationsexperimente 28
2.1.7.5 Lysepuffer 28
2.1.8 Enzyme 29
2.1.9 Größenmarker 30
2.1.10 Antikörper 30
2.1.11 Plasmide 31
2.1.12 Oligonukleotide 34
2.1.12.1 Oligonukleotide für PCR-Klonierungen 34
2.1.12.2 Oligonukleotide für *in vitro*-Mutagenese 35
2.1.12.3 Oligonukleotide für EMSA 36
2.1.12.4 Oligonukleotide für semiquantitative RT-PCR 36
2.1.12.5 Oligonukleotide für Sequenzierung 37

2.2 Methoden ... 37
2.2.1 Klonierung von DNA ... 37
2.2.1.1 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese ... 37
2.2.1.2 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren ... 38
2.2.1.3 Ligation von DNA-Molekülen ... 38
2.2.1.4 Transformation chemokompetenter Bakterien ... 38
2.2.2 Präparation von DNA ... 39
2.2.2.1 DNA-Isolierung aus Bakterien und DNA-Sequenzierung ... 39
2.2.2.2 Konzentrationsmessung von DNA ... 39
2.2.3 Modifikation von DNA-Molekülen ... 39
2.2.3.1 *In vitro*-Mutagenese ... 39
2.2.3.2 Amplifikation von DNA mittels PCR ... 40
2.2.4 RNA-Isolierung aus kultivierten eukaryotischen Zellen ... 41
2.2.5 Synthese von cDNA ... 42
2.2.6 Zellkultur ... 42
2.2.6.1 Kultivierung und Zentrifugation ... 42
2.2.6.2 Transfektion eukaryotischer Zellen ... 42
2.2.6.3 Induktion der Zellen ... 43
2.2.7 Präparation von Proteinextrakten aus Zelllinien ... 43
2.2.7.1 Gesamtproteinextrakte für Luziferase-Messungen ... 44
2.2.7.2 Gesamtproteinextrakte für Western Blot ... 44
2.2.7.3 Gesamtproteinextrakte für die Gelretardationsanalyse ... 44
2.2.7.4 Zytoplasmatische und nukleäre Proteinextrakte ... 44
2.2.7.5 Bradford-Proteinbestimmung ... 45
2.2.8 Luziferase-Messung ... 45
2.2.9 Western Blot ... 46
2.2.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ... 46
2.2.9.2 Transfer auf Nitrozellulose-Membran und Immun-Detektion ... 47
2.2.10 Immunpräzipitation ... 47
2.2.11 *In vivo*-Ubiquitinylierungs-Assay ... 48
2.2.12 *In vivo*-SUMOylierungs-Assay ... 48
2.2.13 DNA/Protein-Bindungsstudien ... 49
2.2.13.1 Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide ... 49
2.2.13.2 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden ... 49
2.2.13.3 Gelretardationsanalyse ... 50

3 ERGEBNISSE ... 51

3.1 Posttranslationale Modifikationen des RelB-Proteins ... 51
3.2 Regulation der RelB-Degradierung durch posttranslationale Modifikationen des RelB-Proteins ... 51
3.3 Etablierung eines *in vivo*-Ubiquitinylierungs-Assays ... 53

3.4 Bedeutung der Ubiquitinylierung für die Stabilität von RelB 55
3.5 Charakterisierung der RelB-konjugierten Polyubiquitinketten 57
3.6 Einfluss der Ubiquitinylierung auf die transkriptionelle Aktivität von RelB 58
3.7 Relevanz der RelB-DNA-Bindungsfähigkeit für die nicht-proteasomale RelB-Ubiquitinylierung 61
3.8 Effekt der RelB-Ubiquitinylierung auf DNA-Bindung und subzelluläre Lokalisation. 63
3.9 Einfluss des alternativen NF-κB-Signalweges auf die RelB-Ubiquitinylierung..... 66
3.10 Identifizierung der ubiquitinylierten RelB-Domäne..... 67
3.11 Spezifizierung der ubiquitinylierten Lysinreste im RelB-Protein..... 69
3.12 Analyse der RelB-SUMOylierung durch SUMO1 und SUMO2..... 74
3.13 Lokalisierung der SUMOylierung innerhalb des RelB-Proteins 77
3.14 Analyse der endogenen RelB-SUMOylierung 79
3.15 Analyse der RelB-Daxx-Interaktion..... 81
3.16 Funktionelle Analyse der RelB-SUMOylierung 86

4 DISKUSSION.....92

4.1 Stellung von RelB im NF-κB-Transkriptionssystem..... 92
4.2 Rolle der Ubiquitinylierung in der Signal-induzierten RelB-Degradierung 93
4.3 Nicht-proteasomale Effekte der basalen RelB-Ubiquitinylierung 94
4.4 Bedeutung der nicht-proteasomalen Ubiquitinylierung für die transkriptionelle Aktivität von RelB..... 96
4.5 Lokalisierung der ubiquitinylierten RelB-Domäne..... 97
4.6 Identifizierung essenzieller Lysinreste im RelB-Protein..... 98
4.7 Nachweis und Charakterisierung der RelB-SUMOylierung 100
4.8 Relevanz der RelB-SUMOylierung für die Interaktion mit Daxx..... 102
4.9 Lokalisierung der RelB-Daxx-Interaktionsdomänen 103
4.10 Effekte der RelB-SUMOylierung auf die transkriptionelle Aktivität und die DNA-Bindung von RelB 104

5 ZUSAMMENFASSUNG.....108

5.1 Deutsche Zusammenfassung 108
5.2 Englische Zusammenfassung (Summary)..... 109

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....110

7 LITERATURVERZEICHNIS.....115

VERÖFFENTLICHUNGEN.....124

ERKLÄRUNG.....126

DANKSAGUNG 127

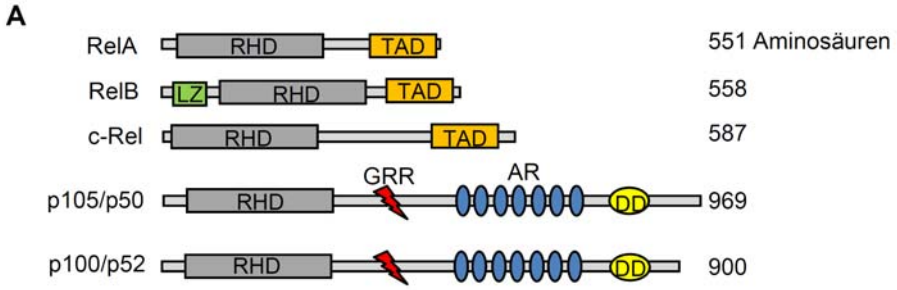
LEBENSLAUF 128

1 Einleitung

Für den Organismus ist es essenziell gezielt auf diverse Umwelteinflüsse wie Bakterien oder Viren, UV-Strahlung oder sonstige Noxen reagieren zu können. Diese Stimuli führen zu einer temporären und/oder gewebsspezifischen Veränderung der Genexpression. Verantwortlich für die Kontrolle der Transkription bestimmter Gene sind unter anderem Transkriptionsfaktoren. Dies sind spezifische Proteine, die spezielle DNA-Sequenzen erkennen und nach erfolgter Bindung an diese Promotor-internen Bereiche die Transkription ihrer Zielgene beeinflussen.
Eine wichtige und seit langem im Brennpunkt der Forschung stehende Transkriptionsfaktor-Familie ist die NF-κB-Familie (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Das erste dieser Familie angehörige Protein wurde vor über zwanzig Jahren als ein Regulator der Genexpression der Immunglobulin kappa-leichten Kette in B-Zellen identifiziert (Sen and Baltimore, 1986). Im Laufe der Zeit wurde jedoch deutlich, dass NF-κB ubiquitär exprimiert wird. Nach heutigen Kenntnissen stellt dieser Transkriptionsfaktor einen zentralen Mediator in Immun- und Entzündungsreaktionen, der Zelldifferenzierung und der Zellproliferation dar (Ghosh and Karin, 2002; Hayden and Ghosh, 2004).

1.1 Strukturelle Charakteristika der NF-κB-Familie

In Säugetieren sind fünf Mitglieder der NF-κB-Familie bekannt (Abb.1.1A): RelA (p65), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF-κB1) und p100/p52 (NF-κB2). Diese lassen sich aufgrund ihrer Struktur in zwei Gruppen einteilen. Die Proteine der ersten Gruppe, p50 und p52, werden als inhibitorische Vorläuferproteine p105 (NF-κB1) bzw. p100 (NF-κB2) synthetisiert, aus welchen erst durch proteolytische Prozessierung des Carboxyterminus die reifen Proteine p50 und p52 hervorgehen. Die Mitglieder der zweiten Gruppe sind die sogenannten Rel-Proteine, bestehend aus RelA, RelB und c-Rel. Sie tragen carboxyterminale Transaktivierungsdomänen und werden direkt als reife Proteine gebildet (Hayden and Ghosh, 2008; Zhong et al., 2002).



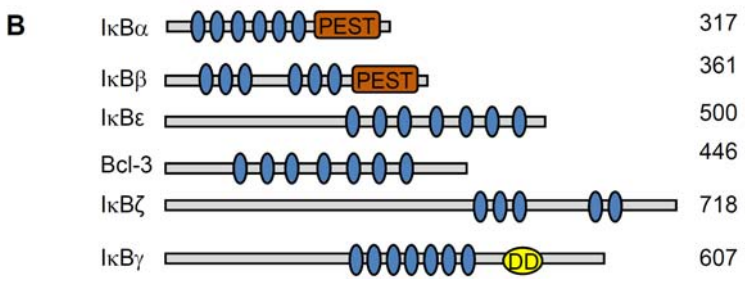


Abb.1.1: Die NF-κB- und IκB-Proteinfamilien
A, Schematische Darstellung der Mitglieder der NF-κB-Familie. AR, Ankyrin Wiederholungen; DD, Todesdomäne; GRR, Glycinreiche Region; LZ, Leucinzipper; RHD, Rel-Homologie-Domäne; TAD, Transaktivierungsdomäne **B,** Schematische Darstellung der IκB Proteine. PEST, Prolin-Glutamat-Serin-Threonin-reiche Region; nach (Perkins, 2006).

Essenziell für die Bindung der NF-κB-Transkriptionsfaktoren an die DNA und damit deren Funktionalität, ist die Bildung von Dimeren aus den fünf Mitgliedern der NF-κB-Familie. Dabei können entweder Homodimere oder Heterodimere in fast beliebiger Kombination gebildet werden. Häufig treten Dimere bestehend aus Rel-Proteinen in Kombination mit p105/p50 oder p100/p52 auf, wobei das klassische und am besten charakterisierte Heterodimer aus RelA und p50 zusammengesetzt ist (Ghosh et al., 1998). Eine Ausnahme bezüglich der Dimerisierungs-Variabilität stellt der NF-κB-Faktor RelB dar. Dieser bildet ausschließlich mit p50 und p52 transkriptionell aktive Heterodimere. RelB-Homodimere wurden, ebenso wie RelB/RelA- und RelB/c-Rel-Heterodimere, beschrieben, über die Funktion dieser Dimere herrscht bisher jedoch keine Klarheit. Es wird vermutet, dass das RelB-Homodimer eine vorübergehende RelB-Stabilisierung herbeiführt, um das Protein anschließend für die Dimerisierung mit p50 bzw. p52 freizugeben (Dobrzanski et al., 1994; Huang et al., 2005; Marienfeld et al., 2003).

Die Entstehung von Homodimeren aus p50 oder p52 führt aufgrund der fehlenden Transaktivierungsdomäne (TAD) in diesen Proteinen zur Inhibierung der Transkription der Zielgene (Schulze-Luehrmann and Ghosh, 2006). RelA, RelB und c-Rel hingegen weisen eine Transaktivierungsdomäne auf, durch welche es den Rel-Proteinen erleichtert wird Koaktivatoren zu rekrutieren bzw. Korepressoren zu entfernen und so transkriptionell aktiv zu werden (Hayden and Ghosh, 2008).

Bezüglich der TAD bildet das RelB-Protein eine strukturelle Ausnahme, da es als einziger NF-κB-Faktor sowohl am Aminoterminus, als auch am Carboxyterminus eine solche Domäne aufweist. Beide Domänen sind essenziell für ein vollständiges Transaktivierungspotential von RelB (Dobrzanski et al., 1993). Das charakteristische Strukturelement der aminoterminalen TAD von RelB ist eine Leucinzipperdomäne (LZ). Grundsätzlich sind Leucinzipperdomänen in der Lage nicht-kovalente Protein-Protein-Interaktionen durch eine (homotypische) Bindung mit einer weiteren Leucinzipperdomäne zu vermitteln. Mit welchen Faktoren RelB über die LZ-Domäne interagiert ist bisher jedoch noch nicht beschrieben worden.

Eine Gemeinsamkeit, die alle Mitglieder der NF-κB-Familie aufweisen, ist die etwa 300 Aminosäuren lange aminoterminale Rel-Homologie-Domäne (RHD). Diese Domäne ist verantwortlich für die spezifische DNA-Bindung, die Dimerisierung, die Kerntranslokation und die Interaktion der NF-κB-Faktoren mit den inhibitorischen Proteinen der IκB-Familie (Hayden and Ghosh, 2004; Hayden and Ghosh, 2008; Perkins, 2006).
Die DNA-Bindung der NF-κB-Dimere erfolgt durch die RHD an einer spezifischen Konsensussequenz der DNA, die typischerweise aus zehn Basenpaaren besteht: $^{5'}$GGGRNWYYCC$^{3'}$ (N=beliebige Base, R=Purin, W=Adenin oder Thymin, Y=Pyrimidin). Geringfügige Variationen dieser Bindungsstellen führen bereits zu einer verminderten Bindungsaffinität von NF-κB. Des Weiteren zeigen die Dimere bereits aufgrund ihrer Komposition Differenzen in der Affinität für bestimmte Varianten der Bindungsstellen (Hayden and Ghosh, 2008). Die Tatsache, dass die NF-κB-Dimere aus mehreren Untereinheiten variabel zusammengesetzt werden, welche je nach Zelltyp und Entwicklungsstadium unterschiedlich stark exprimiert werden, ermöglicht eine differenzielle Regulation der Transkription einer Vielzahl von Genen. Posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen, Acetylierungen, Ubiquitinylierungen oder SUMOylierungen stellen darüber hinaus eine Möglichkeit zur Feinregulation der Aktivität der NF-κB-Komplexe dar (Perkins, 2006).

1.2 Regulation der NF-κB-Aktivität

Die Kontrolle der NF-κB-Aktivität ist aufgrund der essenziellen Rolle für die Transkription einer Vielzahl von Genen, welche unter anderem in physiologische und patho-physiologische zelluläre Prozesse involviert sind, ein sehr wichtiger Gesichtspunkt. Während NF-κB nur in einigen Immunzellen, wie reifen B-Zellen, als konstitutiv aktives Heterodimer im Zellkern vorliegt, liegt es in den meisten anderen Zellen vorwiegend als inaktiver Komplex im Cytosol vor. Verantwortlich für die cytosolische Retention des NF-κB-Dimers ist dessen Interaktion mit einem Vertreter der IκB-Familie. Erst die Degradierung der Inhibitorproteine führt zur Freisetzung der NF-κB-Dimere und nachfolgend zu deren Translokation in den Zellkern, um dort die Transkription der Zielgene zu regulieren.
Zur Familie dieser inhibitorischen Proteine, welche in Abbildung 1.1B schematisch dargestellt sind, gehören unter anderem IκBα, IκBβ und IκBε. Des Weiteren werden die Vorläuferproteine p100 (IκBδ) und p105 dazu gezählt. Durch einen alternativen Spleißvorgang bei der Transkription des *NFKB1*-Gens kann zudem anstelle des vollständigen p105-Proteins das IκBγ-Protein entstehen, welches mit dem Carboxyterminus von p105 identisch ist. Zu dem entsprechenden Protein p100/IκBδ gibt es hingegen noch keine ausreichenden Informationen (Basak et al., 2007; Hayden and Ghosh, 2008). Ein 30 bis 33 Aminosäuren umfassendes Ankyrinmotiv stellt das Charakteristikum dieser Proteinfamilie dar (Abb.1.1B). Alle Mitglieder

weisen dieses Motiv auf, jedoch mit einer unterschiedlichen Anzahl an Wiederholungen. Die Ankyrinmotive interagieren mit Bereichen der RHD des NF-κB-Proteins. Dabei maskieren die IκB-Proteine die Kernlokalisationssequenz (NLS) der NF-κB-Proteine und verhindern so eine Translokation durch die Importin-alpha-Familie in den Zellkern (Fagerlund et al., 2005; Fagerlund et al., 2008).

Zwei weitere induzierbar exprimierte IκB-Proteine sind die atypischen IκB-Proteine IκBζ und Bcl-3, welche sich in der Art und Weise ihrer Bedeutung für die NF-κB-Regulation von den Übrigen unterscheiden. Speziell zu erwähnen ist, dass die Proteine Bcl-3 und IκBζ aufgrund der vorhandenen Ankyrinmotive strukturell gesehen der IκB-Familie angehören, sich funktionell jedoch stark von diesen unterscheiden. Sie fungieren nicht als inhibitorische Proteine, sondern weisen ein Transaktivierungspotential auf. Durch die Interaktion mit spezifischen NF-κB-Dimeren sind sie deshalb in der Lage die NF-κB-Zielgenexpression selektiv zu regulieren (Hacker and Karin, 2006; Hayden and Ghosh, 2008).

Eine Voraussetzung für die zuvor erwähnte Degradierung der IκB-Proteine ist deren Phosphorylierung durch die IκB-Kinasen (IKKs). Diese Kinasen liegen in einem Multienzymkomplex mit einem Molekulargewicht von 700-900kDa vor, der aus den katalytischen Untereinheiten IKKα (IKK1) und IKKβ (IKK2) und der regulatorischen Untereinheit IKKγ (NEMO, *NF-κB essential modulator*) besteht. IKKα und IKKβ, welche in ihrer Sequenz zu 50% identisch sind, beinhalten beide eine aminoterminale Kinasedomäne, eine Leucinzipperdomäne und eine Helix-Loop-Helix-Domäne. Sie interagieren mit NEMO über eine carboxyterminal gelegene NEMO-Bindungs-Domäne (NBD) und dimerisieren miteinander über die zentral gelegene Leucinzipperdomäne (DiDonato et al., 1997; Rothwarf et al., 1998; Yamaoka et al., 1998; Zandi et al., 1997). NEMO weist verschiedene strukturelle Merkmale wie zwei Coiled-coil-Domänen, eine Leucinzipperdomäne und ein Zinkfinger-Motiv auf. Die Domäne, über die NEMO mit IKKα und IKKβ interagiert, befindet sich am Aminoterminus dieses Proteins, wohingegen die Domäne, welche die Aktivierung des IKK-Komplexes und die Interaktion mit übergeordneten Signal-Adapter-Proteinen vermittelt, im Carboxyterminus lokalisiert ist (Hayden and Ghosh, 2008; Makris et al., 2002). NEMO ist für die Stabilität und den korrekten Zusammenbau des Kinase-Komplexes notwendig, indem beispielsweise IKKα/IKKβ-Heterodimere durch die Interaktion zwischen zwei NEMO-Proteinen zusammengehalten werden (Miller and Zandi, 2001).

1.3 Signalwege der NF-κB-Aktivierung

Die NF-κB-Aktivierung erfolgt im Allgemeinen entweder über den klassischen oder über den alternativen NF-κB-Signalweg. Bisher richtet sich diese Differenzierung danach, ob IKKα oder IKKβ als Kinase für die Aktivierung notwendig ist. Aufgrund aktueller Untersuchungen scheint es

zukünftig jedoch sinnvoller zu sein, die Signalwege je nach Notwendigkeit von NEMO bzw. je nach dem spezifischen IκB-Protein, welches phosphoryliert/degradiert wird, in klassisch oder alternativ einzuteilen (Hayden and Ghosh, 2008). Die folgende Erläuterung richtet sich nach der bisherigen Charakterisierung der beiden Aktivierungswege (siehe Abb. 1.2).

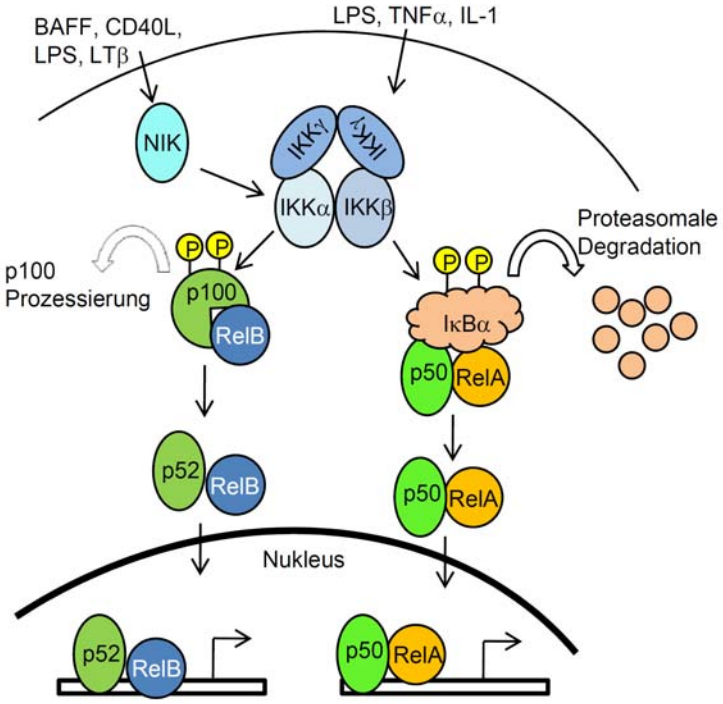


Abb.1.2: Modell der NF-κB-Aktivierung: alternativer (links) und klassischer NF-κB-Signalweg (rechts)
Der alternative Signalweg wird z.B. durch BAFF, CD40L, LPS und LTβ aktiviert und führt über die Proteinkinasen NIK und IKKα zur p100-Prozessierung, woraufhin p52/RelB-Heterodimere in den Zellkern wandern und spezifische Zielgene aktivieren. Der klassische Signalweg kann z.B. durch LPS, TNFα und IL-1 induziert werden und führt über NEMO/IKKβ zum Abbau von IκBα und somit zur Aktivierung von p50/p65-Heterodimeren; nach (Gilmore, 2006).

1.3.1 Der klassische NF-κB-Signalweg

Der klassische NF-κB-Signalweg lässt sich durch eine Vielfalt von Stimuli aktivieren. Die wichtigsten sind inflammatorische Zytokine wie TNFα und IL-1, Bakterien (und deren Produkte, z.B. LPS), Viren, Liganden von Immunrezeptoren, Stress-Signale wie oxidativer Stress oder Umwelteinflüsse wie UV- und Röntgen-Strahlung (Karin and Ben-Neriah, 2000). Die Stimulation durch diese NF-κB-Aktivatoren mündet generell in der Phosphorylierung der IκB-Kinasen an zwei speziellen Serinresten in der sogenannten Aktivierungsschleife, jedoch unterscheiden sich die daran beteiligten Signalkaskaden sehr. Die Aktivierung der IκB-Kinasen führt wiederum zur Phosphorylierung der IκB-Proteine. Im klassischen Weg der NF-κB-Aktivierung spielt die IκB-Kinase β die Hauptrolle und führt vor allem zur Phosphorylierung kleiner IκB-Proteine, wie z.B. des IκBα-Proteins an den Serinresten 32 und 36 (Ser^{32} und Ser^{36}) (bzw. Ser^{19} und Ser^{23} des

IκBβ-Proteins und Ser^{157} und Ser^{161} des IκBε-Proteins), welches das Heterodimer p50/p65 durch Bindung im Cytoplasma zurückhält. Nähere Untersuchungen ergaben, dass der Komplex aus Inhibitor und NF-κB-Dimer keineswegs ausschließlich im Cytoplasma verbleibt, sondern konstant zwischen Nukleus und Cytoplasma pendelt (Whiteside et al., 1997). Das liegt daran, dass IκBα zwar die NLS von p65 maskiert, jedoch nicht jene von p50. Diese weiterhin freiliegende NLS führt in Kombination mit der nukleären Exportsequenz (NES) des IκBα-Proteins zu einem dynamischen Gleichgewicht von nukleärem Import und Export des Komplexes. Erst die IκBα-Degradierung verschiebt das Gleichgewicht zugunsten der nukleären NF-κB-Lokalisation (Dixit and Mak, 2002; Hayden and Ghosh, 2008). Das phosphorylierte IκBα wird anschließend an den Lysinresten 21 und 22 durch einen Ubiquitinligase-Komplex der $SCF^{\beta\text{-TRCP}}$ (Skp1-Cullin-F-Box)-Familie, mit β-TRCP als Substrat-Erkennungseinheit des Ligase-Komplexes, ubiquitinyliert (Ang and Wade Harper, 2005; DiDonato et al., 1996; Hayden and Ghosh, 2004; Kroll et al., 1999; Winston et al., 1999). Als Konsequenz wird das ubiquitinylierte IκBα-Protein vom 26S-Proteasom erkannt und abgebaut, wodurch die NF-κB-Dimere freigesetzt werden und ungehindert in den Kern gelangen können. Die von NF-κB kontrollierten Gene sind vor allem in fundamentale physiologische und patho-physiologische zelluläre Prozesse, wie die Kontrolle des Immunsystems oder die Regulation von Entzündungen und Apoptose, involviert (Abb. 1.2, rechter Teil) (Scheidereit, 2006).

Die IκB-Proteine des klassischen NF-κB-Signalweges sind neben dem üblicherweise beschriebenen IκBα auch IκBβ und IκBε. IκBα wird während der Aktivierung des klassischen NF-κB-Signalweges sehr schnell degradiert und als NF-κB-Zielgen wieder neu synthetisiert, wodurch ein negativer Rückkopplungsmechanismus eingeleitet wird und eine oszillatorische NF-κB-Antwort entsteht. IκBβ und IκBε werden hingegen sehr langsam degradiert und ebenso langsam resynthetisiert, wodurch die NF-κB-Antwort stabilisiert wird. Die funktionellen Charakteristika dieser drei klassischen Inhibitorproteine liegen folglich in temporär unterschiedlich auftretender Degradierung und Neusynthese begründet (Hoffmann et al., 2002).

1.3.2 Der alternative NF-κB-Signalweg

Der alternative Signalweg lässt sich durch einen spezifischen Satz der Stimuli aktivieren, welche größtenteils auch den klassischen Signalweg induzieren. Dazu gehören Zytokine (Lymphotoxin β (LT-β), B-Zell-aktivierender Faktor (BAFF), CD40-Ligand, Rezeptor Aktivator von NF-κB Ligand (RANKL)) oder auch Viren wie der Epstein-Barr Virus (EBV) (Claudio et al., 2002; Hayden and Ghosh, 2004; Neumann and Naumann, 2007). Im alternativen Signalweg findet die Aktivierung des p52/RelB-NF-κB-Dimers unabhängig von NEMO und IKKβ statt und basiert auf den Proteinkinasen NIK und IKKα. In welcher Konstellation IKKα dabei vorliegt, ob

im IKK-Komplex oder als Monomer, ist bisher nicht geklärt, ebenso wenig ist über jene Ereignisse, die zur Aktivierung von NIK führen, bekannt (Ramakrishnan et al., 2004).

Im Zentrum des alternativen NF-κB-Signalweges steht die Prozessierung des Vorläuferproteins p100 zum reifen p52-Protein. Dabei ist p100 an RelB gebunden und übernimmt im alternativen NF-κB-Signalweg die entsprechende Rolle eines IκB-Proteins, da der Carboxyterminus dieses noch unprozessierten Vorläufers sieben Ankyrinwiederholungen beinhaltet (Hoffmann et al., 2006).

Nach der Stimulation kommt es zur Aktivierung der NF-κB-induzierenden Proteinkinase (NIK), die im Signalweg direkt oberhalb von IKKα liegt (Malinin et al., 1997; Xiao et al., 2001). Die Aktivierung von NIK führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von IKKα. Anschließend werden die carboxyterminalen Serinreste 866, 870 und 872 des p52-Vorläuferproteins p100, phosphoryliert (Abb. 1.2, linker Teil) (Liang et al., 2006). Die Phosphorylierung von p100 ist essenziell für die folgende Polyubiquitinylierung am Lysinrest 855 und die proteasomale Prozessierung des Carboxyterminus von p100, woraus die reife p52-Untereinheit hervorgeht (Amir et al., 2004). Das p52/RelB-Dimer transloziert nun in den Nukleus und kontrolliert die Expression spezifischer Zielgene, welche in die Entwicklung sekundärer lymphatischer Gewebe, die Proliferation und in das Überleben und die Reifung von B-Zellen involviert sind (Dejardin, 2006; Dejardin et al., 2002; Hayden and Ghosh, 2008; Scheidereit, 2006; Senftleben et al., 2001).

Ein weiteres Charakteristikum des alternativen Signalweges stellt die langsame Kinetik dar. Die Zeit zwischen der Stimulation und dem Beginn der p100-Prozessierung kann Stunden betragen, während die IκBα-Degradierung im klassischen Signalweg je nach Stimulus bereits nach wenigen Minuten auftreten kann. Des Weiteren führt der alternative Signalweg zu einer lang anhaltenden NF-κB-Aktivierung und ist abhängig von einer aktiven Proteinbiosynthese (Scheidereit, 2006; Vaira et al., 2008). Die beiden beschriebenen Signalkaskaden sind jedoch miteinander verknüpft, da nicht nur gleiche Stimuli zur deren Aktivierung führen, sondern die Transkription der für den alternativen Weg essenziellen Proteine p100 und RelB vom kanonischen Signalweg kontrolliert wird (Scheidereit, 2006).

1.4 Die NF-κB-Untereinheit RelB als transkriptioneller Regulator

Wie weiter oben beschrieben, ist RelB ein Transkriptionsfaktor der NF-κB-Familie und reguliert in dieser Eigenschaft die Transkription spezifischer Zielgene wie beispielsweise *Survivin, Birc3, c-Flip, Dapk1, Ccl5, ELC, Il-12p40* und *Bcl-xl* (Croxton et al., 2006; Jacque et al., 2005; Puto and Reed, 2008). Eine Besonderheit des RelB-Proteins ist es, dass dieser NF-κB-Faktor sowohl als transkriptioneller Aktivator, als auch als Repressor fungieren kann. Dabei kommt es jedoch zu zelltypspezifischen und genspezifischen Unterschieden. Beispielsweise agiert RelB in

Makrophagen als transkriptioneller Aktivator für NF-κB-regulierte Gene wie *Tnf-alpha* (nach LPS oder LPS und IFNγ-Stimulation) (Weih et al., 1997), während es in nicht-lymphoiden Zellen wie Fibroblasten als Repressor am TNFα-Promotor auftritt (Xia et al., 1999). Daher zeigen RelB-defiziente Fibroblasten sowohl basal, als auch nach LPS-Stimulation eine starke Überexpression der Zytokine IL-1α, IL-1β oder TNFα (Xia et al., 1999; Xia et al., 1997). Auch in der Tumorgenese spielt RelB eine Rolle, da es neben den oben beschriebenen antiapoptotischen Faktoren beispielsweise auch durch die Induktion des Gens für die antiapoptotisch wirkende Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) in Prostatakarzinom-Zellen radioprotektive Wirkung zeigt (Josson et al., 2006).
Welche molekularen Mechanismen der Regulation der Funktion von RelB zugrunde liegen ist bisher weitgehend unbekannt. Es ist allerdings beschrieben, dass die transkriptionelle Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden kann.

1.5 Posttranslationale Modifikationen

Proteine können vom Organismus durch posttranslationale Modifikationen (PTMs) der Aminnosäurereste in ihren Eigenschaften wie beispielsweise ihrer Aktivität, der Lokalisierung, der Stabilität und Protein-Protein-Interaktionen beeinflusst werden. Phosphorylierungen können beispielsweise zu Konformationsänderungen des Zielproteins führen und können so Enzyme aktivieren (IκB-Kinasen) oder deaktivieren (Glykogen-Synthase-Kinase). Des Weiteren kann die Phosphorylierung als Signal für weitere posttranslationale Modifikationen dienen (Ubiquitinylierung von IκBα). Zu den bekanntesten posttranslationalen Modifikationen zählen die Serin-, Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung, die Lysin-Acetylierung, die Lysin- und Arginin-Methylierung sowie die Lysin-Ubiquitinylierung und -SUMOylierung. Die Seitenkette eines Lysinrests stellt somit das Ziel verschiedener posttranslationaler Modifikationen dar (Yang and Seto, 2008).
Das aminoterminale Ende des Histon H3-Proteins stellt mit Acetylierung und Biotinylierung von Lysinresten, der Arginin- und Lysin-Methylierung und der Serin- und Threonin-Phosphorylierung ein gutes Beispiel für eine hohe Dichte und Variabilität der posttranslationalen Modifikationen dar. Beispielsweise können an dem Lysinrest an Position 9 des Histon H3-Proteins verschiedene posttranslationale Modifikationen auftreten: die Lys^9-Acetylierung steht im Zusammenhang mit aktiver Transkription und blockiert eine Methylierung dieses Lysins, wohingegen die Methylierung von Lys^9 mit einer Reduktion der Transkription assoziiert wird und eine Lys^9-Acetylierung blockiert (Latham and Dent, 2007). Ebenso wie sich Acetylierung und Methylierung hemmen, können auch die posttranslationalen Modifikationen SUMOylierung und Ubiquitinylierung beispielsweise am IκBα-Protein direkt um denselben Lysinrest konkurrieren und zur Maskierung der Erkennungsregion der jeweils anderen Modifikation führen (Desterro et

al., 1998). Diese Beispiele zeigen bereits, dass die Wechselwirkungen zwischen den posttranslationalen Modifikationen und die dadurch ausgelösten Signale sehr komplex sind.
Die Erkennung von posttranslationalen Modifikationen erfolgt durch spezifische Erkennungs-/Bindungsdomänen der zu rekrutierenden Proteine wie Ubiquitin-Bindungsdomänen (UBDs) oder Phospho-Bindungsdomänen (Hunter, 2007). Sowohl die Ubiquitinylierung als auch die SUMOylierung sind Modifikationen, die für die Regulation vieler zellulärer Prozesse essenziell sind und als Modifikation in Form proteinöser Einheiten vielseitiger und flexibler sind als beispielsweise Phosphorylierung oder Acetylierung (Grabbe and Dikic, 2009).

1.5.1 Die Ubiquitinylierung als posttranslationale Modifikation

Ubiquitin ist ein kleines, ubiquitär exprimiertes Peptid von 76 Aminosäuren (AS) und einem ungefähren Molekulargewicht von 8kDa. Durch die kovalente Bindung einer oder mehrerer Ubiquitineinheiten an die Lysinreste (Lys) von Proteinen kommt es zur sogenannten Ubiquitinylierung (Abb. 1.4). Dadurch werden diverse biologische Prozesse wie beispielsweise Proteinstabilität und Proteininteraktionen, Zellzyklus, DNA-Replikation und -Reparatur sowie Apoptose reguliert (Haglund and Dikic, 2005). Anomalien des Ubiquitinsystems sind daher als Bestandteil der Pathogenese einiger Krankheiten des Menschen wie dem Angelman-Syndrom und dem Liddle-Syndrom beschrieben (Kornitzer and Ciechanover, 2000). Des Weiteren spielen die einzelnen Komponenten des Ubiquitinsystems (siehe Abb. 1.3) eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese. Ubiquitin-Ligasen können beispielsweise abhängig von ihrer Substratspezifität und dem Gewebe, in dem sie auftreten, als Tumor-Aktivator oder -Suppressor agieren (Hoeller and Dikic, 2009). Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt ist die Ubiquitinylierung von Transkriptionsfaktoren, deren transkriptionelle Aktivität auf diese Weise beeinflusst werden kann. Die Ubiquitinylierung des Transkriptionsfaktors Myc durch die HectH9 E3-Ubiquitinligase ist beispielsweise für die Aktivierung zahlreicher Zielgene dieses Transkriptionsfaktors erforderlich. Eine Erklärung stellt hier die durch die Myc-Ubiquitinylierung herbeigeführte Rekrutierung des Koaktivators p300 dar (Adhikary et al., 2005).
Die Ubiquitinylierung ist eine induzierbare, reversible Modifikation, die durch spezielle Ubiquitin-Bindungs-Domänen (UBD) von anderen Proteinen erkannt wird und daher als signalgebendes System fungiert. Die TAK1-bindenden Proteine TAB2 und TAB3 oder HDAC6 (Histondeacetylase 6) besitzen beispielsweise Ubiquitin-Bindungs-Domänen, welche ihnen die Interaktion mit ubiquitinylierten Proteinen ermöglichen (Haglund and Dikic, 2005; Hurley et al., 2006).
Der Mechanismus der Ubiquitinylierung, bzw. auch die Konjugation Ubiquitin-ähnlicher Proteine, ist in der folgenden Abbildung 1.3 schematisch dargestellt:

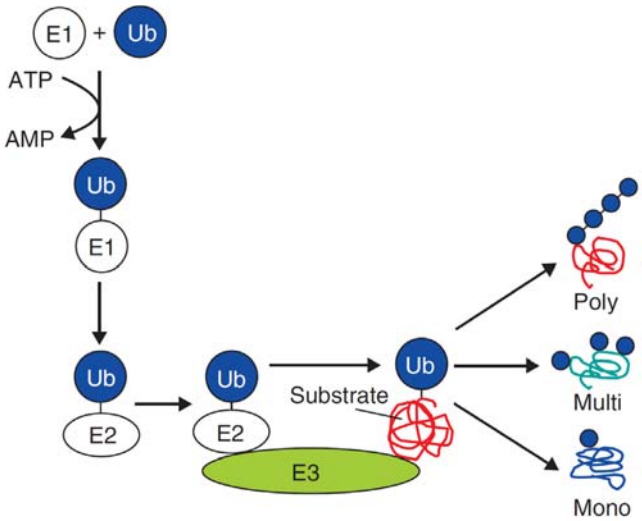


Abb.1.3: Konjugation von Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnlichen Monomeren an Substrate
Ubiquitin wird durch das Aktivierungsenzym E1 unter Verbrauch von ATP aktiviert. Anschließend bindet das Konjugationsenzym E2 kovalent an Ubiquitin und die Ubiquitinligase E3 vermittelt den Transfer auf das Substrat; modifiziert nach (Kaiser and Huang, 2005).

Die Ubiquitinylierung wird von drei Enzymklassen katalysiert. Zunächst wird Ubiquitin durch das Aktivierungsenzym E1 unter ATP-Verbrauch aktiviert, d.h. Ubiquitin wird an der carboxyterminalen Carboxylgruppe adenyliert, wodurch ein instabiles Ubiquitin-AMP-Intermediat gebildet wird. Dessen Bindung wird durch die Sulfhydrylgruppe eines Cysteins des aktiven Zentrums des E1 aufgebrochen und eine Thioesterbindung entsteht. Anschließend wird das Ubiquitin an ein Cystein im aktiven Zentrum des Konjugationsenzyms E2 transferiert und zuletzt vermittelt eine Ubiquitinligase E3 die Konjugation des Ubiquitins mit dem Substrat (Hershko and Ciechanover, 1998; Kerscher et al., 2006; Pickart, 2001). Spezifische Proteasen der DUB(Deubiquitinylierungs)-Familie, welche die Ubiquitin-Abspaltung vom Substrat ermöglichen, machen die Ubiquitinylierung zu einem reversiblen Prozess.
Nachdem ein Protein ubiquitinyliert wurde, d.h. Ubiquitin über das endständige Glycin durch eine Isopeptidbindung an die ε-Aminogruppe eines Lysinrests im Zielprotein gebunden wurde, kann es zur Anlagerung weiterer Ubiquitin-Proteine an einen spezifischen Lysinrest dieses ersten Monoubiquitins und somit zur Polyubiquitinylierung kommen (siehe Abbildung 1.4B).

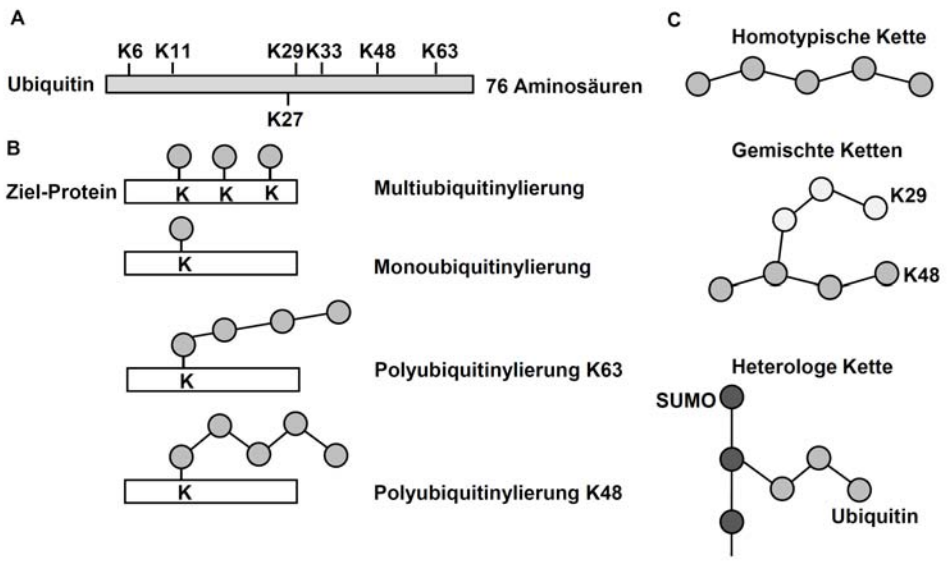


Abb.1.4: Mechanismus der Ubiquitinylierung
A, Schematische Darstellung des Ubiquitinpeptids mit der Kennzeichnung aller enthaltenen Lysinreste (K). **B,** Schematische Darstellung verschiedener Arten der Ubiquitinylierung eines Proteins. **C,** Schematische Darstellung möglicher Ubiquitinketten-Formationen. Homogene Kette: alle Ubiquitinpeptide sind über die gleichen Lysinreste verknüpft (z.B. nur über K29); Gemischte Kette: Verwendung verschiedener Lysinreste in einer fortlaufenden Ubiquitinkonjugation führt zu gabelförmigen Ketten (z.B. K48/K29-Gabeln); Heterologe Kette: Verknüpfung von Ubiquitin mit Ubiquitin-ähnlichen Proteinen wie SUMO; modifiziert nach (Ikeda and Dikic, 2008).

Bei der Ubiquitinylierung spielen vor allem die Länge der Ubiquitinketten und die Position der Lysinreste, welche für die Konjugation der Ubiquitinpeptide miteinander verwendet werden, eine entscheidende Rolle. Alle sieben im Ubiquitin enthaltenen Lysinresten (Lys^{6}, Lys^{11}, Lys^{27}, Lys^{29}, Lys^{33}, Lys^{48}, Lys^{63}) stehen für die Bildung von Ubiquitinketten zur Verfügung (Abb. 1.4A). Sind verschiedene Lysinreste des Ubiquitins an der Kettenbildung beteiligt, entsteht eine gabelförmige „gemischte Kette“. Des Weiteren können Ubiquitin-ähnliche Proteine wie SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) in die Ubiquitinketten integriert werden und heterologe Ketten hervorrufen (Abb. 1.4C). Es ist jedoch auch eine Monoubiquitinylierung möglich, bei der nur ein Lysinrest des Zielproteins mit einem Ubiquitinmonomer konjugiert ist, oder eine Multiubiquitinylierung, bei der verschiedene Lysinreste des Zielproteins mit Ubiquitinmonomeren verbunden sind (Abb. 1.4B) (Hicke, 2001; Ikeda and Dikic, 2008).
Ubiquitinketten, welche über die Ubiquitin-internen Lys^{48} bzw. Lys^{63} miteinander verknüpft sind, sind am besten charakterisiert. Die über Lys^{48} konjugierten Ketten führen typischerweise zur Degradierung des Zielproteins im Proteasom, während die Lys^{63}-Konjugation nicht-proteasomale Effekte zur Folge hat. Eine Monoubiquitinylierung oder Multiubiquitinylierung steht im Zusammenhang mit Endozytose (Haglund and Dikic, 2005). Über Lys^{29} konjugierte Ketten ist inzwischen bekannt, dass sie eine lysosomalen Degradierung einleiten können oder nach Bindung an Kinasen, wie auch Lys^{33}-Konjugationen, deren enzymatische Aktivität verändern können (Li and Ye, 2008).

Des Weiteren sind lineare Ubiquitinketten beschrieben, die nicht über die internen Lysinreste miteinander verknüpft werden, sondern mit dem aminoterminalen Methionin an das Zielprotein gebunden werden und über ihr carboxyterminales Glycin mit dem nächsten Ubiquitinpeptid in einer sog. Kopf-Schwanz-Orientierung verknüpft werden (Kirisako et al., 2006; Tokunaga et al., 2009).

1.5.2 Posttranslationale Modifikation durch SUMOylierung

SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) gehört zur Gruppe der Ubiquitin-ähnlichen Proteine (UBLs, *ubiquitin-like proteins/modifiers*) wie Nedd8 (*Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8*), die ATG8 (*Autophagy-8*)-Familie oder UFM-1 (*ubiquitin-fold modifier-1*). Die Ubiquitin-ähnlichen Proteine können Ubiquitin sowohl in der Primärstruktur als auch in einer Struktur höherer Ordnung ähneln und können in den meisten Fällen über die E1/E2/E3-ähnliche Konjugationsmaschinerie an Zielproteine konjugiert werden (siehe Abb. 1.3) (Grabbe and Dikic, 2009). Die durch UBLs hervorgerufenen Effekte sind ebenso vielfältig wie die des Ubiquitins. Nedd8 modifiziert beispielsweise die E3-Ubiquitinligasen der SCF-Familie und erleichtert die Rekrutierung des E2-Ubiquitinkonjugationsenzyms an den Ubiquitinligasekomplex (Tateishi et al., 2001). Über das komplette Spektrum an Nedd8-Substraten und das resultierende Interaktionsnetzwerk sind die aktuellen Informationen, ebenso wie für eine Vielzahl anderer UBLs, jedoch noch rar (Jones et al., 2008). ATG8 ist beispielsweise eine wichtige Komponente bei der Bildung von Autophagosomen (Xie et al., 2008). Die etwa 11kDa kleinen SUMO-Peptide spielen eine wichtige Rolle in diversen zellulären Prozessen wie der Signaltransduktion, dem Transport in den Nukleus und der Transkription (Kerscher et al., 2006; Shih et al., 2007). In Säugetieren sind bisher vier Isoformen bekannt: SUMO1 (97 Aminosäuren) führt hauptsächlich zur Mono-SUMOylierung der Substrate. SUMO2/3 (92/93 Aminosäuren) sind sich sehr ähnlich, können am Zielprotein aufgrund interner SUMOylierungsmotive SUMO-Ketten bilden und werden wie SUMO1 in allen Geweben exprimiert. Das zuletzt identifizierte SUMO4 scheint nur in Niere und Milz exprimiert zu werden und ist bisher noch nicht ausreichend charakterisiert. SUMOylierungen treten meist an einem klassischen SUMOylierungsmotiv mit der Kern-Aminosäuresequenz ΨKXE (Ψ, hydrophobe Aminosäure; K, Lysin; X, beliebige Aminosäure; E, Glutamat) auf, welche die Bindung zum SUMO-Konjugationsenzym Ubc9 (E2) vermittelt (Gill, 2004; Vertegaal, 2007). Es wurden jedoch auch alternative SUMOylierungsmotive beschrieben bzw. Lysinreste, welche sich in keiner spezifischen Konsensussequenz befinden und dennoch als SUMOakzeptoren fungieren und speziell von E3-SUMOligasen erkannt werden (Figueroa-Romero et al., 2009; Kagey et al., 2003).

