

**Funktion von NF- κ B für
die Differenzierung lymphoider Zellen
und
die inflammatorische Aktivierung von Endothelzellen**

**Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Andrea Lasar

aus

Aschaffenburg

Würzburg 2002

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Rainer Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Wirth

Gutachter: PD. Dr. Gert Pflugfelder

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Zusammenfassung

Die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B wird hauptsächlich durch inhibitorische I κ B-Proteine kontrolliert, die durch die I κ B-Kinasen 1 und 2 phosphoryliert und anschließend degradiert werden. Dadurch werden verschiedene zelluläre Prozesse wie Differenzierung und Aktivierung beeinflusst.

Um die Rolle von NF- κ B in der Differenzierung lymphoider Zellen zu untersuchen, wurden nichtdegradierbare Mutanten der I κ B-Proteine in transgenen Mäusen mit Hilfe des Tet-off-Systems exprimiert. Dieses erlaubt die konditionale, gewebespezifische Expression der Mutanten. Im Thymus von tTA/tetI κ B α -transgenen Mäusen konnte eine doxyzyklinabhängige Reduktion der CD8⁺-Thymozyten beobachtet werden. Eine Einschränkung der Analyse späterer Entwicklungsstadien war die zeitlich begrenzte Expression des Transgens, die nur in frühen Entwicklungsstadien stattfand. Die B-Zellentwicklung wurde anhand eines *in vitro* Differenzierungssystems nachvollzogen, das die Differenzierung von prä-B-Zellen zu unreifen bzw. reifen B-Zellen erlaubt. Dabei zeigte sich, dass ein transdominantes I κ B α beide Differenzierungsschritte nahezu vollständig hemmt, aber nur, wenn das endogene I κ B α nicht vorhanden ist.

Die Beteiligung von NF- κ B an der inflammatorischen Aktivierung von Endothelzellen wurde mit Hilfe von retroviralen Infektionen untersucht. Dabei wurden neben mutanten I κ B-Proteinen auch kinase-inaktive oder konstitutiv-aktive Mutanten der I κ B-Kinasen verwendet. Die transdominanten I κ B-Proteine sowie die kinase-inaktive IKK2 waren in der Lage, die TNF- α -induzierte Expression aller untersuchten Chemokine und Adhäsionsmoleküle komplett zu hemmen. Dagegen wurde durch die kinase-inaktive IKK1 nur ein Teil der untersuchten Moleküle in ihrer Expression beeinflusst. Interessanterweise war eine konstitutiv-aktive IKK2 schon in der Abwesenheit von TNF- α in der Lage, die Expression der untersuchten Proteine zu aktivieren. Die durch die Mutanten veränderte Expression der Adhäsionsmoleküle und Chemokine hatte auch einen Einfluss auf die *in vitro* Adhäsion und Transmigration von Monozyten.

Summary

The activity of the transcription factor NF- κ B is mainly controlled by the inhibitory I κ B proteins which are phosphorylated by the I κ B kinases 1 and 2. This phosphorylation leads to the degradation of the I κ B proteins thereby releasing NF- κ B to the nucleus. The active NF- κ B influences several cellular processes like differentiation and activation.

To investigate the role of NF- κ B in the differentiation of lymphoid cells, nondegradable mutants of the I κ B proteins were expressed in transgenic mice based on the tet-off system. This allows the conditional tissue-specific expression of the mutants. In the thymus of tTA/tetI κ B α transgenic mice, a doxycyclin-dependent reduction of the CD8⁺ thymocytes could be observed. One restriction for the analysis of later stages of the development was the expression pattern of the transgene which was restricted to early developmental stages. The development of the transgenic B cells was investigated with an *in vitro* differentiation system which allows the differentiation to immature or mature B cells, respectively. The transdominant I κ B α inhibits both steps of the differentiation almost completely, but only if the endogenous I κ B α is absent.

The involvement of NF- κ B in the inflammatory activation of endothelial cells was studied by retroviral infections. In addition to the mutant I κ B proteins, kinase-inactive or constitutively active versions of the I κ B kinases were used. The transdominant I κ B mutants as well as the kinase-inactive IKK2 were able to inhibit the TNF- α induced expression of all investigated chemokines and adhesion molecules completely. In contrast, the kinase-inactive IKK1 influenced the expression of only a subset of the investigated genes. Interestingly, the constitutively active IKK2 could activate the expression of the investigated proteins already in the absence of TNF- α . The altered expression of adhesion molecules and chemokines also influenced the *in vitro* adhesion and transmigration of monocytes.

Veröffentlichungen:

Denk, A., Goebeler, M., Schmid, S., Berberich, I., Ritz, O., Lindemann, D., Ludwig, S. and Wirth, T. (2001) Activation of NF-kappa B via the Ikappa B kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells. *J Biol Chem*, **276**, 28451-28458.

Denk, A., Wirth, T. and Baumann, B. (2000) NF-kappaB transcription factors: critical regulators of hematopoiesis and neuronal survival. *Cytokine Growth Factor Rev*, **11**, 303-320.

Huber, M.A., Denk, A., Peter, R.U., Weber, L., Kraut, N. and Wirth, T. (2002) The IKK-2/Ikappa Balpha /NF-kappa B pathway plays a key role in the regulation of CCR3 and eotaxin-1 in fibroblasts. A critical link to dermatitis in Ikappa Balpha -deficient mice. *J Biol Chem*, **277**, 1268-1275.

Leverkus, M., Sprick, M.R., Denk, A.; Bröcker, E.B., Walczak, H. and Neumann, M. TRAIL-induced apoptosis and gene induction in human keratinocytes: differential contribution of TRAIL receptor 1 and 2. Zur Veröffentlichung eingereicht.

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.

Posterpräsentationen:

Denk, A., Goebeler, M., Schmid, S., Berberich, I., Ritz, O., Lindemann, D., Ludwig, S. and Wirth, T. „Activation of NF-kappa B via the Ikappa B kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression and adhesion of monocytes to endothelial cells.“ XXXII. Annual Meeting of the German Society of Immunology (2001). *Immunobiology* **204**, 67

Danksagung

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Wirth danke ich für die interessante und vielfältige Aufgabenstellung sowie die gute Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Pflugfelder gilt mein Dank für die Übernahme der Betreuung im Fachbereich Biologie.

Hilde und Lena möchte ich für die Betreuung der Mäuse bedanken, die ich ohne die Einführung von Jochen nie hätte analysieren können. Außerdem möchte ich Anca danken, die mir durch die Übernahme der Genotypisierungen den Rücken für andere Dinge freigehalten hat.

Für die gute und lustige Zusammenarbeit im Endothelprojekt möchte ich Bille danken. Dadurch war das Projekt nicht nur Arbeit, sondern auch Vergnügen. Außerdem gilt mein Dank Stephan Ludwig und Matthias Goebeler für viele interessante Diskussionen.

Die Etablierung und Kultur der prä-B-Zellen sowie viele andere Labortechniken habe ich von Barbara Kistler gelernt, wofür ich mich ganz herzlich bedanken möchte.

Auch allen anderen jetzigen und früheren Mitgliedern des Labors Wirth gilt mein Dank für viele lustige und lehrreiche Stunden. Besonderer Dank gilt Bernd für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Last but not least möchte ich mich meinen Eltern für ihre Unterstützung über all die Jahre meines Studiums danken. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Wolfgang für sein Verständnis und seine Unterstützung, besonders in schwereren Zeiten.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die NF- κ B-Familie: Transkriptionsfaktoren mit einem breiten Wirkungsspektrum	1
1.1.1. Struktur und Funktion	1
1.1.2. Studien mit transgenen und NF- κ B-defizienten Mäusen	4
1.2. Die I κ B-Familie: Inhibitoren als kritische Regulatoren transkriptioneller Aktivität	7
1.2.1. Struktur und Funktion der I κ B-Proteine	7
1.2.2. Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den signal-abhängig degradierten I κ B-Proteinen I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ	8
1.2.3. Aufschluss über die Funktion der I κ B-Proteine durch transgene und „knock-out“-Mäuse	11
1.3. Der I κ B-Kinase-Komplex: Integrator für viele NF- κ B-induzierende Stimuli	13
1.3.1. Zusammensetzung des Komplexes aus Kinasen und strukturellen Komponenten	13
1.3.2. „Knock“-out- und transgene Tiere zur Untersuchung von Komponenten des I κ B-Kinase-Komplexes	15
1.4. Induktoren und Zielgene von NF- κ B: Hinweise auf die universale Bedeutung des Transkriptionsfaktors für die normale Physiologie und die Entwicklung von Krankheiten	18
1.5. Die induzierbare Aktivierung von NF- κ B: klassische Wege und alternative Mechanismen	20
1.5.1. Aktivierung durch I κ B-Abbau-der klassische Weg	20
1.5.2. Modifikation von NF- κ B: eine zusätzliche Möglichkeit zur transkriptionellen Kontrolle	22
1.5.3. Limitierte Proteolyse zur Prozessierung von NF- κ B1 und NF- κ B2	24
1.6. T-Zellentwicklung und -funktion: NF- κ B als Regulator der T-Lymphopoese	26
1.6.1. Stadien der T-Zellentwicklung	26
1.6.2. Regulation von verschiedenen Stadien der T-Zellentwicklung und -funktion durch NF- κ B	27
1.7. B-Zellentwicklung und -funktion: NF- κ B als Regulator verschiedener B-zellspezifischer Funktionen	29
1.7.1. Stadien der B-Zellentwicklung	29

1.7.2. NF- κ B-ein kritischer Regulator verschiedener Stadien der B-Zellentwicklung	31
1.8. Beteiligung von NF- κ B an inflammatorischen Reaktionen des Endothels	33
2. Zielsetzung der Arbeit	36
3. Ergebnisse	37
3.1. Untersuchung des Einflusses verschiedener I κ B-Mutanten auf die T-und B-Zellentwicklung in transgenen Mäusen basierend auf dem Tet-off-System	37
3. 1.1. Charakterisierung der Expressionsstärke des Transgens in verschiedenen tTA/tetI κ B α -Kombinationen	39
3.1.2. Effekt des tTA-abhängigen I κ B α auf die Thymozytenentwicklung und –aktivierung in den transgenen Tieren	42
3.1.3 Effekt des tTA-abhängig exprimierten I κ B α auf die B-Zell-Differenzierung in den transgenen Mäusen	49
3.1.3.1. B-Zell-Differenzierung in Knochenmark und Milz der transgenen Mäuse	49
3.1.3.2. <i>In vitro</i> Differenzierung von prä-B-Zellen aus tTA/tetI κ B α -transgenen Mäusen	51
3.1.3.3. <i>In vitro</i> Differenzierung von prä-B-Zellen aus doppeltransgenen Mäusen in einem <i>ikba</i> ^{-/-} Hintergrund	61
3.1.4. Etablierung und Charakterisierung von tetI κ B β - und tetI κ B ϵ -transgenen Mauslinien	67
3.1.4.1. pBi5 I κ B β und pBi5 I κ B ϵ ermöglichen eine konditionale Expression der inserierten Ge-ne und des Luziferasegens	68
3.1.4.2. Herstellung und Etablierung von transgenen Mauslinien	69
3.1.4.3. Vergleich der Expressionsstärke des Transgens in verschiedenen tTA/tetI κ B β -Kombinationen	71
3.1.4.4. Effekt des mutanten I κ B β auf die B- und T-Zellentwicklung in doppelt-transgenen Tieren	73
3.1.4.5. Vergleich der Expressionsstärke des Transgens in verschiedenen tTA/tetI κ B ϵ -Kombinationen	75
3.2. Einfluss retroviral transduzierter Mutanten des NF- κ B-Signaltransduktionswegs auf inflammatorische Reaktionen von Endothelzellen	78
3.2.1. Retroviraler Gentransfer in die Endothelzellen	78
3.2.2. Einfluss von transdominantem I κ B α auf die TNF- α -induzierte NF- κ B-Aktivierung in primären Endothelzellen	81
3.2.3. Effekt transdominanter I κ B-Mutanten auf die TNF- α -induzierte Expression proinflammatorischer Proteine	83
3.2.4. Proinflammatorische Genexpression in Endothelzellen mit einer kinase-inaktiven	88

Mutante von SEK	
3.2.5. Hemmung der TNF- α -induzierten endothelialen Genexpression durch kinase-inaktive Mutanten von IKK1 und IKK2	90
3.2.6. Eine konstitutiv-aktive IKK2 ist ausreichend, um die Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen zu aktivieren	92
3.2.7. Einfluss von Mutanten des NF- κ B-Signaltransduktionswegs auf inflammatorische Reaktionen von immortalisierten Endothelzellen	95
4. Diskussion	102
4.1. Untersuchung der B- und T-Zellentwicklung mit Hilfe transgener Mäuse	102
4.1.1. Die transgenen I κ B-Proteine werden nicht stark überexprimiert	102
4.1.2. Die konditionale transgene Expression von I κ B α beeinflusst die Thymozytenentwicklung, nicht jedoch die T-Zellaktivierung	104
4.1.3. Transdominantes I κ B α hemmt die <i>in vitro</i> B-Zelldifferenzierung, aber nicht die Etablierung normaler B-Zellpopulationen in der Maus	108
4.2. Beteiligung von NF- κ B und AP-1 an inflammatorischen Reaktionen des Endothels	114
4.2.1. Hemmung der proinflammatorischen Genexpression durch transdominante I κ B-Proteine	114
4.2.2. Unterschiedliche Beteiligung der I κ B-Kinasen 1 und 2 an der Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen	115
4.2.3. Eine konstitutiv-aktive IKK2-Mutante reicht aus, um proinflammatorische Genexpression in der Abwesenheit von TNF- α zu aktivieren	117
4.2.4. Der JNK/AP-1-Signalweg spielt nur eine untergeordnete Rolle bei der Kontrolle der proinflammatorischen Genexpression	120
4.2.5. Die Adhäsion und Transmigration von Monozyten durch die endotheliale Zellschicht wird durch NF- κ B beeinflusst	121
5. Methoden	124
5.1. Standardmethoden	124
5.1.1. Zentrifugation	124
5.1.2. Ethanol-Präzipitation von DNA	124
5.1.3. Isopropanol-Präzipitation von DNA	124
5.1.4. Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	124
5.1.5. Konzentrationsbestimmung von DNA	125
5.2. Klonierung von DNA-Fragmenten	125