Die SUMO-Konjugation an einen Lysinrest des Zielproteins läuft im Wesentlichen wie die für Ubiquitin beschriebene Kaskade über drei Enzymklassen ab (siehe Abb. 1.3): E1-

Aktivierungsenzym (Heterodimer Aos1-Uba2), E2-Konjugationsenzym (Ubc9) und E3-Ligase (diverse). Ubc9 kann mit SUMO neben der Thioesterbindung auch nicht-kovalent interagieren, wodurch SUMO-Ketten gebildet werden, welche nach ihrer Fertigstellung an das Substrat transferiert werden (Vertegaal, 2007). Die SUMO-Ligase ist nicht immer ein essenzielles Enzym der SUMOylierungskaskade, da bereits Ubc9 als SUMO-Konjugationsenzym in der Lage ist das SUMOylierungsmotiv innerhalb des Zielproteins zu erkennen und das SUMO-Peptid zu übertragen. Durch die SUMO-Ligase E3 wird lediglich die räumliche Nähe zwischen Substrat und SUMO-Konjugationsenzym E2 herbeigeführt. Dieser Vorgang bei einer instabilen Interaktion zwischen Ubc9 und dem Zielprotein essenziell (Bossis and Melchior, 2006; Knipscheer et al., 2007; Niedenthal, 2007).

Obwohl sich die dreidimensionale Struktur von SUMO und Ubiquitin (*β-grasp fold*) und die Art und Weise der Konjugation an die Zielproteine ähneln, unterscheiden sich die durch die Ubiquitinylierung und SUMOylierung hervorgerufenen Effekte dennoch. Als Konsequenz einer SUMOylierung kann das Zielprotein in seiner Lokalisation, Interaktionsfähigkeit, Stabilität oder Aktivität beeinflusst werden. Ebenso wie dem Ubiquitinsystem, wird auch dem SUMOsystem eine Rolle in der Tumorgenese zugeschrieben, die sich beispielsweise durch Überexpression des einzigen SUMO-Konjugationsenzyms Ubc9 in einigen humanen Tumoren wie dem Melanom, Ovarialkarzinom und Lungen-Adenokarzinom zeigt (Johnson, 2004; Meulmeester and Melchior, 2008);(Anckar and Sistonen, 2007; Hoeller and Dikic, 2009).

Die SUMOylierung beeinflusst unter anderem die Aktivität einiger Transkriptionsfaktoren. GATA4 steht hier beispielhaft für Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität durch die SUMOylierung gesteigert wird (Wang et al., 2004). Der häufiger auftretende Effekt der SUMOylierung ist jedoch die Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren und die daraus resultierende Inhibierung der Transkription der Zielgene. Der Transkriptionsfaktor Elk-1 liegt beispielsweise zunächst SUMOyliert in der Zelle vor, wodurch HDAC2 rekrutiert wird und die Expression der Elk-1-Zielgene gehemmt wird. Nach der Aktivierung des MAPK-Signalweges wird Elk-1 durch Erk phosphoryliert, SUMO und HDAC2 werden abgespalten und die Transkription der Zielgene wird aktiviert (Lyst and Stancheva, 2007; Yang et al., 2003).

Da Lysinreste jedoch nicht nur als Akzeptoren für SUMO-Peptide dienen, sondern auch als Ziel von Methylierung, Acetylierung oder Ubiquitinylierung dienen, treten diese posttranslationalen Modifikationen oftmals als Konkurrenten in der Regulation ihrer Zielproteine auf. Die SUMOylierung und die Ubiquitinylierung sind ein häufig vorkommendes Beispiel posttranslationaler Modifikationen, welche um dieselben Aminosäurereste konkurrieren und gegensätzliche Effekte hervorrufen. Beispielsweise wird das IκBα-Protein im Anschluss an die Ser^{32}/Ser^{36}-Phosphorylierung durch eine Lys^{48}-Ubiquitinylierung der Lysinreste an Position 21 und 22 für die Degradierung markiert. Lys^{21} kann jedoch ebenfalls durch SUMO1 modifiziert werden. Dadurch wird die Lys^{21}-Ubiquitinylierung inhibiert und das IκBα-Protein wird stabilisiert.

Die Signal-induzierte Ser^{32}/Ser^{36}-Phosphorylierung wirkt sich demgegenüber inhibierend auf die Lys^{21}-SUMOylierung aus (Desterro et al., 1998; Hay, 2005).

1.5.3 Funktionelle Regulation der NF-κB-Untereinheiten durch posttranslationale Modifikationen

Die Familie der NF-κB-Transkriptionsfaktoren erfüllt eine Vielfalt an Aufgaben, die von unterschiedlich zusammengesetzten Dimeren ausgeführt werden, welche je nach Stimulus und Zelltyp wiederum variable Funktionen ausüben. Wie bereits in den Kapiteln zu Ubiquitinylierung und SUMOylierung erläutert wurde, spielen posttranslationale Modifikationen gerade für Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle bei der Regulation ihrer Aktivität. Daher ist die Analyse der auftretenden posttranslationalen Modifikationen, wie beispielsweise im Fall des RelB-Proteins, ein zentraler Punkt in der Aufklärung der Regulationsmechanismen vieler Proteine. Es wurde bereits beschrieben, dass die NF-κB-Untereinheit RelB sowohl aktivierend als auch hemmend auf die Transkription der Zielgene Einfluss nehmen kann. Die molekularen Mechanismen, die dieser funktionellen Diversität von RelB zugrunde liegen, sind bisher weitgehend unbekannt. Da posttranslationale Modifikationen eine Möglichkeit zur Feinregulation von Transkriptionsfaktoren darstellen, lag die Vermutung nahe, dass die Aktivität und/oder Stabilität des RelB-Proteins durch eine derartige Modifikation beschrieben- beeinflusst wird. Diesbezüglich konnte die spezifische Phosphorylierung von RelB an Thr^{84} und Ser^{552} bereits mit der Degradierung des Proteins in Zusammenhang gebracht werden (Marienfeld et al., 2001).
Eine posttranslationale Modifikation kann einerseits Voraussetzung für eine weitere posttranslationale Modifikation sein, kann andererseits aber auch als Erkennungsstelle für Interaktionspartner des modifizierten Proteins dienen. Bezüglich der NF-κB-Untereinheit RelA wurde beschrieben, dass posttranslationale Modifikationen maßgeblich an der Rekrutierung von Kofaktoren beteiligt sind. Die Phosphorylierung des Serinrests an Position 276 des RelA-Proteins führt zur Rekrutierung des Koaktivators CBP, einer Acetyltransferase, wohingegen RelA im unphosphorylierten Zustand im Komplex mit dem Korepressor HDAC1, einer Histondeacetylase, vorliegt. Die rekrutierten Kofaktoren können die Regulation der Transkription der Zielgene von RelA durch die Veränderung der Histon-Acetylierung beeinflussen (Zhong et al., 2002). In weiteren Studien wurde darüber hinaus die Beteiligung von CBP an der Acetylierung von RelA selbst beschrieben. Die Acetylierung von Lys^{221} verstärkt die DNA-Bindungsaffinität von RelA und führt alleine oder in Kombination mit der Acetylierung von Lys^{218} zu einer verminderten Interaktion mit IκBα. Hingegen ist die Lys^{310}-Acetylierung unabhängig von Einflüssen auf die RelA-DNA-Bindung oder die RelA-IκBα-Interaktion essenziell für die vollständige Transaktivierung durch den NF-κB-Komplex. Vermutlich spielt in diesem Fall die Rekrutierung eines bisher unbekannten Kofaktors eine Rolle (Chen et al., 2002; Chen et al.,

2005; Perkins, 2006). Aktuelle Untersuchungen berichten des Weiteren von der Monomethylierung des RelA-Lysinrests an Position 37, welche die Rekrutierung von RelA an einige Zielgen-Promotoren reguliert. Die Lys^{37}-Methylierung dient möglicherweise ebenfalls als Bindungsstelle für bisher nicht näher charakterisierte Koaktivatoren (Ea and Baltimore, 2009).
Die Rekrutierung von Kofaktoren an das RelB-Protein wurde ebenfalls bereits beschrieben. Ein Beispiel ist die Rekrutierung des Korepressors Daxx. Daxx rekrutiert nach Komplex-Bildung mit RelB die DNA-Methyltransferase1 (Dnmt1), welche nachfolgend zur Hypermethylierung von CpG-Inseln innerhalb der RelB-Zielgen-Promotoren und damit zur Inhibierung der Expression dieser Zielgene führt (Croxton et al., 2006; Puto and Reed, 2008). Die RelB-Daxx-Interaktion stellt somit eine Möglichkeit dar, um die Funktion von RelB als transkriptionellen Repressor zu erklären, wobei hier wiederum unklar ist, welche molekularen Mechanismen die Rekrutierung von Daxx regulieren. Das Daxx-Protein besitzt zwei sogenannte SUMO-Interaktions-Motive (SIM), über welche es nicht-kovalent mit SUMOylierten Proteinen interagieren kann. Da die Möglichkeit besteht, dass die Daxx-RelB Komplexbildung über eine SUMOylierung von RelB erfolgt, spielt die Analyse der RelB-SUMOylierung eine bedeutende Rolle (Santiago et al., 2009).
Ein weiterer bekannter Interaktionspartner von RelB, der ebenfalls die Aktivität dieser NF-κB-Untereinheit modifizieren kann, ist der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR). Normalerweise dimerisiert der Transkriptionsfaktor AhR nach Translokation in den Nukleus mit einem weiteren Faktor, ARNT (Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-Nukleärer-Translokator) (Vogel et al., 2007). In Lungen-Fibroblasten aus $AhR^{-/-}$ Mäusen führt Zigarettenrauch, verglichen mit wildtypischen ($AhR^{+/+}$) Fibroblasten, zu einer verstärkten Entzündungsreaktion, die mit einem Verlust von RelB einhergeht. Wie bereits beschrieben, reduziert RelB die Chemokinexpression in LPS-behandelten Fibroblasten, was zu der Schlussfolgerung führt, dass der AhR möglicherweise durch einen RelB-abhängigen Mechanismus zur Reduktion einer durch Zigarettenrauch hervorgerufenen Entzündungsreaktion führen kann (Baglole et al., 2008; Xia et al., 1997). Es existiert jedoch auch eine spezifische Bindungsstelle für RelB/AhR im IL-8 Promotor, deren Okkupation durch das RelB/AhR-Dimer in Makrophagen zur Induktion der IL-8-Transkription führt (Vogel et al., 2007).
Der Regulationsmechanismus der AhR/RelB-Interaktion ist bisher ungeklärt, jedoch könnte auch hier die SUMOylierung von RelB eine entscheidende Rolle spielen. Im AhR-Signalweg stellt die SUMOylierung von ARNT und AhRR (AhR-Repressor) eine Voraussetzung für die AhRR/ARNT-Komplexbildung und die Interaktion des Dimers mit Korepressoren (HDACs) dar (Oshima et al., 2009). Des Weiteren wurde bereits die Interaktion von RelB mit ARNT beschrieben. Dieses Dimer führt in Assoziation mit einer Histondeacetylase zur Inhibierung der Transkription von NF-κB-Zielgenen (Wright and Duckett, 2009).
Insgesamt betrachtet stellt die Analyse der am RelB-Protein auftretenden posttranslationalen Modifikationen und möglicherweise rekrutierter Kofaktoren eine Grundvoraussetzung dar, um

die Regulation dieses Transkriptionsfaktors verstehen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere posttranslationale Modifikationen am RelB-Protein untersucht, im Folgenden speziell die Ubiquitinylierung und die SUMOylierung.

1.6 Ziel der Arbeit

Die Familie der NF-κB-Transkriptionsfaktoren kontrolliert die Expression zahlreicher Gene, welche besondere Bedeutung für die Regulation von Entzündungsreaktionen, der Zelldifferenzierung und der Apoptose haben. Von den fünf Mitgliedern der NF-κB-Familie nimmt RelB eine Sonderstellung ein: Dieser Faktor kann sowohl als Aktivator wie auch als Repressor der NF-κB-abhängigen Genexpression fungieren. Die molekularen Mechanismen, die der Regulation der Funktion von RelB zugrunde liegen, sind bisher weitgehend ungeklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von Mechanismen der RelB-Regulation auf molekularer Ebene. Im Konkreten sollten drei Teilaspekte bearbeitet werden:

- Protein Stabilität: Ein Mechanismus der Regulation der transkriptionellen Aktivität von RelB ist die proteasomale Degradierung des Transkriptionsfaktors nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation. Die Mechanismen der RelB Degradierung sollten daher analysiert werden.
- Protein-Modifikationen: Posttranslationale Modifikationen spielen für die Regulation vieler Transkriptionsfaktoren eine Rolle. Bisher nicht beschriebene Modifikationen des RelB Proteins sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert werden.
- Kofaktoren: Die Rekrutierung von Kofaktoren stellt einen wichtigen Schritt in der NF-κB-vermittelten Genregulation dar. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Interaktionen von RelB mit Kofaktoren analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reaktionssysteme

Acrylamid	AppliChem
Agar-Agar	Gibco
Agarose	Roth
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	AppliChem
Ampicillin	AppliChem
Ampuwa	Fresenius Kabi
Anti-Flag M2-Agarose	Sigma
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
β-Glycerophosphat	Sigma
β-Mercaptoethanol	Merck
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Merck
Complete Mini (Protease-Inhibitor Cocktail Tabletten)	Roche
Desoxy-NTPs	GE Healthcare
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Dithiotreitol (DTT)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
Enhanced chemiluminescence (ECL)	Pierce
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem
Essigsäure	Merck
Ethanol	Fluka
Ethidiumbromid	Sigma
FLAG-Agarose	Sigma
Ficoll 400	Pharmacia
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco
Gelextraktionskit QIAquick	Qiagen
Glutathion	Sigma
Glutathion-Agarose	Sigma

Glycerol	Roth
Glycin	AppliChem
Hefeextrakt	AppliChem
Ionomycin	Calbiochem
Isopropanol	Fluka
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kit zur Isolation von Plasmid-DNA (Mini)	Qiagen
Kit zur Isolation von Plasmid-DNA (Midi)	Invitrogen
Kit zur Isolation von RNA	Qiagen
Leupeptin	Boehringer
Lipopolysaccharid (LPS)	InvivoGen
Magermilchpulver	AppliChem
Methanol	Fluka
Magnesiumchlorid	Merck
MG132	Calbiochem
Natriumdeoxycholat	Merck
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumfluorid	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumhydroxid	AppliChem
N-Ethyl-Maleimid (NEM)	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Pepton	AppliChem
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Calbiochem
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem
poly(dI/dC)	Roche
Protein A/G Sepharose	Santa Cruz Biotechnology
radioaktive Nukleotide ([α^{32}P]dCTP)	GE Healthcare
Reinigung von DNA-Sonden (NucTrap)	Stratagene
Rinderserumalbumin (BSA)	AppliChem
Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640)	Gibco
Salzsäure (HCl)	Merck
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem
Tumornekrosefaktor-α (TNFα)	Sigma
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	AppliChem
Triton X 100	Sigma

Trypanblau	Sigma
Trypsin	Gibco
Tween20	AppliChem
Xylenxyanol F	Sigma
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Applichem

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Glaswaren	Schott, Brand
Einmalküvetten	Brand
Faltenfilter	Hartenstein
Filterpapier	Whatman
Gene-Pulser Küvetten (0,2cm Elektrode)	Bio-Rad
Nitrozellulose-Membran	Whatman
Parafilm	Nesco
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktiongefäße (Plastik)	Eppendorf, Falcon
Röntgenfilme	Fuji
Spritzen und Kanülen	Braun Melsungen
Sterilfilter	Millipore
Zellkulturschalen	Falcon, Nunc, Greiner

2.1.3 Geräte

Bakterienschüttler	Infors
Blotgerät	C.B.S. Scientific Company
Brutschrank	Heraeus
Eismaschine	Scotsman
Elektrophoresekammer	C.B.S. Scientific Company
Entwickler	AGFA
Handschuhe	Sempercare
Heizblock	VWR
Kurzzeitmesser	VWR
Luminometer	Berthold
Magnetrührer	IKA
Mikroskop	Leica
PCR-Maschine	Peqlab

pH-Meter	Knick
Photometer	Pharmacia
Pipetboy	BRAND
Pipetten	Abimed
Schüttler	Heidolph
Spannungsquellen	Consort
Sterilbank	Heraeus
UV-Anlage	Herolab
UV-Videosystem	Sony
Vortexer	Scientific Instruments
Waagen	Sartorius
Wasserbad	Julabo
Zentrifugen	Heraeus, Beckman

2.1.4 Bakterien

JM109 (*Escherichia coli*)	Stratagene
BL21 (DE3)	Stratagene

2.1.5 Gewebekulturzellen

HEK 293:	embryonale Nierenfibroblasten-Zelllinie des Menschen
Jurkat Tag:	Leukämie-Zelllinie, die von menschlichen T-Zellen abstammt; hervorgegangen aus der Zelllinie Jurkat durch Einbringen des großen T-Antigens des SV40-Virus
S107:	Plasmozytom-Zelllinie der Maus
Namalwa:	B-Burkitt-Lymphom-Zelllinie des Menschen; enthalten das Epstein-Barr-Virus Genom
70Z/3:	Prä-B-Zelllinie der Maus

2.1.6 Nährmedien

LB (Luria Bertano) Medium für *E. coli*	1% Pepton
	0,5% Hefeextrakt
	0,5% NaCl
für LB-Agarplatten	+1,5% Agar
DMEM	+10% FCS
	+1% Penicillin/Streptomycin

RPMI	+10% FCS +1% Penicillin/Streptomycin +1% Glutamin

2.1.7 Lösungen und Puffer

2.1.7.1 Allgemein verwendete Puffer

10x PBS (*Phosphate buffered saline*) pH 7,22	1,5M NaCl 27mM KCl 82,4mM Na_2HPO4 20mM NaH_2PO4

2.1.7.2 Gelelektrophorese

6x DNA-Probenpuffer	80% Glycerin 100mM EDTA 0,025% Bromphenalblau 0,025% Xylenxyanol F
50x TAE (*Tris acetate EDTA*)	2M Tris 5,7% Eisessig 50mM EDTA pH 8,0
1% Agarosegel	0,5g Agarose 50ml 1x TAE 3µl Ethidiumbromid (10mg/ml)

2.1.7.3 Lösungen und Puffer für Western Blot

25x TBS (*Tris buffered saline*)	3,75M NaCl 0,25M Tris
Blockmilch	5% Magermilchpulver in 1x TBS-Tween
6x Ladepuffer für SDS-Gele nach Laemmli	100mM Tris pH 6,8 4% SDS 0,2% Bromphenolblau 60% Glycerin

	0,5% DTT
10x SDS-Laufpuffer für SDS-Gele nach Laemmli	0,25M Tris 1,92M Glycin 1% SDS
Transferpuffer für Immunoblot-Analyse	20% Methanol in 1x SDS-Laufpuffer
Waschpuffer für Western Blot	0,025% Tween 20 in 1x TBS
Stripping-Puffer für Western Blot	0,2M NaOH + 1-2% SDS

2.1.7.4 Lösungen und Puffer für Gelretardationsexperimente

10x Hybridisierungs-Puffer	70mM Tris pH 7,5 70mM $MgCl_2$ 500mM NaCl
STE-Puffer	20mM Tris-HCl pH 7,5 100mM NaCl 10mM EDTA
3x Bandshift-Bindungs-Puffer	60mM HEPES pH 7,9 150mM KCl 3mM EDTA 3mM DTT 20% Ficoll
10x TBE (*Tris borate EDTA*)	2mM EDTA pH 8,0 1M H_3BO_3 1M Tris

2.1.7.5 Lysepuffer

TNT (Tris, NaCl, Triton) für Gesamtzellextrakte	20mM Tris pH8,0 0,2M NaCl 1% Triton X 100 1mM DTT 0,5M Leupeptin

	10mM PMSF
	20mM NaF
	1mM β-Glycerophosphat
Dignam C für Kernlysate	20mM HEPES pH 7,9
	25% Glycerin
	0,42M NaCl
	1,5mM $MgCl_2$
	0,2mM EDTA
	1mM PMSF
	1mM DTT
	1 Tablette Complete Mini
Puffer A (hypoton) für Zytoplasmalysate	10mM HEPES pH 7,9
	10mM KCl
	0,1mM EDTA
	0,1mM EGTA
	1mM DTT
	0,5mM PMSF
Puffer C (hyperton) für Kernlysate	20mM HEPES pH 7,9
	0,4M KCl
	1mM EDTA
	1mM EGTA
	1mM DTT
	1mM PMSF
RIPA-Puffer (*RadioImmunoPrecipitation-Assay)*	50mM Tris pH 8
	150mM NaCl
	1% NP-40
	0,5% Na-Deoxycholat
	0,1% SDS

2.1.8 Enzyme

DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment	Fermentas
Platinum *Pfx* DNA-Polymerase	Invitrogen
Pfu DNA-Polymerase	Stratagene
Taq DNA-Polymerase (GoTaq)	Promega

T4 DNA-Ligase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	Amersham Biolabs
	New England Biolabs
Shrimp alkalische Phosphatase (SAP)	Roche

2.1.9 Größenmarker

DNA-Größenmarker:

1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen

Protein-Größenmarker:

PageRuler	Fermentas
peqGOLD Protein-Marker IV und III	Peqlab

2.1.10 Antikörper

Anti-acetyliertes-Lysin	#9681 von Cell Signaling, Monoklonales Maus IgG2a
Anti-Daxx	D 7810 von Sigma, Polyklonales Kaninchen IgG
Anti-Flag M2	#F1804 von Sigma, Monoklonales Maus IgG
Anti-GST	sc-138 von Santa Cruz, Monoklonales Maus IgG1
Anti-HA-probe	sc-805 von Santa Cruz, Polyklonales Kaninchen IgG
Anti-HDAC6	sc-11420 von Santa Cruz, Polyklonales Kaninchen IgG
	#2162 von Cell Signaling, Polyklonales Kaninchen IgG
Anti-IκBα	sc-371-G von Santa Cruz, Polyklonales Ziegen IgG
Anti-IKKα	sc-7218 von Santa Cruz, Polyklonales Kaninchen IgG
Anti-IKKβ	sc-7607 von Santa Cruz, Polyklonales Kaninchen IgG
Anti-IKKγ	sc-8330 von Santa Cruz, Polyklonales Kaninchen IgG
Anti-NIK	sc-7211 von Santa Cruz, Polyklonales Kaninchen IgG
Anti-p50	sc-114x von Santa Cruz, Polyklonales Kaninchen IgG
Anti-p52/p100	US 06-413 Upstate Biotechnology, Polyklonales Kaninchen IgG
Anti-p65	sc-372 von Santa Cruz, Polyklonales Kaninchen IgG
Anti-RelB	sc-226 und sc-226x von Santa Cruz, Polyklonales Kaninchen IgG
	#4954 von Cell Signaling, Polyklonales Kaninchen IgG
Anti-SUMO1	sc-9060 von Santa Cruz, Polyklonales Kaninchen IgG
Anti-SUMO2/3	sc-32873 von Santa Cruz, Polyklonales Kaninchen IgG
Anti-Ubc9	sc-10759 von Santa Cruz, Polyklonales Kaninchen IgG
Anti-Ubiquitin	UG 9510 von Biomol, Polyklonales Kaninchen IgG

Sekundärer Esel-anti-Kaninchen-Antikörper, #31460 von Pierce, Peroxidase-gekoppelt

Sekundärer Ziege-anti-Maus-Antikörper, #1858413 von Pierce, Peroxidase-gekoppelt
Sekundärer Esel-anti-Ziege-Antikörper, sc-2033 von Santa Cruz, Peroxidase- gekoppelt

Kaninchenserum (*normal rabbit serum*), sc-2338 von Santa Cruz

2.1.11 Plasmide

3xκB Luziferase-Expressionsvektor	Maier HJ (Maier et al., 2003)
Aktin-Renilla-Expressionsvektor	Marienfeld R. (Marienfeld et al., 2003)
EGFP-SUMO1	Niedenthal R. (Jakobs et al., 2007a)
EGFP-SUMO2	Niedenthal R. (Jakobs et al., 2007a)
EGFP-PIASx/β	Niedenthal R. (Jakobs et al., 2007a)
EGFP-PIASγ	Niedenthal R. (Jakobs et al., 2007a)
EGFP-PIAS1	Niedenthal R. (Jakobs et al., 2007a)
EGFP-PIAS3	Niedenthal R. (Jakobs et al., 2007a)
EGFP-PC2	Niedenthal R. (Jakobs et al., 2007a)
EYFP-IKKβ	Baumann B. (Henkler et al., 2003)
pFlag-CMV-2 (Flag-Epitop)	Sigma
pFlag-CMV-2-NEMO	Marienfeld R. (Marienfeld et al., 2006)
pFlag-CMV-2-RelB$_{S368A}$	Maier HJ (Maier et al., 2003)
pFlag-CMV-2-RelB	Marienfeld R. (Marienfeld et al., 2003)
pFlag-CMV-2-RelB$_{1-200}$	Marienfeld R. (Marienfeld et al., 2003)
pFlag-CMV-2-RelB$_{1-300}$	Marienfeld R. (Marienfeld et al., 2003)
pFlag-CMV-2-RelB$_{1-392}$	Marienfeld R. (Marienfeld et al., 2003)

pFlag-CMV-2-RelB$_{\Delta DD}$:

Zur Konstruktion des pFlag-CMV-2-RelB$_{\Delta DD}$-Expressionsvektors wurde zunächst die Sequenz der murinen RelB-cDNA zwischen Base 1 und 789 (Primerpaar RelB_Start34/RelB$_{\Delta DD}$_rev) und zwischen Base 1140 und 1710 (Primerpaar RelB$_{\Delta DD}$_for/ RelB_End1710) in einer ersten PCR amplifiziert. In einer zweiten PCR (Primerpaar RelB_Start34/RelB_End1710) wurden beide Fragmente (Produkte der 1. PCR) als Matrize eingesetzt, um letztlich die gesamte cDNA-Sequenz -mit Ausnahme der deletierten Dimerisierungsdomäne von Aminosäure 264 bis 379- als Produkt zu erhalten. Dieses Produkt wurde in den parentalen Vektor pFlag-CMV-2 (Sigma) zwischen die *Eco*RI (5‘)- und *Bam*HI (3’)-Schnittstelle eingefügt.

pFlag-CMV-2 $RelB_{DD1}$:

Ein *Eco*RI (5')/*Bam*HI (3')-Fragment, welches mittels PCR (Primerpaar $RelB_{DD1}$_for/$RelB_{DD1}$_rev) hergestellt wurde und die Basen 792 bis 1137 der murinen RelB cDNA umfasst, wurde in den pFlag-CMV-2-Vektor kloniert. Das Plasmid kodiert für die Dimerisierungsdomäne von RelB, welche sich von Aminosäure 264 bis 379 erstreckt (Ryseck et al., 1995).

pFlag-CMV-2-SUMO1-RelB:

Die gesamte murine SUMO1-cDNA wurde mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pFlag-CMV-2-RelB zwischen die *Hin*dIII (5‘)- und *Not*I (3’)-Schnittstelle inseriert. Das Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus SUMO1 (aminoterminal) und RelB (carboxyterminal).

pFlag-CMV-2-$RelB_{\Delta 349\text{-}364}$:

Zur Konstruktion des pFlag-CMV-2-$RelB_{\Delta 349\text{-}364}$-Expressionsvektors wurde zunächst die Sequenz der murinen RelB-cDNA zwischen Base 1 und 1044 (Primerpaar RelB_Start34/$RelB_{\Delta 349\text{-}364}$_rev) und zwischen Base 1095 und 1710 (Primerpaar $RelB_{\Delta 349\text{-}364}$_for/RelB_End1710) in einer ersten PCR amplifiziert. In einer zweiten PCR (Primerpaar RelB_Start34/RelB_End1710) wurden beide Fragmente (Produkte der 1. PCR) als Matrize eingesetzt, um letztlich die gesamte cDNA-Sequenz -mit Ausnahme des deletierten Bereiches von Aminosäure 349 bis 364- als Produkt zu erhalten. Dieses Produkt wurde in den parentalen Vektor pFlag-CMV-2 (Sigma) zwischen die *Eco*RI (5‘)- und *Bam*HI (3’)-Schnittstelle eingefügt.

pFlag-CMV-2-$RelB_{\Delta 365\text{-}379}$:

Zur Konstruktion des pFlag-CMV-2-$RelB_{\Delta 365\text{-}379}$-Expressionsvektors wurde zunächst die Sequenz der murinen RelB-cDNA zwischen Base 1 und 1092 (Primerpaar RelB_Start34/$RelB_{\Delta 365\text{-}379}$_rev) und zwischen Base 1140 bis 1710 (Primerpaar $RelB_{\Delta 365\text{-}379}$_for/RelB_End1710) in einer ersten PCR amplifiziert. In einer zweiten PCR (Primerpaar RelB_Start34/RelB_End1710) wurden beide Fragmente (Produkte der 1. PCR) als Matrize eingesetzt, um letztlich die gesamte cDNA-Sequenz -mit Ausnahme des deletierten Bereiches von Aminosäure 365 bis 379- als Produkt zu erhalten. Dieses Produkt wurde in den parentalen Vektor pFlag-CMV-2 (Sigma) zwischen die *Eco*RI (5‘)- und *Bam*HI (3’)-Schnittstelle eingefügt.

pFlag-CMV2-$RelB_{CT}$:

Ein *Xba*I (5')/*Bam*HI (3')-Fragment, das mittels PCR (Primerpaar for$RelB_{CT}$XbaI/ rev$RelB_{CT}$BamHI) hergestellt wurde und die Aminosäuren 348 bis 558 der murinen RelB-cDNA umfasst, wurde in den pFlag-CMV2-Vektor kloniert.

pGL4.20-birc3-200 Luziferase-Expressionsvektor und pGL4.20-birc3-1400 Luziferase-Expressionsvektor:

Zur Konstruktion der pGL4-birc3 Luziferase-Expressionsvektoren wurde die entsprechende Sequenz des humanen birc3-Promotors mittels PCR amplifiziert (entweder -200 oder -1400 Basenpaare bis +1 nach Transkriptionsstart) und in den parentalen Vektor pGL4.20-Luc (Promega) zwischen die XhoI (5‘)- und HindIII (3’)-Schnittstelle inseriert (Hong et al., 2000). Als Primerpaar für pGL4.20-birc3-200 diente birc3for(-200)/birc4rev und für pGL4.20-birc3-1400 das Primerpaar birc3for(-1400)/birc4rev.

pcDNA 3.1(-) bzw. (+)	Invitrogen
pcDNA3.1-NIK	Dick T.
pcDNA3.1-p50	(Maier et al., 2003)
pcDNA3.1-p52	(Maier et al., 2003)
pcDNA3.1-HA-Ubiquitin	Krappmann D. (Oeckinghaus et al., 2007)
pcDNA3.1-HA-Ubiquitin$_{K48R}$	Dikic I. (Haglund et al., 2003b)
pcDNA3.1-HA-Ubiquitin$_{K63R}$	Dikic I. (Haglund et al., 2003b)
pcDNA3.1-HA-Ubiquitin$_{K48/63R}$	Krappmann D.(Oeckinghaus et al., 2007)
pcDNA3-MCS-Ubc9 (pCU)	Niedenthal R. (Jakobs et al., 2007b)
pcDNA3-Ubc9-MCS (pNU)	Niedenthal R. (Jakobs et al., 2007b)
pcDNA3.1/Daxx-myc-His	addgene

pcDNA3.1-HA-Daxx$_{WT}$, HA-Daxx$_{\Delta SIM1}$, HA-Daxx$_{\Delta SIM2}$, HA-Daxx$_{\Delta SIM1+2}$:

Ein *Nhe*I(5‘)/ *Not*I(3’)-Fragment, das mittels PCR (Primerpaar Daxx_for_NheI+HA/ Daxx_rev_Not) hergestellt wurde und die Basen 1 bis 2220 der murinen Daxx-cDNA umfasst, wurde in den pcDNA3.1(-)-Vektor kloniert. Mit Hilfe der Oligonukleotide, welche für die Amplifikation verwendet wurden, wurde der Daxx-Sequenz aminoterminal ein HA-Epitop angefügt. Dementsprechend wurden für die Konstruktion der pcDNA3.1-HA-Daxx$_{\Delta SIM}$-Expressionsvektoren die Aminosäuren 1 bis 732 (ΔSIM2) oder 18 bis 740 (ΔSIM1) bzw. 18 bis 732 (ΔSIM1+2) durch PCR amplifiziert und in den parentalen Vektor pcDNA3.1(-) zwischen die *Nhe*I (5')- und *Not*I (3')-Schnittstelle inseriert.

Als Primerpaar für HA-Daxx$_{\Delta SIM1}$ diente Daxx$_{\Delta SIM1}$_for/Daxx_rev_Not und für HA-Daxx$_{\Delta SIM2}$ das Primerpaar Daxx_for_NheI+HA /Daxx$_{\Delta SIM2}$_rev. Für die Amplifizierung von HA-Daxx$_{\Delta SIM1+2}$ wurde das Primerpaar Daxx$_{\Delta SIM1}$_for/Daxx$_{\Delta SIM2}$_rev eingesetzt.

pCU-RelB:

Zur Konstruktion des pCU-RelB-Expressionsvektors wurde die gesamte murine RelB-cDNA mittels PCR amplifiziert (Primerpaar RelB-Acc65I_for/RelB-EcoRI_rev) und in den

parentalen Vektor pcDNA3-MCS-Ubc9 (pCU) zwischen die *Acc*65I (5‘)- und *Eco*RI (3’)-Schnittstelle inseriert. Das Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus RelB und Ubc9.

pcDNA3.1-RelB:

Ein *Hin*dIII (5')/*Bam*HI (3')-Fragment aus dem pFlag-CMV2-RelB-Vektor, das die gesamte murine RelB-cDNA umfasst, wurde in den pcDNA3.1-Expressionsvektor kloniert.

pFlag-CMV2-RelB: Lysin-zu Arginin-Mutanten

Durch spezifische *in vitro*-Mutagenese des pFlag-CMV-2-RelB-Vektors konnten alle Lysinreste (K) durch Arginin (R) substituiert werden. Die eingesetzten Primer für die Mutagenese-PCR haben eine Länge von ca. 30 Basen. Die zu mutierenden Basen sind mittig in den Primern lokalisiert. Nachfolgend sind alle Mutanten aufgeführt.

Mutante Nr.	Lysin(K) Position Arginin(R)
M1	K44R
M2	K112R
M3	K140R
M4	K165R
M5	K179R
M6	K210/211R
M7	K220R
M8	K234R
M9	K273/274R
M10	K288R
M11	K305/308R
M12	K340R
M13	K386/387/389R
M14	K410/413/414/415R
M15	K386/387/389/410/413/414/415R (=M13+M14)
M16	K273/274/305/308R (=M9+M11)

2.1.12 Oligonukleotide

2.1.12.1 Oligonukleotide für PCR-Klonierungen

birc3for(-200): 5'-GATCCTCGAGCCCCTAAGTCCTAAAAGG-3'

birc3for(-1400): 5'-GATCCTCGAGGGATCCATCAAATACATTTAAAAG-5'

birc3rev: 5'-GATCAAGCTTGCATGCACCAGCAAGGACAAG-3'

Daxx_for_NheI+HA: 5'-GATCGCTAGCATGGACTACCCTTATGATGTGCCGGATTATG CCGCCACCGATGAC-3'

Daxx_rev_Not:	5'-GATCGCGGCCGCCTAATCAGAGTCTG-3'
$Daxx_{\Delta SIM1}$_for:	5'-GATCGCTAGCATGGACTACCCTTATGATGTGCCGGATTATG CCGCTGCTGCTCAACC-3'
$Daxx_{\Delta SIM2}$_rev:	5'-GATCGCGGCCGCCTACTCCTCCGGGTCGC-3'
$RelB_{\Delta 349-364}$_for:	5'-CTACGAGGACCTGGAGGGGGTGTGCAGCGAG-3'
$RelB_{\Delta 349-364}$_rev:	5'- CTCGCTGCACACCCCCTCCAGGTCCTCGTAG-3'
$RelB_{\Delta 365-379}$_for:	5'- CAGCGGCTCACGGATCATGACAGCTACGGTG-3'
$RelB_{\Delta 365-379}$_rev:	5'-CACCGTAGCTGTCATGATCCGTGAGCCGCTG-3'
$RelB_{\Delta DD}$_for:	5'-CTGCACCGCATGGACCATGACAGCTACGGTG-3'
$RelB_{\Delta DD}$_rev:	5'-CACCGTAGCTGTCATGGTCCATGCGGTGCAG-3'
$RelB_{DD1}$_for:	5'-GATCGAATTCAATGCCCATCCTCTCTGAGCC-3'
$RelB_{DD1}$_rev:	5'-GATCGGATCCCTAATCCCGAGGCAGGTACG-3'
RelB_Start34:	5'-GATCGAATTCAATGCCGAGTCGCCGCGC-3'
RelB_End1710:	5'-GATCGGATCCCTACGTGGCTTCAGGCCCC-3'
RelB_End634:	5'-GATCGGATCCGTTAAAGCTGTGCCGGGG-3'
RelB-EcoRI-rev:	5'-GATCGAATTCCGTGGCTTCAGGCCCTGG-3'
RelB-Acc65I-for:	5'-CGGCGGTACCATGCCGAGTCGCCGCGCTGC-3'
$forRelB_{CT}$XbaI:	5'-GATCTCTAGATCAGAGCCCGTGACTGTC-3'
$revRelB_{CT}$BamHI:	5'-GACTGGATCCCTACGTGGCTTCAGGCCC-3'
SUMO1RelBfor:	5'-GATCAAGCTTATGTCTGACCAGGAGGCAAAACC-3'
SUMO1RelBrev:	5'-GATCGCGGCCGCCCCCGTTTGTTCC-3'

2.1.12.2 Oligonukleotide für *in vitro*-Mutagenese

RelB-Mutanten mit Lysin-zu-Arginin Substitutionen:

M1_for2:	5'-CGACGAATACATTAGGGAGAACGGC-3'
M1_rev2:	5'-GCCGTTCTCCCTAATGTATTCGTCG-3'
M2_for:	5'-CAGAGCAGCCAAGGCAGCGTGGCATGC-3'
M2_rev:	5'-GCATGCCACGCTGCCTTGGCTGCTCTG-3'
M3_for:	5'-CCGAAGCCAGCAGGACCCAGCCCGC-3'
M3_rev:	5'-GCGGGCTGGGTCCTGCTGGCTTCGG-3'
M4_for:	5'-GCCTGGTGTGGAGGGACTGGCCACACC-3'
M4_rev:	5'-GGTGTGGCCAGTCCCTCCACACCAGGC-3'
M5_for:	5'-GCCTCGTGGGGAGAGACTGCACGGAC-3'
M5_rev:	5'-GTCCGTGCAGTCTCTCCCCACGAGGC-3'
M6_for:	5'-CCAGTGTGTTAGGAGGAGGGAAATTGAAGCTGCC-3'
M6_rev:	5'-GGCAGCTTCAATTTCCCTCCTCCTAACACACTGG-3'

M7_for:	5'-GCCATTGAGCGGAGGATCCAGCTGGG-3'
M7_rev:	5'-CCCAGCTGGATCCTCCGCTCAATGGC-3'
M8_for:	5'-GCTGGCTCCCTGAGGAACCATCAGGAGG-3'
M8_rev:	5'-CCTCCTGATGGTTCCTCAGGGAGCCAGC-3'
M9_for:	5'-GCCTGTCTACGACAGGAGGTCCACCAACACATC-3'
M9_rev:	5'-GATGTGTTGGTGGACCTCCTGTCGTAGACAGGC-3'
M10_for:	5'-GCCGAATCAACAGGGAGAGCGGGCC-3'
M10_rev:	5'-GGCCCGCTCTCCCTGTTGATTCGGC-3'
M11_for:	5'-CTTGCTCTGTGACAGGGTGCAAAGAGAGGACATATCC-3'
M11_rev:	5'-GGATATGTCCTCTCTTTGCACCCTGTCACAGAGCAAG-3'
M12_for:	5'-CGCCATTGTGTTCAGAACGCCACCCTACG-3'
M12_rev:	5'-CGTAGGGTGGCGTTCTGAACACAATGGCG-3'
M13_for2:	5'-CGGTGTGGACAGGAGGCGAAGGCGGGGACTGCCTG-3'
M13_rev2:	5'-CAGGCAGTCCCCGCCTTCGCCTCCTGTCCACACCG-3'
M14_for2:	5'-GGAATCGAGAGCAGACGAAGGAGAAGGAGACCAGTGTTCT TGGACC-3'
M14_rev2:	5'-GGTCCAAGAACACTGGTCTCCTTCTCCTTCGTCTGCTCTC GATTCC-3'

RelB-Mutanten mit Lysin-zu-Asparagin Substitutionen:

$RelB_{K386/387/389}$ for:	5'-CGGTGTGGACAACAACCGAAACCGGGGACTGCCTG-3'
$RelB_{K386/387/389}$rev:	5'-CAGGCAGTCCCCGGTTTCGGTTGTTGTCCACACCG-3'
$RelB_{K410/413/414/415N}$for:	5'-GGAATCGAGAGCAACCGAAGGAACAACAACCCAGTGTTCT TGGACC-3'
$RelB_{K410/413/414/415N}$rev:	5'-GGTCCAAGAACACTGGGTTGTTGTTCCTTCGGTTGCTCTC GATTCC-3'

2.1.12.3 Oligonukleotide für EMSA

NF-κB sense :	5'-GCGGGCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3'
NF-κB antisense:	5'-GCGGAGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'
Oct sense:	5'-GCGGACCTGGGTAATTTGCATTTCTAAAAT-3'
Oct antisense:	5'-GCGGATTTTAGAAATGCAAATTACCCAGGT-3'

2.1.12.4 Oligonukleotide für semiquantitative RT-PCR

RelB_Start34:	5'-GATCGAATTCAATGCCGAGTCGCCGCGC-3'
RelB_End634:	5'-GATCGGATCCGTTAAAGCTGTGCCGGGG-3'

mB-Aktin_for:	5'-GGTCAGAAGGACTCCTATGTG-3'
mB-Aktin_rev:	5'-AGAGCAACATAGCACAGCTTC-3'
mBirc3(cIAP2)_for:	5'-CTACGTCAGACTCCCCAGAAGATG-3'
mBirc3(cIAP2)_rev:	5'-CAGGGTCAATTTCCCGAAGGGAG-3'

2.1.12.5 Oligonukleotide für Sequenzierung

pFlag-CMV:	5'-GCCCCGTTGACGCAAATG-3'
CMV:	5'-TATTAGGACAAGGCTGGTGGGCAC-3'
RelB_End1210:	5'-GATCGGATCCCAGTCCCCGCTTTCGCTTC-5'
RelB_End1534:	5'GATCGGATCCCCCTGCACCCCCGCTACC-3'
RelB_Start34:	5'-GATCGAATTCAATGCCGAGTCGCCGCGC-3'

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierung von DNA

2.2.1.1 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen spielt unter anderem eine Rolle bei der Konstruktion neuer Plasmide, bei der *in vitro*-Mutagenese und bei der Charakterisierung von Plasmid-DNA. Zu diesem Zweck werden Restriktionsendonukleasen eingesetzt, die definierte DNA-Sequenzen erkennen und schneiden. Es entstehen entweder überhängende Enden (*sticky ends*) oder stumpfe Enden (*blunt ends*) eines DNA-Doppelstrangs. Die Reaktionsbedingungen variieren je nach Enzym in Temperatur, Puffer und Inkubationsdauer. Ein typischer Reaktionsansatz sieht folgendermaßen aus:

2-5µg	DNA
1µl	10x Reaktionspuffer
1µl	Restriktionsenzym (5-10U)
auf 10µl	mit ddH_2O auffüllen
Inkubation:	60min, 37°C

Für das Gesamtvolumen gilt, dass 1µg DNA pro Unit Restriktionsenzym eingesetzt, und die Enzyme aufgrund des Glyceringehalts im Verhältnis 1:10 zum Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes eingesetzt werden sollten.

Nach dem Schneiden der DNA durch die Restriktionsendonukleasen wird der Reaktionsansatz mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen, das abhängig von der Größe des zu erwartenden Fragments 0,7 bis 2%ig sein sollte. Die DNA wird nach der Auftrennung im Agarosegel durch UV-Licht im Gel visualisiert und kann aus

diesem isoliert werden. Die Isolierung und Aufreinigung erfolgt mit dem "QIAquick-Gelextraction-Kit" (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.2 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren

Die Abspaltung der Phosphatgruppen an den 5‘-Enden eines linearisierten Vektors verhindert die Religation des Plasmids. Mit dieser Methode wird die Effizienz der Ligation mit dem Insert gesteigert. Der linearisierte Vektor wird für 10 bis 60 Minuten mit der Shrimp-alkalischen-Phosphatase (SAP) im zugehörigen Reaktionspuffer bei 37°C inkubiert. Anschließend kann die Phosphatase durch 15-minütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert werden, und die Vektor-DNA kann für eine Ligationsreaktion eingesetzt werden.

2.2.1.3 Ligation von DNA-Molekülen

Durch die Ligation wird ein DNA-Fragment (Insert) in einen linearisierten Vektor eingebracht, der die Amplifikation und dauerhafte Lagerung dieses Inserts ermöglicht. Als Enzym wurde die Ligase des Bakteriophagen T4 verwendet. Diese Ligase kann sowohl überhängende als auch glatte Enden ligieren. Für die Ligation wird das Insert im Überschuss eingesetzt, wobei das molare Verhältnis zwischen Vektor und Insert 1:3 bis 1:10 betragen sollte. Typischerweise sieht ein Ligationsansatz folgendermaßen aus:

100ng	Vektor-DNA
≥300ng	Insert-DNA
1µl	10x Ligase-Puffer
1µl	T4-Ligase (400U/µl)
auf 10µl	mit ddH_2O auffüllen

Der Ligationsansatz inkubiert 2 bis 3 Stunden bei Raumtemperatur. Ein Aliquot des Ligationsansatzes wird anschließend zur Transformation chemokompetenter Bakterien verwendet.

2.2.1.4 Transformation chemokompetenter Bakterien

Diese Methode dient der Amplifikation von Plasmiden im *E.coli*-Stamm JM109. Für die Vermehrung wird das Plasmid (1-2µl Plasmidpräparation oder ein Aliquot eines Ligationsansatzes) mit 50µl der chemokompetenten Bakterien für 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann für 90 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Anschließend werden die Bakterien 2 Minuten auf Eis inkubiert, mit 900µl LB-Medium versetzt und für ca. eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach werden die Bakterien in entsprechende Selektionsmedien

aufgenommen bzw. auf Selektionsagar ausplattiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide weisen entweder eine Ampicillin- oder eine Kanamycin-Resistenz auf.

2.2.2 Präparation von DNA

2.2.2.1 DNA-Isolierung aus Bakterien und DNA-Sequenzierung

Plasmide werden in unterschiedlichem Umfang und Reinheitsgrad aus transformierten Bakterien extrahiert. Die transformierten Bakterien expandieren in Flüssigkultur über Nacht bei 220Upm in einem Schüttelinkubator. Dem Medium wird zuvor ein zur Selektion geeignetes Antibiotikum zugesetzt. Die Isolation großer Mengen DNA erfolgt mit dem kommerziell erhältlichen "PureLink HiPure Plasmid Filter Purification Kit" der Firma Invitrogen. Dieser basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und der Plasmid-Aufreinigung über eine Anionenaustauscher-Säule. Für die Plasmid-Aufreinigung im kleineren Maßstab wird der -nach dem gleichen Prinzip funktionierende- "QIAprep Spin Miniprep Kit" der Firma Qiagen eingesetzt. Plasmid-Sequenzierungen wurden bei der Firma GATC (Konstanz) in Auftrag gegeben. Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden mit dem Programm Lasergene ausgewertet.