5.2.1. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	125
5.2.2. Partialverdau von Plasmid-DNA	125
5.2.3. Die Klenow-Reaktion	126
5.2.4. Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren	126
5.2.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	127
5.2.5.1. Phenol-Extraktionsmethode	127
5.2.5.2. Aufreinigung durch DEAE-Papier	127
5.2.6. Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren	127
5.2.7. Transformation chemokompetenter Bakterien	128
5.2.7.1. Transformation von Ligationsansätzen	128
5.2.7.2. Retransformation mit Plasmid-DNA aus einer Maxi-Extraktion	128
5.3. Isolation von DNA	129
5.3.1. Plasmidpräparation im großen Maßstab („Maxipräparation“)	129
5.3.2. Plasmidpräparation in kleinem Maßstab („Minipräparation“)	130
5.3.3. Präparation von genomischer DNA	130
5.4. Hybridisierung von DNA in einer Southern-Blot-Analyse	131
5.5. Radioaktive Markierung von DNA-Proben	131
5.5.1. Markierung von Oligonucleotiden mit „Klenow“-Polymerase	131
5.5.2. Markierung von DNA-Fragmenten durch „Random Priming“	132
5.5.3. Aufreinigung radioaktiv markierter Proben	132
5.6. Sequenzierung von DNA	132
5.7. Genotypisierung von transgenen und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Mäusen	133
5.7.1. Genotypisierung durch Southern-Blot-Analyse	133
5.7.2. Genotypisierung durch PCR-Analysen	133
5.8. Herstellung von Proteinextrakten	134
5.8.1. Proteinextrakte aus Gewebe	134
5.8.1.1. durch Homogenisieren im Ultra-Turrax	134
5.8.1.2. durch Homogenisieren in flüssigem Stickstoff	134
5.8.2. Proteinextrakte aus Zelllinien	135
5.8.2.1. Extrakte für Luziferase- und β -Galaktosidase-Messungen	135
5.8.2.2. Gesamtzellextrakte für Western Blots und Gelretardationsanalysen	135
5.9. Analyse von Proteinen	136
5.9.1. Bestimmung der Proteinkonzentration durch eine Bradford-Messung	136
5.9.2. SDS-PAGE	136

5.9.3. Western-Immunoblot	136
5.9.4. Gelretardationsanalysen	137
5.10. Bestimmung von Enzymaktivitäten	138
5.10.1. Messung der β -Galaktosidase-Aktivität	138
5.10.2. Messung der Luziferase-Aktivität	138
5.11. Allgemeine Zellkulturtechniken	139
5.11.1 Zentrifugation von Zellen	139
5.11.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen	139
5.11.3. Bestimmung der Lebendzellzahl	140
5.12. Aufzucht von Zellen	140
5.12.1. Kultivieren von transformierten adhärennten Zellen	140
5.12.2. Kultivieren der Endothelzellen	140
5.12.3. Etablierung und Kultivierung primärer Thymozyten	141
5.12.4. Etablierung und Kultivierung primärer prä-B-Zellen	141
5.12.4.1. Gewinnung von IL7-haltigem Kulturüberstand	141
5.12.4.2. Kultivieren der ST2-Stromazellen	141
5.12.4.3 Etablierung und Kultivierung von primären prä-B-Zellen	142
5.12.4.4. Doxyzyklin-Behandlung der prä-B-Zellen	142
5.13. Transfektionen und Infektionen von Zellen	142
5.13.1. Kalziumphosphat-Transfektion adhärennter Zellen	142
5.13.2. Stabile Transfektion der Phoenix-Zellen	143
5.13.3. Infektion der HUVEC- und HMEC-1-Zellen mit retroviralen Überständen	143
5.14. Differenzierung der prä-B-Zellen	144
5.14.1. Infektion der prä-B-Zellen mit einem bcl2-Retrovirus	144
5.14.2. Differenzierung der prä-B-Zellen durch IL7-Entzug	144
5.14.3. Differenzierung der prä-B-Zellen durch IL7-Entzug mit gleichzeitiger Stimulation mit α -CD40 und rekombinantem IL4	144
5.14.4. Gewinnung des IL4-haltigen Kulturüberstands	145
5.15. Proliferationsmessung primärer Thymozyten	145
5.16. FACS-Analysen	145
5.16.1. FACS-Analysen von Organen	145
5.16.2. FACS- Analysen von prä-B-Zellen	146
5.16.3. Intrazelluläre FACS-Färbung von HUVEC und HMEC-1	147
5.16.4. Oberflächenfärbung von HUVEC und HMEC-1	147

5.17. Aufreinigung von Monozyten aus dem peripheren Blut	148
5.18. Adhäsionsassay	148
5.19. Transmigrationsassay	149
6. Materialien	150
6.1. Allgemein verwendete Materialien	150
6.1.1. Chemikalien	150
6.1.2. Allgemein verwendete Puffer und Lösungen	150
6.1.3. Reagenzien	152
6.1.4. stimulierende Substanzen	153
6.1.5. Antibiotika	153
6.1.6. Antikörper	153
6.1.7. Enzyme	154
6.1.8. Größenstandards	155
6.1.9. Gebrauchsfertige Kits	155
6.1.10. Primer	155
6.1.11. Vektoren und Plasmide	156
6.1.12. Biologische Materialien	156
6.1.13. Membranen und Filter	158
6.2. Spezielle Puffer und Lösungen	158
6.2.1. Kultivierung von Bakterien	158
6.2.2. Aufreinigung von Plasmid-DNA	159
6.2.3. Aufreinigung von genomischer DNA	159
6.2.4. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen durch DEAE-Papier	159
6.2.5. Hybridisierung von Nukleinsäuren	159
6.2.6. Herstellung von Proteinextrakten	160
6.2.7. Bradford-Proteinbestimmung	161
6.2.8. SDS-PAGE	161
6.2.9. Western-Immunoblot	161
6.2.10. Gelretardationsanalysen	162
6.2.11. Kalziumphosphattransfektionen	162
6.2.12. β -Galaktosidase-Assay	162
6.2.13. Luziferase-Assay	163
6.2.14. FACS-Analysen	163
6.3. Material für Zellkulturarbeiten	163

6.3.1. Plastikmaterial	163
6.3.2. Medien	164
6.4. Verbrauchsmaterialien	165
6.5. Geräte	166
6.6. Datenverarbeitung	167
7. Abkürzungen	168
8. Literatur	171
9. Erklärung	186

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Geburtsort: Aschaffenburg

Geburtstag: 04.03.1974

Staatsangehörigkeit: deutsch

Konfession: katholisch

Familienstand: verheiratet, keine Kinder

Schulbildung:

9/80- 7/84 Grundschule in Sailauf

9/84- 7/93 Hanns-Seidel-Gymnasium in Hösbach mit dem Abschluss Abitur

Studium:

10/93- 4/98 Studium der Biologie an der Julius- Maximilians-
Universität in Würzburg mit dem Abschluss Diplom

Diplomarbeit: „Einfluss dominant-negativer I κ B- Proteine
auf die konstitutive und induzierte NF- κ B-Aktivität“ am
Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung
der Universität Würzburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Wirth

Promotion:

3/98- 12/02 Promotionsstudium am Institut für Medizinische Strahlen-
kunde und Zellforschung der Universität Würzburg und ab 4/00 in
der Abteilung Physiologische Chemie der Universität Ulm unter der
Anleitung von Herrn Prof. Dr. Wirth

1. Einleitung

Für den Säugerorganismus ist es essentiell, dass sich die verschiedenen Zellarten korrekt aus Vorläuferzellen entwickeln können, aber auch, dass er schnell und in geeigneter Weise auf die sich ständig verändernde Umwelt reagieren kann. An beiden Prozessen sind Veränderungen im Genexpressionsmuster beteiligt, die durch die Aktivierung bzw. Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren bewirkt werden.

Eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die in diesem Hinblick besonderes Interesse auf sich gezogen hat, ist die NF- κ B-Familie. Mitglieder dieser Familie spielen eine kritische Rolle bei der Entwicklung und Reifung von Zellen, vor allem des Immunsystems, aber auch bei der Reaktion auf äußere Reize wie z. B. entzündliche Stimuli. Ein derartig vielseitiger Transkriptionsfaktor erfordert eine genaue Regulation, die im Falle von NF- κ B durch eine zweite Familie von Proteinen, die I κ B-Proteine, erreicht wird. Diese sind in der Lage, mit NF- κ B zu interagieren und es zu hemmen. Erst durch spezifische extrazelluläre Signale, die einen I κ B-Kinase-Komplex aktivieren, kommt es zur Aktivierung von NF- κ B. Trotz intensiver Untersuchungen blieb es aber in der Vergangenheit unklar, inwieweit die verschiedenen I κ B-Proteine und Kinasen zur Regulation von NF- κ B in verschiedenen Zellsystemen beitragen.

1.1. Die NF- κ B-Familie: Transkriptionsfaktoren mit einem breiten Wirkungsspektrum

1.1.1. Struktur und Funktion

In Säugern sind bisher fünf strukturell verwandte und evolutionär konservierte Mitglieder der NF- κ B-Familie bekannt: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p105 und p50) und NF- κ B2 (p100 und p52). Diese lassen sich aufgrund ihrer Struktur in zwei Gruppen einteilen: RelA, RelB und c-Rel werden direkt als reife Proteine gebildet, die keiner weiteren Prozessierung bedürfen, während NF- κ B1 und NF- κ B2 als inhibitorische Vorläuferproteine p105 und p100 gebildet werden, die durch proteolytische

Einleitung

Prozessierung zu den Untereinheiten p50 und p52 umgebildet werden (Übersichtsartikel: (Ghosh and Karin, 2002; Karin and Ben-Neriah, 2000)).

Die Mitglieder der NF- κ B-Familie können nahezu uneingeschränkt Homo- und Heterodimere miteinander ausbilden, die an die DNA binden und transkriptionell aktiv sind. Die einzige Ausnahme hierbei bildet RelB, das nur Heterodimere mit p50 oder p52 ausbilden kann (Ryseck et al., 1995). Die verschiedenen NF- κ B-Dimere besitzen unterschiedliche Affinitäten zu κ B-Bindungsstellen, die alle vom Konsensusmotiv GGGRNYYCC (R: Purin, Y: Pyrimidin, N: beliebige Base) abgeleitet sind (Übersichtsartikel: (Ghosh and Karin, 2002; Karin and Ben-Neriah, 2000)).

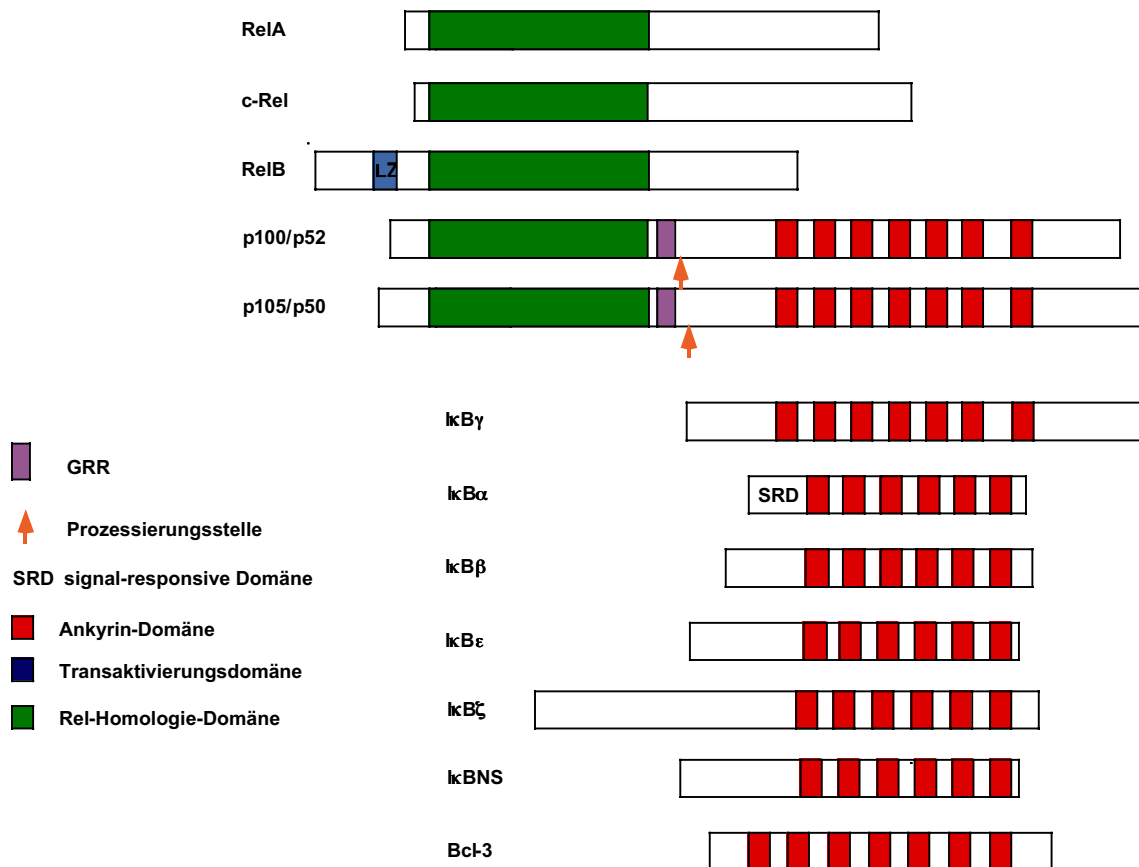


Abb. 1.1: Die NF- κ B/I κ B-Familie der Säuger

LZ: Leucin-Zipper

Allen Mitgliedern der NF- κ B-Familie gemeinsam ist eine etwa 300 Aminosäuren lange Domäne, die Rel-Homologie-Domäne (RHD) (Abb. 1). Diese vermittelt verschiedene NF- κ B-Funktionen: Dimerisierung, Kernlokalisierung, DNA-Bindung und Interaktion mit inhibitorischen Proteinen (Übersichtsartikel: (Ghosh and Karin, 2002; Karin and Ben-Neriah, 2000)). In Röntgenkristallisationsstudien konnte gezeigt werden, dass die RHD eine schmetterlingsähnliche Struktur ausbildet, die mit der DNA interagiert und sich grundlegend von DNA-Bindungsmotiven anderer Transkriptionsfaktoren unterscheidet. Diese Struktur kommt zustande durch zwei immunoglobulinähnliche Faltungen, die durch eine Linker-Region voneinander getrennt sind und von denen Schleifen ausgehen, die die DNA kontaktieren (Chen et al., 1998a; Chen et al., 1998b; Ghosh et al., 1995; Müller et al., 1995). Dadurch wird eine außerordentlich hohe Affinität zur DNA erreicht.

Die Mitglieder der beiden Gruppen unterscheiden sich darin, dass nur RelA, RelB und c-Rel potente Transaktivierungsdomänen besitzen, nicht jedoch p50 und p52, weswegen vermutet wird, dass Homodimere von p50 und p52 die Transkription hemmen anstatt sie zu aktivieren (Übersichtsartikel: (Ghosh and Karin, 2002; Karin and Ben-Neriah, 2000)).

Das Dimer, das nach Stimulation von Zellen, z. B. mit proinflammatorischen Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), aktiviert wird und somit zur schnellen Antwort einer Zelle auf äußere Reize beiträgt, ist das p50/RelA-Heterodimer, das ubiquitär exprimiert wird. Dagegen sind c-Rel- und RelB-enthaltende Komplexe hauptsächlich in lymphoiden Zellen vorhanden und dort für die konstitutive NF- κ B-Aktivität verantwortlich (Lernbecher et al., 1993; Weih et al., 1994).

Die NF- κ B-Familie kommt nicht nur in Säugern vor, sondern auch in Drosophila, wo mittlerweile drei NF- κ B-Homologe identifiziert wurden: Dorsal, Dif und Relish. Diese Proteine besitzen ebenfalls die RHD und unterliegen einer ähnlichen Regulation wie die Säugerproteine. Dabei werden Dif und Dorsal als reife Proteine translatiert, während Relish, ähnlich wie NF- κ B1 und NF- κ B2, als Vorläuferprotein gebildet wird, das anschließend proteolytisch prozessiert wird. Diese Proteine haben eine Funktion sowohl in der dorsoventralen Musterbildung während der Embryonalentwicklung als auch in der Immunantwort nach Infektion mit Pilzen oder Bakterien (Übersichtsartikel: (Silverman and Maniatis, 2001)).

Als erstes Protein mit einer RHD wurde das virale Onkogen v-Rel aus einem Retrovirus isoliert, der Vogelzellen infiziert und transformiert (Stephens et al., 1983).

1.1.2. Studien mit transgenen und NF- κ B-defizienten Mäusen

Um die Funktion der verschiedenen NF- κ B-Proteine *in vivo* näher zu untersuchen, wurden Mauslinien hergestellt, die entweder einzelne NF- κ B-Untereinheiten überexprimieren oder defizient für eine bzw. mehrere NF- κ B-Untereinheiten sind.

Die Abwesenheit von RelA führt aufgrund einer starken Apoptose von Hepatozyten zu embryonaler Letalität 15 bis 16 Tage nach der Befruchtung (Beg et al., 1995b). Diese erhöhte Apoptoserate scheint auf eine erhöhte Sensitivität gegenüber TNF- α zurückzuführen zu sein, da sich RelA-defiziente Mäuse, denen zusätzlich das Gen für TNF- α fehlt, normal entwickeln können (Doi et al., 1999). Dies unterstreicht die Bedeutung von RelA-enthaltenden Komplexen in der Regulation des Zelltods. Werden Zellen aus der fötalen Leber in bestrahlte SCID-Mäuse transplantiert, um die Entwicklung und Funktion von B- und T-Zellen zu untersuchen, zeigt sich eine Reduktion der peripheren B-Zellpopulation und Defekte in der Aktivierung der Lymphozyten, da sie nicht in der Lage sind, auf proliferative Stimuli zu reagieren und bestimmte Immunglobuline zu sezernieren (Doi et al., 1997; Horwitz et al., 1997). Außerdem ist in Mäusen, denen sowohl RelA als auch das Gen für den TNF- α -Rezeptor fehlt, die Entwicklung sekundärer lymphoider Organe gestört (Alcamo et al., 2002).

Wie bereits vorher erwähnt, ist RelB hauptsächlich in lymphoiden Zellen für die konstitutive NF- κ B-Aktivität verantwortlich. Deswegen ist es nicht überraschend, dass RelB-defiziente Mäuse verschiedene immunologische Defekte aufweisen. Zu diesen gehören T-zellabhängige myeloide Hyperplasie, Splenomegalie aufgrund extramedullärer Hämatopoese, inflammatorische Infiltrate, die aus T-Zellen bestehen und eine veränderte Struktur des Thymus (Burkly et al., 1995; Weih et al., 1995). Ebenso fehlen bestimmte Populationen von dendritischen Zellen, was eine nicht-effektive Vernichtung autoreaktiver T-Zellen und damit den inflammatorischen Phänotyp zur Folge haben könnte (Wu et al., 1998). Dagegen ist die B-Zellentwicklung in den RelB-defizienten Tieren normal, obwohl RelB neben den dendritischen Zellen hauptsächlich in reifen B-Zellen exprimiert ist und in beiden Zellen für die Antigenpräsentation benötigt wird (O'Sullivan et al., 2000; Pettit et al., 1997). Auch die Aktivierung der B-Zellen ist weitgehend normal, abgesehen von einem geringen proliferativen Defekt. Allerdings hat die veränderte Mikroarchitektur der Milz zur Folge, dass sich Keimzentren und Marginalzone nicht ausbilden können, was auf

Defekte in Stromazellen und nicht in hämatopoetischen Zellen zurückzuführen ist (Weih et al., 2001). Insgesamt zeigt der Phänotyp der RelB-defizienten Tiere, dass RelB für eine Vielzahl von Immunfunktionen notwendig ist.

Durch transgene Überexpression von RelA bzw. RelB in Thymozyten zeigten sich grundlegende Unterschiede in der Regulation RelA- bzw. RelB-enthaltender Dimere. RelA-Überexpression führt nicht zu einem Anstieg der NF- κ B-Aktivität, da gleichzeitig die Menge an I κ B α ansteigt (Perez et al., 1995). Dagegen ist die DNA-Bindungsaktivität in RelB-transgenen Thymozyten erhöht bei gleichbleibender I κ B α -Expression (Weih et al., 1996). Dies zeigt die unterschiedliche Regulation von RelA und RelB durch I κ B α . Dagegen üben beide Transgene keinen Einfluss auf Differenzierung und Aktivierung von T-Zellen aus.

Wie RelB ist auch c-Rel überwiegend in verschiedenen Zellpopulationen des hämatopoetischen Systems exprimiert. Deswegen ist es nicht überraschend, dass c-Rel-defiziente Mäuse einen Defekt in der Aktivierung von Lymphozyten und Makrophagen zeigen (Gerondakis et al., 1996; Grigoriadis et al., 1996; Grumont et al., 1998; Kontgen et al., 1995). Die Proliferation sowohl von B- als auch von T-Zellen ist beeinträchtigt, was im Falle der B-Zellen auf eine erhöhte Apoptoserate, im Falle der T-Zellen auf die fehlende Synthese des Wachstumsfaktors IL-2 zurückzuführen ist. Neben IL-2 sind auch weitere, von T-Zellen oder Makrophagen gebildete Zytokine von der c-Rel-Defizienz betroffen. Desweiteren ist das „Switching“ der Isotypen in den B-Zellen defekt. Dagegen verläuft die Differenzierung sowohl von B- als auch von T-Zellen normal.

Es wurden auch Mäuse hergestellt, denen nur der C-terminale Teil des c-Rel-Proteins fehlt. Dieses verkürzte Protein kann zwar noch an die DNA binden, aber nicht die Transkription aktivieren. Dies führt zu einem stärkeren Phänotyp als bei den c-Rel-defizienten Mäusen, da c-Rel in den Dimeren nicht durch andere NF- κ B-Proteine ersetzt werden kann (Carrasco et al., 1998). So zeigen die mutanten Mäuse ein hypoplastisches Knochenmark, vergrößerte Milzen und Lymphknoten und lymphoide Hyperplasie. Außerdem treten in diesen Mäusen Defekte in B-Zellaktivierung und Antikörpersynthese auf.

Auch NF- κ B1-defiziente Mäuse zeigen verschiedene immunologische Defekte, die hauptsächlich B-Zellen betreffen: nicht-aktivierte B-Zellen sterben schneller und die Proliferation der B-Zellen nach Stimulation mit manchen Mitogenen ist gehemmt (Grumont et al., 1998; Sha et al., 1995; Snapper et al., 1996). Ebenso sind sie nicht

in der Lage, auf Antigenstimulation zu reagieren und das „switching“ der Isotypen durchzuführen (Snapper et al., 1996).

NF- κ B2 wird, wie RelB und c-Rel, hauptsächlich in verschiedenen hämatopoetischen Geweben exprimiert und p52, die prozessierte Form, bildet hauptsächlich Dimere mit RelB. Deswegen ähnelt der Phänotyp der NF- κ B2-defizienten Mäuse auch dem der RelB-defizienten Mäuse: sie zeigen auch Defekte in der Bildung der Marginalzone und der Keimzentren (Caamano et al., 1998; Franzoso et al., 1998). Mit einer chemisch herbeigeführten Mutation, die zu einem Abbruch der Translation in der DNA-bindenden Domäne von NF- κ B2 führt, konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (Miosge et al., 2002). Außerdem konnte mit diesen Mäusen gezeigt werden, dass diese Defekte zellautonom für die B-Zelllinie sind.

Um zu untersuchen, wie sich die verschiedenen NF- κ B-Untereinheiten gegenseitig ergänzen und ob bei Ausfall eines Gens seine Funktion von anderen Untereinheiten übernommen wird, wurden Mäuse hergestellt, denen mehrere NF- κ B-Untereinheiten fehlen. Dabei zeigten sich zum Teil überraschende neue Phänotypen.

Das gleichzeitige Fehlen von NF- κ B1 und NF- κ B2 führt zu einem Defekt in der Knochenentwicklung, der unter dem Namen Osteopetrose bekannt ist (Franzoso et al., 1997b; Iotsova et al., 1997). Dieser ist gekennzeichnet durch eine Verdichtung der Knochen, da keine Resorption der Knochensubstanz stattfindet. Diese Resorption wird in Wildtypmäusen von Osteoklasten durchgeführt, die sich im Knochenmark unter Einfluss verschiedener Zytokine aus myeloiden Vorläufern entwickeln. Dies zeigt, dass NF- κ B1 und NF- κ B2 redundant bei der Entwicklung der Osteoklasten aus hämatopoetischen Vorläuferzellen sind. Zusätzlich sind in den doppelt-mutanten Tieren die B-Zellen stärker betroffen als in den einfach-mutanten: die B-Zell-Differenzierung findet nur bis zum IgM⁺IgD⁻ Stadium statt, reife B-Zellen können sich nicht entwickeln (Franzoso et al., 1997b).

Wird zusätzlich zum Gen für NF- κ B1 das Gen für RelA deletiert, zeigt sich bei Transplantation fötaler Leberzellen ein massiver B-Zelldefekt: die B-Zellentwicklung ist im lymphoiden Vorläuferstadium arretiert, da ein für das Überleben der Vorläufer wichtiger Faktor fehlt (Horwitz et al., 1997). Wird dieser von kotransplantierten Wildtyp-Knochenmarkszellen gebildet, können sich B-Zellen bilden, die aber unfähig sind, nach Mitogenstimulation zu proliferieren.

Die gleichzeitige Abwesenheit von NF- κ B1 und RelB führt zu einer Verstärkung der inflammatorischen Infiltrate, was zum baldigen Tod der Tiere führt (Weih et al., 1997a). Außerdem ist die B220⁺ B-Zellpopulation stark vermindert.

Im Gegensatz zu den NF- κ B1/NF- κ B2, NF- κ B1/RelA und NF- κ B1/RelB doppelt-defizienten Mäusen zeigen Mäuse, denen sowohl NF- κ B1 als auch c-Rel fehlt, keinen Block in der B-Zellentwicklung, sondern verstärkte proliferative und „switching“-Defekte. Außerdem sind reifere B-Zellpopulationen wie die folliculären und die Mantelzellen nur in reduziertem Ausmaß vorhanden. Nach Immunisierung sind die Mäuse nicht in der Lage, Keimzentren auszubilden (Pohl et al., 2002).

Der gleichzeitige Verlust von RelA und c-Rel übt Effekte auf mehrere hämatopoetische Zellpopulationen aus. Neben einer Reduktion des peripheren B- und T-Zellpools ist auch die Differenzierung von Erythrozyten und Monozyten beeinträchtigt (Grossmann et al., 1999; Grossmann et al., 2000).

Die Untersuchungen an Mäusen, denen mehr als eine NF- κ B-Untereinheit fehlt, zeigen die starke Redundanz der NF- κ B-Proteine, da in allen Fällen die Phänotypen der einfach-defizienten Mäuse verstärkt wurden oder Phänotypen in ganz anderen Organsystemen beobachtet wurden. Dies macht es schwierig, selektiv die Beteiligung der einzelnen Proteine an *in vivo* Prozessen zu beurteilen.

1.2. Die I κ B-Familie: Inhibitoren als kritische Regulatoren transkriptioneller Aktivität

1.2.1. Struktur und Funktion der I κ B-Proteine

Auf der Suche nach dem Regulationsmechanismus von NF- κ B wurde festgestellt, dass seine Aktivität hauptsächlich durch die Assoziation mit inhibitorischen Proteinen, den I κ B-Proteinen, kontrolliert wird. Diese bilden wie NF- κ B eine Familie, zu der momentan zehn Mitglieder gehören: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , I κ B ζ , I κ BNS, p100 und p105 (die Vorläufer von p52 und p50) sowie Bcl3 und das Drosophila-Homolog cactus (Übersichtsartikel: (Whiteside and Israel, 1997)) (Fiorini et al., 2002; Yamazaki et al., 2001)). Die Proteine dieser Familie sind gekennzeichnet durch fünf bis sieben Wiederholungen eines Ankyrin-Motivs (Abb. 1.1). Dieses dient zur

Interaktion mit anderen Proteinen; im Falle der I κ B-Proteine dient es zur Wechselwirkung mit der Rel-Homologie-Domäne der NF- κ B-Proteine. In Röntgenkristallisationsstudien konnte gezeigt werden, dass die Ankyrinmotive von I κ B α einen Zylinder bilden, von dem Schleifen ausgehen, die mit beiden NF- κ B-Untereinheiten in Kontakt treten (Huxford et al., 1998; Jacobs and Harrison, 1998). Dadurch sollte die Kern-Lokalisationssequenz der Dimere sterisch maskiert werden, so dass diese nicht in der Lage sind, in den Kern zu wandern und an DNA zu binden.

Im N-Terminus von I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ befinden sich Sequenzen, die für den stimulus-abhängigen Abbau dieser I κ B-Proteine benötigt werden und auch als signal-responsive Domäne bezeichnet werden. Diese Proteine und der Signalweg zu ihrem Abbau werden in nachfolgenden Abschnitten eingehender besprochen.