2.2.2.2 Konzentrationsmessung von DNA

Die Konzentration einer wässrigen DNA-Lösung wird bei einer Wellenlänge von 260nm photometrisch bestimmt. Eine weitere Messung bei 280nm gibt den Grad der Verunreinigung mit Protein an. In einer Quarzküvette werden 2,5µl der DNA-Präparation mit destilliertem Wasser auf 500µl aufgefüllt und anschließend wird gegen eine Wasserprobe als Referenzwert die Extinktion (E) bestimmt. E = 1 entspricht 50µg/ml. Daraus ergibt sich für die DNA-Präparation eine Konzentration (c) von:

$$c\ [\mu g/\mu l] = E260nm * 50 * 200\ \text{(Verdünnungsfaktor)}$$

2.2.3 Modifikation von DNA-Molekülen

2.2.3.1 *In vitro*-Mutagenese

Mit der verwendeten "QuickChange" *in vitro*-Mutagenese-Methode der Firma Stratagene ist es möglich Plasmid-DNA spezifisch zu verändern. Die für diese PCR eingesetzten Primer haben eine Länge von ca. 30 Basenpaaren (Bp), werden als Sinn- und Gegensinnprimer eingesetzt und tragen die einzuführende Mutation in der Mitte. Die für die PCR verwendete *Pfu*-Polymerase hat eine Korrektur-Lese (*proof-reading*)-Aktivität, wodurch verhindert werden soll, dass zu der gewünschten Mutation zusätzliche unspezifische Mutationen durch fehlerhaftes

Ablesen der parentalen DNA hinzukommen. Ein typischer Mutagenese-PCR-Ansatz sieht folgendermaßen aus:

500ng	Plasmid-DNA
2µl	Sinn-Primer (100ng/µl)
2µl	Gegensinn-Primer (100ng/µl)
5µl	10x Puffer
1,5µl	10mM dNTP-Mix
1µl	*Pfu*-Polymerase (3U/µl)
auf 50µl	mit ddH_2O auffüllen

Die *Pfu*-Polymerase benötigt 2 Minuten für die Synthese von 1000Bp. Für ein Plasmid mit 6kBp würde die Polymerase 12 Minuten benötigen, wozu noch 2 Minuten zusätzlich gerechnet werden, also insgesamt 14 Minuten.
Der PCR-Ansatz wird zunächst bei 95°C für 3 Minuten denaturiert. Dann folgen insgesamt 25 bis 30 Zyklen folgender Art:

30sec, 95°C:	Denaturierung
45sec, 65°C:	Anlagerung der Primer (Hybridisierung)
14min, 72°C:	Elongation

Nach dem abschließenden Schritt der PCR (10min, 72°C) wird die Amplifikation der Plasmid-DNA durch eine Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Danach wird die Template-DNA durch das Restriktionsenzym *Dpn*I geschnitten und abgebaut. Da dieses Enzym nur methylierte DNA erkennt und schneidet, wird während der einstündigen Inkubation bei 37°C ausschließlich die parentale, nicht mutierte, DNA gespalten und die *in vitro* erzeugten Plasmide bleiben erhalten. Daraufhin werden chemokompetente Bakterien mit einem Aliquot des PCR-Ansatzes transformiert.

2.2.3.2 Amplifikation von DNA mittels PCR

Um DNA-Fragmente, die im Weiteren für eine Klonierung eingesetzt werden sollen, möglichst mutationsfrei zu amplifizieren, wird die Platinum *Pfx*-Polymerase nach den Angaben des Herstellers (Fa. Stratagene) verwendet. Durch die wiederholende Abfolge (Zyklen) von Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Polymerisierungsreaktionen, werden ausgehend von kurzen DNA-Oligonukleotiden (Primer) die dazwischenliegenden Sequenzen amplifiziert. Die Primer mit einer Länge von 20 bis 25bp werden so gewählt, dass sie den gewünschten DNA-Bereich einschließen, mit mindestens zwei Nukleotiden „G“ oder „C“ enden, um die Bindung an die DNA zu erhöhen, und eine Schmelztemperatur zwischen 60°C und 80°C haben. Werden die

PCR-Produkte für einen Restriktionsverdau eingesetzt, enthalten die Primer des Weiteren Überhänge mit Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Eine typische Reaktion sieht folgendermaßen aus:

200ng	DNA
2µl	Sinn-Primer (10pmol/µl)
2µl	Gegensinn-Primer (10pmol/µl)
1,5µl	10mM dNTP-Mix
5µl	10x Enhancer-Lösung
5µl	10x Amplifikationspuffer
1µl	MgSO4
0,5µl	*Pfx*-Polymerase
auf 50µl	mit ddH_2O auffüllen

Der PCR-Ansatz wird zunächst bei 94°C für 3 Minuten denaturiert. Dann folgen durchschnittlich 25 bis 35 Zyklen folgender Art:

15sec, 94°C:	Denaturierung
30sec, 55°C:	Hybridisierung
60sec, 68°C:	Elongation (1kb/min)

Die Annealingtemperatur liegt 5-10°C unterhalb der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur der Primer, die Elongationszeit (im Beispiel 1min bei 68°C) wurde entsprechend der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments gewählt. Prinzipiell synthetisiert die Platinum-*Pfx*-Polymerase 1000Bb pro Minute.
Nach dem abschließenden Schritt der PCR (10min, 68°C) werden die PCR-Produkte im Agarosegel aufgetrennt und anschließend aufgereinigt.

2.2.4 RNA-Isolierung aus kultivierten eukaryotischen Zellen

Um die Expression eines Gens zu analysieren, wird die zugehörige mRNA quantifiziert. Deshalb wird zunächst die Gesamt-RNA isoliert:
Die RNA-Isolierung aus Zellen erfolgt nach den Angaben des Herstellers mit dem kommerziell erhältlichen "RNeasy-Kit" der Firma Qiagen, welcher auf der Affinität von RNA zu einer Glasfaser-Matrix basiert. Vor Beginn aller Arbeiten mit RNA werden Arbeitsplatz und Geräte mit dem RNase-Inaktivator (RNase Zap) gereinigt. Nun werden die Zellen durch Zentrifugation in der Tischzentrifuge (TZ) bei Raumtemperatur (RT) (2min, 8000Upm) pelletiert und in 350µl RLT durch mehrmaliges auf- und abziehen durch eine 0,9mm Kanüle lysiert. Nach Zugabe von einem Volumen 70% Ethanol wird das Lysat gemischt, auf die Säule transferiert und 15

Sekunden bei 10000Upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule wird mit 700µl Puffer RW1 und anschließend zweimal mit 500µl RPE-Puffer gewaschen und jeweils für 15 Sekunden bei 10000Upm (TZ) zentrifugiert. Mit 50µl RNase-freiem Wasser wird die RNA eluiert (1min, 10000Upm, RT) und kann bei -80°C gelagert werden.

2.2.5 Synthese von cDNA

Die cDNA wird ausgehend von der isolierten RNA nach den Angaben des Herstellers mit Hilfe des "First-strand cDNA Synthesis Kit" der Firma Invitrogen synthetisiert. Als Template werden 2µg RNA für die Synthese eingesetzt. Als Primer dient der im Kit enthaltene Random-Primer und als Reverse Transkriptase die MMLV-RT. Alle weiteren Reagenzien und die einzelnen Reaktionsschritte wurden entsprechend den Herstellervorgaben eingesetzt bzw. durchgeführt.

2.2.6 Zellkultur

2.2.6.1 Kultivierung und Zentrifugation

Suspensionszellen sowie adhärente Zellen werden bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert. Dafür werden die Zellkulturmedien, DMEM oder RPMI, mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin-Mix versetzt. Für einige Zelllinien wird dem Medium noch 0,1% 500mM β-Mercaptoethanol zugegeben. Die Zentrifugation der Zellen erfolgt bei 900 bis 1500Upm für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Wann und in welcher Dichte Zellen umgesetzt und wieder ausplattiert werden, hängt von der jeweiligen Zelllinie ab.

2.2.6.2 Transfektion eukaryotischer Zellen

Man unterscheidet zunächst zwischen der transienten Transfektion, um DNA nur zeitweilig in eukaryotische Zellen einzubringen, und der stabilen Transfektion, die zum dauerhaften Einbau in das Genom führt. Transient transfizierte Zellen werden nach ein oder zwei Tagen geerntet und für die jeweiligen Experimente eingesetzt. Zellen, welche die DNA dauerhaft integrieren sollen, können aufgrund der Plasmid-internen Antibiotika-Resistenz mit dem entsprechenden Antibiotikum selektioniert werden. Daraus resultierende Klone werden vom Pool getrennt.

Transfektion von adhärenten Zellen mittels der $CaPO_4$-Methode:

Adhärente HEK 293-Zellen können mit der $CaPO_4$-Methode transfiziert werden. Dabei nehmen die Zellen $CaPO_4$-Komplexe, die in ihrem Inneren die DNA beinhalten, durch Endozytose auf. Zunächst werden 10-15% einer 9cm-Schale mit konfluentem Zellrasen auf eine 24-Napf-Platte (0,5ml/Napf) oder auf eine 6-Napf-Platte (2ml/Napf) ausgesät. Am

darauffolgenden Tag findet die Transfektion statt: für Luziferase-Reportergenanalysen werden die 24-Napf-Platten transfiziert, und für Western Blot oder EMSA-Experimente die 6-Napf-Platten. Ein typischer Transfektionsansatz für einen Napf einer 6-Napf-Platte setzt sich wie folgt zusammen: Die zu transfizierende Plasmid-DNA (maximal 4µg) im Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Reinstwasser auf 90µl auffüllen, 10µl 2,5M $CaCl_2$ zugeben, mischen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend werden 100µl 2xHeBS (Natriumphosphat) zum Ansatz pipettiert, erneut vorsichtig gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor der Transfektionsansatz in kleinen Tropfen auf die Zellen pipettiert wird.
Für einen Napf einer 24-Napf-Platte wird entsprechend ein Viertel des oben beschriebenen Ansatzes hergestellt.

Transfektion von Suspensionszellen mittels Elektroporation:

Suspensionszellen (Jurkat) können durch Elektroporation, also mit elektrischer Spannung, welche die Zellmembran permeabilisiert, transfiziert werden. Für einen Transfektionsansatz werden $1x10^7$ Suspensionszellen eingesetzt, die abzentrifugiert und in 500µl frischem Medium resuspendiert werden. Vom Medium der Zellen werden 5ml zur Weiterkultivierung der Zellen aufbewahrt. Die DNA (10 bis 20µg) wird in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß unter Vermeidung von Luftblasen mit der Zellsuspension gemischt und in eine Elektroporations-Küvette (Gene-Pulser Küvette, Bio-Rad) überführt, die über zwei 0,2cm dicke Elektroden aus Aluminium verfügt. Anschließend werden die Zellen elektroporiert (260V, 975µF, Bio-Rad Gene Pulser). Nach einigen Sekunden kann die Küvette wieder entnommen und 5 Minuten auf Eis inkubiert werden, bevor die Zellsuspension mit 5ml frischem und 5ml altem Zellkulturmedium in eine 9cm Petrischale überführt wird.

2.2.6.3 Induktion der Zellen

Im folgenden Abschnitt werden die Bedingungen für die Induktion von Gewebekulturzellen mit unterschiedlichen Stimuli angegeben:

PMA:	50ng/ml
Ionomyzin:	500ng/ml
TNFα:	40ng/ml
LPS:	1µg/ml

2.2.7 Präparation von Proteinextrakten aus Zelllinien

Alle Arbeitsschritte zur Herstellung von Zellextrakten werden mit eisgekühlten Puffern und auf Eis ausgeführt. Auch die Zentrifugation findet stets bei 8°C statt.

2.2.7.1 Gesamtproteinextrakte für Luziferase-Messungen

Adhärente Zellen (HEK 293-Zellen) werden in der Zellkulturschale mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 100µl TNT-Lysepuffer überschichtet. Bei einer 10-minütigen Inkubation bei 4°C findet die Lyse der Zellen statt. Dieser Extrakt kann für die Luziferase-Messung direkt, ohne geklärt zu werden, eingesetzt werden.
Suspensionszellen (Jurkat und S107) werden in ein Falcon-Röhrchen überführt und pelletiert (5min; 900Upm; 4°C). Anschließend werden die Zellen in 1ml PBS gewaschen und dabei in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation (2min, 10000Upm, 4°C) werden die Zellen je nach Volumen des Pellets in 50 bis 200µl Extraktionspuffer resuspendiert und auf diese Weise lysiert. Abschließend werden die Lysate durch Zentrifugation geklärt, die Überstände in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei –80°C gelagert.

2.2.7.2 Gesamtproteinextrakte für Western Blot

Für die Gewinnung von Gesamtproteinextrakten aus eukaryotischen Zellen werden diese pelletiert (5min, 1500Upm, 4°C), der Überstand verworfen, das Pellet mit 1ml eiskaltem PBS gewaschen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut abzentrifugiert (2min, 10000Upm, 4°C).
Die Zelllyse erfolgt durch Resuspendieren des Pellets in einem geeigneten Volumen TNT-Lysepuffer. Anschließend werden die Lysate durch Zentrifugation geklärt (10min, 13000Upm, 4°C). Das Lysat (Überstand) wird nach dem Überführen in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß bei -80°C gelagert.

2.2.7.3 Gesamtproteinextrakte für die Gelretardationsanalyse

Nach der Zellernte (5min, 1500Upm, 4°C) werden die Zellen mit 1ml eiskaltem PBS in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend durch Zentrifugation pelletiert (2min, 8000Upm, RT). Die Zellen werden im Lysepuffer Dignam C resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, danach auf Eis langsam aufgetaut und anschließend durch Vortexen aufgeschlossen. Dieser Vorgang wird zwei Mal wiederholt. Nach dem dritten langsamen Auftauen der Extrakte auf Eis, werden die Lysate durch eine 30-minütige Zentrifugation (13000Upm, 4°C) geklärt. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und bei -80°C gelagert.

2.2.7.4 Zytoplasmatische und nukleäre Proteinextrakte

Nach der Zellernte (5min, 1500Upm, 4°C) werden die Zellen mit 1ml eiskaltem PBS in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut abzentrifugiert (2min, 10000Upm, 4°C). Der

Überstand wird verworfen und das Pellet in Puffer A resuspendiert (200µl für 1-5 x 10^6 Zellen). Die Zellsuspension wird für 20 Minuten auf Eis inkubiert, damit die Zellen anschwellen. Anschließend wird dem Extrakt 1%-iges NP-40 im Verhältnis 1:20 zugegeben und erneut inkubiert (3min, RT). Durch 20-sekündiges Vortexen wird die Zellmembran aufgeschlossen, der Kern bleibt jedoch unbeschädigt. Das Zytoplasma wird durch Zentrifugation (1min, 8000Upm, RT) abgetrennt. Der Überstand (Zytoplasma) wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Resuspendieren des Sediments in 200µl Puffer A und Zentrifugieren bei 8000Upm für eine Minute, wird das Zellkernpellet gewaschen. Dieses wird nun mit 80µl Puffer C versetzt und 30 Minuten bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Abschließend werden sowohl der ungereinigte Zytoplasmaextrakt, als auch der Kernproteinextrakt für 10 Minuten bei 13000Upm (4°C) zentrifugiert, und der jeweilige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Extrakte können bei –80°C aufbewahrt werden.
Der Kernproteinextrakt kann für Gelretardationsanalysen eingesetzt werden, welche dadurch spezifisch die DNA-Bindungsaktivität nukleärer Proteine darstellen. Des Weiteren kann die subzelluläre Lokalisation von Proteinen untersucht werden, indem Zytoplasma- und Kernproteinextrakte getrennt analysiert werden.

2.2.7.5 Bradford-Proteinbestimmung

Um die Konzentration eines Proteinextrakts zu bestimmen, werden 2µl Extrakt mit 1ml Bradford-Reagenz (im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt) gemischt, dessen Farbstoff Coomassie Brillantblau in saurer Lösung Komplexe mit den Proteinen bildet (Bradford, 1976). Dadurch wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffs zu einer Wellenlänge von 595nm verschoben. Der Reaktionsansatz wird gemischt und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor im Photometer die optische Dichte bei 595nm gemessen wird.
Die Proteinkonzentration kann anhand der Eichkurve abgeschätzt werden, die durch mehrere Ansätze einer Proteinlösung (BSA) mit Konzentrationen zwischen 1 und 20µg/µl hergestellt wird.

2.2.8 Luziferase-Messung

Um die transkriptionelle Aktivität von NF-κB zu bestimmen, wurde der Duale–Luziferase-Assay angewendet. Zunächst werden Zellen mit zwei unterschiedlichen Luziferase-Reporterkonstrukten transient transfiziert. Der Photinus-Luziferasereporter (3xκB.luci) enthält drei Kopien des NF-κB-Motivs und ein aus dem amerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis* stammendes Gen, das für das Enzym Luziferase kodiert. Bindet NF-κB nun an das 3xκB-Motiv, so kommt es zur Expression des Enzyms Luziferase, welches unter ATP-Verbrauch Luziferin zu Oxyluziferin umsetzt. Während dieser Reaktion entsteht gelbes Licht, das mit einem

Luminometer gemessen werden kann und ein Maß für die NF-κB-spezifische transkriptionelle Aktivität darstellt.

Das zweite Konstrukt ist der Renilla-Luziferasereporter unter der Kontrolle des β-Aktin-Promotors. Die Luziferase der Weichkoralle (Seefeder) *Renilla reniformis* setzt Coelenterazin in Gegenwart von Sauerstoff zu Coelentamid und Kohlendioxid um. Dabei entsteht blaue Lumineszenz. Die Messung dieses emittierenden Lichts stellt eine interne Kontrolle dar, da der Aktin-Promotor in allen Transfektionsansätzen die gleiche Aktivität aufweisen sollte.

Die transfizierten Zellen werden für 16 bis 20 Stunden im Zellkulturschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und anschließend mit TNT lysiert. Mit den Zelllysaten werden die jeweiligen Luziferaseaktivitäten im Luminometer bestimmt. Zunächst wird die Photinus- und direkt im Anschluss die Renilla-Luziferaseaktivität gemessen. Vom Zellextrakt werden 10µl für die Messung abgenommen und mit 30µl eines Puffers versetzt, der das Substrat der Photinus-Luziferase, Luziferin, enthält. Direkt nach dieser Messung werden 20µl eines Coelenterazin-enthaltenden Puffers zugegeben und die Messung erneut gestartet. Mit dem zweiten Puffer wird zugleich die erste Reaktion gestoppt. Die relative spezifische Luziferaseaktivität kann wie folgt berechnet werden:

„(niedrigster Renilla-Wert/Renilla-Wert) ∗ 3xκB-Luziferase-Wert“

2.2.9 Western Blot

2.2.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Die SDS-Polyacrylamid (PAA)-Gele bestehen aus einem 6-bis 14%-igen Trenngel und einem 5%-igen Sammelgel. Die Trenngellösung wird zwischen zwei -durch Abstandhalter getrennte- Glasplatten, die zuvor mit Ethanol und ddH_2O gereinigt wurden, bis 2cm unterhalb des Randes der kleineren Glasplatte gegossen. Um Luftblasen zu vermeiden und eine glatte Gelkante zu schaffen, wird das Trenngel mit 70%-igem Ethanol überschichtet. Nach der Polymerisation wird zunächst das Ethanol mit ddH_2O ausgewaschen. Anschließend wird das Sammelgel gegossen und ein entsprechender Kamm darin platziert.

Die Proteinextrakte (je 50-100µg) werden in fünf Volumen 6x Laemmli-Probenpuffer für fünf bis zehn Minuten bei 95°C denaturiert und parallel mit einem Größenstandard elektrophoretisch in SDS-Laufpuffer über das SDS-Polyacrylamidgel bei 150V aufgetrennt. Der Gellauf wird gestoppt, wenn die Bromphenolblaufront das untere Ende des Gels erreicht.

2.2.9.2 Transfer auf Nitrozellulose-Membran und Immun-Detektion

Da die Proteine im Polyacrylamidgel nicht mit Antikörpern reagieren können, werden sie elektrophoretisch per Nass-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Membran wird zuvor gewässert und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Für die Elektrophorese werden die Komponenten wie folgt im Transferpuffer zusammengesetzt: das Gel wird auf ein Whatman-Fließpapier in Größe des Gels gelegt, darauf werden die Nitrozellulose-Membran und ein weiteres Whatman-Fließpapier positioniert. Um Luftblasen zwischen Gel und Membran zu vermeiden, wird mit einem Röhrchen leicht darüber gerollt. Dieser Aufbau wird nun zwischen zwei Schwämme gelegt, fixiert und im Transfergerät positioniert, welches mit Transferpuffer aufgefüllt wird. Die Membran wird zur Anode hin orientiert. Der Transfer erfolgt für eine Stunde bei 80V und 4°C in einem Nass-Blotter.
Nach dem Transfer wird die Membran in TBS-Tween gewaschen und unspezifische Bindungen durch eine einstündige Inkubation in Blockmilch abgesättigt. Anschließend wird die Membran im primären Antikörper zwei Stunden inkubiert. Die Antikörperverdünnungen werden nach Hersteller-Angaben in Blockmilch oder BSA (*bovine serum albumin*) angesetzt. Nach der Inkubation wird die Membran dreimal 10 Minuten in TBS-Tween gewaschen. Anschließend wird der Peroxidase-gekoppelte, zweite Antikörper (1:5000 Verdünnung) zugegeben und für eine Stunde mit der Membran inkubiert. Danach wird die Membran dreimal 10 Minuten gewaschen (s.o.) und mit dem ECL-System nach den Angaben des Herstellers behandelt. Durch Zugabe des Peroxidase-Substrats, einem Bestandteil des ECL-Systems, kommt es zur Lichtemission. Um die Proteine zu detektieren, wird die Membran daher einem Röntgenfilm exponiert. Die Expositionszeit wird je nach Signalstärke individuell bestimmt.
Die an die Proteine gebundenen Antikörper können durch 15-minütige Inkubation mit 0,2M NaOH-Lösung (+1-2% SDS) wieder entfernt werden. Nach dieser Behandlung wird die Membran dreimal 10 Minuten mit TBS-Tween gewaschen, um dann erneut blockiert zu werden (s.o.). Nun kann eine weitere Antikörper-Behandlung durchgeführt werden.

2.2.10 Immunpräzipitation

Durch die Immunpräzipitation werden Proteine bzw. Proteinkomplexe mit spezifischen Antikörpern aus Zellextrakten isoliert. Die Zellernte erfolgt wie bereits beschrieben. Die Zellen werden mit TNT -oder je nach Ziel des Experiments mit einem anderen Lysepuffer- lysiert. Das Zelllysat wird mit 2µg eines unspezifischen Serums für eine Stunde auf Eis inkubiert. Das Serum entstammt der gleichen Spezies wie auch der anschließend eingesetzte Antikörper. Dadurch sollen unspezifische Bindungen an den Immunglobulinen abgesättigt werden. Nach der einstündigen Inkubation werden dem Ansatz 10µl einer bereits mit Lysepuffer gewaschenen ProteinA/G-Agarose-Suspension zugesetzt. Die Inkubation erfolgt für eine Stunde auf einem

Rotor bei 4°C. So werden dem Ansatz unspezifische Antikörper durch die Bindung an die ProteinA/G-Agarose wieder entzogen. Die Inkubation wird beendet, indem die Agarose durch Zentrifugation (5sec, 10000Upm, 4°C) sedimentiert wird. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für die Immunpräzipitation (IP) werden von diesem Lysat mindestens 500µg Protein eingesetzt. Für die Kontrolle der Proteinexpression werden etwa 50µg Protein vom Lysat abgenommen und im Western Blot analysiert (Input).
Für die Immunpräzipitation wird das Lysat mit 1µg eines spezifischen Antikörpers für eine Stunde auf Eis inkubiert. Um die spezifischen Antikörper-Antigen-Komplexe aus dem Extrakt zu gewinnen, werden 10µl einer bereits mit Lysepuffer gewaschenen ProteinA/G-Agarose-Suspension zugegeben. Dieses Gemisch inkubiert für weitere 60 Minuten bei 4°C auf einem Rotor. Die Agarose wird pelletiert und der Überstand verworfen. Das Sedimentt, das nun aus Agarose-Antikörper-Antigen-Komplexen besteht, wird zweimal mit TNT-Lysepuffer und einmal mit PBS gewaschen, mit 20µl SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95°C 10 Minuten aufgekocht. Die Proteine können nun mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot detektiert werden.

2.2.11 *In vivo*-Ubiquitinylierungs-Assay

Der *in vivo*-Ubiquitinylierungs-Assay findet generell unter denaturierenden Bedingungen statt. Daher werden die Lysate im TNT-Lysepuffer nach Zugabe von 0,5% SDS für fünf Minuten bei 95°C inkubiert, um so alle nicht kovalent an RelB gebundenen Proteine abzuspalten. Die anschließende RelB-Immunpräzipitation führt daher zur Fällung von RelB und dessen kovalenten Bindungspartnern. Anstelle von TNT kann auch RIPA für die Lyse eingesetzt werden. Die Zugabe von SDS entfällt dann.

2.2.12 *In vivo*-SUMOylierungs-Assay

Für diesen Assay ist die Zugabe des DeSUMOylierungs-Inhibitors NEM (N-Ethyl-Maleimid) wichtig. Nach der Zellerente, dem Überführen der Zellen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß, werden diese in kaltem PBS mit 20mM NEM resuspendiert und 3 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugation nochmals sedimentiert (2min, 8000Upm, 4°C). Die Lyse erfolgt anschließend in TNT ohne DTT, da dieses reduzierende Agens zur Inaktivierung von NEM führt. Nach der Lyse wird DTT (Endkonzentration 1mM) ergänzt, die Extrakte werden durch Zentrifugation geklärt und der Überstand kann für eine Immunpräzipitation eingesetzt werden, um die SUMOylierung von RelB zu analysieren.

2.2.13 DNA/Protein-Bindungsstudien

2.2.13.1 Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide

Zunächst werden die einzelsträngigen Oligonukleotide in Wasser gelöst (100pmol/µl) und anschließend hybridisiert.

Pipettierschema für die Hybridisierung:

3µl	Sinn-Strang Oligonukleotid
3µl	Gegensinn-Strang Oligonukleotid
10µl	10x Annealingpuffer
auf 100µl	mit ddH_2O auffüllen

Der Reaktionsmix wird 10 Minuten bei 100°C inkubiert und über mehrere Stunden hinweg langsam auf Raumtemperatur abgekühlt (1°C/min).

2.2.13.2 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

DNA-Sonden (κB-Sonde, Oct-Sonde) für die Gelretardationsanalysen werden mittels der Klenow-Reaktion radioaktiv markiert. Die Oligonukleotide werden so kreiert, dass sie jeweils ein vier Nukleotide langen Überhang am 3'-Ende aufweisen. Durch die Klenow-Polymerase werden diese überhängenden DNA-Enden mit radioaktiven ^{32}P-Nukleotiden aufgefüllt.

Pipettierschema für die Klenow-Reaktion:

1µl	κB-Sonde oder Oct-Sonde [50 ng/µl]
5µl	10x Klenow-Puffer
2,5µl	0,5mM dNTP-Mix (ohne dCTP)
5µl	^{32}P-dCTP (10µCi/µl)
1µl	Exo (-) Klenow-Enzym (5U/µl)
auf 50µl	mit ddH_2O auffüllen

Der Reaktionsansatz wird für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und mit 20µl STE-Puffer versetzt. Um freie radioaktive Nukleotide von der markierten DNA zu trennen, erfolgt die Aufreinigung mittels gebrauchsfertiger Reinigungssäulen (*push columns*, Fa. Stratagene) nach Angaben des Herstellers. Die Säulen werden zunächst mit 70µl STE-Puffer äquilibriert bevor der Reaktionsansatz durch die Säulen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gepresst wird. Anschließend wird die Säule mit 80µl STE-Puffer gespült. Die spezifische Aktivität der Proben nach der Aufreinigung wird über die Cerenkov-Zählung bestimmt.

2.2.13.3 Gelretardationsanalyse

Die Bindung von Proteinen an spezifische DNA-Sequenzen kann nach (Fried and Crothers, 1981), sowie (Garner and Revzin, 1981) im sogenannten *Elektrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) sichtbar nachgewiesen werden. Proteine werden mit radioaktiv markierter DNA (Sonde) inkubiert und die entstehenden Komplexe in einem nativen Polyacrylamidgel (6% Polyacrylamid; Laufpuffer 0,4x TBE) aufgetrennt. DNA-Protein-Komplexe zeigen eine verzögerte Wanderungsgeschwindigkeit im Gel und können somit von ungebundener DNA abgetrennt werden. Durch den unspezifischen Kompetitor poly[dIdC] werden unspezifisch bindende Proteine abgefangen. Eine spezifische Protein-DNA-Wechselwirkung kann entweder durch Kompetition mit der entsprechenden nicht-radioaktiv markierten DNA-Sonde durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden, oder durch einen spezifischen Antikörper (Supershift). Durch Bindung des Antikörpers an den Protein-DNA-Komplex entsteht im Gel ein großer, sehr langsam wandernder (geshifteter) Komplex. Durch die Antikörperbindung kann es jedoch auch zur Inhibierung der Bindung des Proteins an das Oligomer kommen, weshalb dann kein Komplex zu sehen ist.

Zu 5µg Kernprotein wird folgender Master-Mix hinzugefügt:

0,5µl	poly[dIdC] [2µg/µl]
5µl	3x Bindungs-Puffer
1µl	^{32}P-DNA-Fragment [30000-60000cpm/µl]
auf 15µl	mit H_2O (Ampuwa) auffüllen

Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis werden die Proben parallel zum Farbmarker auf das native PAA-Gel aufgetragen. Der Gelvorlauf erfolgt für zweieinhalb Stunden bei 200V, der eigentliche Gellauf für zwei Stunden bei 200V. Das Gel wird anschließend auf 3MM-Whatman-Papier auf dem Vakuum-Geltrockner 60 Minuten bei 80°C getrocknet und dann über Nacht bei -80°C einem Röntgenfilm exponiert.

3 Ergebnisse

3.1 Posttranslationale Modifikationen des RelB-Proteins

Um die funktionelle Diversität der Familie der NF-κB-Transkriptionsfaktoren zu gewährleisten, bedarf es einer akkuraten Regulation dieser Proteine. Eine erste Steuerungsebene stellt der dimere Aufbau der NF-κB-Faktoren dar, da die verschieden zusammengesetzten NF-κB-Dimere funktionelle Unterschiede aufweisen und zudem Stimulus- und Zelltyp-spezifisch aktiviert werden. Darüber hinaus übernehmen posttranslationale Modifikationen (PTMs), zu denen beispielsweise Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinylierung, Methylierung und SUMOylierung zählen, eine wichtige Rolle bei der Feinregulation des NF-κB-Systems. Die Vielzahl möglicher posttranslationaler Modifikationen führt zu einem breiten Spektrum von Effekten am Zielprotein. Speziell die Konjugation von Ubiquitin-Einheiten, die Ubiquitinylierung, kann das Zielprotein in vielerlei Hinsicht beeinflussen. Die Ubiquitinylierung ist ein notwendiger Schritt beim proteasomalen Abbau von Proteinen. Sie kann sich jedoch auch auf die Aktivierung, subzelluläre Lokalisation oder auch die Protein-Protein-Interaktion des Zielproteins auswirken (Haglund and Dikic, 2005).

3.2 Regulation der RelB-Degradierung durch posttranslationale Modifikationen des RelB-Proteins

In T-Zellen erfolgt nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation bzw. nach T-Zell-Rezeptor-imitierender Behandlung mit PMA und Ionomyzin eine induzierbare Degradierung von RelB. Der Abbau des Proteins findet in zwei Schritten statt: Zunächst kommt es nahe des Aminoterminus von RelB zu einer endoproteolytischen Spaltung, wodurch ein kleineres RelB-Degradierungsprodukt entsteht, welches als zusätzliches Signal im Western Blot detektierbar ist. Den nächsten Schritt stellt der vollständige proteasomale Abbau dar (Marienfeld et al., 2001). Durch einen Proteasominhibitor wird zwar das schneller migrierende Signal stabilisiert, jedoch nicht das Gesamtlängen-Protein. Folglich wird ausschließlich der proteasomale Abbau, aber nicht die intramolekulare Spaltung gehemmt. Basierend auf diesen Vorkenntnissen über den teilweise proteasomalen Abbau von RelB und der Bedeutung einer spezifischen Ubiquitinylierung für den proteasomalen Abbau zellulärer Proteine wurde angenommen, dass auch RelB ein Ziel von Ubiquitinylierungs-Prozessen darstellt.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde der Ubiquitinylierungs-Status von RelB in unbehandelten, PMA/Ionomyzin- oder TNFα-stimulierten Namalwa B-Zellen analysiert. Namalwa B-Zellen wurden für diese Analyse verwendet, da eine spezifische posttranslationale Modifikation häufig nur an einem Bruchteil der Zielproteine erfolgt und RelB in der B-Zelllinie

Namalwa sehr stark exprimiert wird. Die Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder nach 15- bzw. 30-minütiger Stimulation mit PMA/Ionomyzin (P/I) oder TNFα lysiert. Mittels RelB-spezifischer Antikörper wurde endogenes RelB aus den Lysaten präzipitiert und im Western Blot analysiert.

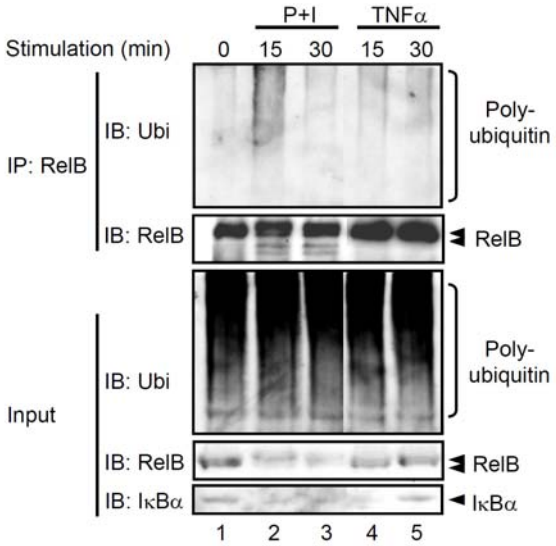


Abb.3.1: Analyse der endogenen RelB-Ubiquitinylierung in Namalwa B-Zellen
Namalwa B-Zellen wurden unbehandelt belassen (Spur 1) oder nach 15- bzw. 30-minütiger PMA/Ionomyzin- (P+I; Spuren 2 und 3) bzw. TNFα-Stimulation (Spuren 4 und 5) mit RIPA lysiert. Mit RelB-spezifischen Antikörpern wurde anschließend das endogene RelB gefällt (IP) und in Western-Blot-Analysen mit den angegebenen Antikörpern eingesetzt. Die RelB- und IκBα-spezifischen Western Blots (IB) wurden mit einem Aliquot der Extrakte vor der IP durchgeführt (Input) und dienen der Kontrolle der Stimulationseffizienz.

Der anti-Ubiquitin Western Blot in Abbildung 3.1 zeigt in Spur 1, dass bereits ohne Stimulation der Zellen eine basale RelB-Polyubiquitinylierung auftritt. Des Weiteren scheint TNFα die basale Ubiquitinylierung nicht zu beeinflussen, da weder nach 15- noch nach 30-minütiger Stimulation eine Veränderung der Intensität oder des Musters des Ubiquitin-Signals im Western Blot auftritt (Spuren 4 und 5, oben). Im Gegensatz dazu führt die PMA/Ionomyzin-Stimulation nach 15 Minuten zu einem deutlichen quantitativen Anstieg der Ubiquitinylierung, die dann aber nach 30-minütiger Stimulation wieder auf das basale Niveau zurückfällt (Spuren 2 und 3, oben).
Wie bereits erwähnt, ist die bekannteste Funktion der Ubiquitinylierung die Markierung des Zielproteins für den proteasomalen Abbau. Daher lag die Vermutung nahe, dass die beobachtete gesteigerte Ubiquitinylierung nach PMA/Ionomyzin-Stimulation tatsächlich im Zusammenhang mit der beschriebenen RelB-Degradierung steht. Abbildung 3.1 (Spuren 1-3, zweite Teilabbildung von oben) zeigt nach PMA/Ionomyzin-Stimulation sowohl schneller wandernde RelB-Signale, als auch eine Degradierung des Gesamtlängen-RelB-Proteins, die mit der zunehmenden Ubiquitinylierung einhergeht. Um diese Verbindung zwischen der gesteigerten RelB-Ubiquitinylierung und dessen Abbau zu belegen, wurden die Namalwa-Zellen

innerhalb eines zweiten Stimulations-Experiments für 30 Minuten mit dem Proteasominhibitor MG132 inkubiert, bevor sie für 20 und 60 Minuten mit PMA/Ionomyzin stimuliert wurden.

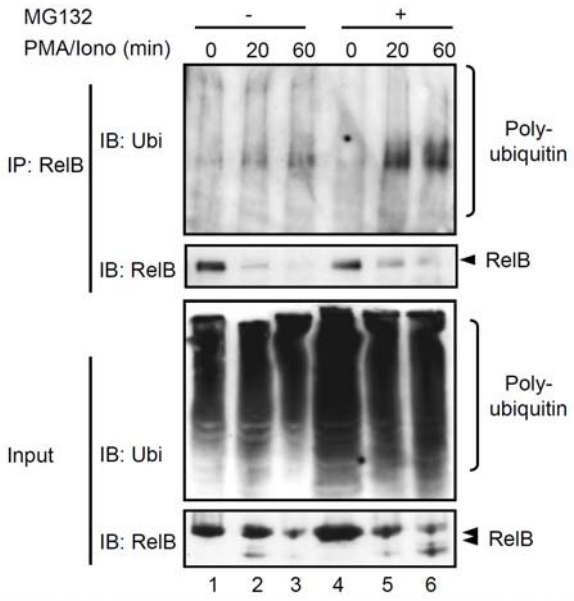


Abb.3.2: Einfluss der endogenen RelB-Ubiquitinylierung in Namalwa B-Zellen auf die Stabilität des RelB-Proteins
Namalwa B-Zellen wurden unbehandelt belassen oder nach 30-minütiger Inkubation mit dem Proteasominhibitor MG132 (25µM) einer 20- bzw. 60-minütigen PMA/Ionomyzin-Stimulation unterzogen. Die Zellen wurden anschließend mit RIPA lysiert, das endogene RelB-Protein wurde gefällt (IP) und im Western Blot mit RelB- und Ubiquitin-spezifischen Antikörpern analysiert. Als quantitative Kontrolle der Proteine wurde direkt nach der Lyse je ein Aliquot der Extrakte vor der IP im Western Blot analysiert (Input).

Das Ergebnis in Abbildung 3.2 zeigt sowohl nach 20- als auch nach 60-minütiger PMA/Ionomyzin-Stimulation die Degradierung (Spuren 1 bis 3, zweite Teilabbildung von oben) und eine im Vergleich zu den unstimulierten Zellen leicht gesteigerte Ubiquitinylierung des RelB-Proteins (Spuren 1 bis 3, oben). Durch die Vorinkubation mit dem Proteasominhibitor kann das RelB-Degradierungsprodukt teilweise stabilisiert und die RelB-Ubiquitinylierung intensiviert werden (Abbildung 3.2, Spuren 4 bis 6). Die Ergebnisse der Abbildungen 3.1 und 3.2 lassen den Schluss zu, dass die durch PMA/Ionomyzin-induzierte gesteigerte Polyubiquitinylierung von RelB mit der gleichzeitig beobachteten Degradierung im Zusammenhang steht. Außerdem weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass PMA und Ionomyzin die Degradierung nicht nur in T-Zellen, sondern auch in B-Zellen induziert.

3.3 Etablierung eines *in vivo*-Ubiquitinylierungs-Assays

Für die detailliertere Analyse der RelB-Ubiquitinylierung wurde der im Folgenden beschriebene *in vivo*-Ubiquitinylierungs-Assay etabliert: Zunächst wurden HEK 293-Zellen transient mit Expressionsvektoren, die für HA-markiertes Ubiquitin, Flag-markiertes wildtypisches RelB (Flag-

$RelB_{WT}$) oder Flag-markiertes NEMO (Positivkontrolle) kodieren, transfiziert, was zur ektopischen Expression von HA-Ubiquitin, Flag-$RelB_{WT}$ bzw. Flag-NEMO führt. Ein wichtiger experimenteller Bestandteil dieses Ubiquitinylierungs-Assays ist die Durchführung von zwei aufeinanderfolgenden Immunpräzipitationen. Die erste Flag-spezifische Präzipitation (IP1) findet unter milden Bedingungen statt, weshalb neben RelB und allen modifizierten Formen von RelB auch mit RelB interagierende Proteine kopräzipitiert werden. Die Hälfte dieser ersten Präzipitation wurde direkt im Western Blot analysiert (IP1, Abb.3.3). Die andere Hälfte wurde im TNT-Lysepuffer nach Zugabe von 0,5% SDS für fünf Minuten bei 95°C inkubiert, um so alle nicht-kovalenten Bindungen zu spalten. Der Überstand wurde für die zweite Flag-spezifische Immunpräzipitation eingesetzt (IP2, Abb.3.3). Das dadurch erhaltene Präzipitat (IP2) sollte RelB und ausschließlich kovalent daran gebundene Proteine beinhalten.

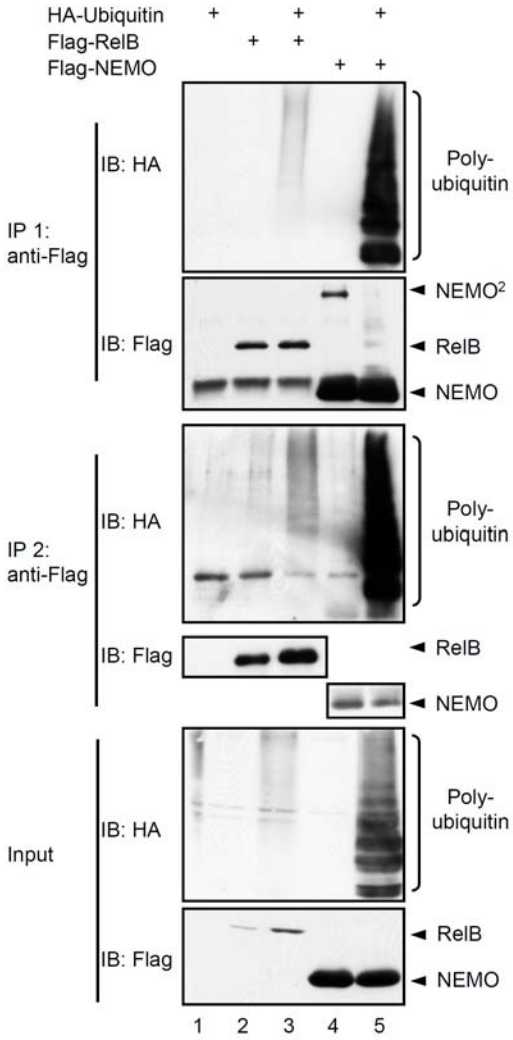


Abb.3.3: Etablierung des *in vivo*-RelB-Ubiquitinylierungs-Assays
Für den *in vivo*-Ubiquitinylierungs-Assay wurden HEK 293-Zellen transient mit je 1µg Flag-RelB oder Flag-NEMO alleine (Spuren 2 und 4) oder in Kombination mit einem Expressionsvektor für HA-Ubiquitin (Spuren 3 und 5) transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen in TNT lysiert und 90% des Extrakts für eine Immunpräzipitation (IP) mit Flag-spezifischen Antikörpern eingesetzt. Die Immunpräzipitate wurden in TNT mit 0,5% SDS aufgekocht. 50% dieses Eluats wurden direkt im Western Blot analysiert (IP1) und

50% wurden nach einer zweiten anti-Flag-Immunpräzipitation analysiert (IP2). 10% des Lysats wurden zur Expressionskontrolle (Input) im Western Blot (IB) mit HA- oder Flag-spezifischen Antikörpern analysiert.

Nach beiden Immunpräzipitationen ist im HA-spezifischen Western Blot ein Signal in Form einer hochmolekularen diffusen Musterung zu sehen. Das bedeutet, dass unter den gewählten Bedingungen eine konstitutive *in vivo*-Ubiquitinylierung des RelB-Proteins stattfindet (Spur 3, IP2). Das NEMO-Protein (Spur 5, IP2) dient als Positivkontrolle, da dessen Ubiquitinylierung bereits bekannt war (Jin et al., 2009). Die diffuse Musterung des Ubiquitinsignals entsteht je nach Anzahl der konjugierten Ubiquitineinheiten aufgrund des variablen Molekulargewichts und Laufverhaltens der modifizierten RelB-Proteine im SDS-Gel. Des Weiteren weisen diese Ergebnisse nicht auf eine Monoubiquitinylierung, sondern auf eine Polyubiquitinylierung oder eine Multiubiquitinylierung (multiple Monoubiquitinylierung) hin. Im Fall der Polyubiquitinylierung sind Ketten von Ubiquitinpeptiden an die Lysinreste des RelB-Proteins gebunden (Li and Ye, 2008), wohingegen beim Auftreten der Multiubiquitinylierung einzelne Ubiquitinpeptide an einige Lysinreste des Zielproteins gebunden sind (Haglund et al., 2003a).

3.4 Bedeutung der Ubiquitinylierung für die Stabilität von RelB

Die Ergebnisse der Abbildungen 3.1 und 3.2 deuten auf eine kritische Rolle der RelB-Ubiquitinylierung für dessen proteasomale Degradierung hin. Um zu analysieren, ob eine verstärkte RelB-Ubiquitinylierung zu einem erhöhten proteasomalen Abbau von RelB führt, wurden HEK 293-Zellen mit Expressionsvektoren, die für Flag-RelB oder HA-Ubiquitin kodieren, kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen für vier oder acht Stunden mit Cycloheximid inkubiert oder blieben unbehandelt.

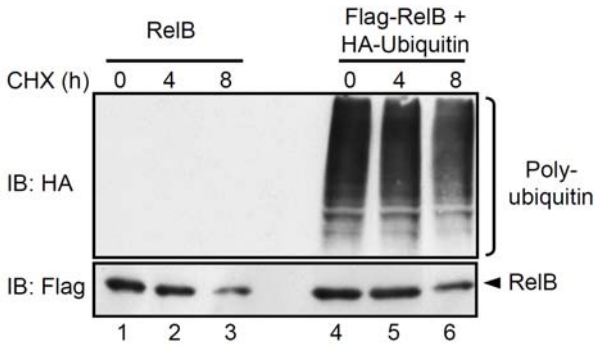


Abb.3.4: Einfluss der RelB-Ubiquitinylierung auf die Stabilität des RelB-Proteins
HEK 293-Zellen wurden transient mit dem Flag-$RelB_{WT}$-Expressionsvektor in Kombination mit (Spuren 4 bis 6) oder ohne HA-Ubiquitin-Expressionsvektor (Spuren 1 bis 3) transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen entweder unbehandelt oder nach 4- bzw. 8-stündiger Cycloheximid-Inkubation (CHX, 50ng/ml) geerntet. Die Gesamtzellextrakte wurden im Western Blot (IB) mit den in der Abbildung angegebenen Antikörpern analysiert.

Das Antibiotikum Cycloheximid führt zur Inhibierung der eukaryotischen Proteinbiosynthese, indem es die Translation der mRNA hemmt. Auf diese Weise kann die Proteinbiosynthese in Zellkulturen kontrolliert inhibiert werden, um die Stabilität kurzlebiger Proteine zu analysieren. Der Western Blot mit Flag-spezifischen Antikörpern zeigt deutlich, dass die Halbwertszeit von RelB trotz Ubiquitin-Koexpression nicht verringert wird (Abb. 3.4, Spuren 4 bis 6). Da es aufgrund dieses Ergebnisses relativ unwahrscheinlich ist, dass eine verstärkte RelB-Ubiquitinylierung generell eine gesteigerte proteasomale Degradierung von RelB nach sich zieht, scheint zumindest die basale RelB-Ubiquitinylierung mit nicht-proteasomalen Funktionen in Verbindung zu stehen.