I κ B ζ und I κ BNS wurden beide im Verlaufe der letzten beiden Jahre kloniert und stellen spezialisierte I κ B-Formen dar. Das nukleäre I κ B ζ wird durch proinflammatorische Stimuli induziert und dient wahrscheinlich dazu, unkontrollierte Entzündungsreaktionen zu vermeiden (Yamazaki et al., 2001). Dagegen wird I κ BNS in Thymozyten gebildet, die der negativen Selektion unterlaufen und kann Apoptose von Thymozyten hervorrufen (Fiorini et al., 2002).

I κ B γ stellt den C-terminalen Teil von NF- κ B1 dar, der die Ankyrinmotive enthält und spezifisch p50-Homodimere hemmen soll (Bell et al., 1996; Liou et al., 1992).

Das Protoonkoprotein Bcl-3 nimmt eine Sonderstellung in der Familie der I κ B-Proteine ein, da es hauptsächlich mit p50- und p52-Homodimeren interagiert. Außerdem kann es nicht nur die Transkription hemmen, sondern auch steigern, entweder durch seine Transaktivierungsdomänen oder durch das Entfernen der transkriptionell inaktiven Homodimere von der DNA (Bours et al., 1993; Fujita et al., 1993).

1.2.2. Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den signalabhängig degradierten I κ B-Proteinen I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ

Wie bereits erwähnt, besitzen I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ N-terminale Sequenzen, die für ihren stimulus-abhängigen Abbau verantwortlich sind. Diese enthalten jeweils zwei Serine, die durch drei Aminosäuren voneinander getrennt sind und die stimulus-abhängig phosphoryliert werden, und Lysine, an denen die Ubiquitylierung stattfindet. Werden die Serine zu Alaninen mutiert oder der gesamte N-Terminus deletiert, bildet

sich eine transdominante Mutante, die nicht mehr degradierbar ist und somit NF- κ B konstitutiv hemmt (Brockman et al., 1995; Chen et al., 1995; DiDonato et al., 1996; Harhaj et al., 1996; McKinsey et al., 1996; Whiteside et al., 1997).

Neben dieser strukturellen Gemeinsamkeit gibt es aber auch Unterschiede zwischen den drei I κ B-Proteinen, was ihre Spezifität für verschiedene NF- κ B-Dimere und ihren Wirkungsmechanismus betrifft.

I κ B α ist in der Lage, mit allen RelA-, RelB- und c-Rel-enthaltenden Komplexen, allerdings nicht mit p50- und p52-Homodimeren zu interagieren und sie zu hemmen. Es konnte aber auch eine verminderte Interaktion mit p52/RelB-Komplexen, wie sie in hämatopoetischen Zellen vorliegen, beobachtet werden (Dobrzanski et al., 1994; Lernbecher et al., 1994). I κ B β dagegen ist nur in der Lage, RelA-enthaltende Komplexe effizient zu hemmen, während I κ $_{\epsilon}$ relativ spezifisch für RelA- und c-Rel-enthaltende Komplexe zu sein scheint (Li and Nabel, 1997; Simeonidis et al., 1997; Thompson et al., 1995; Whiteside et al., 1997).

Entgegen dem ursprünglich postulierten Wirkungsmechanismus, dem Maskieren der NLS von NF- κ B-Dimeren im Zytoplasma, sind alle I κ B-Proteine auch in der Lage, in den Kern einzudringen und dort NF- κ B zu hemmen. Am effizientesten scheint dabei I κ $_{\alpha}$ zu sein, für das ein „Shuttling“ zwischen Kern und Zytoplasma zusammen mit NF- κ B-Dimeren nachgewiesen werden konnte (Huang et al., 2000; Johnson et al., 1999; Rodriguez et al., 1999; Tam et al., 2000). Der Import in den Kern kommt wahrscheinlich in Assoziation mit NF- κ B zustande, dessen NLS durch unvollständige Maskierung mitbenutzt wird, für den Export werden „nuclear export sequences“ (NES) von I κ B α selbst verwendet (Huang et al., 2000; Johnson et al., 1999; Malek et al., 2001). Im Normalfall überwiegt aber die zytoplasmatische Lokalisation.

Da I κ B α selbst ein von NF- κ B abhängiges Gen ist, wird es bei NF- κ B-Aktivierung zwar rasch abgebaut, aber auch schnell resynthetisiert (Chiao et al., 1994; Sun et al., 1993). Danach kann es wie beschrieben in den Kern eintreten und die Transkription beenden, indem es NF- κ B von der DNA entfernt und ins Zytoplasma zurücktransportiert (Arenzana-Seisdedos et al., 1995). Dadurch wird gewährleistet, dass die Aktivität von NF- κ B nur transient ist.

Die Mechanismen, durch die I κ B β und I κ $_{\epsilon}$ NF- κ B-Aktivität hemmen, sind weniger gut erforscht. Von I κ B β nimmt man an, dass es hauptsächlich im Zytoplasma wirkt, weil es die NLS von NF- κ B effizient maskieren kann und keine NES besitzt (Malek et

al., 2001; Tam et al., 2001). Ein weiterer Unterschied zu $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ besteht in der Geschwindigkeit des Abbaus: während $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nach Stimulation der Zellen sehr schnell abgebaut wird, verläuft die Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ langsamer, und es wird auch erst später resynthetisiert (Thompson et al., 1995). Die geringere Geschwindigkeit des Abbaus könnte auf die Assoziation mit κB -Ras-Proteinen zurückzuführen sein, die in Zellen ausschließlich mit $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ interagieren und dessen Abbau verlangsamen (Fenwick et al., 2000). Außerdem ist die inhibitorische Wirkung von $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ geringer als die von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Der Grund dafür könnte im ersten Ankyrinmotiv liegen, das die Stärke der Interaktion von $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteinen mit NF- κB -Dimeren bestimmt (Simeonidis et al., 1999). Trotz der offensichtlichen Unterschiede zwischen $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ konnte in „knock-in“-Studien gezeigt werden, dass die Expression von $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ unter der Kontrolle des $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Promotors ausreicht, um alle $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -abhängigen Funktionen zu erfüllen. Dies weist darauf hin, dass die biochemischen Unterschiede zwischen $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ nur eine untergeordnete Rolle spielen und stattdessen abweichende Expressionsstärken und -muster die funktionellen Unterschiede bewirken (Cheng et al., 1998).

$\text{I}\kappa_{\varepsilon}$, das dritte stimulusabhängige $\text{I}\kappa\text{B}$ -Protein, wurde als letztes kloniert und ist am wenigsten gut charakterisiert (Li and Nabel, 1997; Simeonidis et al., 1997; Whiteside et al., 1997). Es vereint Eigenschaften sowohl von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ als auch von $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ in sich. Es konnte gezeigt werden, dass $\text{I}\kappa_{\varepsilon}$ sich wie $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ sowohl im Zytoplasma als auch im Kern befindet und sich zwischen diesen beiden Kompartimenten bewegen kann; allerdings ist der Import in den Kern weniger effizient als der von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (Lee and Hannink, 2002). Im Kern ist $\text{I}\kappa_{\varepsilon}$ in der Lage, c-Rel-enthaltende NF- κB -Dimere von der DNA zu entfernen und in das Zytoplasma zu überführen. Außerdem ist $\text{I}\kappa_{\varepsilon}$ wie $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ NF- κB -abhängig reguliert, allerdings findet die Resynthese nach Stimulation der Zellen langsamer statt (Li and Nabel, 1997; Whiteside et al., 1997). Dies führt dazu, dass die $\text{I}\kappa_{\varepsilon}$ -kontrollierten Gene länger angeschaltet sind als die von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ kontrollierten Gene. Für eine gewisse funktionelle Überlappung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und $\text{I}\kappa_{\varepsilon}$ spricht auch, dass $\text{I}\kappa_{\varepsilon}$ in $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Fibroblasten verstärkt exprimiert wird (Whiteside et al., 1997). Eine Gemeinsamkeit zwischen $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ und $\text{I}\kappa_{\varepsilon}$ besteht darin, dass beide nach Stimulation mit NF- κB -induzierenden Agentien langsam abgebaut werden (Whiteside et al., 1997).

Die hier beschriebenen Befunde weisen darauf hin, dass verschiedene $\text{I}\kappa\text{B}$ -Moleküle unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen. Allerdings ist nicht klar, wel-

che Auswirkungen diese unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften *in vivo* haben.

1.2.3. Aufschluss über die Funktion der I κ B-Proteine durch transgene und „knock-out“-Mäuse

Um Aufschluss darüber zu erhalten, welche Auswirkungen eine fehlende oder eine konstitutive Hemmung von NF- κ B hat, wurden I κ B-defiziente und –transgene Mauslinien hergestellt.

Dabei zeigen Mäuse, denen I κ B α fehlt, den drastischsten Phänotyp: sie sterben 7 bis 10 Tage nach der Geburt aufgrund einer schweren Entzündung der Haut und einer starken Granulozytose (Beg et al., 1995a; Klement et al., 1996). Dieser Phänotyp ist zurückzuführen auf die erhöhte Expression proinflammatorischer Faktoren aufgrund konstitutiver NF- κ B-Aktivität. Bei einer genaueren Untersuchung verschiedener Zelltypen erwies sich, dass diese Anhebung der NF- κ B-Aktivität zelltyp-spezifisch ist: während Thymozyten und Splenozyten erhöhte NF- κ B-Aktivität zeigen, ist sie in embryonalen Fibroblasten normal. Wurden die Lymphozyten aus neugeborenen I κ B α -defizienten Mäusen untersucht, zeigte sich, dass die Differenzierung der B- und T-Zellen beschleunigt ist und diese stärker aktiviert sind (Chen et al., 2000a). Dagegen entwickeln sich T- und B-Zellpopulationen normal, wenn fötale Leberzellen in RAG2-defiziente Mäuse transplantiert werden, was darauf hinweist, dass extrinsische Faktoren die verstärkte Aktivierung der *ikba*^{-/-}-Lymphozyten aus neugeborenen Mäusen hervorrufen. Bei der Proliferation nach Mitogenstimulation zeigen sich Unterschiede zwischen T- und B-Zellen: während T-Zellen, denen I κ B α fehlt, weniger stark proliferieren als die Wildtyp-Zellen, ist dies bei den B-Zellen genau umgekehrt. Die basale Antikörperproduktion ist zum Teil verstärkt, während T-zellabhängige und T-zellunabhängige Immunglobulinproduktion reduziert sind. Obwohl sich reife B-Zellen nach der Transplantation entwickeln können, ist die Bildung von Keimzentren gestört. In Rag2- und I κ B α -defizienten Mäusen wurde auch die Haut untersucht, die aufgrund von hyperproliferativen Keratinozyten Symptome von Psoriasis zeigt (Chen et al., 2000b).

Neben Mauslinien, denen I κ B α fehlt, wurden auch solche hergestellt, in denen I κ B α in bestimmten Zelltypen konstitutiv-aktiv, also nicht degradierbar ist.

Systemische Expression der Mutante bestätigt die Funktion von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ bei der NF- κB -Regulation in der Haut (Schmidt-Ullrich et al., 2001). Diese Mäuse sind nicht in der Lage, Haarfollikel, Schweiß- und Tränendrüsen zu bilden, was den Symptomen der humanen Krankheit hypohydrotische ektodermale Dysplasie ähnelt.

Wenn das mutante $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in T-Zellen exprimiert wird, führt dies zu Defekten in der Zytokinproduktion und der Proliferation nach Mitogenstimulation (Boothby et al., 1997; Esslinger et al., 1997; Ferreira et al., 1999; Hettmann et al., 1999). Außerdem ist die Zahl der CD8^+ -Zellen in der Peripherie reduziert. Ein interessanter Befund ist auch, dass die konstitutive Hemmung von NF- κB Thymozyten vor $\alpha\text{-CD3}$ -induzierter Apoptose schützt, was ein wichtiger Mechanismus zur Eliminierung selbst-reaktiver Thymozyten ist (Hettmann et al., 1999).

B-zellspezifische Expression des mutanten $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ führt zu einer Hemmung der Proliferation nach B-Zell-Rezeptor-Ligation und zur Reduktion der Zahl reifer B-Zellen in der Milz (Bendall et al., 1999). Da die Abwesenheit von RelA zum Tod im Embryonalstadium aufgrund der Apoptose von Hepatozyten führt, wurde eine transgene Mauslinie hergestellt, die das nichtdegradierbare $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ induzierbar in Leberzellen exprimiert, um zu untersuchen, inwieweit die Funktion der adulten Leber von NF- κB abhängig ist (Lavon et al., 2000). Diese Tiere zeigen eine normale Leberfunktion, sind aber sehr anfällig gegenüber bakteriellen Infektionen, da Immunzellen nicht zur Leber rekrutiert werden können, um die Infektion abzuwehren.

Mäuse, die $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ in T-Zellen exprimieren, zeigen den gleichen Phänotyp wie $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -transgene Tiere (Attar et al., 1998).

Wird das Gen für $\text{I}\kappa_{\varepsilon}$ deletiert, ist der resultierende Phänotyp sehr viel milder als der der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Tiere (Memet et al., 1999). Die einzigen Effekte, die festgestellt werden konnten, sind eine zweifache Reduktion unreifer Thymozyten und eine erhöhte Expression bestimmter Immunoglobulin-Isotypen und Zytokine.

Wie bereits erwähnt, enthalten auch die Vorläuferproteine von p50 und p52, p105 und p100, Ankyrinmotive. Um die Rolle dieser $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteine bei der Regulation von NF- κB zu untersuchen, wurde nur der C-Terminus deletiert, wodurch p50 und p52 noch gebildet werden können, jedoch nicht p105 und p100.

Mäuse, denen der C-Terminus von p105 fehlt, entwickeln Splenomegalie, haben vergrößerte Lymphknoten und weisen lymphozytische Infiltrate auf (Ishikawa et al., 1998). Dieser Phänotyp könnte auf eine Hyperproliferation der B-Zellen zu-

rückzuführen sein. Dagegen zeigen die T-Zellen dieser Mäuse eine geringere Proliferationsrate.

Werden die Ankyrinmotive von p100 entfernt, findet sich ein erhöhter Anteil von Lymphozyten in verschiedenen Geweben und in den Lymphknoten, was mit der erhöhten Proliferationsrate der T-Zellen und einer erhöhten Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen korreliert (Ishikawa et al., 1997).

Bcl3-defiziente Mäuse können sich normal entwickeln, zeigen aber Defekte in antigen-spezifischen B- und T-Zellantworten, wenn sie mit verschiedenen Pathogenen infiziert werden, was auf eine gestörte Mikroarchitektur der Milz, fehlende Keimzentren und eine reduzierte Zahl von B-Zellen im Vergleich zu den T-Zellen zurückzuführen sein könnte (Franzoso et al., 1997a). Eine transgene Überexpression von Bcl3 in Thymozyten führt zu einer Steigerung der DNA-Bindung von p50-Homodimeren (Caamano et al., 1996).

1.3. Der I κ B-Kinase-Komplex: Integrator für viele NF- κ B-induzierende Stimuli

1.3.1. Zusammensetzung des Komplexes aus Kinasen und strukturellen Komponenten

Nachdem die Phosphorylierung der N-terminalen Serinreste in den I κ B-Proteinen als der kritische Schritt in der Aktivierung von NF- κ B identifiziert worden war, begann die Suche nach der Kinase, die diese Phosphorylierung durchführt. Im Laufe der Jahre wurden mehrere Kinasen gefunden, die I κ B α *in vitro* phosphorylieren können, dies allerdings nicht stimulus-abhängig und nicht an den kritischen Serinen tun. Es dauerte bis 1997, die beiden Kinasen IKK1 (oder IKK α) und IKK2 (oder IKK β) zu identifizieren, die diese Eigenschaften besitzen (DiDonato et al., 1997; Mercurio et al., 1997; Régnier et al., 1997; Woronicz et al., 1997; Zandi et al., 1997).

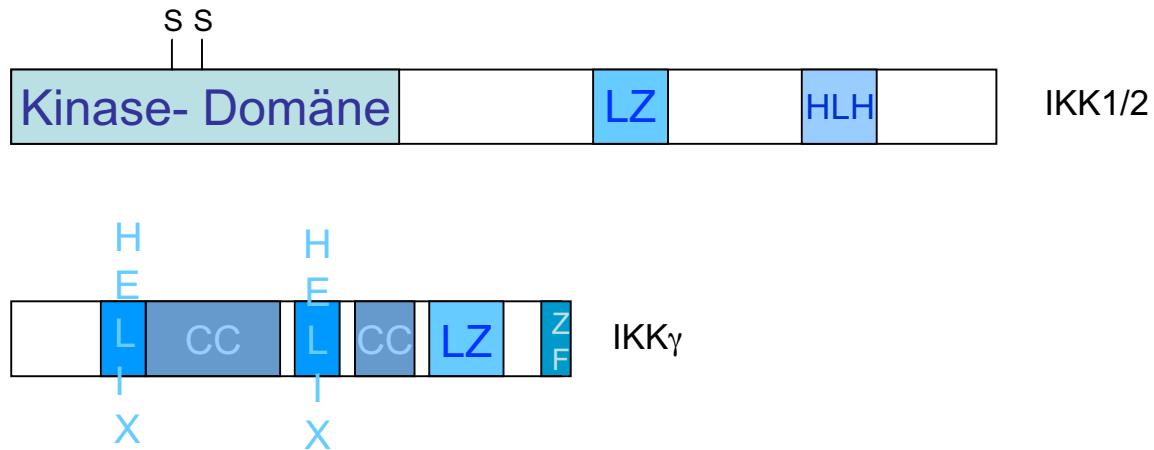


Abb. 1.2: Die essentiellen Komponenten des I κ B-Kinase-Komplexes (nach (Karin and Ben-Neriah, 2000))

Die beiden für die Aktivierung von IKK₁ und IKK₂ benötigten Serinreste im „activation loop“ sind markiert.

LZ: Leucin-Zipper; HLH: Helix-Loop-Helix; CC: coiled coil; ZF: Zinkfinger

Neben der N-terminalen Kinasedomäne besitzen die beiden stark homologen Kinasen ein Leucin-Zipper- und ein Helix-Loop-Helix-Motiv (Abb. 1.2). Durch den Leucin-Zipper bilden die beiden Kinasen Homo- oder Heterodimere, während die Helix-Loop-Helix-Domäne die Aktivität der Kinasen zu regulieren scheint (Delhase et al., 1999; Woronicz et al., 1997; Zandi et al., 1998; Zandi et al., 1997). Eine weitere wichtige Komponente sind zwei konservierte Serinreste im „activation loop“ der Kinasedomäne, deren Phosphorylierung die Aktivierung der Kinase bewirkt (Delhase et al., 1999; Ling et al., 1998; Mercurio et al., 1997). Diese Phosphorylierung kann auch eine Autophosphorylierung sein, da sowohl IKK₁ als auch IKK₂ sich selbst phosphorylieren können (Ling et al., 1998). Außerdem konnte gezeigt werden, dass IKK₁ in der Lage ist, IKK₂ nach Stimulation mit bestimmten NF- κ B-induzierenden Substanzen zu aktivieren, aber nicht umgekehrt (O'Mahony et al., 2000; Yamamoto et al., 2000).

Bereits bei der Aufreinigung der Kinasen stellte sich heraus, dass diese in einem hochmolekularen Komplex mit einer Masse von 700 bis 900 kDa vorliegen (DiDonato et al., 1997; Mercurio et al., 1997; Zandi et al., 1997). Dieser Komplex enthält neben den beiden katalytischen Untereinheiten eine dritte Komponente, die für die Kinase-

Funktion essentiell ist und die IKK γ oder NEMO (NF- κ B essential modulator), seltener IKKAP1 oder FIP-3 genannt wird (Li et al., 1999b; Mercurio et al., 1999; Rothwarf et al., 1998; Yamaoka et al., 1998). Dieses Protein besteht hauptsächlich aus Helices, unterbrochen von „coiled-coil“-Strukturen und einem Leucin-Zipper-Motiv (Abb.1.2) (Rothwarf et al., 1998).

IKK γ scheint im IKK-Komplex mehrere wichtige Funktionen zu erfüllen. Einerseits ist es notwendig für den korrekten Zusammenbau des I κ B-Kinase-Komplexes, in dem IKK1/IKK2-Heterodimere oder IKK2-Homodimere durch Interaktionen zwischen zwei IKK γ -Molekülen zusammengehalten werden (Miller and Zandi, 2001). Die Bedeutung dieser Interaktion wird dadurch unterstrichen, dass ein Peptid mit der Sequenz der NEMO-bindenden Domäne von IKK2 NF- κ B-Aktivierung hemmen kann (May et al., 2000). Außerdem scheint der C-terminale Teil von NEMO, der das Leucin-Zipper- und ein Zinkfinger-Motiv enthält, wichtig für die Interaktion mit Aktivatoren des IKK-Komplexes zu sein (Agou et al., 2002; Makris et al., 2002). Auch die I κ B-Proteine als Substrate scheinen durch IKK γ zum Kinase-Komplex rekrutiert zu werden (Yamamoto et al., 2001). Andererseits wird aber auch IKK γ durch IKK2 phosphoryliert, was dessen stimulatorische Aktivität moduliert (Prajapati and Gaynor, 2002). Dies unterstreicht die gegenseitigen Abhängigkeiten der Komponenten des I κ B-Kinase-Komplexes.

Es wurde vermutet, dass neben den drei essentiellen Komponenten des I κ B-Kinase-Komplexes weitere Proteine, wie die Kinasen MEKK-1 oder NIK, mit dem Komplex assoziiert sind, aber ein eindeutiger Beweis wurde bisher noch nicht erbracht (Cohen et al., 1998; Mercurio et al., 1997; Régnier et al., 1997). Zusätzlich wurden Cdc37 und Hsp90 als Komponenten des I κ B-Kinase-Komplexes identifiziert, die für die TNF- α -induzierte IKK-Aktivierung essentiell sind, allerdings ist nicht klar, ob sie eine funktionelle Bedeutung im Komplex haben (Chen et al., 2002).

1.3.2. „Knock“-out- und transgene Tiere zur Untersuchung von Komponenten des I κ B-Kinase-Komplexes

Um herauszufinden, welche spezifischen Funktionen die Komponenten des I κ B-Kinase-Komplexes in der NF- κ B-Aktivierung erfüllen, wurden Mäuse hergestellt,

denen entweder ein bzw. mehrere IKK-Gen(e) fehlt oder die ein IKK-Gen überexprimieren.

Mäuse, denen IKK1 fehlt, sterben wenige Stunden nach der Geburt und zeigen charakteristische Defekte in der Morphogenese: die Gliedmaßen wachsen nicht aus, während das Skelett sich normal entwickelt (Hu et al., 1999; Takeda et al., 1999). Dieser Phänotyp korreliert mit Befunden, die bei der Entwicklung von Hühnern erhoben wurden. Dort konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von NF- κ B in der Wachstumszone der Gliedmaßen zu einer Hemmung des Gliedmaßenwachstums führt (Bushdid et al., 1998; Kanegae et al., 1998). Wie IKK1 aber diesen Entwicklungsschritt reguliert, ist bisher noch nicht bekannt. Es könnte allerdings sein, dass Gene, die zu denen homolog sind, die in *Drosophila* für die embryonale Musterbildung benötigt werden und die Aktivierung von Dorsal brauchen, auch in Säugern durch NF- κ B-Familienmitglieder reguliert werden. Ein Grund dafür, dass die Gliedmaßen nicht auswachsen, scheinen Defekte in der Hautdifferenzierung sein, was in einer verdickten und stark adhärierenden Epidermis resultiert (Hu et al., 1999; Takeda et al., 1999). Interessanterweise scheint diese Funktion von IKK1 NF- κ B-unabhängig zu sein (Hu et al., 2001). Vielmehr scheint IKK1 über einen bislang unbekanntem Weg die Produktion eines löslichen Faktors zu bewirken, der die Keratinozytendifferenzierung reguliert.

Neben den sehr offensichtlichen Effekten in der Morphogenese der IKK1-defizienten Tiere zeigen diese auch einen immunologischen Defekt: wenn Knochenmarkschimären mit Zellen aus der fötalen Leber von Mäusen, denen IKK1 fehlt, hergestellt wurden, war die Population der reifen B-Zellen reduziert (Kaisho et al., 2001; Senftleben et al., 2001a). Dies ist zum Teil auf eine erhöhte Apoptoserate, aber auch auf einen spezifischen Differenzierungsdefekt zurückzuführen. Zusätzlich zeigen die B-Zellen aus den chimären Mäusen reduzierte Proliferation nach Mitogenstimulation, reduzierte Immunglobulinspiegel und T-zellabhängige Immunantworten und einen Defekt in der Bildung von Keimzentren.

Der Phänotyp der IKK2-defizienten Mäuse ähnelt dem der RelA-defizienten Tiere: sie sterben zwischen Tag 12.5 und 14 der Embryonalentwicklung aufgrund der Apoptose von Hepatozyten (Li et al., 1999a; Tanaka et al., 1999). Wie im Falle von RelA kann auch bei den *ikkb*^{-/-} Mäusen diese Letalität durch die Abwesenheit von TNF- α aufgehoben werden, was darauf hinweist, dass ein veränderter TNF- α -Signalweg die Apoptose der Hepatozyten hervorruft (Li et al., 1999a).

Durch den Transfer von Zellen aus der fötalen Leber in letal bestrahlte Mäuse konnte auch ein Defekt in der B- und T-Zellentwicklung gezeigt werden. Mäuse, die mit IKK2-defizienten Zellen rekonstituiert wurden, entwickeln nur Thymusrudimente, was in einer dramatischen Reduktion der unreifen und reifen T-Zellpopulationen resultiert (Senftleben et al., 2001b). Durch eine Kreuzung mit TNF- α -Rezeptor-1-defizienten Mäusen konnten sowohl ein intakter Thymus als auch normale T-Zellpopulationen wiederhergestellt werden. Deswegen nimmt man an, dass IKK2 für den Schutz der T-Zellen vor TNF- α -induzierter Apoptose verantwortlich ist. Neben der T-Zellentwicklung ist auch die Entwicklung der B-Zellen in den Chimären stark beeinträchtigt, da bereits die gemeinsamen Vorläuferzellen für B- und T-Zellen fehlen (Senftleben et al., 2001b).

Um die Funktion von IKK2 in B-Zellen näher zu untersuchen, wurde IKK2 mit Hilfe des Cre/loxP-Systems spezifisch in der B-Zelllinie ausgeschaltet (Pasparakis et al., 2002b). Es zeigte sich, dass die Population der reifen B-Zellen in der Milz stark reduziert ist, was auf eine erhöhte Umsatzrate der B-Zellen in der Milz zurückzuführen ist. Mäuse, die eine dominant-negative IKK2_Mutante in B-Zellen exprimieren, zeigen normale B-Zellentwicklung, aber Defekte in Proliferation und Immunglobulinsekretion (Ren et al., 2002b).

Das Cre/loxP-System wurde auch angewendet, um IKK2 in den Zellen der Haut zu entfernen (Pasparakis et al., 2002a). Dabei zeigte sich, dass IKK2, anders als IKK1, nicht essentiell für die Entwicklung der Epidermis ist. Allerdings wurde ein schwerer inflammatorischer Phänotyp in der Haut festgestellt, der von TNF- α vermittelt wird.

Wenn man die Ergebnisse der Studien mit IKK2-defizienten Mäusen zusammenfasst, erkennt man, dass IKK2 essentiell notwendig für die Kontrolle TNF- α -vermittelter Signale in verschiedenen Zellsystemen ist.

Vergleicht man die Phänotypen der Tiere ohne IKK1 oder IKK2 miteinander, zeigt sich, dass die beiden Kinasen nichtredundante, essentielle Funktionen ausüben. Dies zeigt sich auch in der Abhängigkeit der zytokin-vermittelten NF- κ B-Induktion von den beiden Kinasen: während die Abwesenheit von IKK1 diese nicht beeinflusst, ist sie in IKK2-defizienten Tieren stark verringert (Hu et al., 1999; Li et al., 1999a; Takeda et al., 1999; Tanaka et al., 1999).

Fehlen beide Kinasen, treten zusätzliche Defekte bei der Neurulation auf, die mit einer erhöhten Apoptoserate neuronaler Zellen einhergehen, was zeigt, dass die beiden Kinasen redundant bei der Regulation der Neurulation sind (Li et al., 2000).

Um die differentielle Funktion von IKK1 und IKK2 in der T-Zellentwicklung und –funktion näher zu untersuchen, wurden transgene Mäuse hergestellt, die dominant-negative Mutanten der Kinasen unter der Kontrolle eines T-zellspezifischen Promotors exprimieren (Ren et al., 2002a). Diese zeigen normale T-Zellentwicklung, aber Defekte in der Aktivierung. IKK2-transgene Thymozyten reagieren nicht auf Stimulation mit dem Mitogen α -CD3. Dadurch wurde IKK2 als die TCR-induzierte Kinase identifiziert. Dagegen können die beiden Kinasen bei der Induktion von Zytokinen nach α -CD3/ α -CD28-Stimulation füreinander kompensieren und nur bei komplettem Funktionsverlust beider Kinasen sind Defekte festzustellen.