Um diesen Punkt weiter zu untersuchen, wurden RelB-Mutanten mit spezifischer Substitution von Thr^{84} und Ser^{552} eingesetzt. Die Phosphorylierung dieser Aminosäurereste spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der RelB-Degradierung. Die Substitution dieser Aminosäuren durch Alanin hat eine phospho-inhibierende Wirkung (Flag-$RelB_{ST/A}$), wohingegen die Substitution durch Glutamat eine ständige Phosphorylierung imitiert (Flag-$RelB_{ST/E}$) (Marienfeld et al., 2001). Somit wäre im Fall der Flag-$RelB_{ST/E}$-Mutante eine erhöhte Ubiquitinylierung und bei Flag-$RelB_{ST/A}$ eine geringere RelB-Ubiquitinylierung zu erwarten, falls die Steuerung des proteasomalen Abbaus die einzige Funktion der RelB-Ubiquitinylierung wäre. HEK 293-Zellen wurden mit Expressionsvektoren, die entweder für Flag-$RelB_{WT}$ oder für die beiden Flag-markierten RelB-Doppelmutanten kodieren, in Kombination mit einem HA-Ubiquitin kodierenden Plasmid kotransfiziert. Nachfolgend wurde die Ubiquitinylierung der verschiedenen RelB-Proteine in einem *in vivo*-Ubiquitinylierungs-Assay auf Unterschiede im Muster der Ubiquitinylierung untersucht (Abb. 3.5).

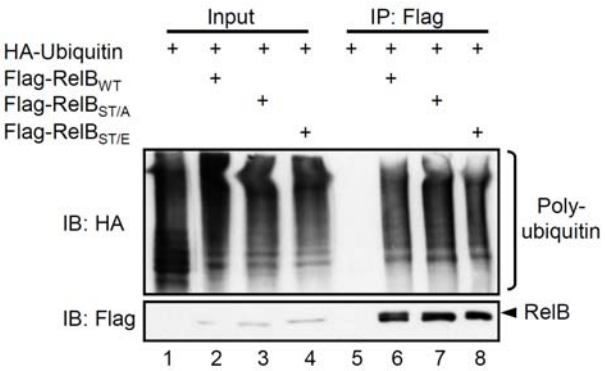


Abb. 3.5: Relevanz spezifischer RelB-Phosphorylierungen für die RelB-Ubiquitinylierung und die Stabilität
In vivo-Ubiquitinylierungs-Assay mit Gesamtzellextrakten von HEK 293-Zellen, welche transient mit dem Flag-$RelB_{WT}$- (Spuren 2 und 6), Flag-$RelB_{ST/A}$- (Spuren 3 und 7) oder Flag-$RelB_{ST/E}$-Expressionsvektor (Spuren 4 und 8) in Kombination mit dem HA-Ubiquitin-Expressionsvektor transfiziert wurden. Die Zellernte sowie die RelB-Präzipitation mit Flag-spezifischen Antikörpern (IP) fanden nach 48 Stunden statt. 10% des Lysats wurden zur Expressionskontrolle (Input) im Western Blot mit HA- und Flag-spezifischen Antikörpern analysiert.

Im Western Blot mit HA-spezifischen Antikörpern sind keine signifikanten Unterschiede im Ubiquitinylierungsmuster der unterschiedlichen RelB-Versionen zu sehen (Spuren 6-8, oben). Das lässt die Vermutung zu, dass die RelB-Ubiquitinylierung durch die Phosphorylierung an Thr^{84} und Ser^{552} nicht beeinflusst wird. In Verbindung mit der durch die Ubiquitinylierung unveränderten Halbwertszeit von RelB (Abb. 3.4) weist dieses Ergebnis darauf hin, dass die basale RelB-Ubiquitinylierung nicht ausschließlich mit der RelB-Degradierung in Zusammenhang steht, sondern auch nicht-proteasomale Aufgaben erfüllt.

3.5 Charakterisierung der RelB-konjugierten Polyubiquitinketten

Die bisher erzielten Ergebnisse deuten auf zwei unterschiedliche Bedeutungen der Ubiquitinylierung für RelB hin: Eine nach PMA/Ionomyzin-Stimulation gesteigerte RelB-Ubiquitinylierung steht eindeutig im Zusammenhang mit der Degradierung dieses Proteins, während die in den *in vivo*-Ubiquitinylierungs-Assays beobachtete RelB-Ubiquitinylierung –und möglicherweise auch die basale Ubiquitinylierung des endogenen RelB-Proteins -scheinbar mit nicht-proteasomalen Funktionen in Verbindung steht. Im Falle der Polyubiquitinylierung werden lange Ketten aus mehreren über Lysinreste verbundenen Ubiquitinpeptiden gebildet. Dabei spielt für die funktionelle Konsequenz der Ubiquitinylierung vor allem die Position der für die Verknüpfung verwendeten Lysinreste innerhalb der Ubiquitineinheiten eine entscheidende Rolle. Die Lys^{48}-Verknüpfung, welche zur proteasomalen Degradierung des Zielproteins führt, und die Lys^{63}-Verknüpfung, welche nicht-proteasomale Effekte wie z. B. Veränderungen in der Funktion und der Lokalisation des Zielproteins hervorruft, sind bisher am besten charakterisiert worden.

Um die Ubiquitinverknüpfung zu charakterisieren, wurden die beiden HA-markierten Punktmutanten HA-$Ubiquitin_{K48R}$ und HA-$Ubiquitin_{K63R}$ im *in vivo*-Ubiquitinylierungs-Assay eingesetzt. Dabei führt die Lysin-zu-Arginin-Substitution an Position 48 bzw. 63 innerhalb dieser Mutanten zur Inhibierung der Lys^{48}- und Lys^{63}-Verknüpfung. Für den Ubiquitinylierungs-Assay wurden HEK 293-Zellen mit Flag-$RelB_{WT}$ alleine oder in Kombination mit einer der Ubiquitinmutanten bzw. dem HA-$Ubiquitin_{WT}$ koexprimiert. Das Experiment wurde zum einen mit RelB (3.6A) und zum anderen mit NEMO (3.6B) als Zielprotein durchgeführt, da sowohl die K63-Ubiquitinylierung von NEMO (Zhou et al., 2004), als auch die K6-Ubiquitinylierung bereits bekannt sind (Tang et al., 2003).

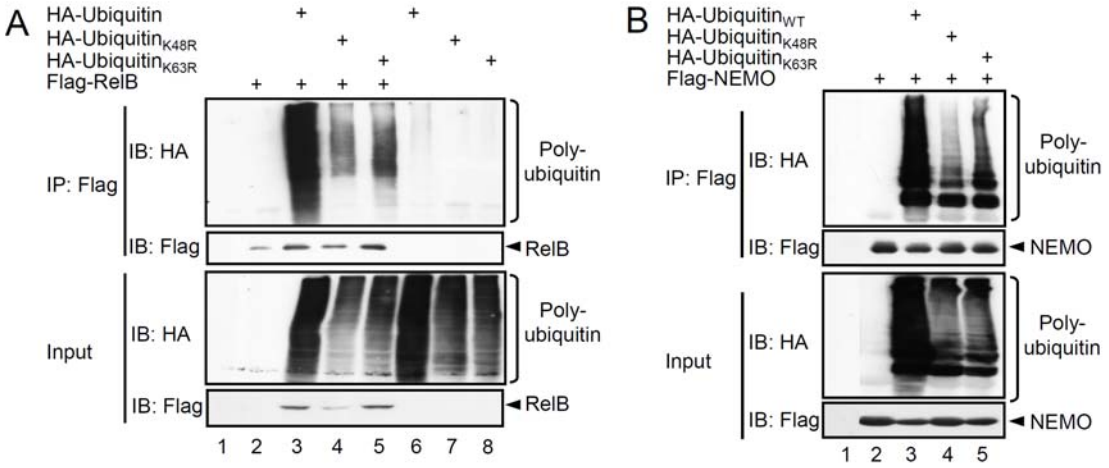


Abb. 3.6: Charakterisierung der Ubiquitinketten am RelB-Protein und am NEMO-Protein
In vivo-Ubiquitinylierungs-Assay mit (**A**) Flag-RelB oder (**B**) Flag-NEMO; HEK 293-Zellen wurden mit 1µg des Expressionsvektors für Flag-RelB (A) bzw. Flag-NEMO (B) ohne oder in Kombination mit 1µg der Expressionsvektoren für HA-Ubiquitin$_{WT}$ oder HA-Ubiquitin$_{K48R}$ bzw. HA-Ubiquitin$_{K63R}$ transient transfiziert. Nach der Lyse der Zellen unter denaturierenden Bedingungen (RIPA) wurden die Flag-markierten Proteine präzipitiert (IP) und im Western Blot analysiert (IB). Zur Expressionskontrolle wurde vor der IP ein Aliquot des Lysats für die direkte Analyse im Western Blot abgenommen (Input).

Sowohl mit HA-Ubiquitin$_{K48R}$ als auch mit HA-Ubiquitin$_{K63R}$ ist eine Ubiquitinylierung von RelB und NEMO nachweisbar. Jedoch erscheint die Ubiquitinylierung durch die beiden Ubiquitinpunktmutanten im Vergleich zur Ubiquitinylierung mit dem wildtypischen Ubiquitin schwächer (Abb. 3.6A und 3.6B, vgl. jeweils Spur 3 mit Spuren 4 und 5 der ersten und dritten Teilabbildung von oben). Diese verminderte Ubiquitinylierung mit den Ubiquitinmutanten lässt sich jedoch durch deren geringe Expression begründen (Abb. 3.6A und Abb. 3.6B, vgl. jeweils Spur 3 mit Spuren 4 und 5 der ersten und dritten Teilabbildung von oben).

3.6 Einfluss der Ubiquitinylierung auf die transkriptionelle Aktivität von RelB

Aus den bisherigen Ergebnissen ist ersichtlich, dass die Ubiquitinylierung nicht nur die Regulation der RelB-Stabilität betrifft, sondern ebenso andere Eigenschaften des Zielproteins beeinflussen könnte. Für den Transkriptionsfaktor Myc ist dessen spezifische Ubiquitinylierung beispielsweise essenziell für die Rekrutierung des Koaktivators p300, während die Inhibierung dieser Ubiquitinylierung Myc als transkriptionellen Repressor agieren lässt (Adhikary et al., 2005; Boquoi and Enders, 2006). Da auch RelB sowohl als transkriptioneller Aktivator als auch als Repressor agieren kann, und der regulierende Mechanismus hierfür bisher nicht aufgeklärt wurde, könnte die Ubiquitinylierung einen „molekularen Schalter“ zur Steuerung der transkriptionellen Aktivität von RelB darstellen.
Um den Einfluss der Ubiquitinylierung auf die Funktion von RelB als Transkriptionsfaktor zu untersuchen, wurde die transkriptionelle Aktivität von RelB im Reportergen-Assay bestimmt.

Das verwendete Luziferase-Reporterplasmid trägt drei hintereinander liegende NF-κB-Bindungsstellen (3xκB-Luziferase-Reporterkonstrukt). Die Analyse wurde in nicht lymphoiden HEK 293-Zellen und in S107 Prä-B-Zellen durchgeführt, die mit ansteigenden Mengen des Ubiquitin-Expressionsvektors entweder in Kombination mit oder ohne einem für RelB kodierenden Plasmid transfiziert wurden (Abb. 3.7A und 3.7B).

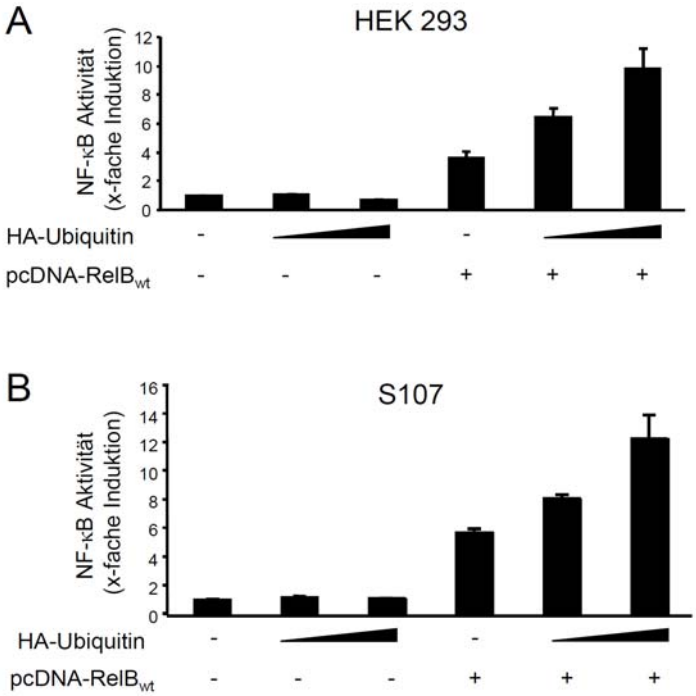


Abb.3.7: Einfluss der *in vivo*-Polyubiquitinylierung auf die transkriptionelle Aktivität von RelB
A, Für den Luziferase-Reportergen-Assay wurden HEK 293-Zellen mit einem NF-κB-abhängigen Luziferase-Reporterkonstrukt (200ng) und mit einem Renilla-Luziferase-Reporter (15ng) in Kombination mit oder ohne ansteigende Mengen eines HA-Ubiquitin-Expressionsvektors (200ng und 400ng) transient transfiziert. Zusätzlich erfolgte in ausgewählten Ansätzen die Kotransfektion eines RelB-Expressionsvektors (100ng). Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit TNT lysiert und die relative Luziferase-Aktivität wurde wie im Kapitel Methoden beschrieben bestimmt. **B,** S107 Prä-B-Zellen wurden mittels Elektroporation mit dem Expressionsvektor für RelB (5µg) oder HA-Ubiquitin (5 und 10µg) wie angegeben transient transfiziert. Zusätzlich wurden ein NF-κB-abhängiger Reporter (3µg) und ein Renilla-Luziferase-Reporter (300ng) kotransfiziert. Die Bestimmung der relativen Luziferase-Aktivität erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion.

Die Abbildungen 3.7A und 3.7B zeigen, dass die ektopische Expression von RelB sowohl in HEK 293-Zellen, als auch in S107 Prä-B-Zellen zu einer vier- bis sechsfachen Steigerung der NF-κB-abhängigen Reportergenexpression führt. Des Weiteren induziert die Ubiquitin-Koexpression einen weiteren konzentrationsabhängigen Anstieg der Reportergenexpression. Ubiquitin alleine bewirkt hingegen keinen Anstieg der NF-κB-abhängigen Genexpression. Die Ergebnisse des Reportergen-Assays deuten daher auf einen positiven Ubiquitin-vermittelten Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von RelB hin.

Da mit beiden Mutanten Ubiquitin$_{K48R}$ und Ubiquitin$_{K63R}$ eine effiziente RelB-Ubiquitinylierung erzielt werden konnte, sollte im nächsten Schritt geklärt werden, inwiefern Ubiquitin$_{K48R}$ bzw.

Ubiquitin$_{K63R}$ im Vergleich zum wildtypischen Ubiquitin die transkriptionelle Aktivität von RelB beeinflussen. Daher wurden für einen Luziferase-Reportergen-Assay Expressionsvektoren, die für diese HA-markierten Ubiquitinpeptide kodieren, in Kombination mit oder ohne Flag-RelB$_{WT}$ in HEK 293-Zellen kotransfiziert und nach 24 Stunden die NF-κB-abhängige Luziferase-Reportergenexpression bestimmt.

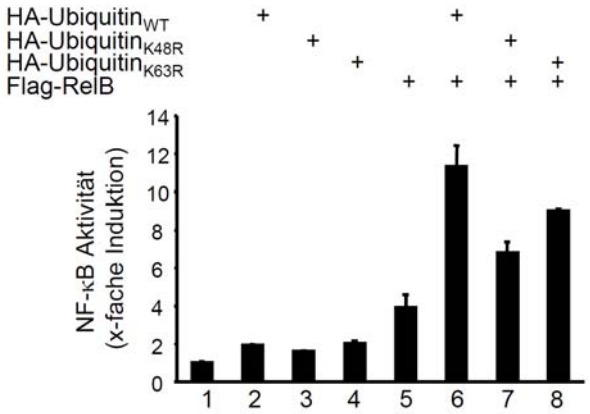


Abb. 3.8: Effekt der K48R- und K63R-Ubiquitinmutanten auf die transkriptionelle Aktivität von RelB
NF-κB-Reportergen-Assay nach transienter Transfektion von HEK 293-Zellen mit 100ng des Flag-RelB-Expressionsvektors ohne oder in Kombination mit 400ng HA-Ubiquitin$_{WT}$, HA-Ubiquitin$_{K48R}$ oder HA-Ubiquitin$_{K63R}$.

Das Ergebnis veranschaulicht, dass die Ubiquitinmutanten zwar einen geringeren, aber dennoch positiven Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von RelB ausüben (Abb. 3.8, Spuren 7 und 8). Wie zu erwarten, kommt es zu einer dreifachen Steigerung der RelB-Aktivität nach Kotransfektion des wildtypischen HA-Ubiquitins (Spur 6). Die Kotransfektion von HA-Ubiquitin$_{K48R}$ bzw. HA-Ubiquitin$_{K63R}$ steigert die transkriptionelle Aktivität von RelB etwa um den Faktor 2-2,5 verglichen mit der basalen Aktivität von RelB.

Um nachzuweisen, ob Lys^{48} oder Lys^{63} für die Konjugation der Polyubiquitinketten am RelB-Protein benötigt werden, wurde die RelB-Ubiquitinylierung durch eine HA-markierte Ubiquitindoppelmutante (HA-Ubiquitin$_{K48/63R}$) in einem *in vivo*-Ubiquitinylierungs-Assay analysiert. Dafür wurden HEK 293-Zellen mit Expressionsvektoren für Flag-RelB$_{WT}$ und der Doppelmutante HA-Ubiquitin$_{K48/63R}$ kotransfiziert. Die Zellen wurden bis zur Lyse entweder unbehandelt belassen oder wurden für 30 Minuten mit dem Proteasominhibitor MG132 inkubiert.

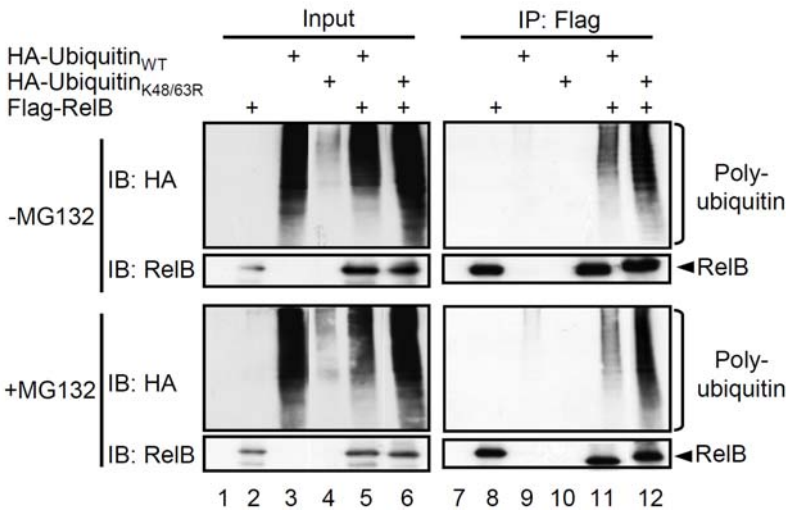


Abb. 3.9: Nachweis der atypischen Ubiquitinylierung des RelB-Proteins
In vivo-Ubiquitinylierungs-Assay von Flag-RelB mit der Doppelmutante HA-Ubiquitin$_{K48/63R}$. Die transfizierten HEK 293-Zellen wurden entweder unbehandelt (oberer Teil) oder nach Inkubation mit dem Proteasominhibitor MG132 (unterer Teil) geerntet und lysiert. Flag-RelB wurde präzipitiert (IP) und im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Zur Expressionskontrolle wurde vor der IP ein Aliquot des Lysats für die direkte Analyse im Western Blot abgenommen (Input).

Trotz der kombinierten Substitution von Lys^{48} und Lys^{63} zu Arginin ist noch eine deutliche RelB-Ubiquitinylierung zu sehen (Abb. 3.9, vgl. Spur 11 mit 12, IP ohne MG132, oben). Durch die Vorinkubation mit dem Proteasominhibitor sollte verhindert werden, dass RelB abgebaut wird und auf diese Weise die Intensität der Ubiquitinylierung verändert wird. Auch im Falle der MG132-Behandlung ist die RelB-Ubiquitinylierung sowohl mit dem wildtypischen Ubiquitin als auch mit der Doppelmutante HA-Ubiquitin$_{K48/63R}$ deutlich zu sehen (Abb. 3.9, vgl. Spur 11 mit 12, IP mit MG132, oben). Diese deutliche RelB-Ubiquitinylierung durch HA-Ubiquitin$_{K48/63R}$ bei gleichzeitig fehlendem Einfluss des Proteasoms, ist ein deutlicher Hinweis für die Modifizierung von RelB durch Polyubiquitinketten, welche nicht über Lys^{48} und Lys^{63} verknüpft sind. Auch die Verknüpfung über einen der anderen fünf Lysinreste im Ubiquitinpeptid wäre denkbar und wird - ebenso wie die Lys^{63}-verknüpfte Ubiquitinylierung- als atypische Ubiquitinylierung bezeichnet.

3.7 Relevanz der RelB-DNA-Bindungsfähigkeit für die nicht-proteasomale RelB-Ubiquitinylierung

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob eine intakte DNA-Bindungsfähigkeit des RelB-Proteins essenziell ist, um diesen Ubiquitin-abhängigen, positiven Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von RelB zu erzielen. Um diesen Punkt zu klären, wurde eine weitere Reportergen-Analyse unter Verwendung einer Flag-markierten RelB-Punktmutante durchgeführt. Aufgrund der spezifischen Substitution des Serin-Restes an Position 368 zu Alanin (Flag-RelB$_{S368A}$) ist diese Mutante nicht mehr zur Dimerisierung mit p50 und p52 in der Lage. Da RelB jedoch nur

als Heterodimer mit p50 oder p52 in der Lage ist an die DNA zu binden, verhindert diese Substitution die RelB-DNA-Bindungsaktivität (Maier et al., 2003).

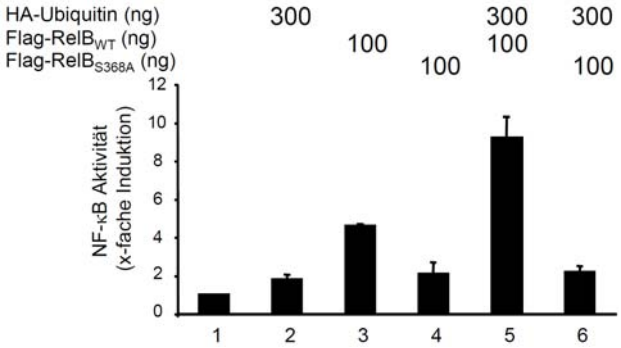


Abb.3.10: Relevanz der RelB-DNA-Bindung für den Ubiquitin-vermittelten Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von RelB
NF-κB-abhängige Reportergen-Analyse: HEK 293-Zellen wurden mit einem HA-Ubiquitin-Expressionsvektor, einem Flag-RelB$_{WT}$- oder Flag-RelB$_{S368A}$-Expressionsvektor in Kombination mit den Luziferase-Reporterkonstrukten transient transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion wurde die relative Luziferase-Aktivität bestimmt.

Die ermittelte Luziferase-Aktivität in Abbildung 3.10 zeigt wie erwartet, dass die basale transkriptionelle Aktivität von Flag-RelB$_{S368A}$ geringer ist (Spur 4) als die des wildtypischen RelB-Proteins (Spur 3). Demgegenüber führt die Expression von Flag-RelB$_{WT}$ ohne Ubiquitin bereits zu einer basalen Aktivität, die um ein Fünffaches über der Grundaktivität liegt. Nach Ubiquitin-Koexpression kommt es im Fall des Flag-RelB$_{WT}$-Proteins, aber nicht im Fall von Flag-RelB$_{S368A}$ zu einer weiteren Steigerung der NF-κB-abhängigen Genexpression.

Um eine verringerte Ubiquitinylierung der S368A-Mutante als Ursache der ausbleibenden Steigerung der transkriptionellen Aktivität von RelB nach Ubiquitin-Koexpression auszuschließen, wurde die S368A-RelB-Mutante in einem *in vivo*-Ubiquitinylierungs-Assay unter denaturierenden Bedingungen überprüft. Hierfür wurden HEK 293-Zellen mit Expressionsvektoren, die für HA-markiertes Ubiquitin, Flag-RelB$_{WT}$ oder Flag-RelB$_{S368A}$ kodieren, transfiziert.

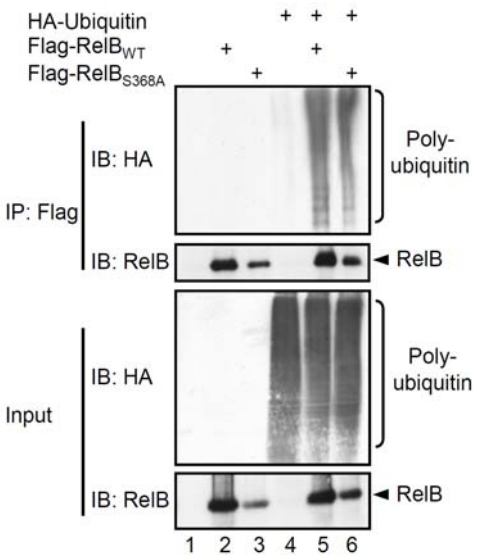


Abb.3.11: *In vivo*-Ubiquitinylierungs-Analyse von RelB$_{WT}$ und Flag-RelB$_{S368A}$
Nach ektopischer Expression von RelB$_{WT}$ und Flag-RelB$_{S368A}$ alleine oder in Kombination mit HA-Ubiquitin$_{WT}$ wurden die Flag-markierten RelB-Proteine unter denaturierenden Bedingungen (RIPA-Lysepuffer) mit Flag-spezifischen Antikörpern präzipitiert (IP) und anschließend im Western Blot (IB) mit HA- und RelB-spezifischen Antikörpern analysiert. 10% des Proteinextrakts wurde zur Kontrolle der Expression im IB eingesetzt (Input).

Wie Abbildung 3.11 zeigt, weisen der RelB-Wildtyp und die S368A-RelB-Mutante weder Unterschiede in der Stärke noch im Muster der Polyubiquitinylierung auf (vgl. Spuren 5 und 6, oben). Die Ubiquitinylierung von RelB wird folglich durch die Punktmutation S368A nicht inhibiert. Zusammengefasst zeigen die Abbildungen 3.10 und 3.11, dass für den positiven Effekt der Ubiquitinylierung auf die transkriptionelle Aktivität von RelB dessen intakte DNA-Bindung essenziell ist.

3.8 Effekt der RelB-Ubiquitinylierung auf DNA-Bindung und subzelluläre Lokalisation

Die vorhergehenden Resultate verweisen auf die Bedeutung der intakten RelB-DNA-Bindung für den positiven Effekt der Ubiquitinylierung. Deshalb wurde in einem Gelretardationsexperiment (EMSA) untersucht, ob eine Ubiquitin-induzierte Steigerung der RelB-DNA-Bindung als mögliche Erklärung für den positiven Effekt auf die transkriptionelle Aktivität in Frage kommt. Daher wurde ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid eingesetzt, das eine für NF-κB spezifische Bindungsstelle besitzt. Als Ladekontrolle dient ein parallel durchgeführter EMSA mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid, das eine spezifische Bindungsstelle für Oct-1 aufweist (Sturm et al., 1988). Das Oct-1-Protein ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der konstitutiv an die DNA bindet und daher im EMSA eine gleichmäßige unbeeinflussbare Bindung aufweisen sollte.

HEK 293-Zellen wurden mit einem RelB-kodierenden Plasmid alleine oder in Kombination mit ansteigenden Mengen eines Expressionsvektors, der für HA-markiertes Ubiquitin kodiert, transfiziert. Nach 48 Stunden wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und je 5µg des Extrakts für den NF-κB- bzw. den Oct-spezifischen EMSA eingesetzt.

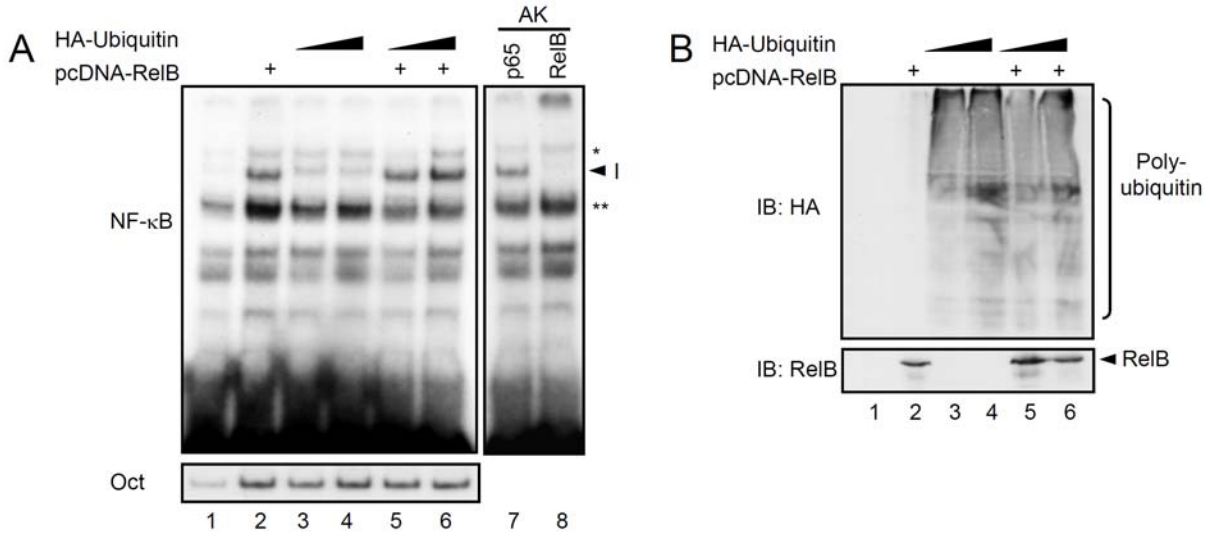


Abb.3.12: Einfluss der *in vivo*-Ubiquitinylierung auf die RelB-DNA-Bindung
HEK 293-Zellen wurden mit Expressionsvektoren, welche für pcDNA-RelB (1µg) und HA-Ubiquitin (0,5 und 1µg) kodieren, transfiziert und nach 48 Stunden mit Dignam C lysiert. **A,** Die Gesamtzellextrakte wurden im EMSA mit NF-κB-spezifischer (oben) oder Oct-spezifischer (unten) Sonde analysiert. Zur Identifizierung der Komponenten im Komplex "I" wurden Supershift-Analysen mit Antikörpern (AK) spezifisch für RelA oder RelB durchgeführt. Die mit "*" bzw. "**" gekennzeichneten Komplexe sind unspezifischer Natur. **B,** Western Blot mit den für den EMSA eingesetzten Extrakten zur Expressionskontrolle von RelB (unten) und HA-Ubiquitin (oben).

Abbildung 3.12A zeigt nach ektopischer Expression von Flag-RelB die Bindung eines weiteren Komplexes an die NF-κB-spezifische Sonde (Spuren 2, 5 und 6), dessen Identität als RelB-DNA-Komplex durch eine „Supershift-Analyse“ nachgewiesen werden konnte (Spuren 7 und 8). Als Basis dieser Methode dient die Beeinflussung eines Komplexes durch spezifische Antikörper. Dabei erfuhr der Komplex "I" nur durch Zugabe eines RelB-Antikörpers, jedoch nicht durch Zugabe des RelA-spezifischen Antikörpers, eine Veränderung ("shift"; Spur 8).

Zudem wird in Abbildung 3.12A deutlich, dass die Koexpression des HA-Ubiquitins weder zu einer signifikanten Steigerung der Bindung des ektopisch exprimierten RelB-Proteins an die NF-κB-Sonde (Abb. 3.12A, Spuren 2, 5 und 6) noch zu einer wesentlichen Veränderung der basalen NF-κB-Bindungsaktivität führt (Spuren 3 und 4). Zwar ist eine geringe Steigerung der basalen DNA-Bindungsaktivität in Folge der separaten HA-Ubiquitinexpression feststellbar (vgl. Spur 1, und 4). Jedoch sind diese Veränderungen auch in dem EMSA mit der Oct-spezifischen Sonde zu beobachten. Das Ergebnis zeigt, dass der Ubiquitin-abhängige positive Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von RelB nicht durch eine gesteigerte RelB-DNA-Komplexbildung hervorgerufen wird. Zudem kann Ubiquitin alleine nicht an die NF-κB-spezifische Sonde binden

und beeinflusst auch die basale DNA-Bindungsaktivität von NF-κB nicht. Die gleichmäßige Expression von RelB und Ubiquitin wurde im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 3.12B).
Ein weiterer Aspekt, der im Zuge dieser Untersuchung analysiert werden sollte, ist der potenzielle Einfluss der Ubiquitinylierung auf die subzelluläre Lokalisation bzw. Verteilung von RelB-Proteinen, wodurch die transkriptionelle Aktivität von RelB positiv beeinflusst werden könnte. Dazu wurden HEK 293-Zellen mit einem RelB-kodierenden Plasmid alleine oder in Kombination mit ansteigenden Mengen eines für HA-Ubiquitin kodierenden Expressionsvektors transient transfiziert (0,5 und 1µg). Nach 48 Stunden wurden aus den transfizierten Zellen zytoplasmatische und nukleäre Extrakte gewonnen und im Western Blot bezüglich der Proteinverteilung analysiert.

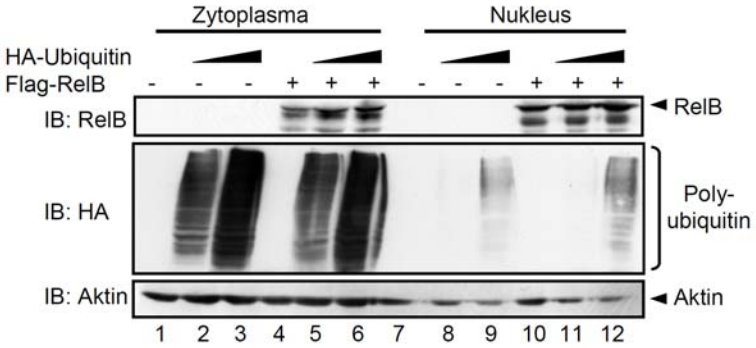


Abb.3.13: Subzelluläre Lokalisation des RelB-Proteins nach Ubiquitinylierung
Die subzelluläre Lokalisation des ektopisch exprimierten RelB-Proteins ohne und nach Koexpression von HA-Ubiquitin wurde nach Isolierung von nukleären und cytoplasmatischen Extrakten im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Als Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinexpression wurde dieselbe Membran nach Inkubation mit einem Aktin-Antikörper analysiert.

In Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Bindungsstudie (Abb. 3.12A) zeigt sich in Abbildung 3.13 kein negativer Einfluss der Ubiquitin-Koexpression auf die subzelluläre Verteilung des ektopisch exprimierten RelB-Proteins. Auch die Gesamtmenge des ektopisch exprimierten RelB-Proteins bleibt bei Koexpression von HA-Ubiquitin relativ stabil (vgl. Spur 4 mit 5 und 6 bzw. Spur 10 mit 11 und 12, oben). Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse der Abbildungen 3.12 und 3.13 den Schluss zu, dass weder die DNA-Bindung noch die subzelluläre Verteilung beziehungsweise eine mögliche Steigerung der nukleären RelB-Proteinmenge ein Grund für die Ubiquitin-abhängig gesteigerte transkriptionelle Aktivität von RelB sein können.
Da bei RelB-Ubiquitin-Kotransfektionen vereinzelt ein Anstieg der Proteinmenge von RelB auftrat, sollte dieser Effekt als Ursache der gesteigerten Ubiquitin-induzierten transkriptionellen Aktivität von RelB ausgeschlossen werden. In einem Reportergen-Assay wurden daher ansteigende Mengen eines RelB-kodierenden Plasmids transfiziert, um den Einfluss auf die Reportergenexpression zu untersuchen.

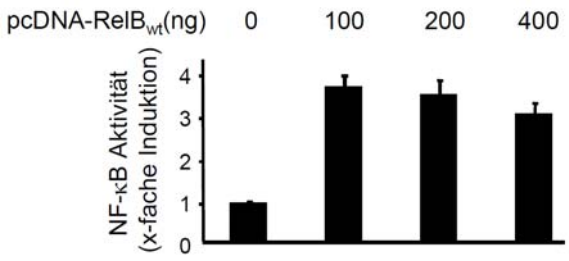


Abb.3.14: Abhängigkeit der transkriptionellen RelB-Aktivität von dessen Proteinmenge
Ein NF-κB-abhängiger Luziferase-Reportergen-Assay wurde nach transienter Transfektion von HEK 293-Zellen mit ansteigenden Mengen eines RelB-Expressionsvektors in Kombination mit einem NF-κB-abhängigen Reporterkonstrukt (3xκB) und einem Renilla-Reporterkonstrukt durchgeführt.

Da eine ansteigende Menge des transfizierten RelB-kodierenden Plasmids zu keiner konzentrationsabhängigen Zunahme der NF-κB-Reporteraktivität führt (Abb. 3.14), ist eine gesteigerte RelB-Menge höchstwahrscheinlich nicht der Grund für den positiven Effekt des Ubiquitins auf die RelB-Aktivität.

3.9 Einfluss des alternativen NF-κB-Signalweges auf die RelB-Ubiquitinylierung

RelB ist ein Hauptbestandteil des alternativen NF-κB-Signalweges, in dem IKKα in Kooperation mit der Proteinkinase NIK einen spezifischen Satz von NF-κB-Zielgenen aktiviert (Hayden and Ghosh, 2004). Aufgrund der herausragenden Bedeutung von RelB für den alternativen NF-κB-Signalweg wurde analysiert, ob die Ubiquitinylierung von RelB durch Aktivierung des alternativen NF-κB-Signalweges moduliert werden kann. Dazu wurden zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze verfolgt: Zum einen erfolgte die Analyse der Ubiquitinylierung des endogenen RelB-Proteins nach Stimulation mit LPS, einem Agonisten des alternativen NF-κB-Signalweges. Zum anderen erfolgte eine Analyse der Ubiquitinylierung von ektopisch exprimiertem RelB nach transienter Kotransfektion von HEK 293-Zellen mit Expressionsvektoren, welche für Flag-markiertes RelB, HA-markiertes Ubiquitin oder pcDNA-NIK kodieren.

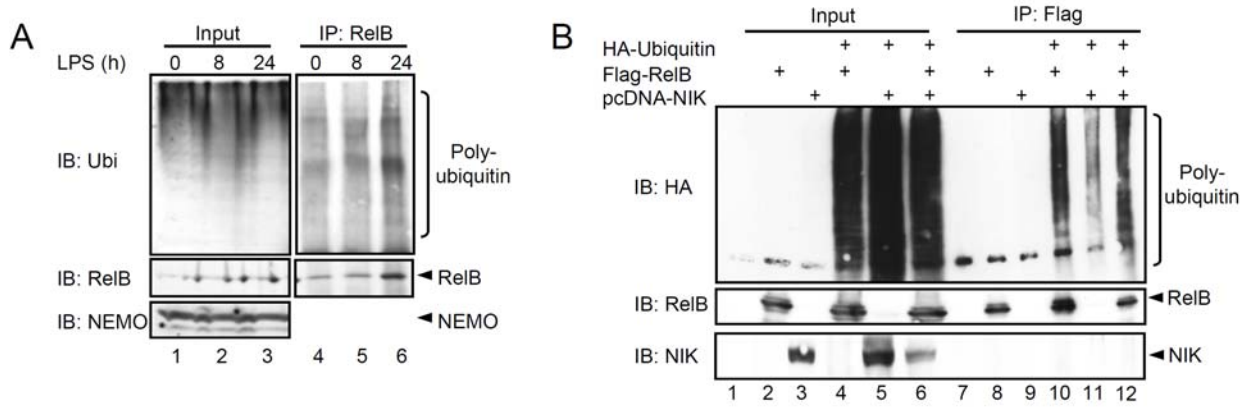


Abb.3.15: RelB-Ubiquitinylierung nach Aktivierung des alternativen NF-κB-Signalweges
A, 70Z/3 Prä-B-Zellen wurden entweder unbehandelt oder nach 8- bzw. 24-stündiger LPS-Stimulation (1µg/ml) in RIPA-Puffer lysiert. Anschließend wurde RelB präzipitiert (IP) und -ebenso wie 50µg des Ausgangsmaterials (Input)- im Western Blot analysiert. **B,** *In vivo*-Ubiquitinylierungs-Assay mit Gesamtzellextrakten von HEK 293-Zellen, die mit Expressionsvektoren für Flag-RelB, HA-Ubiquitin und/oder einem pcDNA-NIK-Expressionsvektor transient transfiziert wurden.

Wie zu erwarten, erfolgt in den 70Z/3 Prä-B-Zellen nach LPS-Stimulation für 8 oder 24 Stunden eine Induktion von RelB (Abb. 3.15A, vgl. Spuren 1-3). Es ist auch eine leichte Steigerung der RelB-Ubiquitinylierung nach 24-stündiger LPS-Stimulation zu beobachten. Jedoch scheint der LPS-induzierte Anstieg in den zellulären RelB-Spiegeln höchstwahrscheinlich auch der Grund für die beobachtete Steigerung der RelB-Ubiquitinylierung zu sein (Abb. 3.15A, Spur 6).
Des Weiteren wurde in einem *in vivo*-Ubiquitinylierungs-Assay der Einfluss der Proteinkinase NIK auf die RelB-Ubiquitinylierung analysiert (Abb. 3.15B). Hierfür wurden Flag-RelB, HA-Ubiquitin und pcDNA-NIK entweder einzeln oder kombiniert in HEK 293-Zellen exprimiert .Unter dem Einfluss von NIK scheint zwar das Muster des Signals leicht zu variieren, aber die Kinase verursacht keine deutliche quantitative Veränderung der RelB-Ubiquitinylierung (Spuren 10 und 12, oben).

3.10 Identifizierung der ubiquitinylierten RelB-Domäne

Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Steigerung der transkriptionellen Aktivität von RelB einen der nicht-proteasomalen Effekte der RelB-Ubiquitinylierung darstellt. Um diesen positiven Effekt näher zu charakterisieren, wurde mit der Bestimmung der Domäne(n) begonnen, in der/denen die Ubiquitinylierung von RelB erfolgt. Dazu wurden Expressionsvektoren, die für Flag-markierte carboxyterminale RelB-Deletionsmutanten (Abb.3.16A) oder nur für den Carboxyterminus kodieren, in einem weiteren *in vivo*-Ubiquitinylierungs-Assay mit HA-Ubiquitin$_{WT}$ oder HA-Ubiquitin$_{K48/63R}$ verwendet (Abb.3.16B).

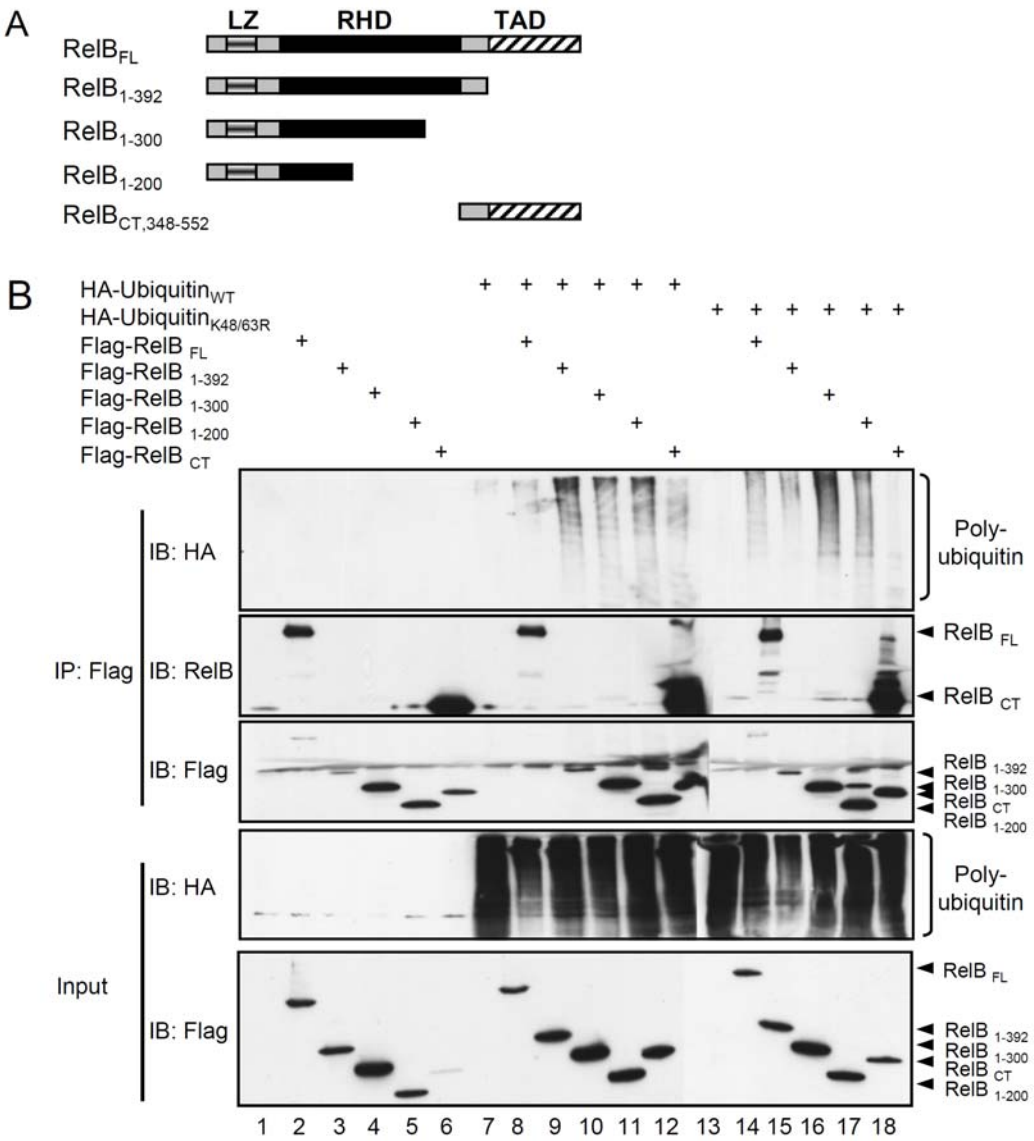


Abb. 3.16: Lokalisierung von Ubiquitinylierungsdomänen im RelB-Protein
A, Schematische Darstellung der verschiedenen Flag-markierten RelB-Deletionsmutanten. LZ, Leucinzipper; RHD, Rel-Homologie-Domäne; TAD, Transaktivierungsdomäne. **B,** *In vivo*-Ubiquitinylierungs-Assay von ektopisch exprimierten Flag-markierten RelB-Deletionsmutanten in Kombination mit HA-Ubiquitin$_{WT}$ oder der HA-Ubiquitin$_{K48/63R}$-Doppelmutante. 48 Stunden nach der transienten Transfektion wurden die HEK 293-Zellen unter denaturierenden Bedingungen geerntet und 90% der Gesamtzellextrakte für eine Immunpräzipitation (IP) mit Flag-spezifischen Antikörpern eingesetzt; 10% der Extrakte wurden im Kontroll-Western Blot (Input) eingesetzt. Der Nachweis der Ubiquitinylierung erfolgte durch Western Blot-Analysen (IB) mit den angegebenen Antikörpern.

Im HA-spezifischen Western Blot in Abbildung 3.16B sind bei allen eingesetzten Deletionsmutanten, sowohl nach Kotransfektion mit dem für Wildtyp-Ubiquitin kodierenden Plasmid, als auch mit dem für die K48/63R-Mutante kodierenden Plasmid, Ubiquitinylierungssignale zu sehen (Abb. 3.16B, oben, Spuren 8-12 und 14-18). Die schwache Ubiquitinylierung von Flag-RelB$_{FL}$ liegt in der geringen Expression dieses RelB-Proteins begründet. Die Ubiquitinylierung der Deletionsmutante RelB$_{CT}$, die die Aminosäuren 348 bis 552 umspannt, ist zwar von geringer Intensität, aber dennoch nachweisbar. Die Expression des

RelB-Gesamtlängenproteins ($RelB_{FL}$) konnte mit RelB-spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 3.16B, zweite Teilabbildung von oben, Spuren 8 und 14), die Expression der carboxyterminalen RelB-Deletionsmutanten jedoch nur mit Flag-spezifischen Antikörpern.

3.11 Spezifizierung der ubiquitinylierten Lysinreste im RelB-Protein

Da durch die Analyse der Ubiquitinylierung unter Verwendung der Deletionsmutanten keine konkrete Domäne identifiziert werden konnte, die als Zielbereich für die Ubiquitinylierung dient, wurden im nächsten Schritt alle 21 im RelB-Protein befindlichen Lysinreste durch Argininreste (entweder einzeln oder in Gruppen) substituiert (Abb.3.17A). Zunächst wurden die 15 Punktmutanten im Luziferase-Reportergen-Assay hinsichtlich ihrer basalen (Abb. 3.17B) sowie ihrer Ubiquitin-induzierten (Abb. 3.17C) transkriptionellen Aktivität analysiert.

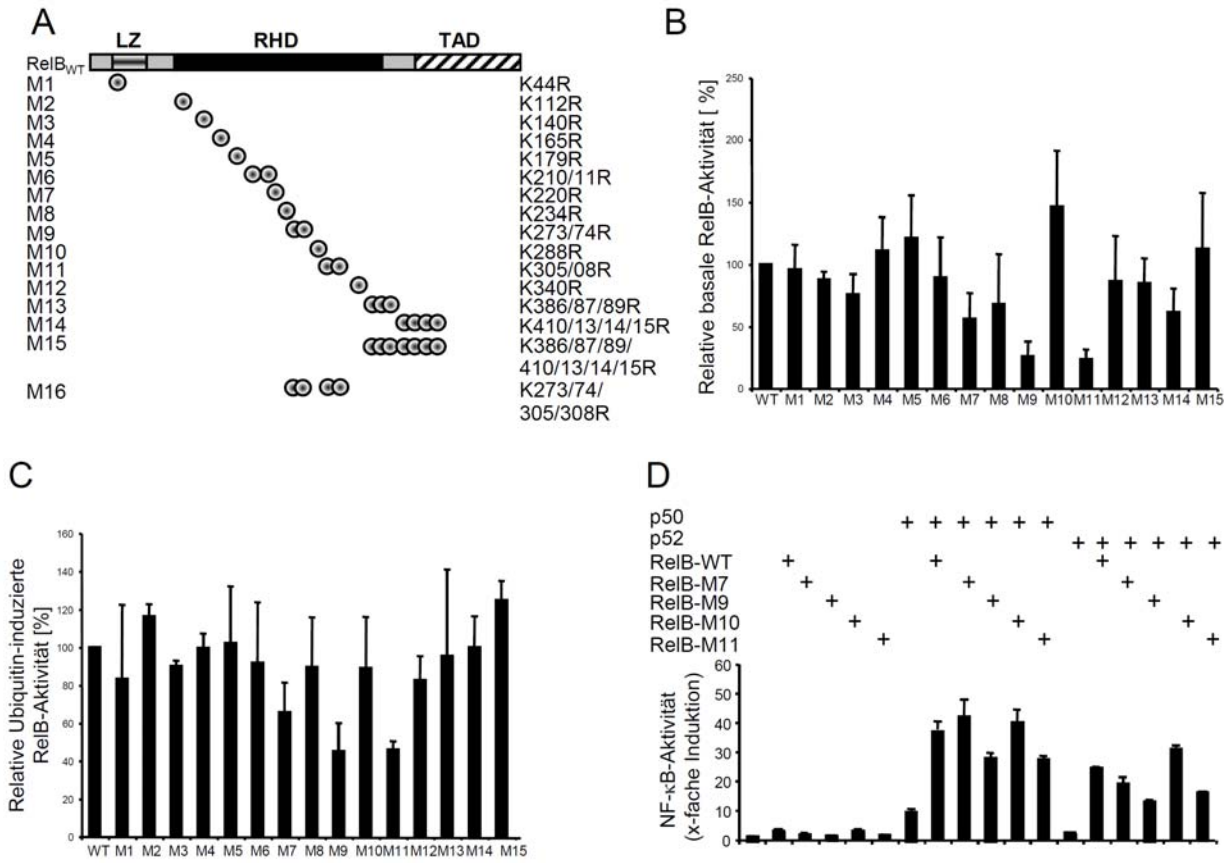


Abb. 3.17: Identifizierung der für die basale und Ubiquitin-induzierte transkriptionelle Aktivität von RelB wichtigen Lysinreste
A, Schematische Darstellung der Lysin-zu-Arginin RelB-Punktmutanten. Einige der Mutanten weisen nur eine einzige Substitution auf, die meisten tragen jedoch Substitutionen mehrerer nebeneinander lokalisierter Lysinreste. **B,** Luziferase-Reportergen-Assay in HEK 293-Zellen mit einem NF-κB-abhängigen Luziferase-Reporterkonstrukt und mit einem Renilla-Luziferase-Reporter. Es ist die relative basale transkriptionelle Aktivität der Punktmutanten im Vergleich zum $RelB_{WT}$ dargestellt, dessen Aktivität gleich 100% gesetzt wurde. **C,** Vergleich der Ubiquitin-induzierten transkriptionellen Aktivität der RelB-

Mutanten mit dem $RelB_{WT}$. **D,** NF-κB-Reportergen-Analyse mit den RelB-Varianten alleine oder in Kombination mit p50- oder p52-Expressionsvektoren.

Die basale bzw. die Ubiquitin-induzierte transkriptionelle Aktivität der diversen Punktmutanten wurde untersucht, indem die RelB-Mutanten alleine oder in Kombination mit Wildtyp-Ubiquitin in HEK 293-Zellen koexprimiert wurden. Die y-Achse zeigt in Abbildung 3.17B und 3.17C die transkriptionelle Aktivität in % der Aktivität des RelB-Wildtyps. Dabei weisen die RelB-Mutanten M7, M9 und M11 sowohl eine geringere basale Aktivität auf (Abb. 17B), als auch einen geringeren Anstieg nach Ubiquitin-Kotransfektion (Abb. 17C). RelB ist nur als RelB:p50- oder RelB:p52-Heterodimer transkriptionell aktiv, bildet jedoch keine Homodimere. Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte im Fall der Mutanten M7, M9 und M11 durch ein Defizit an zellulären RelB-Bindungspartnern (p50 oder p52) herrühren, wurden p50 bzw. p52 in einem weiteren Reportergen-Assay koexprimiert (Abb. 3.17D). Die Mutante RelB-M10 wird aufgrund der hohen basalen Aktivität und der Lokalisierung zwischen M9 und M11 innerhalb des RelB-Proteins als Kontrolle eingesetzt, um unspezifische Effekte auszuschließen. Das Diagramm 3.17D zeigt, dass die Aktivität von M7 durch p50/p52-Koexpression auf einen mit dem Wildtyp vergleichbaren Spiegel angehoben werden konnte. Die Mutanten M9 und M11 hingegen weisen auch hier eine niedrige transkriptionelle Aktivität auf.

Die K/R-Substitutionen der RelB-Mutanten M7, M9 und M11 sind innerhalb der für DNA-Bindung und Dimerisierung verantwortlichen Rel-Homologie-Domäne (RHD) von RelB lokalisiert. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die geringe transkriptionelle Aktivität von M7, M9 und M11 auf eine verminderte DNA-Bindung dieser Mutanten zurückzuführen ist, wurde ein Gelretardationsexperiment (EMSA) mit NF-κB-spezifischer, radioaktiv markierter Sonde durchgeführt. Dafür wurden $RelB_{WT}$ oder die Mutanten M7, M9, M10, M11 in Kombination mit HA-$Ubiquitin_{WT}$ in HEK 293-Zellen koexprimiert. Die daraus gewonnenen Dignam C-Lysate wurden im EMSA eingesetzt.

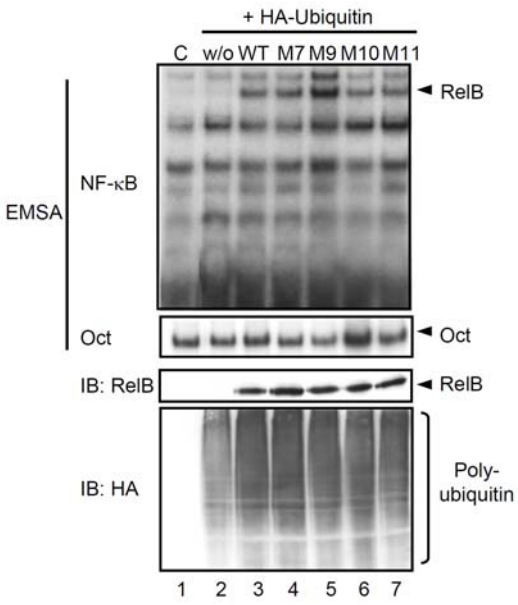


Abb. 3.18: DNA-Bindungsaktivität ausgewählter RelB-Mutanten mit Lysin-zu-Arginin-Substitutionen
Die Flag-markierten RelB-Mutanten wurden in Kombination mit HA-Ubiquitin$_{WT}$ in HEK 293-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden in Dignam C lysiert und die Gesamtzellextrakte wurden im EMSA analysiert. Als radioaktiv markierte Sonde wurde entweder die NF-κB-spezifische oder die Oct-spezifische Sonde eingesetzt (oben). Die Extrakte wurden im Western Blot (IB) auf gleichmäßige Proteinexpression hin analysiert (unten).

Die Abbildung 3.18 zeigt, dass die RelB-spezifische DNA-Bindung durch die K/R-Substitutionen nicht wesentlich beeinträchtigt wird. Die Bindung der RelB-Mutanten M7, M9, M10 und M11 an die NF-κB-spezifische Sonde gleicht in ihrer Intensität der des RelB-Wildtyps (Abb.3.18, oben, vgl. Spur 3 mit Spuren 4 bis 7). Wie erwartet, sind auch keine Unterschiede in der Expressionshöhe der unterschiedlichen RelB-Varianten sowie von Ubiquitin zu beobachten (Abb.3.18A, untere und zweite Teilabbildung von unten). Daher ist anzunehmen, dass die beobachtete Reduktion der basalen transkriptionellen Aktivität sowie die verminderte Ubiquitin-induzierte Aktivitätssteigerung von M7, M9 und M11 nicht auf einer reduzierten DNA-Bindung beruhen.

Letztlich blieb zu klären, ob die K/R-Substitutionen einen Effekt auf die RelB-Ubiquitinylierung haben. Daher wurden in einem *in vivo*-Ubiquitinylierungs-Assay sowohl der Ubiquitin-Wildtyp als auch die K48/63R-Ubiquitindoppelmutante eingesetzt und mit RelB-Wildtyp, M7, M9, M10 oder M11 koexprimiert. Nach der Präzipitation der Flag-markierten RelB-Proteine wurden diese im Western Blot hinsichtlich ihrer Ubiquitinylierung analysiert.

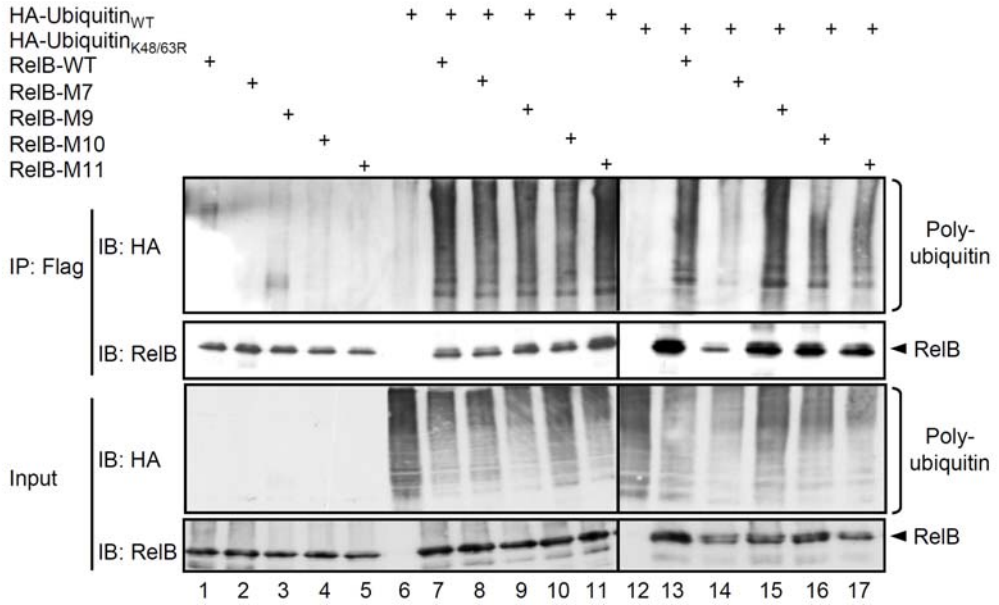


Abb. 3.19: *In vivo*-Ubiquitinylierungs-Analyse ausgewählter RelB-Mutanten mit Lysin-zu-Arginin-Substitutionen
In vivo-Ubiquitinylierungs-Assay mit ektopisch exprimierten Flag-markierten RelB-K/R-Mutanten in Kombination mit HA-Ubiquitin$_{WT}$ oder der HA-Ubiquitin$_{K48/63R}$-Doppelmutante. 48 Stunden nach der transienten Transfektion mit den entsprechenden Expressionsvektoren wurden die HEK 293-Zellen unter denaturierenden Bedingungen geerntet und 90% der Gesamtzellextrakte für eine Immunpräzipitation (IP) mit Flag-spezifischen Antikörpern eingesetzt; 10% der Extrakte wurden im Kontroll-Western Blot (Input) eingesetzt. Der Nachweis der Ubiquitinylierung erfolgte durch Western Blot-Analysen (IB) mit den angegebenen Antikörpern.

Hier wird deutlich, dass sich die Ubiquitinylierung der K/R-RelB-Mutanten nach Koexpression von HA-Ubiquitin$_{WT}$ weder im Muster noch in der Intensität von der Ubiquitinylierung des RelB-Wildtyps unterscheidet (Abb.3.19 oben, vgl. Spur 7 mit Spuren 8-11). Des Weiteren scheint die Ubiquitinylierung der Mutanten auch bei Koexpression von HA-Ubiquitin$_{K48/63R}$ mit der des wildtypischen RelB-Proteins vergleichbar zu sein (Abb.3.19 oben, vgl. Spur 13 mit Spuren 14-17). Die geringere Ubiquitinylierung von RelB-M7 durch HA-Ubiquitin$_{K48/63R}$ (Spur 14, oben) ist durch die vergleichsweise geringe Menge an präzipitiertem RelB-Protein zu erklären (Spur 14 zweite Teilabbildung von oben). Demzufolge scheinen die K/R-Substitutionen keinen Einfluss auf die Ubiquitinylierung des vollständigen RelB-Proteins zu haben.

Abschließend sollte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der beobachteten RelB-Ubiquitinylierung um eine artifizielle, endständige Ubiquitinylierung am aminoterminalen Methionin handelt (Ciechanover and Ben-Saadon, 2004). Daher wurde die aminoterminale Flag-RelB$_{CT\text{-}DM}$-Deletionsmutante (Aminosäuren 349 bis 552), bei der alle Lysinreste substituiert wurden, auf ihre Ubiquitinylierung hin untersucht (Abb. 3.20A). Zu erwarten war eine starke Reduktion der Ubiquitinylierung von Flag-RelB$_{CT\text{-}DM}$, da die Ubiquitinylierung andernfalls unabhängig von Lysinresten auftreten würde. Für einen besseren Vergleich wurden mehrere aminoterminale RelB-Deletionsmutanten mit spezifischen Lysin-zu-Asparagin-Substitutionen, welche entweder nur einige (Flag-RelB$_{CT\text{-}K386N}$ und Flag-RelB$_{CT\text{-}K310N}$) oder aber alle Lysinreste

(Flag-RelB$_{CT-DM}$) betreffen, mit HA-Ubiquitin$_{WT}$ oder HA-Ubiquitin$_{K48/63R}$ koexprimiert. Dabei führt die Substitution eines Lysinrests durch einen Asparaginrest, ebenso wie die Lysin-zu-Arginin-Substitution, zur Inhibierung einer Ubiquitinylierung an dieser Position.

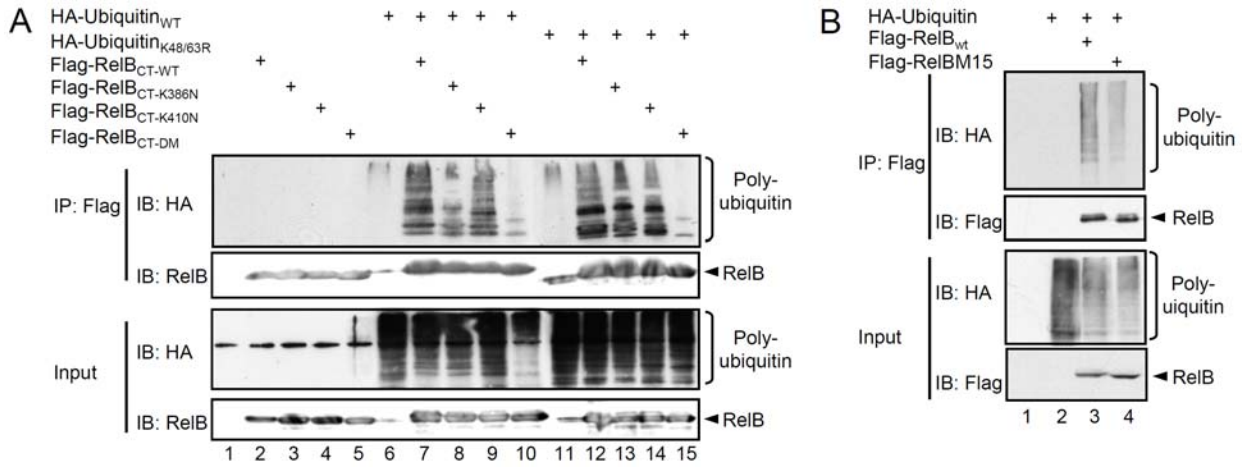


Abb. 3.20: Analyse der Ubiquitinylierung des RelB-Carboxyterminus
A, *In vivo*-Ubiquitinylierungs-Assay mit ektopisch exprimierten aminoterminalen Flag-markierten RelB-Deletionsmutanten mit Lysin-zu-Asparagin-Substitutionen (K/N) in Kombination mit HA-Ubiquitin$_{WT}$ oder der HA-Ubiquitin$_{K48/63R}$-Doppelmutante. IP: Immunpräzipitation, IB: Western Blot. **B,** *In vivo*-Ubiquitinylierungs-Assay von ektopisch exprimiertem Flag-markiertem RelB$_{WT}$ oder Flag-RelB$_{M15}$ in Kombination mit HA-Ubiquitin$_{WT}$.

Nur die Mutation aller im Carboxyterminus vorkommenden Lysinreste führt zur deutlichen Reduktion der *in vivo*-Ubiquitinylierung, sowohl durch Ubiquitin$_{WT}$ (Abb. 3.20A, Spur 10, oben) als auch durch HA-Ubiquitin$_{K48/63R}$ (Abb. 3.20A, Spur 15, oben). Das Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die RelB-Polyubiquitinylierung an allen Lysinresten in diesem Bereich stattfindet, da nur nach der Substitution aller vorhandenen Lysinreste innerhalb der aminoterminalen RelB-Deletionsmutanten eine starke Reduktion der Ubiquitinylierung zu sehen ist. Außerdem deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass es sich bei der Polyubiquitinylierung von RelB nicht um eine aminoterminale Ubiquitinylierung des Methioninrests handelt, da die Anwesenheit von Lysinresten im RelB-Protein essenziell ist.

Um zu analysieren, wie sich die Ubiquitinylierung darstellt, wenn zwar alle carboxyterminalen Lysinreste des RelB-Gesamtlängenproteins durch Arginin substituiert werden, die übrigen Lysinreste aber noch vorhanden sind (Flag-RelB$_{M15}$), wurde ein weiterer *in vivo*-Ubiquitinylierungs-Assay durchgeführt. Dafür wurde HA-Ubiquitin$_{WT}$ mit Flag-RelB$_{WT}$ oder der Mutante Flag-RelB$_{M15}$ koexprimiert (Abb. 3.20B).

Das Ergebnis zeigt, dass die Mutation aller im Carboxyterminus vorkommenden Lysinreste auch im Falle eines Gesamtlängenkonstruktes zu einer Reduktion der *in vivo*-Ubiquitinylierung führt (Abb. 3.20B, Spur 4 oben). Jedoch bleibt ein schwaches Ubiquitinylierungssignal im Western Blot detektierbar, welches sich auf eine Ubiquitinylierung der verbleibenden Lysin-Reste in der RelB-Mutante M15 zurückführen lässt.

Die Abbildungen 3.20A und 3.20B führen zu dem Schluss, dass es sich um keine artifizielle endständige Ubiquitinylierung handelt, und dass sich die Ubiquitinylierung nur bei Substitution einer bedeutenden Anzahl von Lysinresten reduzieren lässt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zahlreiche Lysinreste innerhalb des RelB-Proteins ubiquitinyliert werden können, jedoch beeinflusst nur die Ubiquitinylierung an den Lysinresten K273/274R (M9) und K305/308R (M11) tatsächlich die transkriptionelle Aktivität von RelB.

3.12 Analyse der RelB-SUMOylierung durch SUMO1 und SUMO2

Die in dem vorherigen Abschnitt dargelegten Ergebnisse weisen eindeutig auf eine kritische Bedeutung von Lysinresten bzw. der (Ubiquitin-) Modifikation dieser Aminosäurereste für die transkriptionelle Aktivität von RelB hin. Jedoch sind die molekularen Mechanismen, die dieser Lysin-Modifikation-vermittelten RelB-Regulation unterliegen, noch weitestgehend unbekannt. Eine Hypothese ist, dass durch die Polyubiquitinylierung Koaktivatoren rekrutiert oder Korepressoren freigesetzt werden könnten. Ein solcher Koaktivator ist beispielsweise CBP (*CREB binding protein*), dessen Interaktion mit der NF-κB-Untereinheit RelA bereits nachgewiesen wurde (Zhong et al., 2002). Jedoch konnte eine Komplexbildung von RelB mit CBP in Interaktionsstudien mit ektopisch exprimierten Proteinen nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Einen weiteren Kandidaten stellt das Protein Daxx (*death domain associated protein*) dar. Daxx bildet einen Proteinkomplex mit RelB und hemmt dadurch die Transkription einiger anti-apoptotischer NF-κB/RelB-Zielgene, indem es zusätzlich die DNA-Methyltransferase1 (Dnmt1) rekrutiert. Dnmt1 methyliert CpG-Dinukleotide in den Promotorbereichen dieser Zielgene und unterbindet somit deren Expression (Croxton et al., 2006; Puto and Reed, 2008). Interessanterweise besitzt Daxx zwei SUMO-Interaktions-Motive (SIM), kurze konservierte Domänen am Amino- bzw. Carboxyterminus, über die es SUMOylierte Proteine binden kann (Lin et al., 2006; Santiago et al., 2009). Zudem wurde bereits nachgewiesen, dass die SUMOylierung und die Ubiquitinylierung um Lysinreste konkurrieren und antagonistische Effekte hervorrufen können (Desterro et al., 1998). So könnte eine Ubiquitinylierung die Interaktion von RelB mit Daxx hemmen, während eine SUMOylierung der gleichen Lysinreste, möglicherweise durch günstigere räumliche Anordnung, zur Rekrutierung von Daxx führen würde.

Um diese Hypothese zu überprüfen, war es zunächst wichtig zu analysieren, ob eine SUMOylierung von RelB stattfindet. Dazu wurden zwei unterschiedliche experimentelle Strategien verwendet. Zum einen wurde die sogenannte UFDS-Methode (*Ubc9 fusion dependent SUMOylation*) angewandt, und zum anderen wurde eine *in vivo*-SUMOylierung von RelB nach ektopischer Überexpression von Flag-RelB, Ubc9 und SUMO-Peptiden mittels Immunpräzipitation analysiert. Für die UFDS-Methode wurde ein Expressionsvektor kloniert,

welcher für ein Fusionsprotein bestehend aus RelB und dem SUMO-E2-Protein Ubc9 kodiert. Für die SUMOylierung eines Zielproteins reicht die Anwesenheit des SUMO-Konjugationsenzyms Ubc9 vollständig aus. Eine SUMO-Ligase (E3) ist nicht essenziell. Somit wird durch die Fusion von Ubc9 und RelB die SUMOylierung deutlich erleichtert (schematische Darstellung Abb. 3.21 A). Zudem erfolgt diese SUMOylierung an Lysinresten, die auch unter physiologischen Bedingungen modifiziert werden (Jakobs et al., 2007b). Zum Nachweis der RelB-SUMOylierung wurde pCU-RelB$_{WT}$ alleine oder in Kombination mit EGFP-SUMO1 bzw. EGFP-SUMO2 in HEK 293-Zellen koexprimiert. Die gewonnenen Extrakte wurden entweder direkt für einen anti-RelB Western Blot eingesetzt (Abb. 3.21B, Input, linker Teil) oder für eine anschließende RelB-spezifische Immunpräzipitation verwendet (Abb. 3.21B, IP, rechter Teil).

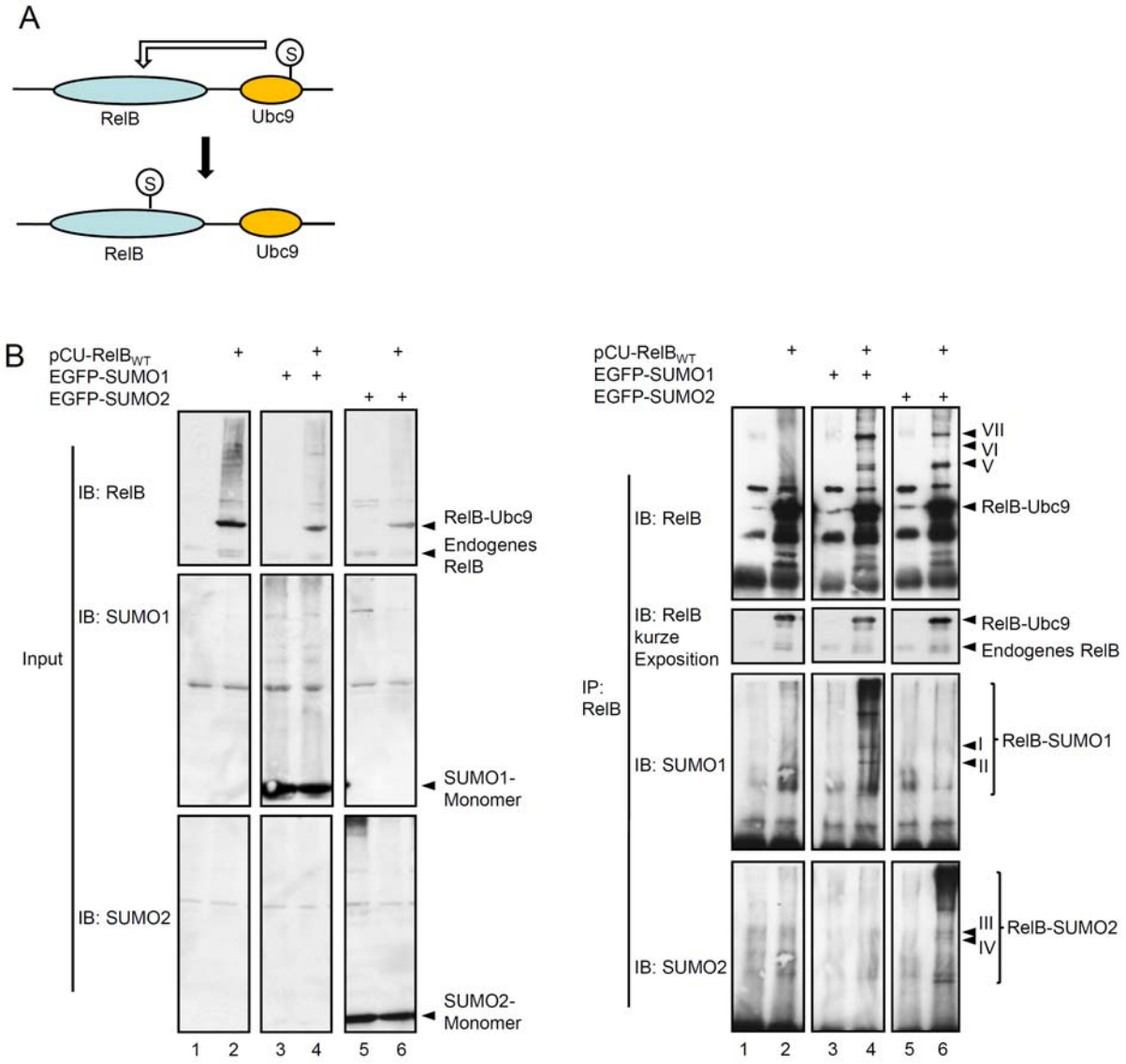


Abb. 3.21: Analyse der RelB-SUMOylierung durch SUMO1 und SUMO2
A, Schematische Darstellung der UFDS-Methode bzw. des RelB-Ubc9-Fusionsproteins. **B,** SUMOylierungs-Assay mit Gesamtzellextrakten aus HEK 293-Zellen nach transienter Transfektion mit einem Expressionsvektor für RelB$_{WT}$-Ubc9 entweder alleine oder in Kombination mit einem

Expressionsvektor für EGFP-SUMO1 bzw. EGFP-SUMO2. Die Extrakte wurden entweder für eine anti-RelB-Immunpräzipitation (90%) eingesetzt (rechter Teil, IP) oder als Kontrolle im Western Blot (linker Teil, Input). Nach erfolgter Immunpräzipitation wurden die aufgereinigten Immunkomplexe im Western Blot mit Antikörpern gegen SUMO1, SUMO2 oder RelB gefärbt.

Eine SUMOylierung von RelB stellt sich im Western Blot durch das Auftreten von hochmolekularen RelB-spezifischen Signalen dar. Wie in Abbildung 3.21B zu sehen ist, erfolgt nach Immunpräzipitation die SUMOylierung des RelB-Ubc9-Fusionsproteins in HEK 293-Zellen nach Kotransfektion von SUMO1- oder SUMO2-Expressionsvektoren sehr effizient (rechter Teil, Spuren 4 und 6). Dabei kommt es in beiden Fällen zur Bildung dreier zusätzlicher RelB-Signale (V, VI, VII), jedoch weisen die SUMOylierungsmuster leichte Unterschiede auf (rechter Teil, vgl. Signale I und II Spur 4 mit III und IV Spur 6). Western Blot-Analysen mit anti-SUMO1 und anti-SUMO2-Antikörper (rechter Teil) erzeugen deutliche Signale, die jedoch -im Gegensatz zu den anti-RelB Western Blot-Analysen (linker Teil)- neben diskreten Banden auch einen zusätzlichen hochmolekularen „Schmier“ aufweisen.

Ein ähnlich deutliches Bild ergab sich auch beim zweiten *in vivo*-SUMOylierungs-Test. Dazu wurde neben dem NF-κB-Faktor RelB auch RelA verwendet. Nach Koexpression von Flag-markiertem RelA bzw. RelB mit dem SUMO-Konjugationsenzym Ubc9 und EGFP-SUMO1 in HEK 293-Zellen wurden die RelA- und RelB-Proteine im Anschluss an die Lyse präzipitiert und im Western Blot auf eine SUMOylierung hin geprüft.

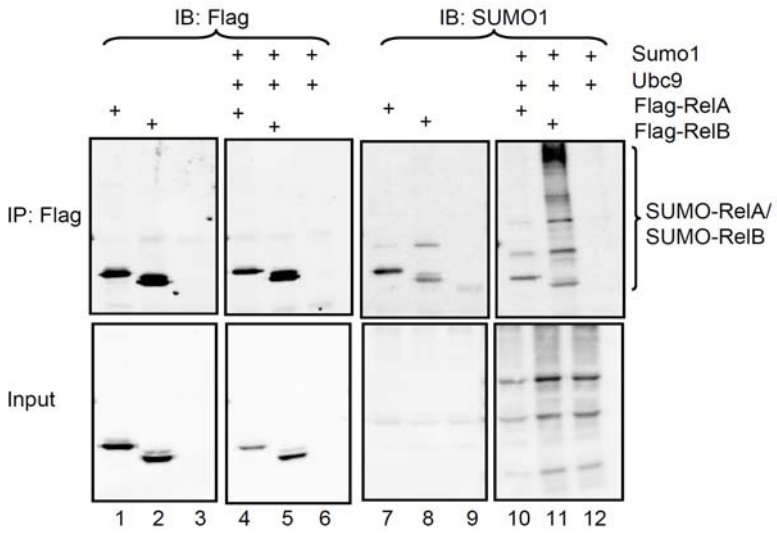


Abb. 3.22: Analyse der SUMOylierung von NF-κB-Faktoren *in vivo*
SUMOylierungs-Assay mit Gesamtzellextrakten aus HEK 293-Zellen, die transient mit Expressionsvektoren für Flag-RelB oder Flag-RelA alleine oder in Kombination mit Expressionsvektoren für Ubc9 und EGFP-SUMO1 transfiziert wurden. Die Gesamtzellextrakte wurden entweder für eine anti-Flag-Immunpräzipitation (90%) eingesetzt (oben, IP) oder als Kontrolle im Western Blot (unten, Input). Nach erfolgter Immunpräzipitation wurden die aufgereinigten Immunkomplexe im Western Blot mit Antikörpern gegen SUMO1 oder das Flag-Epitop gefärbt.

Im Western Blot mit SUMO1-spezifischen Antikörpern ist sowohl bei RelA als auch bei RelB eine deutliche basale SUMOylierung zu sehen (Abb. 3.22, oben, vgl. Spuren 7 und 8). Nach Koexpression von Ubc9 und SUMO1 hingegen traten deutliche Unterschiede zutage, da die RelA-SUMOylierung kaum gesteigert werden konnte, die RelB-SUMOylierung jedoch deutlich zunahm (Abb. 3.22, oben, vgl. Spuren 10 und 11).

3.13 Lokalisierung der SUMOylierung innerhalb des RelB-Proteins

Für die Identifikation der SUMOylierungsstellen im RelB-Protein wurden die cDNAs für die RelB-Mutanten K410/413/414/415N und K386/387/389/410/413/414/415N ebenfalls in das pCU-Plasmid inseriert. Bei diesen Mutanten wurden die Lysinreste aufgrund ihrer Lage in einem sogenannten SUMOylierungsmotiv ausgewählt und durch Asparagin-Reste substituiert. Die entsprechenden Konstrukte wurden mit einem für SUMO1 kodierenden Expressionsvektor in HEK 293-Zellen kotransfiziert und die gewonnenen Extrakte wurden für eine anschließende anti-RelB-Immunpräzipitation eingesetzt.

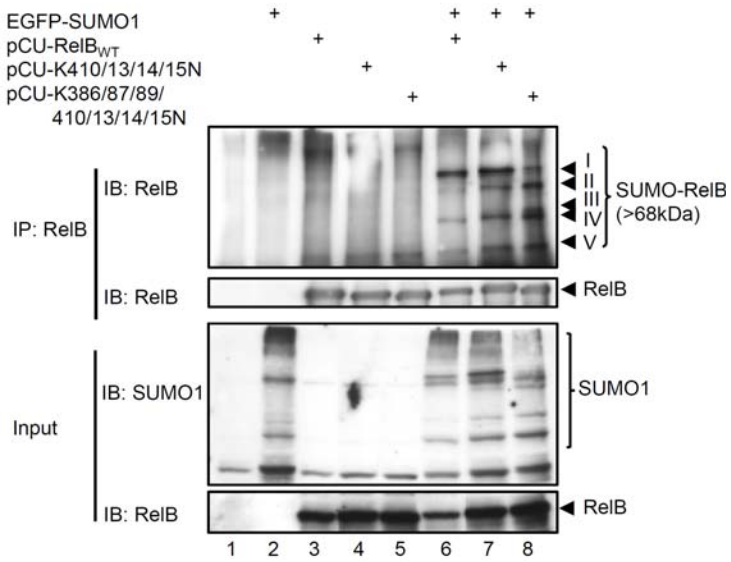


Abb. 3.23: Analyse der SUMOylierung verschiedener RelB-Ubc9-Versionen
SUMOylierungs-Assay in HEK 293-Zellen nach transienter Transfektion mit den angegebenen RelB-Ubc9-Expressionsvektoren entweder alleine oder in Kombination mit einem Expressionsvektor für EGFP-SUMO1. Die Gesamtzellextrakte wurden entweder für eine anti-Flag-Immunpräzipitation (90%) eingesetzt (oberer Teil, IP) oder als Kontrolle im Western Blot (unterer Teil, Input). Nach erfolgter Immunpräzipitation wurden die aufgereinigten Immunkomplexe im Western Blot mit Antikörpern gegen SUMO1 oder RelB gefärbt.

Sowohl der pCU-RelB$_{WT}$ als auch beide im SUMOylierungs-Assay analysierten Mutanten weisen eine deutliche SUMOylierung auf (Spuren 3 bis 5 Signal V, oberer Teil). Nach Kotransfektion eines SUMO1-kodierenden Vektors traten zusätzliche langsam migrierende RelB-spezifische Signale auf, die weitere SUMOylierte RelB-Spezies darstellen (Signal I-IV,

Spuren 6-8, oben). Die RelB-Mutante M15 zeigt eine deutliche Reduktion des Signals I wohingegen sich die Signale II und III zu verstärken scheinen.

Diese ersten Ergebnisse wiesen auf die Existenz mehrerer SUMOylierungsstellen im RelB-Protein hin. Bislang führte nur die Substitution der Lysin-Reste an den Positionen 386, 387, 389, 410, 413, 414 und 415 zu einer Veränderung des SUMOylierungsmusters, jedoch nicht zu einem vollständigen Verlust der RelB-SUMOylierung. Um weitere Lysinreste zu identifizieren, die als SUMOylierungsakzeptoren dienen, wurden im nächsten experimentellen Schritt die in Abb. 3.17A dargestellten RelB-Mutanten in einem *in vivo*-SUMOylierungs-Assay eingesetzt. Dazu wurden die unterschiedlichen RelB-Expressionsvektoren alleine oder in Kombination mit Expressionsvektoren für das SUMO-Konjugationsenzym Ubc9 (Plasmid pNU) und für EGFP-SUMO1 in HEK 293-Zellen kotransfiziert. In einem ersten Experiment wurde die SUMOylierung für alle vorhandenen Mutanten (M1 bis M16) untersucht (Daten nicht gezeigt). Wiederum zeigte nur die Mutante M15 mit den kombinierten Arginin-Substitutionen an den Positionen 386, 387, 389, 410, 413, 414 und 415 eine Veränderung des SUMOylierungsmusters. In Abbildung 3.24B ist in einem weiteren *in vivo*-SUMOylierungs-Assay mit ausgewählten, in Abb. 3.24A schematisch dargestellten Flag-markierten RelB-Varianten, die Reduktion des spezifischen SUMO-RelB-Signals dargestellt (Signal III, Abb. 3.24B, oberer Teil).

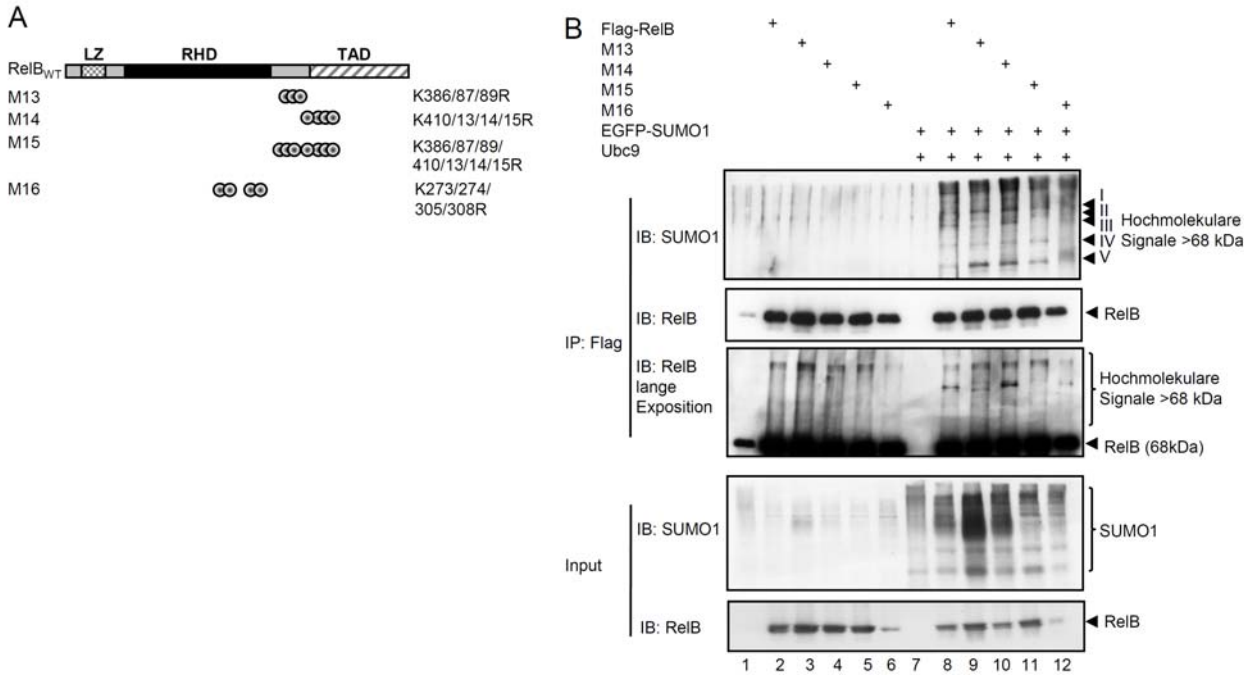


Abb. 3.24: Analyse der SUMOylierung verschiedener Flag-markierter RelB-Varianten
A, Schematische Darstellung der Lage konservierter SUMOylierungsmotive im RelB-Protein **B,** SUMOylierungs-Assay in HEK 293-Zellen nach Transfektion mit den angegebenen RelB-Expressionsvektoren entweder alleine oder in Kombination mit Expressionsvektoren für EGFP-SUMO1 und Ubc9. Die Gesamtzellextrakte wurden entweder für eine anti-Flag-Immunpräzipitation (IP, oberer Teil) oder als Kontrolle im Western Blot (unterer Teil, Input) eingesetzt. Nach erfolgter Immunpräzipitation wurden die aufgereinigten Immunkomplexe im Western Blot mit Antikörpern gegen SUMO1 oder RelB gefärbt.

Der SUMO1-spezifische Western Blot zeigt sowohl die SUMOylierung von Flag-RelB$_{WT}$ (Spur 8) als auch die SUMO-Modifikationen der Mutanten M13, M14, M15 und M16 (Spuren 9-12, obere Teilabbildung 3.24B). Neben dem hochmolekularen Schmier stellen die zahlreichen hochmolekularen Signale I-V die SUMOylierung von RelB dar, deren Spezifität durch die Verwendung des anti-SUMO1-Antikörpers gegeben ist. Laut Literatur ist die Modifikation durch SUMO1 meist eine Mono-SUMOylierung, aber die Bindung eines SUMO-Proteins mit einem Molekulargewicht von 11kDa lässt das RelB-Protein (68kDa) im SDS-Gel ca. 20kDa größer erscheinen. Durch SUMOylierungen an mehreren Lysinresten wird das Molekulargewicht des Zielproteins ebenfalls gesteigert. Von allen untersuchten Mutanten zeigt im Western Blot mit SUMO1-spezifischen Antikörpern wiederum vor allem M15 eine deutliche Veränderung des SUMOylierungsmusters, speziell den Verlust des hochmolekularen Signals III (Abb. 3.24B, oben, Spur 11).
Zwar zeigt RelB-M16 in Spur 12 des SUMO-spezifischen Western Blots nach Präzipitation, verglichen mit dem Wildtyp in Spur 8, ein schwächeres SUMO-Signal, aber auch die Expression dieser Mutante ist vergleichsweise gering. Wiederholungen des Experiments zeigen, dass M16 im Vergleich zu RelB$_{WT}$ keine Unterschiede in der SUMOylierung aufweist (Daten nicht gezeigt).

3.14 Analyse der endogenen RelB-SUMOylierung

Im Anschluss an den Nachweis der *in vivo*-SUMOylierung nach Transfektion der HEK 293-Zellen, wurde die endogene SUMOylierung von RelB in Namalwa-Zellen analysiert. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit PMA/Ionomyzin stimuliert und anschließend lysiert. Für die Expressionskontrolle (Input, mittlerer Teil) wurden 70µg Protein und für die anti-RelB-spezifische Immunpräzipitation (IP, oberer Teil) 1mg Protein eingesetzt. Als Spezifitätskontrolle wurde in einem parallel durchgeführten Versuch anstelle des RelB-spezifischen Antikörpers jeweils 1µg eines unspezifischen Kaninchen-Serums (*normal rabbit serum*) eingesetzt (Abb. 3.25, unterer Teil).

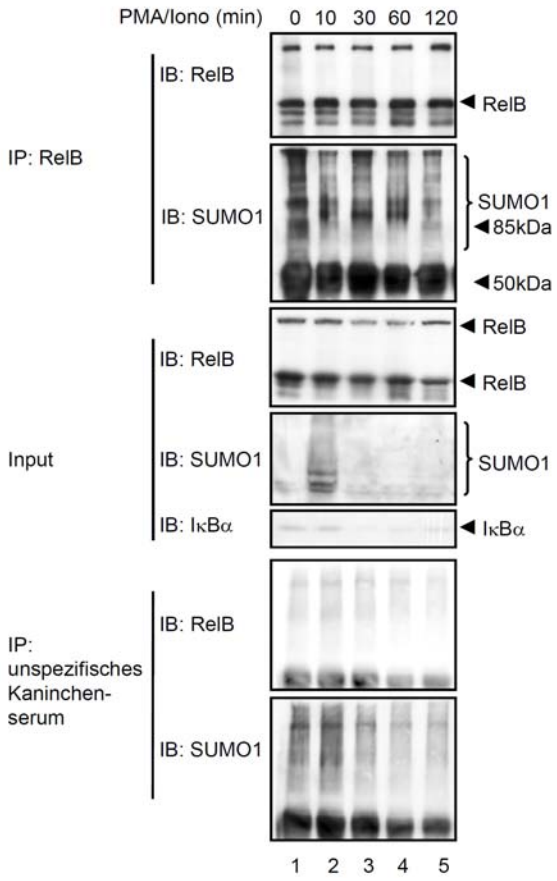


Abb.3.25: Analyse der endogenen RelB-SUMOylierung in Namalwa B-Zellen
Namalwa B-Zellen wurden unbehandelt oder nach 10-, 30-, 60- oder 120-minütiger PMA/Ionomyzin-Stimulation mit TNT lysiert. Mit RelB-spezifischen Antikörpern wurde anschließend das endogene RelB-Protein gefällt. Die RelB- und IκBα-spezifischen Western Blots (Input) wurden mit einem Aliquot der Extrakte vor der Immunpräzipitation (IP) durchgeführt und dienen der Kontrolle der Stimulationseffizienz. Die IP mit unspezifischem Kaninchen-Serum dient als Kontrolle der Spezifität der RelB-Immunpräzipitation.