Ähnlich wie RelA- und IKK2-defiziente Mäuse sterben auch Tiere, denen IKK γ fehlt, aufgrund TNF- α -vermittelter Apoptose von Leberzellen bereits im Embryonalstadium (Makris et al., 2000; Rudolph et al., 2000). Von diesem Phänotyp sind ausschließlich Männchen betroffen, da IKK γ X-chromosomal vererbt wird und somit in Männchen schon ein mutantes Allel ausreicht, um die Symptome hervorzurufen. Heterozygote Weibchen zeigen einen Hautphänotyp, der durch inflammatorische Infiltration, erhöhte Proliferation und Apoptose von Keratinozyten gekennzeichnet ist (Makris et al., 2000; Schmidt-Supprian et al., 2000). Diese Symptome ähneln der humanen Krankheit Incontinentia Pigmenti, und in der Tat konnte bewiesen werden, dass in betroffenen Individuen das Gen für IKK γ mutiert ist (Smahi et al., 2000). Daneben weisen die heterozygoten Weibchen auch eine veränderte Thymus- und Milzarchitektur auf, die hauptsächlich durch massive Apoptose hervorgerufen wird (Makris et al., 2000). Ähnlich wie IKK2 wurde auch IKK γ B-zellspezifisch ausgeschaltet, was wie bei den IKK2-defizienten Mäusen in einer Reduktion der Zahl reifer B-Zellen in der Milz resultiert (Pasparakis et al., 2002b).

Die mit IKK γ -defizienten Mäusen erhaltenen Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung dieser regulatorischen Komponente des I κ B-Kinase-Komplexes.

1.4. Induktoren und Zielgene von NF- κ B: Hinweise auf die universelle Bedeutung des Transkriptionsfaktors für die normale Physiologie und die Entwicklung von Krankheiten

Die Beschreibung der Phänotypen von Mäusen, denen eine oder mehrere Komponenten des NF- κ B-Systems fehlen, hat bereits gezeigt, dass NF- κ B in viele

verschiedene physiologische Prozesse eingreift. Dies spiegelt sich auch wider in der Vielzahl der NF- κ B-induzierenden Stimuli und der Zielgene.

So kann NF- κ B zum Beispiel durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder IL-1 aktiviert werden. Im Anschluss daran reguliert es die Expression unter anderem von Zelladhäsionsmolekülen und Chemokinen, die inflammatorische Zellen aus der Blutbahn zum darunter liegenden Gewebe rekrutieren (Übersichtsartikel: (Pahl, 1999). Da ein Überschießen dieser Reaktion pathologische Prozesse wie Asthma, rheumatoide Arthritis oder Atherosklerose zur Folge hat, muss die Aktivität von NF- κ B streng reguliert werden. Wird NF- κ B in Folge pathologischer Prozesse zu stark aktiviert, bietet es einen Angriffspunkt für anti-inflammatorische Medikamente wie Aspirin oder Glucocorticoide (Übersichtsartikel: (Yamamoto and Gaynor, 2001)).

Daneben spielt NF- κ B sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunität eine Rolle. Zum einen wird es durch mikrobielle Produkte, die an so genannte Toll-like-Rezeptoren binden, aktiviert und reguliert die Expression von Genen für Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Akutphasenproteine und induzierbare Enzyme wie iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase). Dadurch wird eine erste, unspezifische Verteidigung gegen Pathogene erreicht (Übersichtsartikel: (Zhang and Ghosh, 2001)). Danach werden B- und T-Zellen aktiviert, die das Pathogen spezifisch erkennen und somit Teil der adaptiven Immunität sind. Auch an dieser Aktivierung ist NF- κ B beteiligt, da es zum Beispiel durch verschiedene Rezeptorliganden wie CD40-Ligand oder CD28-Ligand induziert wird (Übersichtsartikel: (Pahl, 1999)).

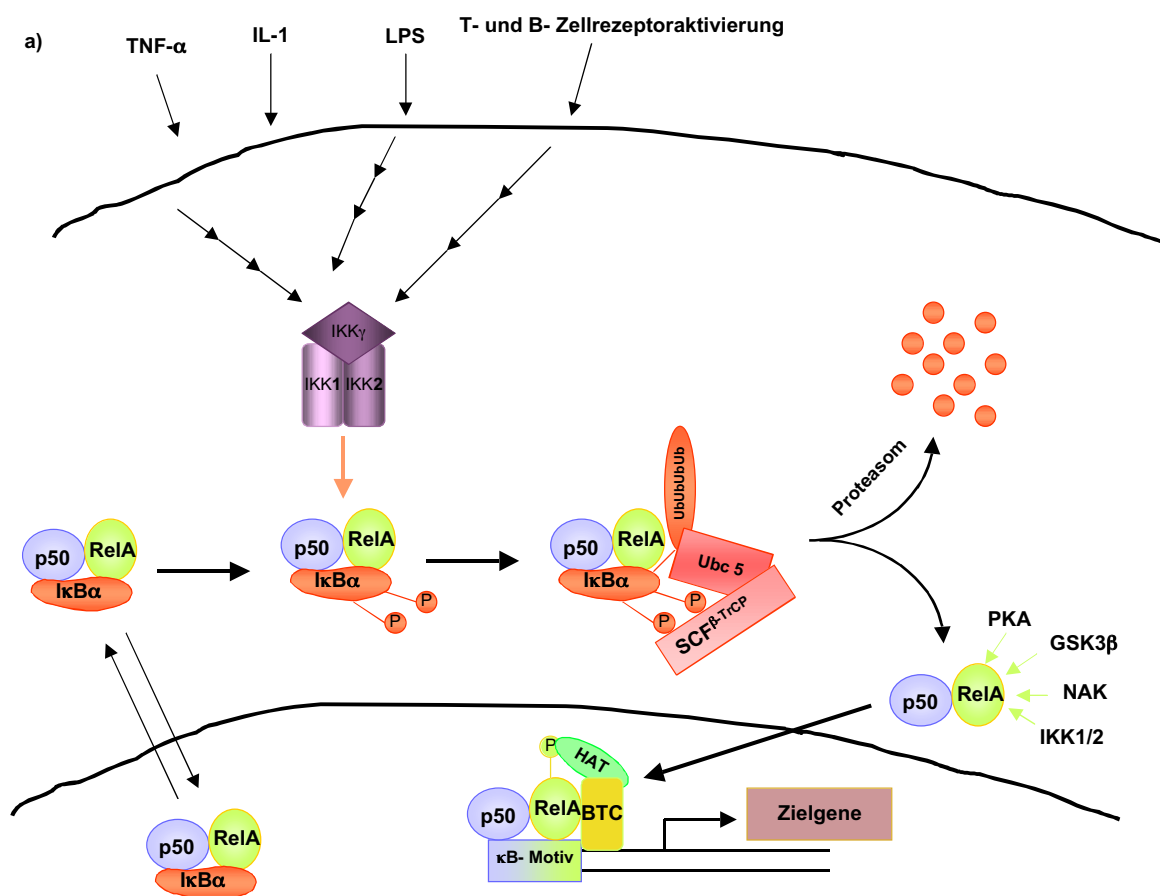
Eine weitere wichtige Rolle fällt NF- κ B bei der Regulation der Apoptose zu, was durch die Studien mit RelA- oder IKK2-defizienten Tieren eindrucksvoll unter Beweis gestellt wird. Zielgene von NF- κ B, die anti-apoptotisch wirken, sind unter anderem die c-IAPs (cellular inhibitors of apoptosis) und Mitglieder der bcl2-Familie (Übersichtsartikel: (Karin and Lin, 2002)). Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass NF- κ B unter bestimmten Umständen und in bestimmten Zelltypen, z. B. Nervenzellen, pro-apoptotisch wirken kann (Übersichtsartikel: (Denk et al., 2000)).

Diese Beispiele zeigen, dass NF- κ B in viele verschiedene zelluläre Prozesse eingreift, dass aber auch eine genaue Kontrolle der NF- κ B-Aktivität nötig ist, um pathologische Reaktionen zu vermeiden.

1.5. Die induzierbare Aktivierung von NF- κ B: klassische Wege und alternative Mechanismen

1.5.1. Aktivierung durch I κ B-Abbau-der klassische Weg

Wie vorher bereits beschrieben, führt die Behandlung von Zellen mit den meisten NF- κ B-induzierenden Stimuli zur Phosphorylierung der I κ B-Proteine I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ durch den I κ B-Kinase-Komplex (Abb. 1.3a).



b)

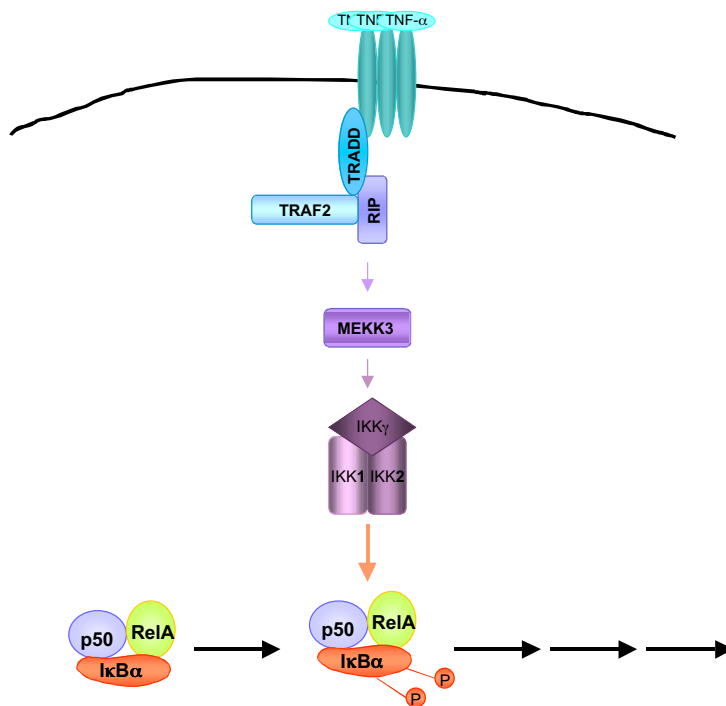


Abb. 1.3: Der klassische Weg zur NF-κB-Aktivierung

a) IκB-Abbau vermittelt durch den IκB-Kinase-Komplex

Gezeigt ist auch die Phosphorylierung von RelA durch verschiedene Kinasen und das „Shutteln“ IκBα-gebundener NF-κB-Komplexe zwischen Zytoplasma und Kern.

b) Aktivierung des IκB-Kinase-Komplexes durch den TNF-α-Rezeptor 1

Die phosphorylierten Serine dienen anschließend als Erkennungsstellen für die Ubiquitin-Ligase $SCF^{\beta-TrCP}$. Deren Rezeptorkomponente $\beta-TrCP$ ist in der Lage, die Proteinsequenz zwischen den beiden Serinen zu erkennen. Danach wird das IκB-Protein durch Zusammenarbeit von $SCF^{\beta-TrCP}$ mit dem ubiquitin-konjugierenden Enzym UbcH5 an zwei N-terminalen Lysinresten ubiquitinyliert (Übersichtsartikel: (Ben-Neriah, 2002)). Diese Polyubiquitinylierung wird vom Proteasom erkannt, welches den Abbau der IκB-Proteine durchführt. Dadurch werden die NF-κB-Dimere freigesetzt, die in den Kern wandern, an die DNA binden und die Transkription der Zielgene bewirken können.

Da der Signalweg vom TNF-α-Rezeptor sehr gut charakterisiert ist und ein Teil meiner Experimente mit TNF-α-Stimulation verbunden ist, soll dieser Weg etwas näher beschrieben werden.

TNF- α ist ein Homotrimer, das an den ebenfalls trimeren Rezeptor 1 bindet (Abb. 1.3b) (Chen and Goeddel, 2002). Dies bewirkt die Rekrutierung des Adaptor-Proteins TRADD (TNF receptor-associated death domain), das wiederum die beiden Adaptor-Proteine TRAF2 (TNF receptor-associated Factor 2) und RIP (receptor interacting protein) zum Rezeptor bringt. Von den beiden Adaptor-Proteinen ist nur RIP essentiell für die NF- κ B-Induktion durch TNF- α , wie der komplette Verlust der NF- κ B-Aktivierung in RIP-defizienten, nicht jedoch in TRAF2-defizienten Mäusen zeigt (Kelliher et al., 1998; Yeh et al., 1997). Die Interaktion der beiden Proteine mit dem I κ B-Kinase-Komplex bringt die Kinase zum Rezeptorkomplex, wo sie aktiviert wird. Allerdings gibt es widersprüchliche Publikationen darüber, ob eine TRAF2-IKK1/IKK2-Interaktion oder eine RIP/IKK γ -Interaktion diese Rekrutierung verursacht (Devin et al., 2000; Devin et al., 2001; Zhang et al., 2000). Nachdem sie zum TNF- α -Rezeptor gebracht wurde, wird die I κ B-Kinase phosphoryliert und dadurch aktiviert. Die Kinase, die diese Phosphorylierung durchführt, konnte bisher noch nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Es wurde vermutet, dass die MAP3-Kinasen NIK oder MEKK-1 eine Rolle spielen, allerdings zeigen die Mäuse, denen diese Kinasen fehlen, keinen Defekt in der IKK-Aktivierung nach TNF- α -Stimulation, was gegen diese Vermutung spricht (Yin et al., 2001; Yujiri et al., 1998). Im Gegensatz dazu haben MEKK3-defiziente Fibroblasten einen Defekt in der NF- κ B-Aktivierung nach TNF- α -Stimulation. Es konnte auch gezeigt werden, dass MEKK3 mit RIP interagiert und den I κ B-Kinase-Komplex phosphorylieren kann (Yang et al., 2001). Dies macht es wahrscheinlich, dass MEKK3 an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt ist.

Nach der Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes findet die Phosphorylierung und der Abbau von I κ B α sowie der nukleäre Transport der NF- κ B-Komplexe statt wie bereits besprochen.