Zur Kontrolle der PMA/Ionomyzin-Stimulation wurde die IκBα-Degradierung im Western Blot analysiert. Dabei ist eine deutliche IκBα-Reduktion nach 30-minütiger Stimulation nachweisbar. Im Gegensatz zur Kontroll-IP (Abb. 3.25, unten) sind bei der RelB-spezifischen Immunpräzipitation im nachfolgenden Western Blot deutliche SUMO-spezifische Signale zu sehen. Dabei zeigt sich die basale SUMOylierung des endogenen RelB-Proteins mit zwei prominenten Signalen bei einem Molekulargewicht von ca. 85kDa (Abb. 3.25, Spur 1). Im Verlauf der Stimulation mit PMA/Ionomyzin schwächen sich diese Signale ab, dafür erscheint ein weiteres Signal etwas oberhalb von 85 kDa (Abb. 3.25, Spuren 2-4). Die Ergebnisse dieser *in vivo*-SUMOylierungsstudie lassen den Schluss zu, dass auch das endogene RelB Ziel von SUMOylierungsereignissen ist, und dass die SUMOylierung von RelB Signal-induzierten Veränderungen unterworfen ist.

3.15 Analyse der RelB-Daxx-Interaktion

Mit dem Nachweis der *in vivo*-SUMOylierung von RelB ist eine wichtige Voraussetzung zur postulierten SUMOylierungs-abhängigen Komplexbildung von RelB und Daxx gegeben. Um diese Hypothese letztendlich zu belegen und die von Croxton et al. beschriebene Daxx-RelB-Interaktion näher zu charakterisieren (Croxton et al., 2006), sollte zu Beginn die mit Daxx interagierende Region im RelB-Protein identifiziert werden. Daher wurden die ausgewählten Flag-markierten Deletionsmutanten $RelB_{1-392}$, $RelB_{1-300}$, $RelB_{CT}$ und Flag-$RelB_{WT}$ (siehe Abb.3.16A) in HEK 293-Zellen mit HA-markiertem Daxx koexprimiert. Die Zellen wurden nach 48 Stunden geerntet und im Anschluss wurde eine Immunpräzipitation mit anti-Flag-Antikörpern durchgeführt (Abb. 3.26).

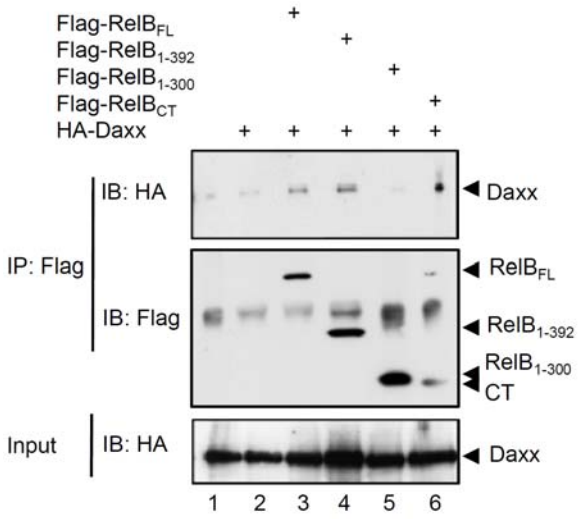


Abb.3.26: Lokalisierung der Daxx-Interaktionsdomäne im RelB-Protein
Die Flag-markierten RelB-Deletionsmutanten oder Flag-$RelB_{WT}$ wurden ektopisch in Kombination mit HA-markiertem Daxx in HEK 293-Zellen exprimiert. 48 Stunden nach der transienten Transfektion wurden die Zellen mit TNT geerntet und 90% der Gesamtzellextrakte für eine Immunpräzipitation (IP, oberer Teil) mit Flag-spezifischen Antikörpern eingesetzt; 10% der Extrakte wurden im Kontroll-Western Blot (Input) eingesetzt. Der Nachweis der Daxx-Kopräzipitation erfolgte im Western Blot (IB) mit HA-spezifischen Antikörpern, die Kontrolle der RelB-Präzipitation mit Flag-spezifischen Antikörpern.

Im Western Blot mit HA-spezifischen Antikörpern (Abb. 3.26, oben) treten Daxx-spezifische Signale in den Spuren 3, 4 und 6 auf. Folglich kann nur die $RelB_{1-300}$-Deletionsmutante nicht mit Daxx interagieren. Die $RelB_{CT}$-Deletionsmutante hingegen ist in der Lage Daxx zu binden. Die Ergebnisse aus dieser Interaktions-Studie legen somit nahe, dass die gesuchte Bindungsregion zwischen Aminosäure 349, dem Startpunkt von $RelB_{CT}$ und Aminosäure 392, dem Endpunkt von $RelB_{1-392}$ liegen muss.

Mit den beiden Deletionsmutanten $RelB_{\Delta DD}$ und $RelB_{DD1}$ (schematische Darstellung Abb. 3.27A) konnte diese 50 Aminosäuren lange Region noch weiter eingegrenzt werden. Das Konstrukt

$RelB_{DD1}$ erstreckt sich über die Aminosäuren 264 bis 379, die hier als Dimerisierungsdomäne (DD) von RelB definiert sind, wohingegen der zweiten Deletionsmutante $RelB_{\Delta DD}$ genau diese Region fehlt. Das Flag-markierte $RelB_{\Delta DD}$ und das Flag-markierte $RelB_{DD1}$ wurden in zwei getrennten Experimenten mit Daxx in HEK 293-Zellen koexprimiert, und nach Flag-Immunpräzipitation im Western Blot im Vergleich zum Flag-$RelB_{WT}$ auf die Daxx-Interaktion getestet.

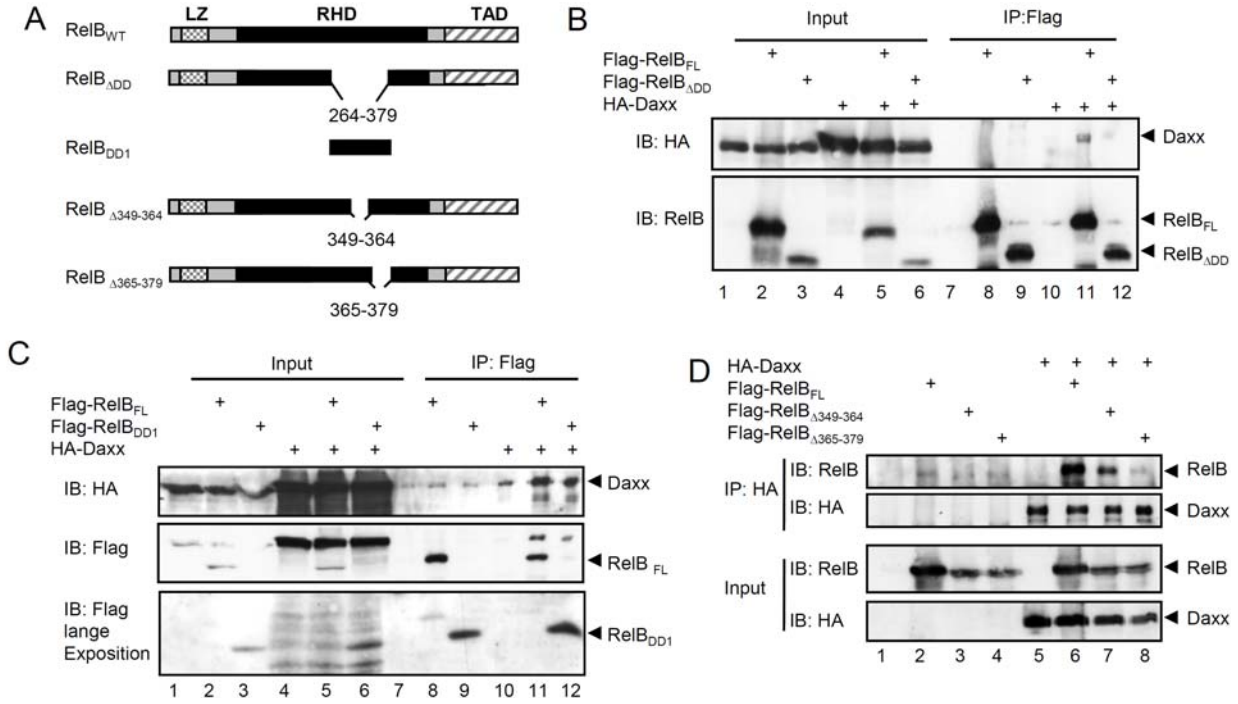


Abb.3.27: Eingrenzung der lokaklisierten Daxx-Interaktionsdomäne im RelB-Protein
A, Schematische Darstellung der verschiedenen Flag-markierten RelB-Deletionsmutanten. **B** und **C,** Ektopische Expression der Flag-markierten RelB-Deletionsmutante $RelB_{\Delta DD}$ (**B**) bzw. $RelB_{DD1}$ (**C**) oder von Flag-$RelB_{WT}$ in Kombination mit HA-markiertem Daxx. 48 Stunden nach der transienten Transfektion wurden die HEK 293-Zellen in TNT lysiert und 90% der Gesamtzellextrakte für eine Immunpräzipitation mit Flag-spezifischen Antikörpern eingesetzt (IP, rechter Teil); 10% der Extrakte wurden im Kontroll-Western Blot (Input, linker Teil) eingesetzt. Der Nachweis der Daxx-Kopräzipitation erfolgte durch Western Blot-Analysen (IB) mit HA-spezifischen Antikörpern, die Kontrolle der RelB-Expression sowie -Präzipitation mit Flag-spezifischen Antikörpern. **D,** Die Flag-markierten Deletionsmutanten $RelB_{\Delta 349-364}$ bzw. $RelB_{\Delta 365-379}$ oder Flag-$RelB_{WT}$ wurden alleine oder in Kombination mit HA-markiertem Daxx in HEK 293-Zellen ektopisch exprimiert. 48 Stunden nach der transienten Transfektion wurden die HEK 293-Zellen in TNT lysiert und 90% der Gesamtzellextrakte für eine Immunpräzipitation mit HA-spezifischen Antikörpern eingesetzt (IP, oberer Teil); 10% der Extrakte wurden im Kontroll-Western Blot (Input, unterer Teil) eingesetzt. Der Nachweis der RelB-Kopräzipitation erfolgte durch Western Blot-Analysen (IB) mit RelB-spezifischen Antikörpern, die Kontrolle der Daxx-Expression sowie -Präzipitation mit HA-spezifischen Antikörpern.

Abbildung 3.27B zeigt die Kopräzipitation von Daxx mit $RelB_{WT}$ im Western Blot mit HA-spezifischen Antikörpern (oberer Teil, Spur 11). Die $RelB_{\Delta DD}$-Mutante zeigt jedoch keine Interaktion mit Daxx (Spur 12). Die essenzielle Rolle der Dimerisierungsdomäne konnte im reziproken Experiment weiter untermauert werden. Dabei war die $RelB_{DD1}$-Mutante (AS 264-379) in der Lage im gleichen Umfang wie $RelB_{WT}$ mit Daxx zu interagieren (Abb. 3.27C, oberer

Teil, vgl. Spuren 11 und 12). Beide Experimente zusammengefasst zeigen, dass die Daxx-Interaktionsdomäne im RelB-Protein wahrscheinlich zwischen den Aminosäuren 349 und 379 liegt.

Schließlich wurden zwei weitere RelB-Deletionsmutanten generiert, bei denen jeweils 15 Aminosäuren der 30 Aminosäuren umfassenden Region zwischen Position 349 und 379 deletiert wurden. Eine schematische Darstellung der Deletionsmutanten $RelB_{\Delta 349\text{-}364}$ und $RelB_{\Delta 365\text{-}379}$ findet sich in Abbildung 3.27A. Die beiden Flag-markierten Deletionsmutanten und Flag-$RelB_{WT}$ wurden mit HA-markiertem Daxx in HEK 293-Zellen koexprimiert, welches nach HA-Präzipitation im Western Blot auf die RelB-Interaktion getestet wurde. Im Western Blot mit RelB-spezifischen Antikörpern (Abb. 3.27D, obere Teilabbildung) zeigte sich eine deutliche Interaktion von Daxx mit Flag-$RelB_{WT}$ (Spur 6) sowie mit Flag-$RelB_{\Delta 349\text{-}364}$ (Spur 7), nicht jedoch mit der Deletionsmutante Flag-$RelB_{\Delta 365\text{-}379}$ (Spur 8).

Bereits publizierte Daten beschreiben jedoch eine kritische Rolle des Bereichs um den Serinrest an Position 368 für die Fähigkeit von RelB Protein-Protein-Interaktionen auszubilden. Die untersuchte Flag-$RelB_{\Delta 365\text{-}379}$-Deletionsmutante betrifft in der Tat den carboxyterminalen Teil der Dimerisierungsdomäne, welche sich in ihrer gesamten Länge über die Aminosäuren 264 bis 379 des RelB-Proteins erstreckt (Huang et al., 2005; Maier et al., 2003; Ryseck et al., 1995). Deswegen wurde zur Kontrolle der Interaktionsfähigkeit Flag-$RelB_{WT}$ bzw. die Deletionsmutante Flag-$RelB_{\Delta 365\text{-}379}$ mit p52 koexprimiert und nach Flag-spezifischer Immunpräzipitation im Western Blot auf die p52-Interaktion analysiert (Abb. 28).

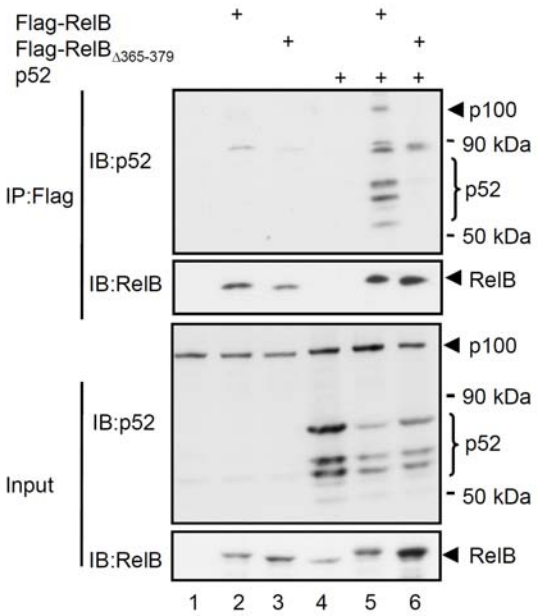


Abb.3.28: Analyse des Einflusses der Deletion von Ser[368] auf die Interaktionsfähigkeit von RelB
Kotransfektion von Expressionsvektoren für Flag-$RelB_{WT}$ oder Flag-$RelB_{\Delta 365\text{-}379}$ alleine oder in Kombination mit einem Expressionsvektor für p52 in HEK 293-Zellen. Die Ernte erfolgte nach 48 Stunden in TNT-Lysepuffer, 90% der Gesamtzellextrakte wurden für eine Immunpräzipitation mit Flag-spezifischen

Antikörpern eingesetzt (IP, oberer Teil); 10% der Extrakte wurden im Kontroll-Western Blot eingesetzt (Input, unterer Teil). Der Nachweis der p52-Kopräzipitation erfolgte durch Western Blot-Analysen (IB) mit p52-spezifischen Antikörpern, die Kontrolle der RelB-Expression sowie -Präzipitation mit Flag-spezifischen Antikörpern.

Tatsächlich zeigte sich im Fall von $RelB_{\Delta 365\text{-}379}$ eine deutliche Reduktion der kopräzipitierten Proteine NF-κB2/p52 und NF-κB2/p100 im Vergleich zum wildtypischen RelB-Protein (Abb. 3.28, oberer Teil, vgl. Spuren 5 und 6). Die Region zwischen Aminosäure 365 und 379 scheint also prinzipiell für die Interaktion von RelB mit Komplexpartnern wichtig zu sein und könnte die Interaktion mit Daxx vermitteln.

Jedoch ist damit noch nicht geklärt, ob die Interaktion zwischen RelB und Daxx von der RelB-SUMOylierung abhängig ist. Der für die Daxx-Bindung essenzielle RelB-Bereich umfasst nicht die in der RelB-M15-Mutante identifizierten Lysin-Reste, beide Bereiche liegen jedoch in unmittelbarer Nähe zueinander. Da deswegen noch keine abschließende Aussage über die SUMOylierungs-Abhängigkeit der Daxx-RelB-Interaktion getroffen werden konnte, wurden in einem weiteren experimentellen Ansatz Daxx-Mutanten verwendet, die nicht mehr in der Lage sind SUMOylierte Proteine zu binden. Wie in der Einleitung beschrieben, besitzt das Daxx-Protein zwei SUMO-Interaktionsmotive (Lokalisation in Abb. 3.29A), welche für eine SUMO-abhängige Daxx-RelB-Interaktion essenziell wären. Durch die Koexpression der HA-markierten Daxx-SIM-Deletionsmutanten $Daxx_{\Delta SIM1}$, $Daxx_{\Delta SIM2}$, $Daxx_{\Delta SIM1+2}$ bzw. des Daxx-Wildtyp-Proteins mit Flag-$RelB_{WT}$ in HEK 293-Zellen und einer anschließenden HA-spezifischen Immunpräzipitation wurde die Interaktion dieser Daxx-Mutanten mit RelB überprüft (Abb. 3.29B).

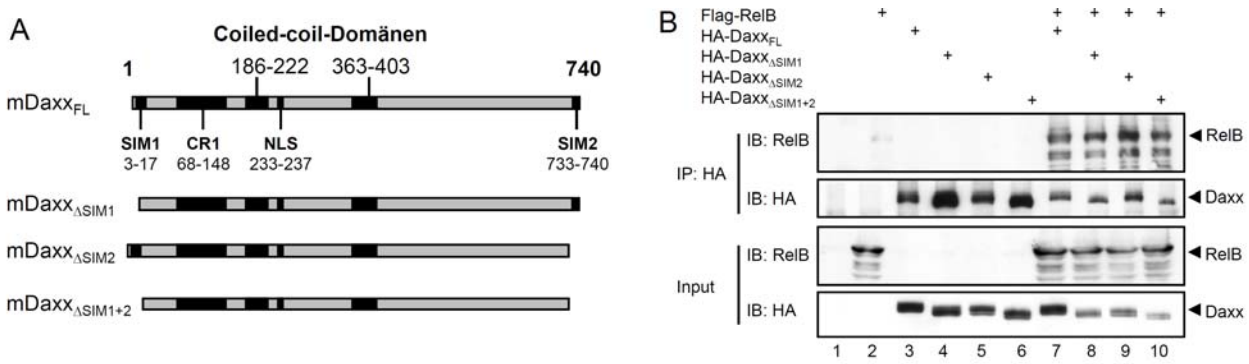


Abb.3.29: Lokalisierung der RelB-Interaktionsdomäne im Daxx-Protein
A, Schematische Darstellung der eingesetzten HA-markierten Daxx-Deletionsmutanten. **B**, Die HA-markierten Daxx-Deletionsmutanten wurden alleine oder in Kombination mit Flag-$RelB_{WT}$ in HEK 293-Zellen exprimiert. Nach 48 Stunden wurden die HEK 293-Zellen in TNT lysiert und 90% der Gesamtzellextrakte für eine Immunpräzipitation mit HA-spezifischen Antikörpern eingesetzt (IP, oberer Teil); 10% der Extrakte wurden im Kontroll-Western Blot eingesetzt (Input, unterer Teil). Der Nachweis der RelB-Kopräzipitation erfolgte durch Western Blot-Analysen (IB) mit RelB-spezifischen Antikörpern, die Kontrolle der Daxx-Expression sowie -Präzipitation mit HA-spezifischen Antikörpern.

Der Western Blot mit RelB-spezifischen Antikörpern zeigt nach Immunpräzipitation erwartungsgemäß die Kopräzipitation von RelB mit dem Daxx-Wildtyp (Abb. 3.29B, oben, Spur 7). RelB-spezifische Signale sind jedoch auch bei allen verwendeten Daxx-Mutanten nachweisbar (Abb. 3.29B, oben, Spuren 8, 9 und 10). Dieses Ergebnis ist somit ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Daxx-RelB-Interaktion nicht auf einer SUMOylierung von RelB basiert.
Um schließlich die Bedeutung der zuvor als SUMOylierungs-Akzeptoren identifizierten Lysinreste für die RelB-Daxx-Interaktion zu analysieren, wurde eine weitere Interaktions-Studie mit ektopisch exprimierten Flag-RelB-Mutanten und Daxx durchgeführt.

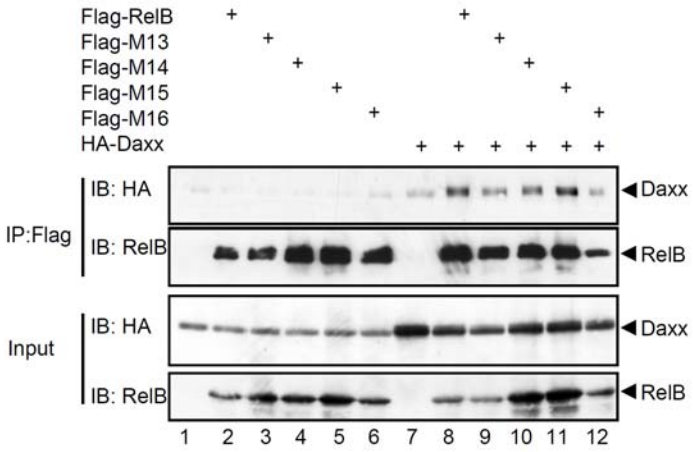


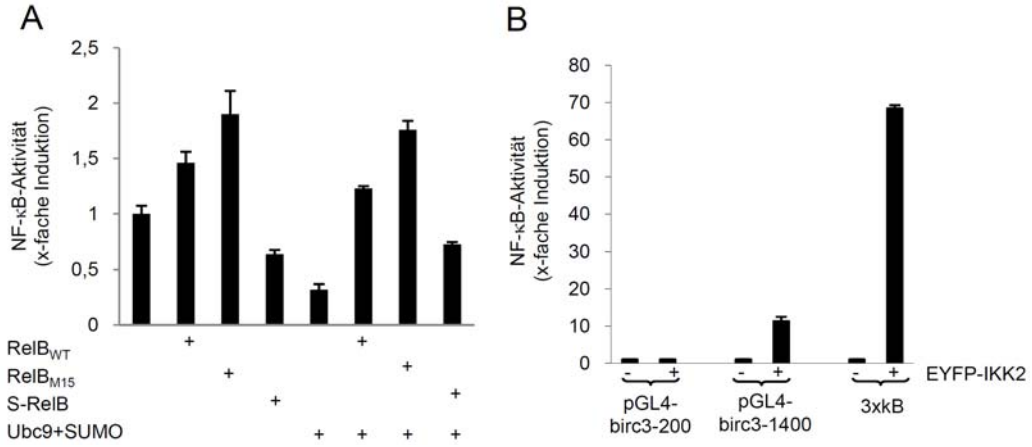
Abb.3.30: Analyse der Daxx-Interaktion von RelB-K/R-Mutanten
Transiente Transfektion der Expressionsvektoren für die angegebenen Flag-markierten K/R-RelB-Mutanten oder Flag-$RelB_{WT}$ alleine oder in Kombination mit HA-markiertem Daxx. Nach 48 Stunden erfolgte die Lyse der transfizierten HEK 293-Zellen in TNT und 90% der Gesamtzellextrakte wurden für eine Immunpräzipitation mit Flag-spezifischen Antikörpern eingesetzt (IP, oberer Teil); 10% der Extrakte wurden im Kontroll-Western Blot eingesetzt (Input, unterer Teil). Der Nachweis der Daxx-Kopräzipitation erfolgte durch Western Blot-Analysen (IB) mit HA-spezifischen Antikörpern, die Kontrolle der RelB-Expression sowie -Präzipitation mit Flag-spezifischen Antikörpern.

Dabei zeigte die Mutante RelB-M15 in der nachfolgenden Western Blot-Analyse eine im Vergleich zum wildtypischen RelB äquivalente Menge an kopräzipitiertem Daxx (Abb. 3.30, oben, vgl. Spur 8 mit Spur 11). Dieses Ergebnis ist folglich ein weiteres Indiz für die SUMO-unabhängige Interaktion von Daxx mit RelB, da selbst die Mutante mit veränderter SUMOylierung die quantitativ gleiche Daxx-Interaktion zeigt.
Die im selben Experiment auf ihre Daxx-Interaktion getesteten RelB-K/R-Mutanten M13 und M16 scheinen eine geringere Interaktion mit Daxx zu zeigen (Abb. 3.30, oben, vgl. Spur 8 mit den Spuren 9 und 12). Betrachtet man jedoch zugleich die präzipitierten Mengen der jeweiligen RelB-Mutanten (zweite Teilabbildung von oben), dann zeigt sich, dass auch die Expression dieser RelB-Mutanten geringer als die des Wildtyps ist. So ergibt sich für alle in diesem Experiment analysierten RelB-Varianten doch eine ähnliche Intensität der Daxx-Interaktion.
Da nun von einer SUMOylierungs-unabhängigen RelB-Daxx-Interaktion auszugehen war, blieb weiterhin die Frage nach der Interaktions-Domäne innerhalb des Daxx-Proteins zu klären. Zu

diesem Zweck wurden carboxyterminale Daxx-Deletionsmutanten mit RelB kotransfiziert, Daxx wurde präzipitiert und hinsichtlich der Interaktion mit RelB im Western Blot analysiert. Da RelB jedoch durch alle Daxx-Deletionsmutanten kopräzipitiert werden konnte, wurde keine spezifische Interaktionsdomäne identifiziert (Ergebnis nicht gezeigt).

3.16 Funktionelle Analyse der RelB-SUMOylierung

Um die funktionelle Relevanz der RelB-SUMOylierung zu analysieren, wurde $RelB_{WT}$ mit der RelB-Mutante M15 und einem SUMO1-RelB-Fusionsprotein verglichen. Diese beiden Mutanten wurden ausgewählt, da zum einen die Mutante M15 eine Veränderung des SUMOylierungsmusters aufwies (Abb. 3.23 und 3.24) und zum anderen weil die Fusion mit SUMO1 eine SUMOylierung imitieren kann (Nayak et al., 2009). Zur Bestimmung der transkriptionellen Aktivität der verschiedenen RelB-Varianten wurden im ersten Schritt unterschiedliche Reportergen-Assays durchgeführt. Neben einem NF-κB-abhängigen Luziferase-Reporterplasmid (3xκB Reporter) wurden auch Luziferase-Reporterplasmide konstruiert, bei denen die Luziferase-Expression durch unterschiedliche Teile des *Birc3*-Promotors reguliert wird.



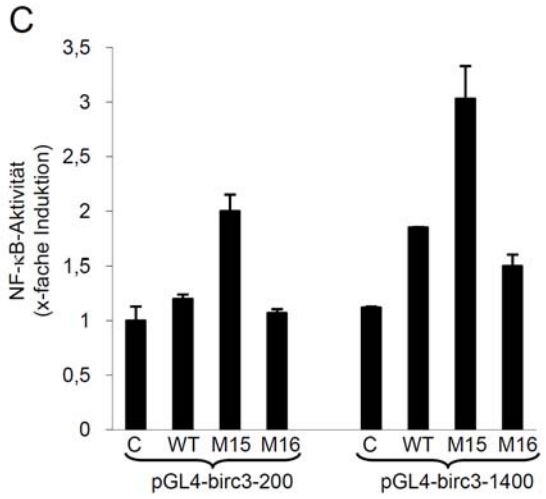


Abb.3.31: Effekt der Substitution für die SUMOylierung wichtiger Lysinreste im RelB-Protein auf dessen transkriptionelle Aktivität
A, Reportergen-Assay nach transienter Transfektion von HEK 293-Zellen mit dem Flag-$RelB_{WT}$-Expressionsvektor oder Flag-markierten Expressionsvektoren der RelB-Mutanten M15 oder SUMO-RelB. Kotransfiziert wurden das NF-κB-abhängige Luziferase-Reporterkonstrukt und das Renilla-Luziferase-Reporterkonstrukt. **B,** Zur Kontrolle der NF-κB-Abhängigkeit der birc3-Luziferase-Konstrukte wurden HEK 293-Zellen entweder mit dem NF-κB-abhängigen Luziferase-Reporterkonstrukt 3xκB oder pGL4-birc3-1400 (bzw. als Negativkontrolle mit dem pGL4-birc3-200) und mit einem Renilla-Luziferase-Reporter alleine oder in Kombination mit einem EYFP-IKK2-Expressionsvektor transient transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit TNT lysiert und die relative Luziferase-Aktivität wurde, wie im Kapitel Methoden beschrieben, bestimmt. **C,** Reportergen-Assay nach transienter Transfektion von HEK 293-Zellen mit dem Flag-$RelB_{WT}$-Expressionsvektor oder Flag-markierten Expressionsvektoren der RelB-Mutanten M15 oder M16. Kotransfiziert wurden entweder das pGL4-birc3-1400- bzw. als Negativkontrolle pGL4-birc3-200 Luziferase-Reporterkonstrukt in Kombination mit einem Renilla-Luziferase-Reporter.

Interessanterweise zeigt RelB-M15 im Luziferase-Reportergen-Assay mit dem 3xκB-Reporter eine höhere basale transkriptionelle Aktivität als das wildtypische Protein. Hingegen scheint die basale Aktivität des SUMO-RelB-Fusionsproteins im Vergleich zu $RelB_{WT}$ geringer zu sein (Abb. 3.31A). Eine SUMO- und Ubc9-Kotransfektion führt zu einem Absinken sowohl der basalen NF-κB-Aktivität als auch der durch $RelB_{WT}$ und RelB-M15 vermittelten NF-κB-Aktivität, dagegen scheint sich die transkriptionelle Aktivität des SUMO-RelB-Fusionsproteins nicht weiter zu verringern. Das Verhältnis der transkriptionellen Aktivität der drei analysierten Proteine untereinander bleibt auch nach SUMO- und Ubc9-Kotransfektion gleich.

Ein ähnliches Bild ergaben die Reportergen-Analysen mit dem birc3-Promotor-getriebenen Reporterkonstrukt. Es wurden zwei unterschiedliche birc3-Reporter verwendet: Ein Reporterkonstrukt mit dem Bereich –200Bp relativ zum Transkriptionsstart des birc3-Gens wurde als Negativkontrolle verwendet, in einem weiteren Konstrukt wurde demgegenüber das längere –1400-Fragment des *Birc3*-Promotors inseriert. Während der birc3-1400-Reporter NF-κB-, und insbesondere RelB-abhängig, reguliert werden sollte, sollte der birc3-200-Reporter nicht durch RelB bzw. NF-κB induziert werden können (Croxton et al., 2006).

In der Tat wird die Aktivität des pGL4-birc3-200-Konstrukts durch ektopische Expression von IKK2 nicht gesteigert, wohingegen die Promotoraktivität des pGL4-birc3-1400-Konstrukts durch

die Überexpression von IKK2 deutlich gesteigert wird (Abbildung 3.31B). Bezüglich der RelB-induzierten Promotoraktivität dieser Reporterkonstrukte wird aus Abbildung 3.31C ersichtlich, dass die Aktivität von RelB-M15 wiederum stärker, die Aktivität von RelB-M16 jedoch weitaus schwächer ist als jene durch den $RelB_{WT}$. RelB-M16 ist eine Kombination aus den weniger aktiven Mutanten RelB-M9 und RelB-M11 und wurde in diesem Experiment als Negativkontrolle eingesetzt. Als Gesamtergebnis der Luziferase-Reportergen-Analysen lässt sich festhalten, dass RelB durch die SUMOylierung in seiner transkriptionellen Aktivität tendenziell negativ beeinflusst wird. Dies wird bereits aufgrund der geringen basalen transkriptionellen Aktivität des SUMO-RelB-Fusionsproteins deutlich. Die Substitution der carboxyterminalen Lysinreste durch Arginin (M15) führt im Vergleich zum wildtypischen Protein zu einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität.

Das Resultat der Luziferase-Reportergen-Analysen wurde durch eine semiquantitative RT-PCR weitergehend charakterisiert. Nach ektopischer Expression von $RelB_{WT}$, RelB-M15 oder SUMO-RelB in S107 Prä-B-Zellen kann die mRNA-Menge des RelB-Zielgens *Birc-3* nach cDNA-Synthese mit spezifischen Primern durch RT-PCR semi-quantitativ bestimmt werden.

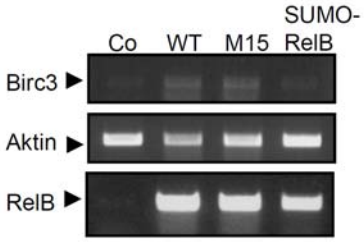
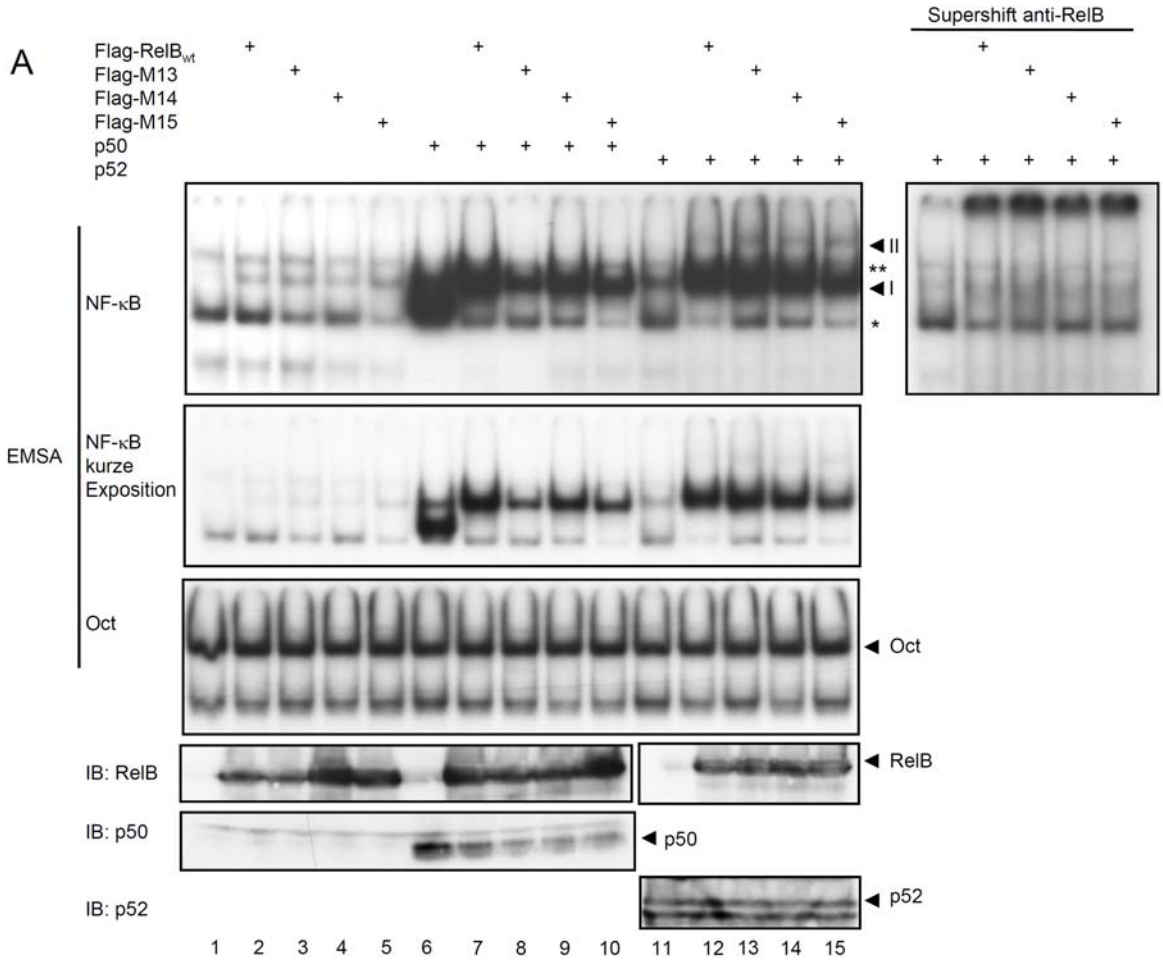


Abb.3.32: Semi-quantitative RT-PCR nach RelB-Überexpression
S107-Prä-B-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Flag-markiertes $RelB_{WT}$, Flag-markiertes RelB-M15 oder Flag-markiertes SUMO-RelB transfiziert. Nach 48 Stunden wurde die RNA extrahiert und cDNA mit Hilfe des Invitrogen-Kits synthetisiert. Anschließend wurde eine PCR mit β-Aktin-, eine PCR mit RelB- und eine PCR mit birc3-cDNA-spezifischen Primern durchgeführt und die PCR-Produkte in einem Agarosegel analysiert. Die Intensität der Aktin-Signale (Ladekontrolle) ist in allen Proben vergleichbar. Die Intensität der birc3-Signale steht für die birc3-RNA-Quantität und die der RelB-Signale für die RNA-Quantität der jeweils exprimierten RelB-Proteine.

Ein Teil der Promotorregion des hier analysierten NF-κB-Zielgens *Birc-3* wurde zuvor als NF-κB-spezifisches Reporterkonstrukt in Luziferase-Assays untersucht (Abb. 3.31B und C). Die Ergebnisse der semi-quantitativen RT-PCR zeigen, dass nach SUMO-RelB-Überexpression weniger birc3-mRNA vorliegt als nach Überexpression des $RelB_{WT}$-Proteins oder des RelB-M15-Proteins. Gemeinsam mit den Luziferase-Ergebnissen betrachtet, deuten diese Ergebnisse auf eine negative Rolle der SUMOylierung für die Funktion von RelB hin.

Eine mögliche Ursache für diese veränderten transaktivierenden Eigenschaften der RelB-Mutanten RelB-M15 und SUMO-RelB wäre eine Beeinflussung der basalen DNA-Bindung. Um diesen Punkt zu klären, wurden EMSA-Experimente mit einer ^{32}P-markierten NF-κB-

spezifischen Sonde zunächst zum Vergleich des wildtypischen RelB-Proteins mit M13, M14 und M15 durchgeführt.



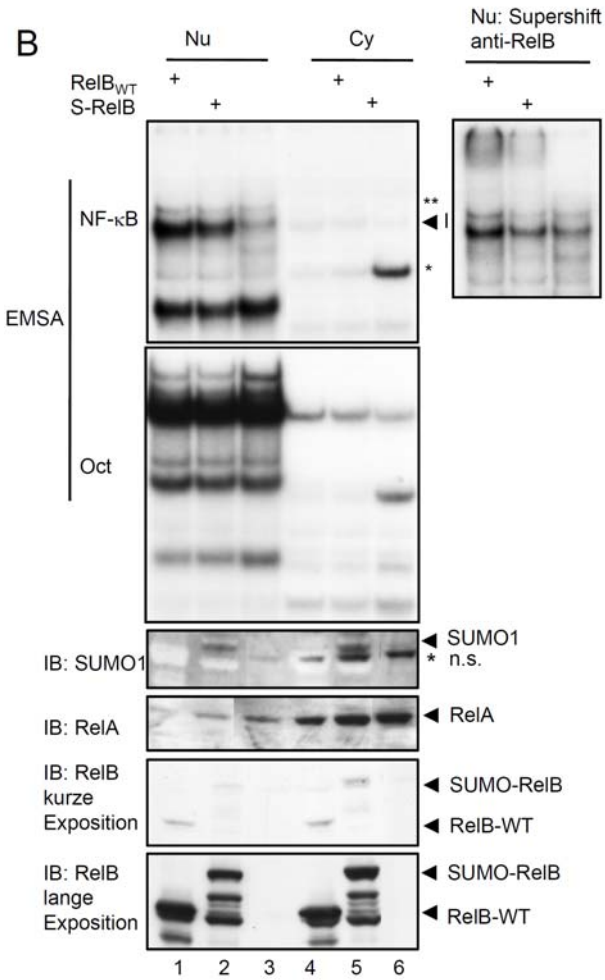


Abb.3.33: RelB-DNA-Bindungsfähigkeit in Abhängigkeit von den Dimerisierungspartnern p50 bzw. p52
A, HEK 293-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Flag-markiertes RelB$_{WT}$ oder Flag-markiertes RelB-M13, -M14 oder -M15 und p50 bzw. p52 transfiziert und nach 48 Stunden mit Dignam C lysiert. Die Gesamtzellextrakte wurden im EMSA mit NF-κB-spezifischer (oben) oder Oct-spezifischer Sonde analysiert. Zur Identifizierung der RelB-enthaltenden DNA-Protein-Komplexe wurde eine Supershift-Analyse mit RelB-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die unteren beiden Teilabbildungen zeigen den Western Blot mit den für den EMSA eingesetzten Extrakten zur Expressionskontrolle von RelB (oben) und p52/p50 (unten). **B,** EMSA mit NF-κB-spezifischer (oben) oder Oct-spezifischer Sonde mit nukleären und cytoplasmatischen Extrakten transient transfizierter HEK 293-Zellen. Die vier unteren Teilabbildungen zeigen den Western Blot mit den für den EMSA eingesetzten Extrakten zur Expressionskontrolle von SUMO, RelA (als Ladekontrolle) und RelB.

Die Gelretardationsanalyse in Abbildung 33A zeigt im Vergleich zum wildtypischen RelB-Protein keine deutliche Veränderung der basalen DNA-Bindung der RelB-Mutanten M13, M14 und M15 (Kombination M13+M14) (Spuren 2 bis 5, Komplex I). Bezüglich der subzellulären Verteilung konnte in einem Western Blot gezeigt werden, dass die SUMO-Koexpression keinen Einfluss auf die Proteinverteilung zu haben scheint (Ergebnis nicht gezeigt).

Da die Proteinmenge der RelB-Dimerisierungspartner p50 bzw. p52 oftmals einen limitierenden Faktor für die RelB-DNA-Bindung darstellt, wurde im EMSA ebenfalls die DNA-Bindung von RelB$_{WT}$, RelB-M13, RelB-M14 und RelB-M15 nach p50- bzw. p52-Kotransfektion analysiert (Abb. 3.33A, Spuren 6-15 oben). Jedoch zeigen sich weder nach p50- noch nach p52-

Kotransfektion deutliche Unterschiede zwischen $RelB_{WT}$ und den getesteten Mutanten in der Affinität zur DNA. Durch den Supershift mit RelB-spezifischen Antikörpern ließen sich die Komplexe I und II als RelB-spezifische Komplexe identifizieren. Die mit Stern (*) gekennzeichneten Signale sind unspezifisch.

Das SUMO-RelB-Fusionsprotein wurde ebenfalls in einem EMSA bezüglich der DNA-Bindung mit $RelB_{WT}$ verglichen. Zytoplasmatische und nukleäre Extrakte transient transfizierter HEK 293-Zellen wurden separat analysiert. Jedoch scheint die zytoplasmatische Fraktion kaum DNA-bindende NF-κB-Komplexe zu beinhalten (Abb. 3.33B, Spuren 4-6 oben). Durch den Supershift mit RelB-spezifischen Antikörpern ließ sich der Komplex I als RelB-spezifischer Komplex identifizieren. Das SUMO-RelB-Fusionsprotein scheint eine etwas schwächere DNA-Bindung aufzuweisen (Abb. 3.33B, vgl. Spur 1 mit 2). Des Weiteren ist im RelB-spezifischen Western Blot -verglichen mit dem wildtypischen Protein- eine geringere Menge des SUMO-RelB-Proteins im Nukleus detektierbar.

In Anbetracht der EMSA-Ergebnisse scheint der schwache negative Effekt der SUMOylierung partiell in veränderter DNA-Bindung bzw. subzellulärer Verteilung begründet zu liegen. Einen weiteren Beitrag zum "SUMO-Effekt" könnten Kofaktoren leisten.

4 Diskussion

4.1 Stellung von RelB im NF-κB-Transkriptionssystem

Die Familie der NF-κB-Transkriptionsfaktoren reguliert eine Vielzahl von Genen, welche in Entzündungsreaktionen, die Zelldifferenzierung, die Apoptose und die Immunantwort involviert sind (Ghosh and Karin, 2002). Da bereits eine geringfügige Dysregulation enorme negative Folgen wie chronische Entzündungsreaktionen oder Tumorgenese hat, spielt die akkurate Regulation des NF-κB-Transkriptionssystems eine entscheidende Rolle. Eine dauerhafte Aktivierung und folglich andauernde nukleäre Lokalisation von NF-κB führt beispielsweise in einer Reihe von Tumor-Zellen (z.B. Hodgkin-Lymphomen) zu einer verstärkten Induktion von NF-κB-Zielgenen wie beispielsweise der anti-apoptotischen Gene *Bcl2l1*, *Xiap*, *A20*, *Birc2* und *Birc3* (Greten et al., 2004; Karin and Lin, 2002). Auch die Zellproliferation, die Metastasierung, die Angiogenese und die Immortalisierung von Zellen können durch die NF-κB-regulierte Genexpression gefördert werden. Im Gegensatz dazu werden der Familie der NF-κB-Transkriptionsfaktoren aber auch Tumor-suppressive und Entzündungs-auflösende Funktionen zugeschrieben, weshalb die Analyse der komplexen Regulationsmechanismen dieser Familie von Transkriptionsfaktoren einen wichtigen Punkt der Forschung darstellt (Basseres and Baldwin, 2006; Perkins and Gilmore, 2006).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse der Regulationsmechanismen von RelB, einer Untereinheit der Familie der NF-κB-Transkriptionsfaktoren. RelB spielt als Teil des RelB/p52-Heterodimers eine wichtige Rolle innerhalb des induzierbaren IKKα-abhängigen alternativen NF-κB-Signalweges. Darüber hinaus übt RelB jedoch auch vielfältige Funktionen im kanonischen NF-κB-Signalweg aus. Von besonderem Interesse ist dabei die konstitutive nukleäre Lokalisation bzw. Aktivierung von RelB in B-Zellen, ein Umstand welcher für die Reifung von B-Zellen von außerordentlicher Bedeutung ist. Des Weiteren ist RelB in der Lage die Expression einer Reihe von NF-κB-Zielgenen durch Rekrutierung von Korepressoren negativ zu beeinflussen (Derudder et al., 2003; Lernbecher et al., 1994; Lo et al., 2006; Senftleben et al., 2001; Weih et al., 1994).

Jedoch weist RelB eine breite funktionelle Diversität als transkriptioneller Aktivator und als Repressor auf (siehe Einleitung) (Ruben et al., 1992; Suhasini and Pilz, 1999). Da die molekularen Mechanismen, welche zur Regulation der Aktivität von RelB beitragen, noch weitgehend unbekannt sind, stand deren Aufklärung im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

Eine Möglichkeit, wie zumindest der negative RelB-Effekt aufgehoben werden kann, stellt die bereits beschriebene Degradierung von RelB nach T-Zellrezeptor-Stimulation dar. Obwohl die Signaltransduktionskaskade, welche die RelB-Degradierung reguliert, noch nicht in allen Einzelheiten identifiziert werden konnte, ist jedoch bekannt, dass dieser Prozess durch zwei

Phosphorylierungsereignisse an Thr^{84} und Ser^{552} positiv beeinflusst wird und in zwei Phasen verläuft. Dabei wird in der ersten Phase die aminoterminal lokalisierte Leucinzipperdomäne durch einen endoproteolytischen Schnitt abgespalten und das verbleibende längere RelB-Fragment wird anschließend durch das Proteasom abgebaut (Marienfeld et al., 2001).

4.2 Rolle der Ubiquitinylierung in der Signal-induzierten RelB-Degradierung

Die Abhängigkeit der RelB-Degradierung vom Proteasom legt eine Beteiligung von Ubiquitinylierungs-Ereignissen am RelB-Protein nahe. Ubiquitinmonomere werden über interne Lysinreste zu Polyubiquitinketten verknüpft, wobei die Position der Lysinreste, über welche die Ubiquitinpeptide verknüpft werden, maßgeblich die Effekte auf das ubiquitinylierte Protein beeinflusst. Speziell Lys^{48}-verknüpfte Polyubiquitinketten induzieren die proteasomale Degradierung des ubiquitinylierten Proteins, wohingegen die Lys^{63}-verknüpfte Polyubiquitinylierung Einfluss auf Protein-Protein-Interaktionen nimmt (Haglund and Dikic, 2005).

In der Tat ließ sich eine gesteigerte *in vivo*-Ubiquitinylierung des endogenen RelB-Proteins nach PMA/Ionomyzin-Stimulation von Namalwa B-Zellen nachweisen. Da sich diese induzierbare RelB-Ubiquitinylierung durch Vorbehandlung mit dem pharmakologischen Proteasom-Inhibitor MG132 weiter steigern ließ und mit einer partiellen Stabilisierung des RelB-Proteins korrelierte, ist in der Tat davon auszugehen, dass eine Lys^{48}-verknüpfte Polyubiquitinylierung ein notwendiges Signal für die RelB-Degradierung darstellt. Da die Stimulation mit PMA/Ionomyzin die Antigenrezeptor-induzierten Signalkaskaden, wie z.B. die Proteinkinase C-Isoformen und Ca^{2+}-abhängigen Signale, nicht nur in T-Zellen, sondern auch in B-Zellen aktiviert, ist darüber hinaus der RelB-Abbau in B-Zellen nicht unbedingt verwunderlich. Innerhalb der NF-κB-Signalwege wurden sowohl die proteasomale Degradierung von IκBα, als auch die proteasomale Prozessierung der Vorläuferproteine NF-κB1/p105 und NF-κB2/p100 als Folgen der Lys^{48}-verknüpften Ubiquitinylierung beschrieben. Auch für die NF-κB-Familienmitglieder p65/RelA und p50 wurde bereits eine proteasomale Degradierung mit vorausgehender Ubiquitinylierung beschrieben (Carmody et al., 2007; Lawrence et al., 2005). Durch die p65/RelA-Degradierung wird die Transkription von Zielgenen terminiert, wohingegen die RelB-Degradierung vermutlich zur Aufhebung des repressiven Effekts auf transkriptioneller Ebene führt, also letztlich positive Folgen hat (Saccani et al., 2004). Da RelB jedoch auch als transkriptioneller Aktivator agiert, ist es möglich, dass sich die Degradierung negativ auf die Transkription der RelB-Zielgene auswirkt.

4.3 Nicht-proteasomale Effekte der basalen RelB-Ubiquitinylierung

Interessanterweise ließ sich neben der induzierbaren RelB-Ubiquitinylierung auch eine basale RelB-Ubiquitinylierung in Namalwa- und 70Z/3-B-Zellen nachweisen (Abb. 3.1, 3.2, 3.15A), welche durch eine Koexpression von Flag-RelB und HA-Ubiquitin in HEK 293-Zellen gesteigert werden konnte (Abb. 3.3). Diese basale RelB-Ubiquitinylierung scheint jedoch nicht mit der Proteasom-abhängigen RelB-Degradierung in Verbindung zu stehen. Beispielsweise beeinflusst die Koexpression von HA-Ubiquitin und somit verstärkte Ubiquitinylierung die Halbwertszeit des RelB-Proteins nicht, wie durch den Einsatz des Proteinbiosynthese-Inhibitors Cycloheximid gezeigt werden konnte (Abb. 3.4). Hinzu kommt die im Vergleich zum $RelB_{WT}$ unbeeinträchtigte Ubiquitinylierung der RelB-Mutanten $RelB_{ST/A}$ und $RelB_{ST/E}$, welche an den Positionen Ser^{552}/Thr^{84} Alanin-Substitutionen ($RelB_{ST/A}$, phospho-inhibierend) bzw. Glutamat-Substitutionen ($RelB_{ST/E}$, phospho-imitierend) tragen. Da die Ser^{552}/Thr^{84}-Phosphorylierung ein wichtiges positives Signal für die RelB-Degradierung darstellt, wäre eine erhöhte Ubiquitinylierung der phospho-imitierenden $RelB_{ST/E}$-Mutante zu erwarten gewesen (Marienfeld et al., 2001). Häufig werden Phosphorylierungen wie im Beispiel der p65/RelA-Phosphorylierung am Ser^{468} als Voraussetzung für eine nachfolgende Ubiquitinylierung und proteasomale Degradierung des Zielproteins beschrieben. Vermutlich ändert die Ser^{468}-Phosphorylierung die Konformation von RelA, wodurch das Protein für die Ubiquitinylierungsmaschinerie zugänglicher wird (Geng et al., 2009; Mao et al., 2009). Da aber weder die Inhibition noch die Imitation der Thr^{84}/Ser^{552}-Phosphorylierung die RelB-Ubiquitinylierung beeinflusste (Abb. 3.5), wurde der Phosphorylierung dieser Aminosäurereste keine signalgebende Wirkung für die RelB-Ubiquitinylierung zugeschrieben. Daher scheint keine Verbindung der basalen RelB-Ubiquitinylierung mit der RelB-Stabilität, sondern mit weiteren, nicht-proteasomalen Funktionen zu bestehen. Jedoch kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Glutamat-Substitution ihre Funktion als Phospho-Imitator nicht erfüllt, oder weitere Modifikationen am RelB-Protein dessen Degradierung letztendlich bestimmen.

Neben diesen beiden Experimenten unterstützt auch das Ergebnis eines weiteren *in vivo*-Ubiquitinylierungs-Assays mit der $Ubiquitin_{K48R}$-Mutante die Hypothese, dass die basale RelB-Ubiquitinylierung mit nicht-proteasomalen Funktionen in Verbindung steht. Trotz der K48R-Substitution des Ubiquitinpeptids und damit inhibierten Lys^{48}-verknüpften Ubiquitinylierung, welche als Signal der Proteindegradierung dient, trat eine -wenn auch abgeschwächte- RelB-Ubiquitinylierung auf (Abb. 3.6A).

Die beschriebenen Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die RelB-Ubiquitinylierung durch atypische Ubiquitinketten stattfinden kann, welche definitionsgemäß alle Varianten multimerer Ubiquitinketten -außer der klassischen Lys^{48}-verknüpften Ubiquitinylierung- umfassen (Ikeda and Dikic, 2008). Die diversen atypischen Ubiquitinketten sind in verschiedene Klassen eingeteilt, wie beispielsweise homotypische Ketten, welche aus Verknüpfungen durch einen der

sechs Lysinreste Lys^{6}, Lys^{11}, Lys^{27}, Lys^{29}, Lys^{33}, Lys^{63} im Ubiquitin entstehen. Heterologe Ketten enthalten hingegen neben Ubiquitinketten auch Ketten mit Ubiquitin-ähnlichen Einheiten wie SUMO. Gemischte Ubiquitinketten beinhalten zwei verschiedene Lysin-Verknüpfungen wie Lys6/11-, Lys27/29-, Lys29/48- oder Lys29/33-Ubiquitinketten (Ikeda and Dikic, 2008; Kim et al., 2007). Auch die lineare Ubiquitinylierung, eine Verknüpfung des carboxyterminalen Glycins eines Ubiquitinpeptids mit dem aminoterminalen Methionin eines weiteren Ubiquitinmonomers durch den Ubiquitinligasekomplex LUBAC (*linear ubiquitin chain-assembly complex*), stellt eine Möglichkeit der RelB-Ubiquitinylierung dar (Iwai and Tokunaga, 2009; Kirisako et al., 2006). Im NF-κB-System wurde die lineare Ubiquitinylierung beispielsweise für NEMO als wichtiger Schritt der IKK-Aktivierung beschrieben (Haas, 2009; Rahighi et al., 2009). Ubiquitin, welches aminoterminal mit einem Epitop wie beispielsweise HA fusioniert ist, kann jedoch nicht linear verknüpft werden (Tokunaga et al., 2009).

Bezüglich der RelB-Modifikation durch atypische Ubiquitinketten konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitinylierung von RelB sowohl durch die Einzelmutante $Ubiquitin_{K63R}$ als auch durch die Doppelmutante $Ubiquitin_{K48/63R}$ noch möglich ist (Abb. 3.6A und 3.9). Auch die Kotransfektion von NEMO mit den Mutanten $Ubiquitin_{K48R}$ und $Ubiquitin_{K63R}$ führt in jedem Fall zu einer Ubiquitinylierung von NEMO (Abb. 3.6B). Zwar scheinen die Ubiquitinmutanten eine schwächere Modifikation zu verursachen als $Ubiquitin_{WT}$, jedoch ist auch die basale Expression der Mutanten bereits schwächer als die von $Ubiquitin_{WT}$. Da sowohl die K63-Ubiquitinylierung von NEMO (Zhou et al., 2004), als auch die K6-Ubiquitinylierung bereits bekannt sind (Tang et al., 2003), kann der NEMO-Ubiquitinylierungs-Assay in Abbildung 3.6B als Kontrolle für das Auftreten atypischer Ubiquitinylierungen angesehen werden kann. Da auch die Ubiquitinylierung von RelB sowohl durch die Einzel- als auch durch die Doppel-Ubiquitinmutante(n) sattfindet, ist davon auszugehen, dass es sich auch im Fall von RelB um eine atypische, jedoch nicht über Lys^{63} verknüpfte, Ubiquitinylierung handelt.

Um die Verknüpfung der Ubiquitinketten am RelB-Protein im Detail zu analysieren, wären Ubiquitinmutanten mit der Substitution von sechs der sieben Lysinreste im Ubiquitinpeptid zu Arginin optimale Konstrukte. Die Expression solcher Mutanten sinkt mit zunehmender Anzahl substituierter Lysinreste jedoch so gravierend, dass eine Detektion kaum mehr möglich ist. Eine massenspektroskopische Analyse oder der Einsatz von Polyubiquitin-verknüpfungsspezifischen Antikörpern, welche bisher jedoch nur für Lys^{48}- und Lys^{63}-verknüpftes Polyubiquitin existieren, wäre ebenfalls eine Möglichkeit die Verknüpfung der Ubiquitinpeptide untereinander zu untersuchen (Newton et al., 2008).

4.4 Bedeutung der nicht-proteasomalen Ubiquitinylierung für die transkriptionelle Aktivität von RelB

Die durch Polyubiquitinylierung hervorgerufenen Effekte sind sehr vielseitig, aber die Folgen der Modifikation durch atypische Polyubiquitinketten sind -abgesehen von Lys^{63}-verknüpften Polyubiquitinketten- noch nicht ausreichend charakterisiert. Zu den wenigen konkret bekannten Effekten gehört beispielsweise die lysosomale Degradierung von DTX (Deltex), einem Modulator des Notch-Signalweges, welche durch dessen Lys^{29}-konjugierte Polyubiquitinylierung induziert wird, oder auch die Beeinflussung der Aktivität der AMPK-verwandten Kinasen durch Lys^{29} und/oder Lys^{33}-konjugierte Ubiquitinketten (Al-Hakim et al., 2008; Chastagner et al., 2006). Beispielsweise kann der Tumor-Suppressor BRCA1 durch Autoubiquitinylierung mit Lys^{6}-konjugierten Ubiquitinketten die BRCA1-Aktivität positiv regulieren (Nishikawa et al., 2004). Des Weiteren führt die atypische Ubiquitinylierung des Androgenrezeptors (AR) zu einer Rekrutierung von Kofaktoren und einer Stabilisierung des Transkriptionskomplexes an der DNA, woraufhin die AR-vermittelte Transkription aktiviert wird (Xu et al., 2009).

Im Gegensatz zum größten Teil der atypischen Polyubiquitinylierung, ist sowohl die Lys^{48}- als auch die Lys^{63}-verknüpfte Polyubiquitinylierung bereits sehr intensiv analysiert worden. Im NF-κB-Signalweg ist zum Beispiel die Lys^{63}-verknüpfte Ubiquitinylierung mit nicht-proteasomalen Effekten in die Aktivierung der IκB-Kinasen involviert (Chen, 2005; Terzic et al., 2007). Besonders die direkte Ubiquitinylierung von Transkriptionsfaktoren spielt für die Regulation der transkriptionellen Aktivität eine wichtige Rolle. Ein ungewöhnliches Beispiel stellt die Lys^{48}-verknüpfte Ubiquitinylierung des Transkriptionsfaktors p53 durch die atypische Ubiquitin-Ligase E4F1 dar, welche zur Aktivierung von p53 an Promotoren Zellzyklusarrest-induzierender Gene führt. In diesem Fall scheint die Kürze der Lys^{48}-verknüpften Ubiquitinpeptide am p53-Protein dafür verantwortlich zu sein, dass kein Kontakt zum Proteasom entsteht (Le Cam et al., 2006).

Aufgrund dieser Informationen wurde ein möglicher Einfluss der Ubiquitinylierung von RelB auf dessen transkriptionelle Aktivität im Luziferase-Reportergen-Assay analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass sowohl $Ubiquitin_{WT}$ (Abb. 3.7A und B) als auch $Ubiquitin_{K48R}$ und $Ubiquitin_{K63R}$ die transkriptionelle Aktivität von RelB deutlich steigern (Abb. 3.8). Der positive Einfluss auf das Transaktivierungspotential von RelB könnte eine nicht-proteasomale Funktion seiner basalen Polyubiquitinylierung darstellen. Der molekulare Mechanismus, der diesem positiven Effekt der Ubiquitinylierung auf die transkriptionelle Aktivität von RelB unterliegt, konnte in dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Die unveränderte DNA-Bindung von RelB nach HA-Ubiquitin Koexpression bzw. nach Lysin-Substitution und die unbeeinflusste subzelluläre Lokalisation verweisen auf einen Mechanismus, der erst nach DNA-Bindung zum Tragen kommt (Abb. 3.12 und 3.13). Diese Schlussfolgerung wird durch eine Reportergenanalyse mit der Mutante $RelB_{S368A}$ unterstützt, welche die DNA-Bindung und/oder die Heterodimerisierung von RelB als

Notwendigkeit für den positiven Ubiquitin-Effekt auf die RelB-Aktivität demonstriert (Abb.3.10 und 3.11).
Eine Erklärung für die gesteigerte transkriptionelle Aktivität von RelB wäre die Funktion der RelB-Polyubiquitinylierung als molekularer Schalter, der das Protein-Interaktionsmuster von RelB verändern könnte. Dadurch könnte die RelB-Ubiquitinylierung die Rekrutierung von Kofaktoren oder die Freisetzung von Korepressoren bedingen. Ein Beispiel für eine solche auf Ubiquitinylierung basierende Protein-Protein-Interaktion, ist die beschriebene Ubiquitinylierungs-abhängige Interaktion des Transkriptionsfaktors c-Myc mit dem Koaktivator p300, welche essenziell für die transkriptionelle Aktivierung von c-Myc ist (Adhikary et al., 2005; Boquoi and Enders, 2006). Ein möglicher Korepressor, dessen Abspaltung von RelB zu transkriptionellen Aktivierung führen könnte, ist das Daxx-Protein, dessen Interaktion mit RelB bereits beschrieben wurde. Daxx kann die Transkription einiger anti-apoptotischer RelB-Zielgene hemmen, indem es die DNA-Methyltransferase1 (Dnmt1) rekrutiert, welche nachfolgend CpG-Dinukleotide in den Promotorbereichen dieser Zielgene methyliert und somit die Transkription dieser Gene unterbindet (Croxton et al., 2006; Puto and Reed, 2008). Die Ubiquitinylierung kann wie im Fall des Transkriptionsfaktors Met4 jedoch auch zur Inhibierung der Interaktion mit einem Koaktivator führen und so die transkriptionelle Aktivität hemmen (Kaiser et al., 2000). Die Möglichkeit des Einflusses von Kofaktoren auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wird im Kapitel 4.6 detaillierter behandelt.

Da die RelB-Aktivität im alternativen NF-κB-Signalweg eine zentrale Komponente darstellt, wurde die Ubiquitinylierung auch hinsichtlich der Aktivierung dieses Signalweges untersucht. Die RelB-Ubiquitinylierung wurde jedoch weder durch LPS, einen Stimulus des alternativen NF-κB-Signalweges, noch durch Kotransfektion der essenziellen Kinase NIK verstärkt (Abb. 3.15A und B) (Senftleben et al., 2001). Des Weiteren induzierte die Aktivierung des alternativen NF-κB-Signalweges keine Degradierung von RelB, wodurch das Ausbleiben einer verstärkten induzierten Ubiquitinylierung in diesem Fall erklärt werden kann.

4.5 Lokalisierung der ubiquitinylierten RelB-Domäne

Da die Identifizierung der ubiquitinylierten Domäne innerhalb des RelB-Proteins Aufschluss über die Funktionen der Modifikation geben könnte und eine Voraussetzung für die Identifikation der als Ubiquitin-Akzeptoren fungierenden Lysin-Reste darstellt, wurden RelB-Deletionsmutanten für *in vivo*-Ubiquitinylierungs-Analysen eingesetzt (Abb.3.16A). Dabei zeigte sich jedoch, dass die Ubiquitinylierung nicht an einer isolierten Domäne erfolgt, sondern über das ganze RelB-Protein verteilt auftritt, also stark redundant ist (Abb.3.16B).

Für andere Zielproteine wie p53, CyclinA und MALT1 wurde ebenfalls eine geringe Spezifität der Ubiquitinylierung beschrieben, wohingegen im IκBα-Protein mit Lys^{21} und Lys^{22} spezifische Lysinreste ubiquitinyliert werden. Die Identifizierung konkreter Lysinreste, die ubiquitinyliert werden gestaltet sich insofern schwer, als die Substitution eines gewöhnlich durch Ubiquitin modifizierten Lysinrests dazu führen kann, dass Ubiquitin ersatzweise an ein benachbartes Lysin konjugiert wird (Chan et al., 2006; Fung et al., 2005; Oeckinghaus et al., 2007). Diesbezüglich wurde auch beschrieben, dass beispielsweise RING E3-Ligasen die Ubiquitinpeptide nicht präzise an einem spezifischen Lysinrest im Zielprotein positionieren und somit nicht notwendigerweise ein spezifischer Lysinrest oder eine spezifische Domäne eines Proteins ubiquitinyliert wird (Passmore and Barford, 2004).

Aufgrund der Schwierigkeit spezifische Domänen bzw. Lysinreste zu identifizieren, welche als Ubiquitinakzeptoren fungieren, sollte die Möglichkeit einer Lysin-unspezifischen RelB-Ubiquitinylierung ausgeschlossen werden. Durch die Verwendung eines unmarkierten $RelB_{WT}$-Proteins (pcDNA-$RelB_{WT}$) in weiteren *in vivo*-Ubiquitinylierungsstudien, konnte zunächst eine Flag-spezifische Ubiquitinylierung ausgeschlossen werden, da Flag-RelB und unmarkiertes RelB mit gleicher Effizienz ubiquitinyliert wurden (Ergebnisse nicht gezeigt). Des Weiteren zeigt die Mutante Flag-$RelB_{CT\text{-}DM}$, innerhalb der alle vorkommenden Lysinreste durch Arginin substituiert wurden (Abb. 3.20A), kaum noch Ubiquitinylierung. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Ubiquitinylierung tatsächlich am RelB-Protein selbst und darüber hinaus spezifisch an Lysinresten und nicht an anderen Aminosäureresten auftritt, wie z. B. an Threonin- oder Serinresten (über Esterbindung an OH-Gruppen) wie beispielsweise bei der carboxyterminalen Ubiquitinylierung der MHC I -schweren Kette (Wang et al., 2007)). Auch die Thiolgruppen von Cysteinresten können als Ziel der Ubiquitinylierung dienen (Li and Ye, 2008). Die Möglichkeit der aminoterminalen Ubiquitinylierung sollte durch die beobachtete Ubiquitinylierung der RelB-Deletionsmutanten mit fehlendem Aminoterminus mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden (Abb.3.20A). Des Weiteren scheint diese Art der Ubiquitinylierung hauptsächlich mit der Degradierung des Zielproteins im Zusammenhang zu stehen (Ciechanover and Ben-Saadon, 2004; Meinnel et al., 2006).

4.6 Identifizierung essenzieller Lysinreste im RelB-Protein

Wie bereits erwähnt, sind im RelB-Protein 21 Lysinreste lokalisiert. Um zu analysieren, ob und welche Lysinreste bzw. deren Modifikation die transkriptionelle Aktivität von RelB beeinflussen, wurden die Lysinreste im RelB-Protein entweder einzeln oder in Gruppen durch Arginin substituiert (Abb. 3.17A). Die nachfolgende Analyse der basalen sowie der Ubiquitin-induzierten transkriptionellen Aktivität, verwies aufgrund sehr geringer transkriptioneller Aktivität im Fall von M7, M9 und M11 auf die Relevanz der im Rahmen dieser Mutanten durch Arginin substituierten Lysinreste Lys^{220} (M7), $Lys^{273/274}$ (M9) und $Lys^{305/308}$ (M11) (Abb.3.17B und C). Dieser Effekt war

im Fall von M9 und M11 nicht auf eine verminderte Bindungsaffinität an die Komplexpartner (p50 oder p52) zurückzuführen, wohingegen die transkriptionelle Aktivität von RelB-M7 durch Koexpression von p50 bzw. p52 annähernd auf die Höhe der transkriptionellen Aktivität des wildtypischen RelB-Proteins angehoben werden konnte (Abb. 3.17D). Dies deutet darauf hin, dass zumindest die Bindung von RelB-M7 an die für die RelB-Aktivität notwendigen Heterodimerisierungspartner gestört ist, was jedoch nicht der einzige Grund für die verminderte transkriptionelle Aktivität dieser Mutante sein muss. Obwohl die substituierten Lysinreste in M9 und M11 innerhalb der für die DNA-Bindung essenziellen RHD lokalisiert sind ($Lys^{273/274}$, $Lys^{305/308}$), konnte eine verringerte DNA-Bindung als Ursache der geringeren transkriptionellen Aktivität ausgeschlossen werden (Abb. 3.18). Die Substitution aller Lysinreste innerhalb der carboxyterminalen TAD (M15) hatte keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität, weshalb anzunehmen ist, dass die Lysinreste an den Positionen 273, 274, 305 und 308 eine spezifische Rolle sowohl für die basale, als auch für die Ubiquitin-induzierte transkriptionelle Aktivität von RelB spielen. Die *in vivo*-Ubiquitinylierung von $Lys^{273/274}$ und $Lys^{305/308}$ konnte formal nicht nachgewiesen werden, da die Substitution von zwei Lysinresten innerhalb des RelB-Gesamtlängenproteins (M9 bzw. M11) keinen Unterschied in der Intensität der Ubiquitinylierung verursacht (Abb. 3.19). Die fehlende Steigerung der transkriptionellen Aktivität beider Mutanten ist jedoch ein deutliches, wenn auch indirektes Indiz für die Funktion der in diesen Mutanten inaktivierten Lysinreste als Ubiquitin-Akzeptoren. Möglicherweise könnte durch die gleichzeitige Substitution aller Lysinreste mit Ausnahme der in RelB-M9 und RelB-M11 zu analysierenden deren Ubiquitinylierung besser nachweisbar sein (Petroski and Deshaies, 2003). Allerdings könnte so die Faltung des Proteins und folglich die Eigenschaft der untersuchten Lysinreste als Ubiquitin-Akzeptoren beeinträchtigt werden. Letztlich wäre die massenspektroskopische Analyse des ubiquitinylierten RelB-Proteins die beste Möglichkeit für eine präzise Lokalisierung der modifizierten Lysinreste (Kaiser and Wohlschlegel, 2005).

Eine Erklärung für die durch Ubiquitinylierung gesteigerte transkriptionelle Aktivität von RelB, bzw. geringere Aktivität der Mutanten RelB-M9 und RelB-M11, könnte die Ubiquitinylierungs-abhängige Rekrutierung von Kofaktoren oder die Freisetzung von Korepressoren sein. Eine Interaktion mit dem Koaktivator CBP, ein bekannter Modulator des NF-κB-Systems und Interaktionspartner von RelA (Zhong et al., 2002), konnte jedoch in Koimmunpräzipitations-Experimenten nicht nachgewiesen werden. Daxx ist ein weiterer Kofaktor, dessen Interaktion mit RelB durch einen Ubiquitinylierungs-abhängigen Mechanismus beeinflusst werden könnte. Außerdem wäre eine weitere Möglichkeit, mit der die Bedeutung von $Lys^{273/274}$ und $Lys^{305/308}$ für die Aktivität von RelB erklärt werden könnte, eine potenzielle Modifikation dieser Lysinreste auch durch andere Lysin-spezifische posttranslationale Modifikationen wie SUMOylierung oder Acetylierung.

Interessanterweise zeigen die Ubiquitinylierung und die SUMOylierung in einigen Fällen, wie am Beispiel von IκBα in der Einleitung bereits beschrieben wurde, antagonistische Wirkung

(Desterro et al., 1998). Auch im NEMO-Protein wurde für den Lysinrest an Position 309 eine aktivierend wirkende Ubiquitinylierung beschrieben und des Weiteren die SUMOylierung desselben Lysinrests mit bisher jedoch unbekannter Wirkung (Haas, 2009). Gerade hinsichtlich der transkriptionell aktivierenden als auch reprimierenden Effekte von RelB wäre eine Ubiquitinylierung, welche zur Rekrutierung von Koaktivatoren, und eine antagonistisch wirkende SUMOylierung, die zur Rekrutierung von Korepressoren führt, ein möglicher Regulations-Mechanismus. Beispielsweise führt die SUMOylierung von Elk-1 zur Rekrutierung von HDAC2 und anschließend zur Repression der Transkription der jeweiligen Zielgene (Chang et al., 2005; Lyst and Stancheva, 2007). Ein weiteres Beispiel für einen solchen Regulationsmechanismus ist CBP, ein Koaktivator vieler Transkriptionsfaktoren, bei dem als Folge der SUMOylierung Daxx rekrutiert wird, welches nachfolgend die Bindung von HDAC2 an CBP erleichtert und die transkriptionelle CBP-Aktivität reduziert (Kuo et al., 2005). Ein Beispiel der Ubiquitin-induzierten Rekrutierung von Koaktivatoren ist zudem die Ubiquitinylierung von Myc, welche durch die Rekrutierung des Koaktivators p300 zur Transaktivierung zahlreicher Zielgene führt (Adhikary et al., 2005).

4.7 Nachweis und Charakterisierung der RelB-SUMOylierung

Aufgrund der Bedeutung der Ubiquitinylierung für die Aktivität von RelB und der beschriebenen antagonistischen Wirkung von SUMOylierung und Ubiquitinylierung wurde analysiert, ob RelB ebenfalls ein Ziel von SUMOylierungsprozessen darstellen könnte. In der Tat konnte eine effiziente *in vivo*-SUMOylierung sowohl mit dem endogenen RelB-Protein als auch nach Kotransfektion von RelB mit SUMO1 beobachtet werden (Abb. 3.25, 3.24B). Interessanterweise ließ sich die SUMOylierung des endogenen RelB-Proteins in Namalwa B-Zellen durch eine PMA/Ionomyzin-Stimulation steigern bzw. modifizieren. Durch diese Signal-induzierte Veränderung des SUMOylierungsmusters des RelB-Proteins wird deutlich, dass dieser Prozess höchst dynamisch ist (Abb. 3.25). In der Zukunft wären weiterführende Experimente mit anderen NF-κB-Agonisten -u.a. auch solcher, die den alternativen NF-kB-Signalweg induzieren- notwendig, um den Grad der SUMOylierung und seine Bedeutung weiter bestimmen zu können. Interessanterweise ließ sich die *in vivo*-SUMOylierung von ektopisch exprimiertem RelB auch mit SUMO2 nachweisen (Abb. 3.21B). Diesbezüglich ist bereits bekannt, dass SUMO1 und SUMO2 sowohl unterschiedliche als auch gleiche Ziel-Proteine modifizieren können, und daher möglicherweise sowohl redundante als auch nicht-redundante zelluläre Funktionen haben (Vertegaal et al., 2006). Des Weiteren wird die Modifikation durch SUMO1 meist als monomere SUMOylierung beschrieben, wohingegen SUMO2 bzw. SUMO3 aufgrund interner SUMOylierungsmotive (Aminosäuren: ΨKXE) zur Kettenbildung fähig sind und infolge dessen nach Konjugation an das Zielprotein möglicherweise zu anderen Effekten führen als SUMO1 (Meulmeester and Melchior, 2008). Interessant wären daher Experimente zur Analyse einer

möglichen Modifikation durch SUMO3 sowie Luziferase-Reportergen-Assays zur funktionellen Analyse der bereits gezeigten SUMO2-RelB-Modifikation.

Die anschließende Analyse der *in vivo*-SUMOylierung aller RelB-K/R-Mutanten (RelB-M1 bis RelB-M16, Ergebnis nicht gezeigt) sowie der RelB-Deletionsmutanten $RelB_{1-392}$ und $RelB_{1-300}$ veranschaulichte, dass die SUMOylierung, ähnlich der RelB-Ubiquitinylierung, über das gesamte Protein aufzutreten scheint. Klassischerweise dienen SUMOylierungsmotive (ΨKXE) als Erkennungs-Sequenz für das Ubc9-SUMO-Konjugationsenzym, aber in zahlreichen Fällen, wie beispielswese an Drp1 (*dynamin-related protein*), findet die SUMOylierung außerhalb dieser Konsensus-Motive statt (Figueroa-Romero et al., 2009; Hay, 2005). Daher ist eine weitläufige Verteilung der SUMOylierung über das RelB-Protein -unabhängig von den durch das Online-Programm *SUMOplot™ Prediction* vorhergesagten klassischen SUMOylierungsmotiven (Lys^{210}, Lys^{308}, Lys^{340}, Lys^{389}, Lys^{415})- nicht verwunderlich. Vermutlich tritt die SUMOylierung unspezifisch auf und kann nach Substitution eines Lysinrests ersatzweise an einem anderen stattfinden. Für PEA3 wurde beispielsweise beschrieben, dass mehrere Lysinreste im Protein SUMOyliert werden und unklar ist, ob diese funktionell redundant sind oder die SUMOylierung aller Lysinreste relevant ist (Guo and Sharrocks, 2009).

Die SUMOylierung von RelB wird sowohl durch hochmolekularen Schmier als auch durch deutliche Einzelbanden sichtbar, in welchen sich einzig die Mutante RelB-M15 (K/R-Substitution aller carboxyterminalen Lysinreste) vom $RelB_{WT}$ unterschied. Es war jedoch nicht zu klären, ob spezifische Lysinreste oder alle carboxyterminalen Lysinreste modifiziert werden, da sich das SUMOylierungsmuster nur nach kombinierter Substitution aller sieben carboxyterminalen Lysinreste (M15) verändert (Abb.3.24B). Dies gleicht der Situation am NF-κB2/p100-Vorläuferprotein, für welches durch *SUMOplot™ Prediction* vier mögliche SUMOylierungsmotive identifiziert wurden, deren K/R-Substitution erst zu einer deutlichen Reduktion der p100-SUMOylierung führte, nachdem alle gleichzeitig substituiert wurden (Vatsyayan et al., 2008).

Da RelB-M15 des Weiteren nach Koexpression von Ubiquitin ein abgeschwächtes Ubiquitinylierungssignal (Abb. 3.20B) zeigte, scheint neben der SUMOylierung auch eine Ubiquitinylierung der (innerhalb von M15 substituierten) carboxyterminalen Lysinreste 386/387/389/410/413/414/415 stattzufinden. Interessanterweise stellt im p100-Protein die SUMOylierung eine Voraussetzung für eine nachfolgende Phosphorylierung dar, welche wiederum als Erkennungssignal für die Prozessierungs-induzierende Ubiquitinylierung dient (Vatsyayan et al., 2008).

Zur genaueren Charakterisierung der RelB-SUMOylierung gehört des Weiteren die Identifizierung der RelB-spezifischen SUMO-Ligase. Die Analyse der E3-SUMO-Ligasen PIAS1, PIAS3, PIASx/β, PIASγ und PC2 hinsichtlich ihrer Fähigkeit RelB zu SUMOylieren, ergab eine sehr intensive SUMOylierung durch PC-2. Die SUMOylierung durch PIASγ führte zu einem starken spezifischen hochmolekularen SUMO-Signal (Ergebnis nicht gezeigt). Eine detailliertere

Charakterisierung liegt jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vor und eine eindeutige Zuordnung einer der getesteten Ligasen als "RelB-SUMO-Ligase" war bisher nicht möglich.

4.8 Relevanz der RelB-SUMOylierung für die Interaktion mit Daxx

Wie zuvor erwähnt, war die ursprüngliche Motivation zur Analyse der RelB-SUMOylierung deren potenzielle Bedeutung für die Interaktion von RelB mit dem Korepressor Daxx (Croxton et al., 2006; Puto and Reed, 2008). Diese Hypothese wird darüber hinaus von der Tatsache gestützt, dass Daxx über ein aminoterminales und ein carboxyterminales SUMO-Interaktions-Motiv (SIM) verfügt, wodurch ein SUMOyliertes Protein leichter mit Daxx interagiert als ein nicht-SUMOyliertes Protein (Santiago et al., 2009). Im Fall des Smad4-Proteins stellt dessen SUMOylierung beispielsweise eine Voraussetzung für die Interaktion mit Daxx und die daraus resultierende Hemmung der Expression von Smad4-Zielgenen dar (Chang et al., 2005). Interaktionsstudien mit Daxx-Deletionsmutanten zeigten jedoch, dass die Daxx-RelB-Interaktion unabhängig von SUMO-Interaktions-Motiven stattfinden kann, und die RelB-SUMOylierung daher für die Bildung eines RelB-Daxx Proteinkomplexes nicht notwendig ist (Abb. 3.29B). Darüber hinaus zeigte auch die RelB-Mutante M15, welche ein verändertes SUMOylierungsmuster aufwies, keine veränderte Interaktion mit Daxx, wodurch die Aussage der SUMOylierungs-unabhängigen Daxx-RelB-Interaktion bekräftigt wird (Abb. 3.30). Aufgrund der Tatsache, dass weder RelB-M15 noch RelB-M16 eine veränderte Daxx-Interaktion zeigen, wäre es zusammenfassend betrachtet denkbar, dass die RelB-Daxx-Interaktion nicht speziell durch Lysin-Modifikationen am RelB-Protein beeinflusst wird.

Um letztlich nachzuweisen, dass es sich tatsächlich um eine SUMO-unabhängige Interaktion handelt, könnte die Koexpression von RelB, Daxx und der SUMO-spezifischen Isopeptidase SENP1 mit anschließender Koimmunpräzipitation von Nutzen sein. Sollte trotz Koexpression von SENP1 eine RelB-Daxx-Interaktion möglich sein, würde das die Aussage der vorhergehenden Experimente bestärken. Für C/EBPβ konnte die SUMO-unabhängige Interaktion mit Daxx durch die SENP-Koexpression gezeigt werden (Wethkamp and Klempnauer, 2009).

Ferner wurde für den Glucocorticoid-Rezeptor (GR) zunächst eine SUMO-abhängige Daxx-Interaktion und daraus resultierende Hemmung der Zielgen-Transkription beschrieben (Lin et al., 2006). Es stellte sich jedoch heraus, dass Daxx die reprimierenden Effekte anderweitig vermittelt und die Inhibierung von GR-Zielgenen nicht über eine SUMO-abhängige GR-Daxx-Interaktion, sondern über andere SUMO-interagierende Proteine stattfindet (Holmstrom et al., 2008). Daher muss die RelB-Daxx-Interaktion nicht zwangsläufig zu einem SUMO-abhängigen reprimierenden Effekt auf die Transkription führen. Des Weiteren ist aufgrund eines fehlenden *in vitro*-Nachweises bisher unklar, ob die Interaktion zwischen RelB und Daxx direkt stattfindet oder indirekt in Abhängigkeit von Adapterproteinen.

4.9 Lokalisierung der RelB-Daxx-Interaktionsdomänen

Aufgrund der SUMOylierungs-unabhängigen Natur der RelB-Daxx Interaktion drängte sich die Frage nach der Lage der Interaktionsdomänen in den beiden Proteinen auf. In weiterführenden Interaktionsstudien, unter Verwendung von Daxx- und RelB-Deletionsmutanten, konnten jedoch alle Daxx-Deletionsmutanten mit RelB interagieren (Ergebnis nicht gezeigt). Es scheint innerhalb des Daxx-Proteins keine Spezifität für die Interaktion mit RelB zu herrschen. Im zuvor beschriebenen Beispiel der SUMO-unabhängigen C/EBPβ-Daxx-Interaktion konnte zwar eine spezifische Region zwischen Aminosäure 190 und 400 als Interaktionsdomäne identifiziert werden (Wethkamp and Klempnauer, 2009), in einem anderen Fall der ARF-Daxx-Interaktion wurden jedoch zwei notwendige Domänen des Daxx-Proteins für die Interaktion identifiziert (Ivanchuk et al., 2008). Daher wäre es möglich, dass auch für die Interaktion mit RelB mehrere Daxx-Domänen von Bedeutung sind.

Im Gegensatz zu Daxx war die Identifizierung der Interaktionsdomäne im RelB-Protein weitaus erfolgreicher. Im Zusammenhang mit der DID (Daxx-Interaktions-Domäne) des Ets1-Proteins wurde bereits eine mögliche DID innerhalb des RelB-Proteins postuliert, deren Lokalisierung jedoch nicht genauer spezifiziert wurde (Li et al., 2000; Puto and Reed, 2008). Durch eigene Experimente konnte die Dimerisierungsdomäne (DD) innerhalb der Aminosäuren 264 bis 379 des RelB-Proteins als DID identifiziert werden (Abb. 3.27B und C), bzw. noch spezifischer, die Region zwischen Aminosäure 349 und 379 (Abb. 3.26 und 3.27B). Der zur Interaktion notwendige Bereich schien zuletzt auf eine 15 Aminosäuren lange Region (AS 365-379) eingegrenzt werden zu können, innerhalb derer jedoch auch das für die RelB-Dimerisierung mit p50 und p52 essenzielle Ser^{368} liegt (Maier et al., 2003). Ein RelB-Protein mit der alleinigen Deletion der Aminosäuren 365-379 zeigte weder eine Interaktion mit p52 noch mit Daxx (Abb. 3.27D und 3.28). Die Aminosäuren 365-379 stellen eine essenzielle Domäne für die Dimerisierung von RelB mit p50, p52 oder auch anderen Proteinen dar, welche als Adapter für die Interaktion mit Daxx dienen könnten. Die Frage, ob Daxx direkt oder über Adapterproteine mit der RelB-Dimerisierungsdomäne interagiert, könnte nur ein *in vitro*-Experiment mit bakteriell exprimierten Proteinen klären, welches auch in früheren Studien anderer Autoren nicht durchgeführt wurde. Strukturell gesehen ist die Dimerisierungsdomäne in ihrer kompletten Länge für die RelB-Daxx-Interaktion jedoch ausreichend.

4.10 Effekte der RelB-SUMOylierung auf die transkriptionelle Aktivität und die DNA-Bindung von RelB

Zahlreiche Transkriptionsfaktoren zeigen aufgrund ihrer SUMOylierung eine Steigerung der transkriptionellen Aktivität, wie etwa GATA4 im Zusammenspiel mit der SUMO-Ligase PIAS1 (Wang et al., 2004) oder p53, dessen SUMOylierung der Mdm2-vermittelten Ubiquitinylierung entgegenwirkt und so die p53-Degradierung verhindert (Lyst and Stancheva, 2007; Rodriguez et al., 1999). Die SUMOylierung kann sich auf die transkriptionelle Aktivität wie im Fall von CBP und diversen anderen Transkriptionsfaktoren jedoch auch negativ auswirken (Kuo et al., 2005).
Daher wurde in Luziferase-Reportergen-Analysen der SUMO-spezifische Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des wildtypischen RelB-Proteins untersucht. Tatsächlich zeigte sich ein genereller, RelB-unabhängiger negativer Einfluss einer Koexpression exogener Ubc9- und SUMO-Proteine auf die Aktivität eines NF-κB-abhängigen Reporterkonstrukts. Zunächst ist in Betracht zu ziehen, dass die SUMO-Koexpression auch weitere Proteine im NF-κB-/IKK-Transkriptionssystem oder auch Faktoren der generellen Transkriptionsmaschinerie modifiziert, welche die NF-κB-spezifische Reportergenaktivität zusätzlich beeinflussen könnten. Des Weiteren wird vom gesamten in der Zelle vorkommenden RelB-Pool nur ein Bruchteil SUMOyliert, weshalb SUMO-bedingte Effekte auf die transkriptionelle Aktivität nicht immer sehr ausgeprägt sind.
Dass die SUMOylierung dennoch einen negativen Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von RelB ausübt, zeigte sich in den Experimenten mit einem SUMO1-RelB-Fusionsprotein. Die Imitation der SUMOylierung von RelB durch eine aminoterminale Fusion mit dem SUMO1-Protein hat sich auch in anderen Fällen, wie z.B. bei C/EBP, NEMO und NFAT1, als experimentelle Strategie bewährt (Berberich-Siebelt et al., 2006; Huang et al., 2003; Nayak et al., 2009). Durch die Fusion eines SUMO1-Peptides an den Aminoterminus von RelB wird eine konstitutive RelB-SUMOylierung imitiert, weshalb sich die Effekte einer RelB-SUMOylierung deutlicher darstellen als bei reiner Koexpression von RelB und SUMO1. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Reportergen-Analysen zeigt SUMO1-RelB im Vergleich zum $RelB_{WT}$-Protein auch in semi-quantitativen RT-PCR-Analysen eine geringere Induktion des RelB-Zielgens *Birc3*. Im Gegensatz zum SUMO1-RelB-Fusionsprotein ließ sich mit dem ebenfalls analysierten $RelB_{M15}$ sowohl basal als auch nach SUMO-Koexpression eine -im Vergleich zum $RelB_{WT-}$ höhere transkriptionelle Aktivität nachweisen. Daher scheint die SUMOylierung der carboxyterminalen Lysinreste für den reprimierenden Effekt auf das transaktivierende Potential von RelB eine wichtige Rolle zu spielen.
Obwohl die beobachteten Effekte mit SUMO1-RelB und der SUMOylierungs-defekten RelB-M15 Mutante die ursprüngliche Hypothese der hemmenden Wirkung einer RelB-SUMOylierung stützt, ist der molekulare Mechanismus, der dieser hemmenden Wirkung unterliegt nicht geklärt.

Zum einen erwies sich die RelB-Daxx-Interaktion als SUMOylierungs-unabhängig, zum anderen schien auch die DNA-Bindung von RelB durch eine SUMOylierung nur leicht gestört zu werden. Dies zeigte sich eindrücklich in DNA-Bindungsanalysen mit SUMO1-RelB bzw. $RelB_{WT}$ oder $RelB_{M15}$ in Kombination mit oder ohne SUMO. Bezüglich der Luziferase-Messungen ist des Weiteren zu beachten, dass diverse Faktoren -wie beispielsweise die Zelldichte- RelB und dessen Funktionen beeinflussen. Da die Ergebnisse der Luziferase-Assays einigen Schwankungen unterlagen, könnten die bisherigen Versuchsbedingungen -wie im Fall der Analyse der transkriptionellen Aktivität des GATA-1 Transkriptionsfaktors beschrieben (Collavin et al., 2004)- suboptimal sein: Experimente von Collavin et al. in verschiedenen Zelllinien mit ansteigender SUMO-Konzentration zeigten keine reproduzierbaren Unterschiede mit dem verwendeten Reporterkonstrukt. Optimierte Versuchsbedingungen ergaben, dass die Reduktion der transkriptionellen Aktivität von GATA-1 auf der Rekrutierung der PIASγ-SUMO-Ligase und nicht auf der SUMOylierung selbst beruht. Daher kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht mit Sicherheit festgehalten werden ob und wie sich die SUMOylierung auf die RelB-Aktivität auswirkt.

Eine alternative Erklärung des SUMO-Effekts auf die transkriptionelle Aktivität von RelB könnte eine durch Rekrutierung des bekannten RelB-Interaktionspartners HDAC6 an SUMOyliertes RelB hervorgerufene Inhibierung der Transkription sein (Bouwmeester et al., 2004). Die SUMO-abhängige Interaktion von HDAC6 wurde bereits im Zusammenhang mit p300 beschrieben (Girdwood et al., 2003). Des Weiteren wurde berichtet, dass ein RelB/ARNT-Dimer (Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor Nukleärer Translokator) in Assoziation mit einer HDAC die Transkription von NF-κB-Zielgenen inhibiert (Wright and Duckett, 2009). Zusammengefasst könnten die beschriebenen Interaktionen einen Regulationsmechanismus der transkriptionellen RelB-Aktivität darstellen.

Des Weiteren sind HDACs, ebenso wie Daxx, Bestandteile der nukleären PML-Körper (PML-nbs, *promyelocytic leukemia protein nuclear bodies*). PML-nbs kommen in beinahe jeder Säugetierzelle vor und stellen nukleäre makromolekulare Strukturen dar, innerhalb welcher über 50 verschiedene Proteine konstitutiv oder transient lokalisiert sein können. Die PML-nbs rekrutieren unter anderem Faktoren, welche in die Transkriptionsregulation involviert sind. Darunter befinden sich häufig SUMOylierte Proteine oder SUMO-interagierende-Proteine, welche via SUMOyliertes PML rekrutiert werden. Da auch HDACs und Daxx an PML-nbs rekrutiert werden, könnte mit diesen Proteinen interagierendes SUMOyliertes RelB ebenfalls in die PML-nbs befördert und somit dem transkriptionell aktiven RelB-Pool entzogen werden. Auf diese Weise könnten jedoch auch bisher unbekannte RelB-Kofaktoren zur Rekrutierung von SUMOyliertem RelB in die PML-Körper führen (Nayak et al., 2009; Wethkamp and Klempnauer, 2009).

Aufgrund des bereits dargestellten positiven Effekts der Ubiquitinylierung auf die transkriptionelle Aktivität von RelB (Abb. 3.7), wäre es möglich, dass die SUMOylierung zu einem antagonistischen negativen Effekt am RelB-Protein führt. Am IκBα-Protein konkurrieren SUMOylierung und Ubiquitinylierung beispielsweise um den gleichen Lysinrest, wohingegen am p53-Protein beide Modifikationen zwar nicht um denselben Aminosäurerest konkurrieren aber dennoch antagonistische Wirkung zeigen (Rodriguez et al., 1999). Daher könnte die SUMOylierung der carboxyterminalen Lysinreste auch mit der Ubiquitinylierung des RelB-Proteins interferieren, obwohl diese an anderen Lysinresten auftritt ($Lys^{273/274}$ und $Lys^{305/308}$). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass SUMOylierung und Ubiquitinylierung der carboxyterminalen Lysinreste einen Mechanismus darstellen, welcher getrennt von der $Lys^{273/274}$- und $Lys^{305/308}$-Ubiquitinylierung betrachtet werden sollte.

Zusammenfassend lässt sich nun festhalten, dass Differenzen der basalen transkriptionellen Aktivität von $RelB_{WT}$ und SUMO-RelB auftreten und die SUMOylierung die transkriptionelle Aktivität von RelB negativ beeinflusst. Dieser SUMO-Effekt wird möglicherweise durch die spezifische SUMOylierung der carboxyterminalen Lysinreste vermittelt, da RelB-M15 eine höhere transkriptionelle Aktivität als $RelB_{WT}$ und SUMO-RelB aufweist.

Es ist bisher zwar unklar, inwiefern die Rekrutierung von Kofaktoren an der SUMO- bzw. Ubiquitin-abhängigen Regulation der transkriptionellen Aktivität von RelB beteiligt ist, aber es wurde mehrfach beschrieben, dass RelB mit Hilfe rekrutierter Kofaktoren die Transkription der Zielgene reguliert. Innerhalb der LPS-Endotoxin-Toleranz wurde RelB beispielsweise eine entscheidende Rolle im *gene-silencing* während einer Sepsis zugeschrieben. Die Endotoxin-Toleranz definiert sich durch die reprimierte Expression einiger proinflammatorischer Gene nach Endotoxin-Stimulation von Monozyten über den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4). *De novo* induziertes RelB tritt nach einer solchen Stimulation in humanen promonozytischen Zellen (THP-1) als Repressor an den IL-1β- und TNFα-Promotoren auf, indem es die Methyltransferase G9a rekrutiert, welche durch Dimethylierung des Histons H3 eine Bindungsstelle für HP1 (Heterochromatin-Protein) generiert. HP1 rekrutiert die DNA-Methyltransferase Dnmt3, CpG-Inseln werden methyliert, fakultatives Heterochromatin entsteht und die IL-1β-Transkription wird inhibiert (Chen et al., 2009; El Gazzar et al., 2007; Yoza et al., 2006).

Eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) wäre nun eine Möglichkeit, durch welche sowohl die basale als auch die SUMO-beeinflusste RelB-Bindung von $RelB_{WT}$, RelB-M15 und SUMO-RelB an Promotoren bekannter RelB-Zielgene (z.B. TNFα) analysiert werden könnte. Besonders interessant wäre darüberhinaus der Vergleich einer HP-1- bzw. Methyl-H3-ChIP-Analyse stabiler RelB-M15- versus $RelB_{WT}$-exprimierender Zellen (z.B. S107) gerade hinsichtlich der im vorigen Absatz beschriebenen Rolle von RelB bei Endotoxin-Toleranz. Des Weiteren sollten

verschiedene Zelltypen verglichen werden, da RelB die Transkription der Zielgene wie weiter oben beschrieben zelltypspezifisch reguliert (Weih et al., 1997; Xia et al., 1999).

Ein weiterer die RelB-Aktivität modifizierender Interaktionspartner ist der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR), der gewöhnlich nach nukleärer Translokation mit ARNT dimerisiert. In Makrophagen führt die Bindung von RelB/AhR im IL-8-Promotor nach Stimulation zu einer Induktion der Transkription (Vogel et al., 2007). In Lungen-Fibroblasten aus $AhR^{-/-}$ Mäusen führt Zigarettenrauch, verglichen mit wildtypischen Zellen, zu einer verstärkten Entzündungsreaktion, die mit einem Verlust von RelB einhergeht. Aufgrund der weiter oben beschrieben RelB-vermittelten reduzierten Chemokinexpression in LPS-behandelten Fibroblasten, vermittelt der AhR möglicherweise durch einen RelB-abhängigen Mechanismus die Reduktion einer durch Zigarettenrauch hervorgerufenen Entzündungsreaktion. Somit ist sogar der AhR als RelB-Kofaktor an der zelltyp-spezifischen Regulation der Transkription der Zielgene beteiligt (Baglole et al., 2008; Xia et al., 1997).

Da der Regulations-Mechanismus der AhR/RelB-Interaktion bisher unbekannt ist, wäre eine Beteiligung der RelB-SUMOylierung, aufgrund des für den AhR-Signalweg bereits beschriebenen SUMO-abhängigen Regulations-Mechanismus, denkbar. Dabei konkurriert der AhR-Repressor (AhRR) mit AhR um die Heterodimer-Bildung mit ARNT und verhindert so die Bindung des AhR/ARNT-Komplexes an die DNA. Für die Dimerisierung von AhRR mit ARNT ist die SUMOylierung beider Proteine essenziell. Diese Modifikation scheint nicht nur für die AhRR/ARNT-Komplexbildung wichtig zu sein, sondern auch für die Interaktion mit Korepressoren (HDACs) (Oshima et al., 2009).

Zahlreiche Beispiele offerieren Möglichkeiten, wie SUMOylierung und Ubiquitinylierung des RelB-Proteins dessen Funktionen beeinflussen könnten. Daher sind weitere Arbeiten zur Aufklärung der Regulationsmechanismen der RelB-Aktivität unabdinglich.

5 Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Der NF-κB-Transkriptionsfaktor RelB spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung lymphatischer Gewebe, bei der Regulation von Entzündungsreaktionen und bei der Tumorgenese. Dabei fungiert RelB als zentrale Komponente des alternativen NF-κB-Signalweges, kann jedoch auch im klassischen NF-κB-Signalweg als transkriptioneller Aktivator sowie als Repressor agieren. Bisher sind die molekularen Grundlagen für diese funktionelle Diversität von RelB noch weitgehend unverstanden. Ein bekannter Mechanismus zur Regulation von RelB stellt dessen proteasomale Degradierung in aktivierten T-Zellen dar.
Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis einer für den proteasomalen Protein-Abbau notwendigen Lys^{48}-verknüpften Ubiquitinylierung im Prozess der RelB-Degradierung. Tatsächlich ließ sich im Zuge der induzierbaren RelB-Degradierung eine gesteigerte Polyubiquitinylierung beobachten. Darüber hinaus trat eine basale nicht-proteasomale Ubiquitinylierung auf, die zu einem Anstieg der transkriptionellen Aktivität von RelB führte. Insbesondere Lys^{273}, Lys^{274}, Lys^{305} und Lys^{308} spielten sowohl für die basale als auch für die Ubiquitin-induzierte Steigerung der transkriptionellen Aktivität von RelB eine Rolle. Eine nähere Klassifizierung dieser über das gesamte RelB-Protein auftretenden Ubiquitinylierung zeigte, dass es sich dabei um eine atypische Ubiquitinylierung handelt. Der dem positiven Ubiquitin-Effekt zugrunde liegende Mechanismus konnte nicht vollständig geklärt werden. Aufgrund der erzielten Resultate ist jedoch zu vermuten, dass die Interaktion von RelB mit Kofaktoren aufgrund der Ubiquitinylierung moduliert wird. Eine weitere Lysin-spezifische Modifikation, welche die Kofaktoren-Bindung beeinflussen und der Ubiquitinylierung entgegenwirken kann, ist die SUMOylierung. In der Tat konnte eine Modifizierung von RelB sowohl durch SUMO1 als auch durch SUMO2 nachgewiesen werden. Die RelB-SUMOylierung wirkt sich auf die transkriptionelle Aktivität von RelB negativ aus. So führt die Arginin-Substitution der carboxyterminalen Lys^{386}, Lys^{387}, Lys^{389}, Lys^{410}, Lys^{413}, Lys^{414} und Lys^{415} zu einem veränderten SUMOylierungsmuster von RelB sowie zu einem leichten Anstieg der transkriptionellen Aktivität, während ein SUMO1-RelB-Fusionsprotein eine verringerte transkriptionellen Aktivität aufwies. Eine Möglichkeit zur Erklärung des negativen Einflusses der SUMOylierung auf die transkriptionelle Aktivität von RelB war die Beteiligung der bereits bekannten Interaktion von RelB mit dem Korepressor Daxx, welcher SUMOylierungs-abhängig mit Kofaktoren interagieren kann. Die RelB-Daxx-Interaktion erwies sich jedoch als SUMOylierungs-unabhängig und basierte auf der RHD von RelB. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen auf einen neuen Ubiquitinylierungs- und SUMOylierungs-abhängigen Regulationsmechanismus der Aktivität von RelB hin, welcher in der NF-κB-Familie bisher einzigartig ist.

5.2 Englische Zusammenfassung (Summary)

The NF-κB-transcription factor RelB plays an important role during the development of lymphatic tissues, for the inflammatory response and during tumorigenesis. RelB acts as a key component of the alternative NF-κB signalling pathway, however, RelB also modulates the classical NF-κB signalling pathway by acting as both a transcriptional activator and repressor of the NF-κB-dependent gene expression. Until now, the molecular mechanisms underlying this functional diversity are largely unknown. Yet, the previously described proteasomal degradation of RelB in activated T cells represents one mechanism for the regulation of RelB.

Therefore, one aim of this dissertation was to prove the involvement of the degradation-inducing Lys^{48}-linked ubiquitinylation within the process of RelB-degradation. Indeed, the inducible RelB-degradation was accompanied by an increasing polyubiquitinylation. Furthermore, a basal non-proteasomal ubiquitinylation of RelB was observed that could be linked to an increase of the transcriptional activity of RelB. Importantly, the ubiquitinylation of RelB was not restricted to a specific domain but rather appeared throughout the complete RelB-protein. However, a lysine-to-arginine scanning of RelB revealed a particular importance of Lys^{273}, Lys^{274}, Lys^{305} and Lys^{308} for the basal as well as for the ubiquitin-induced augmentation of the transcriptional activity of RelB. A more detailed characterization of this ubiquitinylation revealed an atypical nature of the polyubiquitin chains attached to RelB for which neither Lys^{48} nor Lys^{63} of ubiquitin is essential. The molecular mechanism underlying this positive ubiquitin-effect could not be solved completely, yet the obtained results point to alterations in cofactor-interactions by the ubiquitinylated RelB. The SUMOylation is another lysine-specific posttranslational modification that is able to affect cofactor-interactions and to antagonize the ubiquitinylation. Indeed, RelB-modifications by SUMO1 as well as SUMO2 were observed. Functionally, the SUMOylation seems to antagonize RelB-ubiquitinylation as it appears to have a negative effect on RelB activity. For instance, the arginine-substitution of the carboxyterminal Lys^{386}, Lys^{387}, Lys^{389}, Lys^{410}, Lys^{413}, Lys^{414} and Lys^{415} caused a modification of the SUMOylation pattern but augmented the transcriptional activity of RelB, whereas the SUMO1-RelB fusion protein showed a decreased transcriptional activity. A possible explanation for the negative influence of the SUMOylation on the transcriptional activity of RelB was the involvement of the corepressor Daxx, a known RelB-interaction partner, which interacts SUMOylation-dependent with cofactors. However, the Daxx-RelB-interaction is most likely not the molecular basis of the negative SUMOylation effect since it appeared SUMO-independent within the RHD of RelB. In summary, the presented results display a new mechanism for regulating the transcriptional activity of RelB by ubiquitinylation and SUMOylation, which is unique among the NF-κB family.

6 Abkürzungsverzeichnis

α-	anti
Abb.	Abbildung
AhR	Aryl Hydrocarbon Rezeptor
AhRR	Aryl Hydrocarbon Rezeptor Repressor
AK	Antikörper
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Ankyrinwiederholungen (*ankyrin repeats*)
ARNT	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-Nukleärer-Translokator
AS	Aminosäure
BARD	BRCA1-assoziiertes RING-Domänen Protein 1
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
Birc3	*baculoviral IAP repeat-containing 3* (=cIAP2)
BRCA1	*breast cancer 1*
BSA	Bovines Serumalbumin
ddH_20	Bidestilliertes Wasser
CBP	CREB bindendes Protein
CD	Differenzierungsantigen
CD40L	CD40-Ligand
C/EBPβ	*CCAAT/enhancer binding protein beta*
CMV	Zytomegalie-Virus
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CREB	*cAMP response element binding*
CT	Carboxyterminus
DD	Dimerisierungsdomäne
DID	Daxx-Interaktions-Domäne
DMEM	*Dulbecco's modified eagle medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonuleic acid*)
Dnmt	DNA-Methyltransferase
Drp1	*dynamin-related protein*
DTT	Dithiothreitol
DTX	Deltex
DUB	Deubiquitinylierungsenzym

E	Extinktion
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	*enhanced chemoluminescence*
ELC	*Epstein–Barr virus-induced molecule-1-ligand chemokine*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
EMSA	*electrophoretic mobility shift assay*
Erk	*extracellular-signal regulated kinases*
FCS	Fötales Kälberserum (*fetal calf serum*)
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
HA-tag	Hämagglutinin-Epitop
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
Hdm2	*human double minute 2*
HEK Zellen	Humane embryonale Nierenzellen (*human embyonic kidney*)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinethansulfonsäure
IAP	Inhibitor der Apoptose
Ig	Immunglobulin
IκB	Inhibitorisches κB-Protein
IKK	IκB-Kinase
IL	Interleukin
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria Bertani Medium
LPS	Lipopolysaccharid
LTβ	Lymphotoxin β
LUBAC	*linear ubiquitin chain-assembly complex*
luc	Luziferase
LZ	Leucinzipperdomäne
M	mol pro Liter
MALT1	*mucosa-associated lymphoid tissue*
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MG132	N-(benzyloxycarbonyl)leucinylleucinylleucinal
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*)
MMLV-RT	*Moloney Murine Leukemia Virus* Reverse Transkriptase
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase

mRNA	*messenger-RNA*
NBD	NEMO-Bindungsdomäne
NEMO	NF-κB-essenzieller Modulator
NES	nukleäres Exportsignal
NEM	N-Ethyl-Maleimid
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
NIK	NF-κB-induzierende Kinase
NLS	nukleäres Lokalisationssignal (*nuclear localization signal*)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*)
PC	Polycomb
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
PEST-Sequenz	Prolin(P)-Glutamat(E)-Serin(S)-Threonin(T)-reiche Sequenz
PIAS	*protein inhibitor of activated STAT*
PMA	Phorbolmyristatacetat
PML-Körper	promyelocytic leukemia bodies
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
poly dI/dC	Poly-desoxyinoson/ Poly-desoxycytosin
PTM	Posttranslationale Modifikation
RANKL	Rezeptor Aktivator von NF-κB Ligand
RANTES	Chemokin-Ligand 5, CCL5 (*regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted*)
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RNA	Ribonukleinsäure (*ribonuleic acid*)
rpm	Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*)
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute medium*
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SAP	Shrimp-alkalische Phosphatase
SCF	Skp1-Cullin-F-Box Familie
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SENP	SUMO1/sentrin spezifische Peptidase 1
SIM	SUMO-Interaktions-Motiv
STAT	*signal transducers and activators of transcription*
SUMO	*small ubiquitin related modifier*
TAD	Transaktivierungsdomäne

TAE	Tris-acetat-EDTA Puffer
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*
TBE	Tris-Borsäure-EDTA Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (*tris buffered saline)*
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	T-Zellrezeptor
U	Enzymeinheit (*unit*)
UBD	Ubiquitin-Bindungs-Domäne
Ubl	Ubiquitin-ähnliches Protein (*ubiquitin-like protein*)
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

Nukleinbasen und Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
N	Nukleotid (Nukleinbase+Pentose+Phosphatrest), A, C, G oder T
R	Purin, A oder G
Y	Pyrimidin, C oder T
W	Adenin oder Thymin
NTP	Nukleotidtriphosphat
analog: ATP etc.	analog Adenosintriphosphat etc.
dNTP	Desoxynukletidtriphosphat
analog: dATP etc.	analog: Desoxyadenosintriphosphat etc.

Aminosäuren

Alanin	A (Ala)
Arginin	R (Arg)
Asparagin	N (Asn)
Glutamat	E (Glu)
Lysin	K (Lys)
Serin	S (Ser)
Threonin	T (Thr)

Beliebige Aminosäure	X
Hydrophobe Aminosäure	Ψ

SI-Einheiten und Präfixe

m	Meter
g	Gramm
s	Sekunde
min	Minute
°C	Grad Celsius
Bq	Bequerel
V	Volt
m	milli-
µ	mikro-
n	nano-

7 Literaturverzeichnis

Adhikary, S., Marinoni, F., Hock, A., Hulleman, E., Popov, N., Beier, R., Bernard, S., Quarto, M., Capra, M., Goettig, S., Kogel, U., Scheffner, M., Helin, K. and Eilers, M. (2005) The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell*, **123**, 409-421.

Al-Hakim, A.K., Zagorska, A., Chapman, L., Deak, M., Peggie, M. and Alessi, D.R. (2008) Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains. *Biochem J*, **411**, 249-260.

Amir, R.E., Haecker, H., Karin, M. and Ciechanover, A. (2004) Mechanism of processing of the NF-kappa B2 p100 precursor: identification of the specific polyubiquitin chain-anchoring lysine residue and analysis of the role of NEDD8-modification on the SCF(beta-TrCP) ubiquitin ligase. *Oncogene*, **23**, 2540-2547.

Anckar, J. and Sistonen, L. (2007) SUMO: getting it on. *Biochem Soc Trans*, **35**, 1409-1413.

Ang, X.L. and Wade Harper, J. (2005) SCF-mediated protein degradation and cell cycle control. *Oncogene*, **24**, 2860-2870.

Baglole, C.J., Maggirwar, S.B., Gasiewicz, T.A., Thatcher, T.H., Phipps, R.P. and Sime, P.J. (2008) The aryl hydrocarbon receptor attenuates tobacco smoke-induced cyclooxygenase-2 and prostaglandin production in lung fibroblasts through regulation of the NF-kappaB family member RelB. *J Biol Chem*, **283**, 28944-28957.

Basak, S., Kim, H., Kearns, J.D., Tergaonkar, V., O'Dea, E., Werner, S.L., Benedict, C.A., Ware, C.F., Ghosh, G., Verma, I.M. and Hoffmann, A. (2007) A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell*, **128**, 369-381.

Basseres, D.S. and Baldwin, A.S. (2006) Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene*, **25**, 6817-6830.

Berberich-Siebelt, F., Berberich, I., Andrulis, M., Santner-Nanan, B., Jha, M.K., Klein-Hessling, S., Schimpl, A. and Serfling, E. (2006) SUMOylation interferes with CCAAT/enhancer-binding protein beta-mediated c-myc repression, but not IL-4 activation in T cells. *J Immunol*, **176**, 4843-4851.

Boquoi, A. and Enders, G. (2006) Ubiquitination of Myc: flipping the switch. *Cancer Biol Ther*, **5**, 907-908.

Bossis, G. and Melchior, F. (2006) SUMO: regulating the regulator. *Cell Div*, **1**, 13.

Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P.O., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S., Hopf, C., Huhse, B., Mangano, R., Michon, A.M., Schirle, M., Schlegl, J., Schwab, M., Stein, M.A., Bauer, A., Casari, G., Drewes, G., Gavin, A.C., Jackson, D.B., Joberty, G., Neubauer, G., Rick, J., Kuster, B. and Superti-Furga, G. (2004) A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol*, **6**, 97-105.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.

Carmody, R.J., Ruan, Q., Palmer, S., Hilliard, B. and Chen, Y.H. (2007) Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF-kappaB p50 ubiquitination blockade. *Science*, **317**, 675-678.

Chan, W.M., Mak, M.C., Fung, T.K., Lau, A., Siu, W.Y. and Poon, R.Y. (2006) Ubiquitination of p53 at multiple sites in the DNA-binding domain. *Mol Cancer Res*, **4**, 15-25.

Chang, C.C., Lin, D.Y., Fang, H.I., Chen, R.H. and Shih, H.M. (2005) Daxx mediates the small ubiquitin-like modifier-dependent transcriptional repression of Smad4. *J Biol Chem*, **280**, 10164-10173.

Chastagner, P., Israel, A. and Brou, C. (2006) Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Rep*, **7**, 1147-1153.

Chen, L.F., Mu, Y. and Greene, W.C. (2002) Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *Embo J*, **21**, 6539-6548.

Chen, L.F., Williams, S.A., Mu, Y., Nakano, H., Duerr, J.M., Buckbinder, L. and Greene, W.C. (2005) NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Mol Cell Biol*, **25**, 7966-7975.

Chen, X., El Gazzar, M., Yoza, B.K. and McCall, C.E. (2009) The NF-kappaB factor RelB and histone H3 lysine methyltransferase G9a directly interact to generate epigenetic silencing in endotoxin tolerance. *J Biol Chem*.

Chen, Z.J. (2005) Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol*, **7**, 758-765.

Ciechanover, A. and Ben-Saadon, R. (2004) N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol*, **14**, 103-106.

Claudio, E., Brown, K., Park, S., Wang, H. and Siebenlist, U. (2002) BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol*, **3**, 958-965.

Collavin, L., Gostissa, M., Avolio, F., Secco, P., Ronchi, A., Santoro, C. and Del Sal, G. (2004) Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8870-8875.

Croxton, R., Puto, L.A., de Belle, I., Thomas, M., Torii, S., Hanaii, F., Cuddy, M. and Reed, J.C. (2006) Daxx represses expression of a subset of antiapoptotic genes regulated by nuclear factor-kappaB. *Cancer Res*, **66**, 9026-9035.

Dejardin, E. (2006) The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol*, **72**, 1161-1179.

Dejardin, E., Droin, N.M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z.W., Karin, M., Ware, C.F. and Green, D.R. (2002) The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity*, **17**, 525-535.

Derudder, E., Dejardin, E., Pritchard, L.L., Green, D.R., Korner, M. and Baud, V. (2003) RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-beta receptor activation: critical roles for p100. *J Biol Chem*, **278**, 23278-23284.

Desterro, J.M., Rodriguez, M.S. and Hay, R.T. (1998) SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell*, **2**, 233-239.

DiDonato, J., Mercurio, F., Rosette, C., Wu-Li, J., Suyang, H., Ghosh, S. and Karin, M. (1996) Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol*, **16**, 1295-1304.

DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E. and Karin, M. (1997) A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature*, **388**, 548-554.

Dixit, V. and Mak, T.W. (2002) NF-kappaB signaling. Many roads lead to madrid. *Cell*, **111**, 615-619.

Dobrzanski, P., Ryseck, R.P. and 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.

Dobrzanski, P., Ryseck, R.P. and Bravo, R. (1994) Differential interactions of Rel-NF-kappa B complexes with I kappa B alpha determine pools of constitutive and inducible NF-kappa B activity. *Embo J*, **13**, 4608-4616.

Ea, C.K. and Baltimore, D. (2009) Regulation of NF-{kappa}B activity through lysine monomethylation of p65. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 18972-18977.

El Gazzar, M., Yoza, B.K., Hu, J.Y., Cousart, S.L. and McCall, C.E. (2007) Epigenetic silencing of tumor necrosis factor alpha during endotoxin tolerance. *J Biol Chem*, **282**, 26857-26864.

Fagerlund, R., Kinnunen, L., Kohler, M., Julkunen, I. and Melen, K. (2005) NF-{kappa}B is transported into the nucleus by importin {alpha}3 and importin {alpha}4. *J Biol Chem*, **280**, 15942-15951.

Fagerlund, R., Melen, K., Cao, X. and Julkunen, I. (2008) NF-kappaB p52, RelB and c-Rel are transported into the nucleus via a subset of importin alpha molecules. *Cell Signal*, **20**, 1442-1451.

Figueroa-Romero, C., Iniguez-Lluh, J.A., Stadler, J., Chang, C.R., Arnoult, D., Keller, P.J., Hong, Y., Blackstone, C. and Feldman, E.L. (2009) SUMOylation of the mitochondrial

fission protein Drp1 occurs at multiple nonconsensus sites within the B domain and is linked to its activity cycle. *Faseb J*.

Fried, M. and Crothers, D.M. (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, **9**, 6505-6525.

Fung, T.K., Yam, C.H. and Poon, R.Y. (2005) The N-terminal regulatory domain of cyclin A contains redundant ubiquitination targeting sequences and acceptor sites. *Cell Cycle*, **4**, 1411-1420.

Garner, M.M. and Revzin, A. (1981) A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res*, **9**, 3047-3060.

Geng, H., Wittwer, T., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M. and Schmitz, M.L. (2009) Phosphorylation of NF-kappaB p65 at Ser468 controls its COMMD1-dependent ubiquitination and target gene-specific proteasomal elimination. *EMBO Rep*, **10**, 381-386.

Ghosh, S. and Karin, M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, **109 Suppl**, S81-96.

Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, **16**, 225-260.

Gill, G. (2004) SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev*, **18**, 2046-2059.

Gilmore, T.D. (2006) Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, **25**, 6680-6684.

Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O.A., Thain, A., Anderson, L.A., Snowden, A.W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N.D. and Hay, R.T. (2003) P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell*, **11**, 1043-1054.

Grabbe, C. and Dikic, I. (2009) Functional roles of ubiquitin-like domain (ULD) and ubiquitin-binding domain (UBD) containing proteins. *Chem Rev*, **109**, 1481-1494.

Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.W., Egan, L.J., Kagnoff, M.F. and Karin, M. (2004) IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*, **118**, 285-296.

Guo, B. and Sharrocks, A.D. (2009) Extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase signaling initiates a dynamic interplay between sumoylation and ubiquitination to regulate the activity of the transcriptional activator PEA3. *Mol Cell Biol*, **29**, 3204-3218.

Haas, A.L. (2009) Linear polyubiquitylation: the missing link in NF-kappaB signalling. *Nat Cell Biol*, **11**, 116-118.

Hacker, H. and Karin, M. (2006) Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*, **2006**, re13.

Haglund, K., Di Fiore, P.P. and Dikic, I. (2003a) Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci*, **28**, 598-603.

Haglund, K. and Dikic, I. (2005) Ubiquitylation and cell signaling. *Embo J*, **24**, 3353-3359.

Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P.P. and Dikic, I. (2003b) Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol*, **5**, 461-466.

Hay, R.T. (2005) SUMO: a history of modification. *Mol Cell*, **18**, 1-12.

Hayden, M.S. and Ghosh, S. (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*, **18**, 2195-2224.

Hayden, M.S. and Ghosh, S. (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, **132**, 344-362.

Henkler, F., Baumann, B., Fotin-Mleczek, M., Weingartner, M., Schwenzer, R., Peters, N., Graness, A., Wirth, T., Scheurich, P., Schmid, J.A. and Wajant, H. (2003) Caspase-mediated cleavage converts the tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor (TRAF)-1 from a selective modulator of TNF receptor signaling to a general inhibitor of NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, **278**, 29216-29230.

Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, **67**, 425-479.

Hicke, L. (2001) A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell*, **106**, 527-530.

Hoeller, D. and Dikic, I. (2009) Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature*, **458**, 438-444.
Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M.L. and Baltimore, D. (2002) The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science*, **298**, 1241-1245.
Hoffmann, A., Natoli, G. and Ghosh, G. (2006) Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene*, **25**, 6706-6716.
Holmstrom, S.R., Chupreta, S., So, A.Y. and Iniguez-Lluhi, J.A. (2008) SUMO-mediated inhibition of glucocorticoid receptor synergistic activity depends on stable assembly at the promoter but not on DAXX. *Mol Endocrinol*, **22**, 2061-2075.
Hong, S.Y., Yoon, W.H., Park, J.H., Kang, S.G., Ahn, J.H. and Lee, T.H. (2000) Involvement of two NF-kappa B binding elements in tumor necrosis factor alpha -, CD40-, and epstein-barr virus latent membrane protein 1-mediated induction of the cellular inhibitor of apoptosis protein 2 gene. *J Biol Chem*, **275**, 18022-18028.
Huang, D.B., Vu, D. and Ghosh, G. (2005) NF-kappaB RelB forms an intertwined homodimer. *Structure*, **13**, 1365-1373.
Huang, T.T., Wuerzberger-Davis, S.M., Wu, Z.H. and Miyamoto, S. (2003) Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell*, **115**, 565-576.
Hunter, T. (2007) The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell*, **28**, 730-738.
Hurley, J.H., Lee, S. and Prag, G. (2006) Ubiquitin-binding domains. *Biochem J*, **399**, 361-372.
Ikeda, F. and Dikic, I. (2008) Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO Rep*, **9**, 536-542.
Ivanchuk, S.M., Mondal, S. and Rutka, J.T. (2008) p14ARF interacts with DAXX: effects on HDM2 and p53. *Cell Cycle*, **7**, 1836-1850.
Iwai, K. and Tokunaga, F. (2009) Linear polyubiquitination: a new regulator of NF-kappaB activation. *EMBO Rep*, **10**, 706-713.
Jacque, E., Tchenio, T., Piton, G., Romeo, P.H. and Baud, V. (2005) RelA repression of RelB activity induces selective gene activation downstream of TNF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 14635-14640.
Jakobs, A., Himstedt, F., Funk, M., Korn, B., Gaestel, M. and Niedenthal, R. (2007a) Ubc9 fusion-directed SUMOylation identifies constitutive and inducible SUMOylation. *Nucleic Acids Res*, **35**, e109.
Jakobs, A., Koehnke, J., Himstedt, F., Funk, M., Korn, B., Gaestel, M. and Niedenthal, R. (2007b) Ubc9 fusion-directed SUMOylation (UFDS): a method to analyze function of protein SUMOylation. *Nat Methods*, **4**, 245-250.
Jin, H.S., Lee, D.H., Kim, D.H., Chung, J.H., Lee, S.J. and Lee, T.H. (2009) cIAP1, cIAP2, and XIAP Act Cooperatively via Nonredundant Pathways to Regulate Genotoxic Stress-Induced Nuclear Factor-{kappa}B Activation. *Cancer Res*.
Johnson, E.S. (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem*, **73**, 355-382.
Jones, J., Wu, K., Yang, Y., Guerrero, C., Nillegoda, N., Pan, Z.Q. and Huang, L. (2008) A targeted proteomic analysis of the ubiquitin-like modifier nedd8 and associated proteins. *J Proteome Res*, **7**, 1274-1287.
Josson, S., Xu, Y., Fang, F., Dhar, S.K., St Clair, D.K. and St Clair, W.H. (2006) RelB regulates manganese superoxide dismutase gene and resistance to ionizing radiation of prostate cancer cells. *Oncogene*, **25**, 1554-1559.
Kagey, M.H., Melhuish, T.A. and Wotton, D. (2003) The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell*, **113**, 127-137.
Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C. and Reed, S.I. (2000) Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell*, **102**, 303-314.
Kaiser, P. and Huang, L. (2005) Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome Biol*, **6**, 233.

Kaiser, P. and Wohlschlegel, J. (2005) Identification of ubiquitination sites and determination of ubiquitin-chain architectures by mass spectrometry. *Methods Enzymol*, **399**, 266-277.

Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*, **18**, 621-663.

Karin, M. and Lin, A. (2002) NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, **3**, 221-227.

Kerscher, O., Felberbaum, R. and Hochstrasser, M. (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **22**, 159-180.

Kim, H.T., Kim, K.P., Lledias, F., Kisselev, A.F., Scaglione, K.M., Skowyra, D., Gygi, S.P. and Goldberg, A.L. (2007) Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *J Biol Chem*, **282**, 17375-17386.

Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K. and Iwai, K. (2006) A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *Embo J*, **25**, 4877-4887.

Knipscheer, P., van Dijk, W.J., Olsen, J.V., Mann, M. and Sixma, T.K. (2007) Noncovalent interaction between Ubc9 and SUMO promotes SUMO chain formation. *Embo J*, **26**, 2797-2807.

Kornitzer, D. and Ciechanover, A. (2000) Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J Cell Physiol*, **182**, 1-11.

Kroll, M., Margottin, F., Kohl, A., Renard, P., Durand, H., Concordet, J.P., Bachelerie, F., Arenzana-Seisdedos, F. and Benarous, R. (1999) Inducible degradation of IkappaBalpha by the proteasome requires interaction with the F-box protein h-betaTrCP. *J Biol Chem*, **274**, 7941-7945.

Kuo, H.Y., Chang, C.C., Jeng, J.C., Hu, H.M., Lin, D.Y., Maul, G.G., Kwok, R.P. and Shih, H.M. (2005) SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 16973-16978.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Latham, J.A. and Dent, S.Y. (2007) Cross-regulation of histone modifications. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 1017-1024.

Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G.Y., Nizet, V. and Karin, M. (2005) IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature*, **434**, 1138-1143.

Le Cam, L., Linares, L.K., Paul, C., Julien, E., Lacroix, M., Hatchi, E., Triboulet, R., Bossis, G., Shmueli, A., Rodriguez, M.S., Coux, O. and Sardet, C. (2006) E4F1 is an atypical ubiquitin ligase that modulates p53 effector functions independently of degradation. *Cell*, **127**, 775-788.

Lernbecher, T., Kistler, B. and Wirth, T. (1994) Two distinct mechanisms contribute to the constitutive activation of RelB in lymphoid cells. *Embo J*, **13**, 4060-4069.

Li, R., Pei, H., Watson, D.K. and Papas, T.S. (2000) EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS1 target genes. *Oncogene*, **19**, 745-753.

Li, W. and Ye, Y. (2008) Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 2397-2406.

Liang, C., Zhang, M. and Sun, S.C. (2006) beta-TrCP binding and processing of NF-kappaB2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870. *Cell Signal*, **18**, 1309-1317.

Lin, D.Y., Huang, Y.S., Jeng, J.C., Kuo, H.Y., Chang, C.C., Chao, T.T., Ho, C.C., Chen, Y.C., Lin, T.P., Fang, H.I., Hung, C.C., Suen, C.S., Hwang, M.J., Chang, K.S., Maul, G.G. and Shih, H.M. (2006) Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol Cell*, **24**, 341-354.

Lo, J.C., Basak, S., James, E.S., Quiambo, R.S., Kinsella, M.C., Alegre, M.L., Weih, F., Franzoso, G., Hoffmann, A. and Fu, Y.X. (2006) Coordination between NF-kappaB

family members p50 and p52 is essential for mediating LTbetaR signals in the development and organization of secondary lymphoid tissues. *Blood*, **107**, 1048-1055.

Lyst, M.J. and Stancheva, I. (2007) A role for SUMO modification in transcriptional repression and activation. *Biochem Soc Trans*, **35**, 1389-1392.

Maier, H.J., Marienfeld, R., Wirth, T. and Baumann, B. (2003) Critical role of RelB serine 368 for dimerization and p100 stabilization. *J Biol Chem*, **278**, 39242-39250.

Makris, C., Roberts, J.L. and Karin, M. (2002) The carboxyl-terminal region of IkappaB kinase gamma (IKKgamma) is required for full IKK activation. *Mol Cell Biol*, **22**, 6573-6581.

Malinin, N.L., Boldin, M.P., Kovalenko, A.V. and Wallach, D. (1997) MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature*, **385**, 540-544.

Mao, X., Gluck, N., Li, D., Maine, G.N., Li, H., Zaidi, I.W., Repaka, A., Mayo, M.W. and Burstein, E. (2009) GCN5 is a required cofactor for a ubiquitin ligase that targets NF-kappaB/RelA. *Genes Dev*, **23**, 849-861.

Marienfeld, R., Berberich-Siebelt, F., Berberich, I., Denk, A., Serfling, E. and Neumann, M. (2001) Signal-specific and phosphorylation-dependent RelB degradation: a potential mechanism of NF-kappaB control. *Oncogene*, **20**, 8142-8147.

Marienfeld, R., May, M.J., Berberich, I., Serfling, E., Ghosh, S. and Neumann, M. (2003) RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *J Biol Chem*, **278**, 19852-19860.

Marienfeld, R.B., Palkowitsch, L. and Ghosh, S. (2006) Dimerization of the I kappa B kinase-binding domain of NEMO is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappa B activity. *Mol Cell Biol*, **26**, 9209-9219.

Meinnel, T., Serero, A. and Giglione, C. (2006) Impact of the N-terminal amino acid on targeted protein degradation. *Biol Chem*, **387**, 839-851.

Meulmeester, E. and Melchior, F. (2008) Cell biology: SUMO. *Nature*, **452**, 709-711.

Miller, B.S. and Zandi, E. (2001) Complete reconstitution of human IkappaB kinase (IKK) complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKKgamma on the complex activity in the absence of stimulation. *J Biol Chem*, **276**, 36320-36326.

Nayak, A., Glockner-Pagel, J., Vaeth, M., Schumann, J.E., Buttmann, M., Bopp, T., Schmitt, E., Serfling, E. and Berberich-Siebelt, F. (2009) Sumoylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and interleukin-2 repression by histone deacetylase. *J Biol Chem*, **284**, 10935-10946.

Neumann, M. and Naumann, M. (2007) Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *Faseb J*, **21**, 2642-2654.

Newton, K., Matsumoto, M.L., Wertz, I.E., Kirkpatrick, D.S., Lill, J.R., Tan, J., Dugger, D., Gordon, N., Sidhu, S.S., Fellouse, F.A., Komuves, L., French, D.M., Ferrando, R.E., Lam, C., Compaan, D., Yu, C., Bosanac, I., Hymowitz, S.G., Kelley, R.F. and Dixit, V.M. (2008) Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell*, **134**, 668-678.

Niedenthal, R. (2007) Ubc9 fusion-directed SUMOylation (UFDS). *Biochem Soc Trans*, **35**, 1430-1432.

Nishikawa, H., Ooka, S., Sato, K., Arima, K., Okamoto, J., Klevit, R.E., Fukuda, M. and Ohta, T. (2004) Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, **279**, 3916-3924.

Oeckinghaus, A., Wegener, E., Welteke, V., Ferch, U., Arslan, S.C., Ruland, J., Scheidereit, C. and Krappmann, D. (2007) Malt1 ubiquitination triggers NF-kappaB signaling upon T-cell activation. *Embo J*, **26**, 4634-4645.

Oshima, M., Mimura, J., Sekine, H., Okawa, H. and Fujii-Kuriyama, Y. (2009) SUMO modification regulates the transcription repressor function of aryl hydrocarbon receptor (AhR) repressor. *J Biol Chem*.

Passmore, L.A. and Barford, D. (2004) Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem J*, **379**, 513-525.

Perkins, N.D. (2006) Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene*, **25**, 6717-6730.
Perkins, N.D. and Gilmore, T.D. (2006) Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ*, **13**, 759-772.
Petroski, M.D. and Deshaies, R.J. (2003) Context of multiubiquitin chain attachment influences the rate of Sic1 degradation. *Mol Cell*, **11**, 1435-1444.
Pickart, C.M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, **70**, 503-533.
Puto, L.A. and Reed, J.C. (2008) Daxx represses RelB target promoters via DNA methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation. *Genes Dev*, **22**, 998-1010.
Rahighi, S., Ikeda, F., Kawasaki, M., Akutsu, M., Suzuki, N., Kato, R., Kensche, T., Uejima, T., Bloor, S., Komander, D., Randow, F., Wakatsuki, S. and Dikic, I. (2009) Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. *Cell*, **136**, 1098-1109.
Ramakrishnan, P., Wang, W. and Wallach, D. (2004) Receptor-specific signaling for both the alternative and the canonical NF-kappaB activation pathways by NF-kappaB-inducing kinase. *Immunity*, **21**, 477-489.
Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Midgley, C.A., Lane, D.P. and Hay, R.T. (1999) SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J*, **18**, 6455-6461.
Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G. and Karin, M. (1998) IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature*, **395**, 297-300.
Ruben, S.M., Klement, J.F., Coleman, T.A., Maher, M., Chen, C.H. and Rosen, C.A. (1992) I-Rel: a novel rel-related protein that inhibits NF-kappa B transcriptional activity. *Genes Dev*, **6**, 745-760.
Ryseck, R.P., Novotny, J. and Bravo, R. (1995) Characterization of elements determining the dimerization properties of RelB and p50. *Mol Cell Biol*, **15**, 3100-3109.
Saccani, S., Marazzi, I., Beg, A.A. and Natoli, G. (2004) Degradation of promoter-bound p65/RelA is essential for the prompt termination of the nuclear factor kappaB response. *J Exp Med*, **200**, 107-113.
Santiago, A., Godsey, A.C., Hossain, J., Zhao, L.Y. and Liao, D. (2009) Identification of two independent SUMO-interacting motifs in Daxx: evolutionary conservation from Drosophila to humans and their biochemical functions. *Cell Cycle*, **8**, 76-87.
Scheidereit, C. (2006) IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene*, **25**, 6685-6705.
Schulze-Luehrmann, J. and Ghosh, S. (2006) Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. *Immunity*, **25**, 701-715.
Sen, R. and Baltimore, D. (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, **46**, 705-716.
Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C. and Karin, M. (2001) Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science*, **293**, 1495-1499.
Shih, H.M., Chang, C.C., Kuo, H.Y. and Lin, D.Y. (2007) Daxx mediates SUMO-dependent transcriptional control and subnuclear compartmentalization. *Biochem Soc Trans*, **35**, 1397-1400.
Sturm, R.A., Das, G. and Herr, W. (1988) The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes Dev*, **2**, 1582-1599.
Suhasini, M. and Pilz, R.B. (1999) Transcriptional elongation of c-myb is regulated by NF-kappaB (p50/RelB). *Oncogene*, **18**, 7360-7369.
Tang, E.D., Wang, C.Y., Xiong, Y. and Guan, K.L. (2003) A role for NF-kappaB essential modifier/IkappaB kinase-gamma (NEMO/IKKgamma) ubiquitination in the activation of the IkappaB kinase complex by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*, **278**, 37297-37305.
Tateishi, K., Omata, M., Tanaka, K. and Chiba, T. (2001) The NEDD8 system is essential for cell cycle progression and morphogenetic pathway in mice. *J Cell Biol*, **155**, 571-579.
Terzic, J., Marinovic-Terzic, I., Ikeda, F. and Dikic, I. (2007) Ubiquitin signals in the NF-kappaB pathway. *Biochem Soc Trans*, **35**, 942-945.

Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., Yamamoto, M., Akira, S., Takao, T., Tanaka, K. and Iwai, K. (2009) Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. *Nat Cell Biol*, **11**, 123-132.

Vaira, S., Johnson, T., Hirbe, A.C., Alhawagri, M., Anwisye, I., Sammut, B., O'Neal, J., Zou, W., Weilbaecher, K.N., Faccio, R. and Novack, D.V. (2008) RelB is the NF-kappaB subunit downstream of NIK responsible for osteoclast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 3897-3902.

Vatsyayan, J., Qing, G., Xiao, G. and Hu, J. (2008) SUMO1 modification of NF-kappaB2/p100 is essential for stimuli-induced p100 phosphorylation and processing. *EMBO Rep*, **9**, 885-890.

Vertegaal, A.C. (2007) Small ubiquitin-related modifiers in chains. *Biochem Soc Trans*, **35**, 1422-1423.

Vertegaal, A.C., Andersen, J.S., Ogg, S.C., Hay, R.T., Mann, M. and Lamond, A.I. (2006) Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*, **5**, 2298-2310.

Vogel, C.F., Sciullo, E., Li, W., Wong, P., Lazennec, G. and Matsumura, F. (2007) RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol*, **21**, 2941-2955.

Wang, J., Feng, X.H. and Schwartz, R.J. (2004) SUMO-1 modification activated GATA4-dependent cardiogenic gene activity. *J Biol Chem*, **279**, 49091-49098.

Wang, X., Herr, R.A., Chua, W.J., Lybarger, L., Wiertz, E.J. and Hansen, T.H. (2007) Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. *J Cell Biol*, **177**, 613-624.

Weih, F., Carrasco, D. and Bravo, R. (1994) Constitutive and inducible Rel/NF-kappa B activities in mouse thymus and spleen. *Oncogene*, **9**, 3289-3297.

Weih, F., Warr, G., Yang, H. and Bravo, R. (1997) Multifocal defects in immune responses in RelB-deficient mice. *J Immunol*, **158**, 5211-5218.

Wethkamp, N. and Klempnauer, K.H. (2009) Daxx is a transcriptional repressor of CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta). *J Biol Chem*.

Whiteside, S.T., Epinat, J.C., Rice, N.R. and Israel, A. (1997) I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *Embo J*, **16**, 1413-1426.

Winston, J.T., Strack, P., Beer-Romero, P., Chu, C.Y., Elledge, S.J. and Harper, J.W. (1999) The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro. *Genes Dev*, **13**, 270-283.

Wright, C.W. and Duckett, C.S. (2009) The aryl hydrocarbon nuclear translocator alters CD30-mediated NF-kappaB-dependent transcription. *Science*, **323**, 251-255.

Xia, Y., Chen, S., Wang, Y., Mackman, N., Ku, G., Lo, D. and Feng, L. (1999) RelB modulation of IkappaBalpha stability as a mechanism of transcription suppression of interleukin-1alpha (IL-1alpha), IL-1beta, and tumor necrosis factor alpha in fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **19**, 7688-7696.

Xia, Y., Pauza, M.E., Feng, L. and Lo, D. (1997) RelB regulation of chemokine expression modulates local inflammation. *Am J Pathol*, **151**, 375-387.

Xiao, G., Harhaj, E.W. and Sun, S.C. (2001) NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell*, **7**, 401-409.

Xie, Z., Nair, U. and Klionsky, D.J. (2008) Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell*, **19**, 3290-3298.

Xu, K., Shimelis, H., Linn, D.E., Jiang, R., Yang, X., Sun, F., Guo, Z., Chen, H., Li, W., Kong, X., Melamed, J., Fang, S., Xiao, Z., Veenstra, T.D. and Qiu, Y. (2009) Regulation of androgen receptor transcriptional activity and specificity by RNF6-induced ubiquitination. *Cancer Cell*, **15**, 270-282.

Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J. and Israel, A. (1998) Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell*, **93**, 1231-1240.

Yang, S.H., Jaffray, E., Hay, R.T. and Sharrocks, A.D. (2003) Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell*, **12**, 63-74.

Yang, X.J. and Seto, E. (2008) Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell*, **31**, 449-461.

Yoza, B.K., Hu, J.Y., Cousart, S.L., Forrest, L.M. and McCall, C.E. (2006) Induction of RelB participates in endotoxin tolerance. *J Immunol*, **177**, 4080-4085.

Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M. and Karin, M. (1997) The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*, **91**, 243-252.

Zhong, H., May, M.J., Jimi, E. and Ghosh, S. (2002) The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell*, **9**, 625-636.

Zhou, H., Wertz, I., O'Rourke, K., Ultsch, M., Seshagiri, S., Eby, M., Xiao, W. and Dixit, V.M. (2004) Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature*, **427**, 167-171.

Veröffentlichungen

Publikationen

Leidner J, Palkowitsch L, Marienfeld U, Fischer D, Marienfeld R.
Identification of lysine residues critical for the transcriptional activity and polyubiquitination of the NF-κB family member RelB.
Biochem. J. (2008); 416(1):117-27

Palkowitsch L, Leidner J, Ghosh S, Marienfeld R.
Phosphorylation of serine 68 in the IkappaB kinase (IKK)-binding domain of NEMO interferes with the structure of the IKK complex and tumor necrosis factor-alpha-induced NF-kappaB activity.
J Biol Chem. 2008; 283(1):76-86

Poster

Leidner J, Palkowitsch L, Marienfeld R.
The phosphorylation at threonine 84 and serine 552 regulates the activity of the NF-κB transcription factor RelB.
Internationales Symposium „Signal Transduction and Disease" (2009)
Aachen, Deutschland

Palkowitsch L, Leidner J, Ghosh S, Marienfeld R.
Analysis of the phosphorylation-dependent structural alterations of the IκB-kinase complex.
Internationales Symposium „Signal Transduction and Disease" (2009)
Aachen, Deutschland

Leidner J, Marienfeld R.
Regulation of the transcriptional activity of the NF-κB family member RelB by site-specific ubiquitination.
ELSO (European Life Scientist Organization) Meeting (2007)
Dresden, Deutschland

Marienfeld R, Leidner J, Neumann M.
Regulation of the interleukin 2-expression by the signal-induced degradation of RelB.
ELSO (European Life Scientist Organization) Meeting (2007)
Dresden, Deutschland

Palkowitsch L, Leidner J, Ghosh S, Marienfeld R.
The phosphorylation of serine 68 in the IKK-binding domain of NEMO interferes with the structure of the IKK-complex and the TNF-α-induced NF-κB activity.
ELSO (European Life Scientist Organization) Meeting (2007)
Dresden, Deutschland

Leidner J, Hestler T, Neumann M, Marienfeld R.
The role of the IKK-mediated phosphorylation of the NF-κB family member RelB.
Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS) (2006)
Weimar, Deutschland

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Textpassagen als solche kenntlich gemacht habe.

Julia Ulrike Anna Leidner

Ulm, den.....

Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Thomas Wirth danke ich dafür, dass ich dieses Projekt im Institut für Physiologische Chemie bearbeiten konnte.

Herrn Juniorprofessor Dr. Ralf Marienfeld möchte ich für die Vergabe der interessanten Aufgabenstellung und besonders für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit und seine stete Hilfsbereitschaft danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie und besonders den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Marienfeld, durch die das Projekt nicht nur Arbeit, sondern auch Vergnügen war.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit und Martin für seine Geduld und sein Verständnis.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Julia Ulrike Anna Leidner
Geburtsdatum	30.05.1979 in Ulm/Donau
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Studium

02/2004-12/2009	Promotionsstudium am Institut für Physiologische Chemie der Universität Ulm unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Wirth, im Labor von Herrn Juniorprofessor Dr. Ralf Marienfeld: "Die Rolle Lysin-spezifischer posttranslationaler Modifikationen für die Funktion des NF-κB-Faktors RelB"
10/1998-12/2003	Studium der Biologie an der Universität Ulm mit dem Abschluss Diplom
03/2003-12/2003	Diplomarbeit: "Untersuchungen zu neuronalen Funktionen von NF-κB in transgenen Mäusen" am Institut für Physiologische Chemie der Universität Ulm unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Wirth, unter der Betreuung von Dr. Bernd Baumann

Schulausbildung

09/1989-06/1998	Nikolaus-Kopernikus-Gymnasium Weißenhorn Abschluss: Allgemeine Hochschulreife