1.5.2. Modifikation von NF- κ B: eine zusätzliche Möglichkeit zur transkriptionellen Kontrolle

Neben der Kontrolle der nukleären Translokation und der DNA-Bindung kann die NF- κ B-abhängige Transkription auch durch Modifikationen an den NF- κ B-Untereinheiten selbst beeinflusst werden.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass RelA nach Stimulation von Zellen an mehreren Stellen phosphoryliert wird (Naumann and Scheidereit, 1994; Neumann et al., 1995). Später wurde dann die katalytische Untereinheit der PKA (cAMP-abhängige Proteinkinase) mit zytosolischen NF- κ B/I κ B-Komplexen aufgereinigt. Diese Kinase wird nach I κ B-Abbau aktiviert und kann RelA phosphorylieren (Zhong et al., 1997). Durch diese Modifikation wird die DNA-Bindung von RelA und seine Interaktion mit dem Koaktivator CBP (CREB binding protein)/p300 verstärkt (Zhong et al., 2002; Zhong et al., 1998).

Auch von den Kinasen GSK3 β (glykogen synthase kinase) und NAK (NF- κ B activating kinase) wird angenommen, dass sie RelA phosphorylieren können, allerdings konnte keine direkte Interaktion gezeigt werden (Bonnard et al., 2000; Hoeflich et al., 2000; Tojima et al., 2000). Die Annahme resultiert vielmehr aus Studien mit „knock-out“-Mäusen, in denen NF- κ B zwar an die DNA binden, aber die Transkription nicht aktivieren kann. Weitere Studien müssen folgen, um die Signifikanz der Phosphorylierung von RelA durch die verschiedenen Kinasen für die Erhöhung der transkriptionellen Kompetenz zu untersuchen.

Neben der Regulation des I κ B-Abbaus scheinen die I κ B-Kinasen auch die transkriptionelle Aktivität von RelA zu beeinflussen, nachdem sie selbst durch den Phosphatidylinositol 3'-Kinase/AKT-Weg aktiviert worden sind (Sizemore et al., 2002).

Ein Mechanismus, wie die Phosphorylierung von NF- κ B seine Fähigkeit, die Transkription zu aktivieren, beeinflusst, könnte die Interaktion mit Histonacetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC) sein, die durch Acetylierung oder Deacetylierung von Histonen Genloci transkriptionell kompetent oder inkompetent machen können. Für die Rekrutierung der HATs CBP/p300 und p/CAF (p300/CBP associated factor) durch NF- κ B und damit verbundene transkriptionelle Aktivierung gibt es verschiedene Hinweise (Gerritsen et al., 1997; Merika et al., 1998; Perkins et al., 1997; Sheppard et al., 1999; Zhong et al., 1998). Im Gegensatz dazu scheinen HDACs die NF- κ B-abhängige Transkription negativ regulieren zu können (Ashburner et al., 2001; Ito et al., 2000; Lee et al., 2000; Zhong et al., 2002).

Es wurde aber auch gezeigt, dass die HATs und HDACs direkt RelA modifizieren können. Das acetylierte RelA ist durch die Modifikation vor der Interaktion mit I κ B α geschützt und erst die Deacetylierung läßt die Interaktion wieder zu (Chen et al., 2001).

Im Drosophila-System hat die Phosphorylierung von „dorsal“ einen anderen Zweck: sie reguliert den Import in den Kern (Drier et al., 1999). Es wäre deshalb denkbar, dass ähnliche Regulationsmechanismen auch in Säugern eine Rolle spielen.

Auch das c-Rel-Protein wird nach Stimulation phosphoryliert, aber es gibt noch keine Hinweise darauf, welche Kinase beteiligt ist und welche Konsequenzen die Phosphorylierung hat (Fognani et al., 2000; Martin and Fresno, 2000).

1.5.3. Limitierte Proteolyse zur Prozessierung von NF- κ B1 und NF- κ B2

Im Gegensatz zum vollständigen Abbau von I κ B α , I κ B β und I κ $_{\epsilon}$ muss bei der Prozessierung von NF- κ B1 und NF- κ B2 die Degradation unvollständig bleiben, um die Proteine p50 und p52 zu erhalten. Ein wichtiges Strukturelement dafür ist die glycinreiche Region (GRR), die den kompletten Abbau verhindert (Lin and Ghosh, 1996; Orian et al., 1999).

Bis jetzt gibt es widersprüchliche Befunde darüber, ob die Prozessierung ko- oder posttranslational erfolgt (Ciechanover et al., 2001; Lin et al., 1998).

Der genaue Mechanismus der Prozessierung von p105 konnte noch nicht aufgeklärt werden, aber in mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass der Ubiquitin/Proteasomweg daran beteiligt ist (Coux and Goldberg, 1998; Orian et al., 1995; Palombella et al., 1994; Sears et al., 1998). Außerdem wird p105 durch IKK2 phosphoryliert, wobei dies aber eher zum kompletten Abbau als zur Prozessierung führt (Heissmeyer et al., 2001; Heissmeyer et al., 1999; Orian et al., 2000; Salmeron et al., 2001).

Im Gegensatz zu p105 konnten für p100 die Ereignisse, die der Prozessierung vorangehen, näher charakterisiert werden. Dabei zeigte sich eine Beteiligung der IKK $_{\epsilon}$ (Senftleben et al., 2001a). IKK1 ist in der Lage, p100 zu phosphorylieren, nachdem sie selbst von NIK, der NF- κ B-induzierenden Kinase, phosphoryliert worden ist (Abb. 1.4) (Senftleben et al., 2001a; Xiao et al., 2001b). Diese Phosphorylierung führt zur Prozessierung von p100 unter Beteiligung der SCF $^{\beta}$ -TrCP Ubiquitin-Ligase und der 19S-Proteasom-Untereinheit S9 (Fong and Sun, 2002; Fong et al., 2002). NIK kann vom Lymphotoxin- β -Rezeptor, vom BAFF-Rezeptor oder durch den CD40-Rezeptor aktiviert werden (Claudio et al., 2002; Coope et al., 2002; Dejardin et al., 2002; Kayagaki et al., 2002; Matsushima et al., 2001).

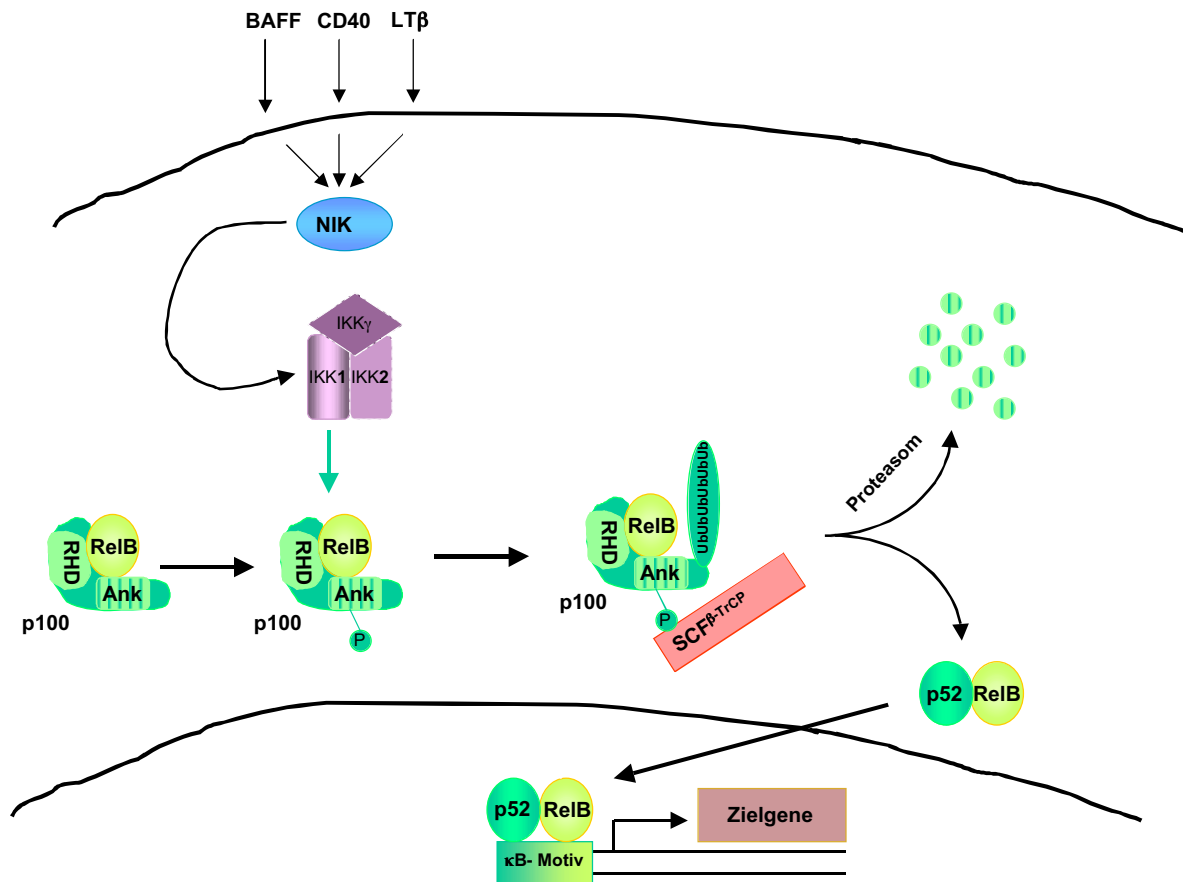


Abb. 1.4: Prozessierung von p100 als alternativer Weg der NF-κB-Aktivierung

Durch die Prozessierung von p100 werden p52/RelB-Dimere freigesetzt, die die Entwicklung lymphoider Organe durch die Regulation der Chemokin-Expression steuern. Die Bedeutung dieses Signalwegs zeigt sich darin, dass Mutanten der Komponenten dieses Weges ähnliche Defekte in der B-Zellentwicklung und der Ausbildung sekundärer lymphoider Organe aufweisen (Burkly et al., 1995; Caamano et al., 1998; Franzoso et al., 1998; Kaisho et al., 2001; Miyawaki et al., 1994; Senftleben et al., 2001a; Shinkura et al., 1999; Weih et al., 1995; Yamada et al., 2000).

Eine p100-Prozessierung, vermittelt durch IKK1, wurde auch nach Infektion von T-Zellen mit dem Retrovirus HTLV-1 (human T-cell leukemia virus) festgestellt. Hierbei scheint das retrovirale Protein Tax p100 und IKK1 miteinander in Kontakt zu bringen (Xiao et al., 2001a).

1.6. T-Zellentwicklung und -funktion: NF- κ B als Regulator der T-Lymphopoese

1.6.1. Stadien der T-Zellentwicklung

T-Zellen entwickeln sich im Thymus aus lymphoiden Vorläuferzellen. Dort können sie anhand der Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD8 in verschiedene Entwicklungsstadien eingeteilt werden (Abb. 1.5).

Zunächst exprimieren die T-Zellvorläufer weder CD4 noch CD8, das heißt, sie sind doppelt-negativ. Anschließend durchlaufen sie ein unreifes CD8-einfach-positives und ein doppelt-positives Stadium, bevor sie die Expression eines der beiden Oberflächenmarker endgültig verlieren, einfach-positiv werden und den Thymus verlassen. In der Peripherie reifen die naiven CD4⁺-Zellen durch Kontakt mit Antigenen zu Th1- und Th2-Zellen, während die CD8⁺-Zellen sich zu zytotoxischen T-Zellen entwickeln (Übersichtsartikel: (Staal et al., 2001)).

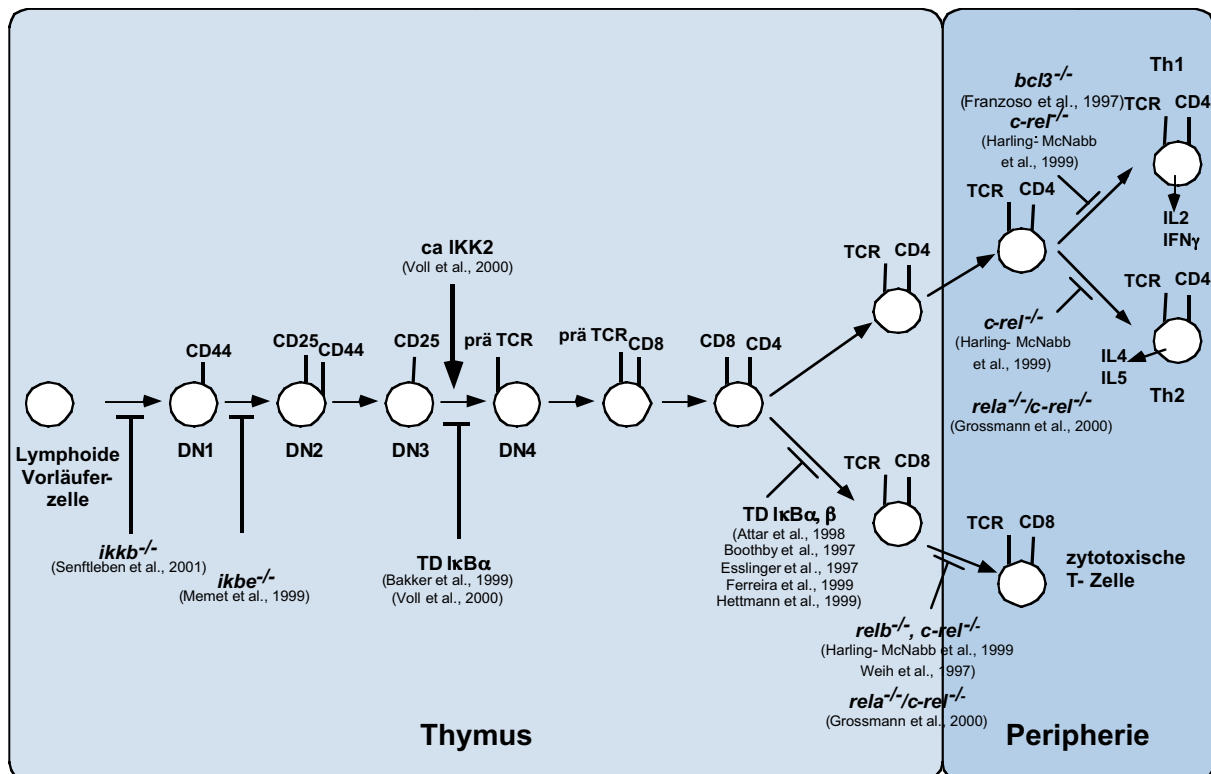


Abb.1.5: T-Zellentwicklung in Thymus und Peripherie mit Beteiligung von NF- κ B an verschiedenen Stellen der Differenzierung

Das doppelt-negative Stadium (DN) kann anhand der Marker CD25 und CD44 weiter unterteilt werden. Zu Beginn der Entwicklung exprimieren die T-Zellen nur CD44 (DN1), bevor zusätzlich auch CD25 exprimiert wird (DN2). Im nächsten Entwicklungsschritt verlieren die Zellen CD44 (DN3) und anschließend auch CD25 (DN4).

Eine weitere Möglichkeit, die sich entwickelnden T-Zellen zu charakterisieren, bietet der Status der Rearrangements der Gene für den T-Zell-Rezeptor (TCR). Die β -Kette beginnt im DN3-Stadium mit dem Rearrangement und bildet im DN4 und unreifen einfach-positiven Stadium zusammen mit einer prä- α -Kette den prä-TCR. Im CD4⁺CD8⁺-Stadium ist dann auch das Rearrangement der reifen α -Kette abgeschlossen, so dass die α -Kette zusammen mit der β -Kette den reifen TCR bilden kann.

Während des CD4⁺CD8⁺-Stadiums finden Selektionsprozesse statt, die dafür sorgen sollen, dass nur Zellen, die einen TCR mit ausreichend hoher Affinität zu den eigenen MHCs exprimieren, in die Peripherie kommen (positive Selektion). Außerdem wird gewährleistet, dass Zellen mit einem TCR, der gegen eigene Antigene gerichtet ist, eliminiert werden (negative Selektion).

1.6.2. Regulation von verschiedenen Stadien der T-Zellentwicklung und –funktion durch NF- κ B

Die Stimulation des TCR und des Korezeptors CD28 führt zur Aktivierung von NF- κ B durch den I κ B-Kinase-Komplex und damit zur Transkription von Genen, die wichtig für die T-Zellfunktion sind, z. B. von Zytokinen und deren Rezeptoren (Chen and Rothenberg, 1993; Jamieson et al., 1991; Kang et al., 1992; Sen et al., 1995). Wie bereits vorher beschrieben, führt der Verlust von c-Rel zu einer verringerten Produktion von Zytokinen, was die Bedeutung dieser NF- κ B-Komponente für die Zytokinproduktion unterstreicht (Gerondakis et al., 1996; Kontgen et al., 1995). Zusätzlich weisen T-Zellen, denen c-Rel oder RelA fehlen oder die mutantes IKK2 überexprimieren, proliferative Defekte auf (Doi et al., 1997; Kontgen et al., 1995; Liou et al., 1999; Ren et al., 2002a). Es zeigte aber keine „knock-out“-Maus für NF- κ B-Untereinheiten Defekte in der T-Zellentwicklung. Einzig die IKK2-defiziente Maus

weist eine dramatische Reduktion aller T-Zellpopulationen und einen stark verkleinerten Thymus auf, was auf TNF- α -induzierte Apoptose zurückzuführen ist (Senftleben et al., 2001b).

Transgene Mäuse, die transdominantes I κ B α oder I κ B β im Thymus exprimieren, zeigen ebenfalls Aktivierungsdefekte, aber auch einen Verlust der CD8⁺-Zellen in der Peripherie (Attar et al., 1998; Boothby et al., 1997; Esslinger et al., 1997; Ferreira et al., 1999; Hettmann et al., 1999). Der partielle Verlust von CD44⁻ CD25⁺-Zellen in den I κ _ ϵ -defizienten Tieren weist auf eine Beteiligung von NF- κ B auch in den früheren Stadien der T-Zellentwicklung hin (Memet et al., 1999). Dies wird weiter bestätigt durch Untersuchungen mit Adenoviren, die eine transdominante I κ B α -Mutante in „fe-tal thymic organ cultures“ (FTOC) exprimieren (Bakker et al., 1999). Diese Zellen zeigen einen Block am Übergang vom Stadium DN3 zu DN4, der auf erhöhte Apoptose zurückzuführen ist. Diese Befunde korrelieren mit der Tatsache, dass in diesen Stadien der frühen T-Zellentwicklung die Aktivität von NF- κ B stark ansteigt (Feuillard et al., 2000).

Mit Hilfe transgener Mäuse, die ein NF- κ B-abhängiges Reporter gen tragen, konnte gezeigt werden, dass NF- κ B Signale des prä-TCR vermittelt, die zum Überleben der Thymozyten mit produktivem Rearrangement der β -Kette führen (Voll et al., 2000).

Ein weiterer Mechanismus der Reifung von Thymozyten, an dem NF- κ B beteiligt ist, ist die positive und negative Selektion im doppelt-positiven Stadium. Es konnte gezeigt werden, dass während der positiven Selektion die c-Rel-Expression stark anwächst und p50/RelA- und p50/c-Rel-Komplexe konstitutiv aktiviert werden (Moore et al., 1995). Jedoch scheinen die NF- κ B- Proteine dabei redundante Funktionen zu erfüllen, da c-Rel-defiziente Tiere keinen Defekt in positiver oder negativer Selektion zeigen (Strasser et al., 1999). Einmal mehr diente die Verwendung einer transdominanten I κ B α -Mutante zur weiteren Analyse. Wenn eine CD4⁺ CD8⁺ Thymozytenzelllinie mit einem Retrovirus infiziert wurde, der diese Mutante exprimiert, war die durch MHC-Peptid induzierte Differenzierung und somit die positive Selektion blockiert (Ochoa-Garay et al., 1998). In einem transgenen Mausmodell mit dieser Mutante konnte gezeigt werden, dass NF- κ B während der positiven Selektion nicht das Überleben der Thymozyten bewirkt, sondern Differenzierungssignale vermittelt (Esslinger et al., 1998). Eine andere Gruppe bestätigte diesen Befund und zeigte auch einen Effekt auf die negative Selektion. Beide Defekte scheinen auf ineffiziente Signalübertragung vom T-Zellrezeptor zurückgeführt werden

können (Mora et al., 2001). Eine weitere Gruppe stellte einen spezifischen Effekt auf die CD8⁺-Population fest, was gut mit der Reduktion der CD8⁺-Zellen in der Peripherie korreliert (Hettmann et al., 1999). Obwohl die Daten für eine Beteiligung von NF-κB an der negativen Selektion nicht sehr zahlreich sind, spricht auch die Klonierung des IκB-Proteins IκBNS, das spezifisch während der negativen Selektion exprimiert wird, dafür, dass NF-κB auch in diesem Schritt eine wichtige Rolle spielt (Fiorini et al., 2002).

Neben der Entwicklung im Thymus beeinflusst NF-κB auch die Etablierung von Effektor-T-Zell-Populationen in der Peripherie. So führt die Abwesenheit von RelB zu verminderten zytotoxischen Antworten (Weih et al., 1997b). Fehlt c-Rel, ist sowohl die Entwicklung von zytotoxischen als auch von T-Helferzellen aufgrund der Abwesenheit des Wachstumsfaktors IL2 gestört (Liou et al., 1999). Der Verlust von Bcl3 führt dazu, dass Th1-vermittelte Immunantworten nicht stattfinden können (Franzoso et al., 1997a). Dieser selektive Defekt in der Th1-Linie korreliert mit der hohen NF-κB-Aktivität in diesen Zellen im Vergleich zu Th2-Zellen (Lederer et al., 1996).

Insgesamt zeigt die Analyse der Rolle von NF-κB in T-Zellen, dass dieser Transkriptionsfaktor an vielen verschiedenen Stellen der Entwicklung und Aktivierung eingreift und zum Teil essentielle Funktionen ausübt.

1.7. B-Zellentwicklung und –funktion: NF-κB als Regulator verschiedener B-zellspezifischer Funktionen

1.7.1. Stadien der B-Zellentwicklung

In der Maus findet die B-Zellentwicklung während der Embryonalentwicklung in der fötalen Leber, im adulten Organismus im Knochenmark statt. Dabei können verschiedene Stadien anhand der Expression von Oberflächenmarkern und Enzymen und des Stadiums des Rearrangements der leichten und schweren Kette unterschieden werden (Abb. 1.6) (Übersichtsartikel: (Meffre et al., 2000)).

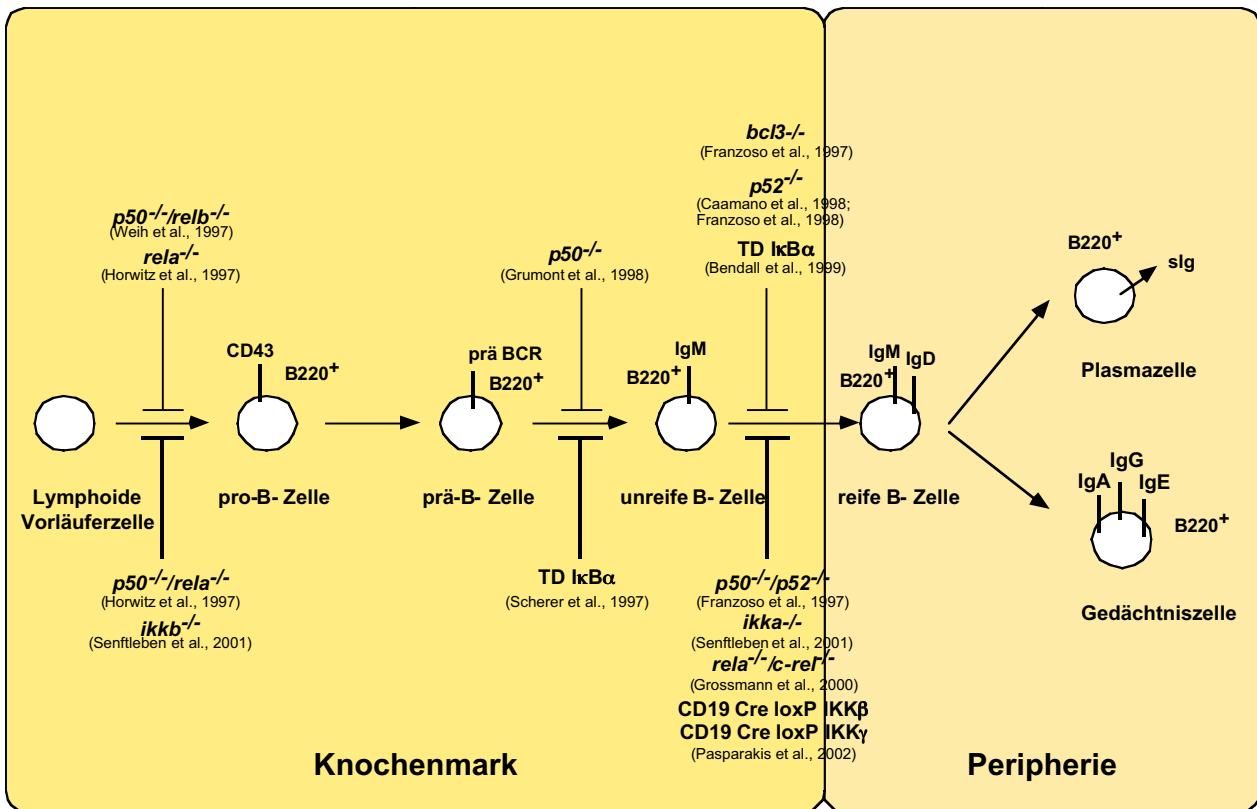


Abb. 1.6: B-Zellentwicklung in Knochenmark und Peripherie mit Beteiligung von NF-κB an verschiedenen Stellen der Differenzierung

Die frühesten B-Zell-Vorläufer werden als pro-B-Zellen bezeichnet und sind gekennzeichnet durch die Expression des pan-B-Zellmarkers B220, von CD43 und c-kit. Diese Zellen führen während ihrer Entwicklung zu prä-B-Zellen das Rearrangement der schweren Kette durch und verlieren die Expression von CD43 und c-kit. Außerdem exprimieren die prä-B-Zellen den sogenannten prä-B-Zellrezeptor, der sich aus der Ig-μ schweren Kette und den beiden Proteinen λ5 und V_{preB} zusammensetzt, die die leichte Kette zunächst ersetzen. Im nächsten Entwicklungsabschnitt beginnt das Rearrangement der leichten Kette, das im Stadium der unreifen B-Zellen abgeschlossen ist. Die unreifen B-Zellen haben entweder die κ oder die λ leichte Kette produktiv rearrangiert und exprimieren IgM auf der Oberfläche. Diese Zellen verlassen das Knochenmark und wandern in die Peripherie aus, wo sie mit Antigenen in Kontakt treten und in Keimzentren durch Interaktion mit folliculären dendritischen Zellen und T-Helferzellen zu Gedächtnis- oder Plasmazellen reifen.

1.7.2. NF- κ B-ein kritischer Regulator verschiedener Stadien der B-Zell-entwicklung

NF- κ B wurde zuerst kloniert aufgrund seiner Fähigkeit, in reifen B-Zellen und Plasmazellen konstitutiv an den intronischen Enhancer der κ leichten Kette zu binden (Sen and Baltimore, 1986). Anschließend konnte gezeigt werden, dass es auch in früheren B-Zellstadien in einer induzierbaren Form vorliegt. Die konstitutive und die induzierbare Form von NF- κ B unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Dimere: während die induzierbare Form in prä-B-Zellen aus p50 und RelA besteht, liegen in reifen B-Zellen und Plasmazellen Komplexe aus p50, p52, c-Rel und RelB vor (Dobrzanski et al., 1994; Grumont and Gerondakis, 1994; Lernbecher et al., 1993; Liou et al., 1994; Miyamoto et al., 1994b; Weih et al., 1994). Dadurch werden in verschiedenen Entwicklungsstadien unterschiedliche Zielgene reguliert, da die verschiedenen Komplexe unterschiedliche Sequenzen in den Promotorregionen binden. Jedoch scheinen sich die verschiedenen Komplexe auch gegenseitig ergänzen zu können, da Studien mit p50-, RelB- und c-Rel-defizienten Mäusen keine Auswirkung auf die Entwicklung, sondern nur auf Proliferation und das „Switching“ der Isotypen feststellen konnten. Dagegen zeigen Mäuse, denen mehr als eine NF- κ B-Untereinheit fehlt, zum Teil eine fehlerhafte B-Zellentwicklung.

Für eine funktionelle Redundanz der NF- κ B-Untereinheiten spricht auch, dass die B-zellspezifische Expression des transdominanten $I\kappa B\alpha$ das mehrere NF- κ B-Untereinheiten hemmt, zu einer Hemmung der Proliferation nach B-Zell-Rezeptor-Ligation und zur Reduktion der Zahl reifer B-Zellen in der Milz führt (Bendall et al., 1999). Weiterhin beeinträchtigt die Expression der $I\kappa B\alpha$ -Mutante in Abelson-virus-transformierten prä-B-Zellen die signal-abhängige Aktivierung der $Ig\kappa$ -Transkription und die $V_{\kappa}J_{\kappa}$ -Rekombination (Scherer et al., 1996).

Neben der Regulation der transkriptionellen Aktivierung des κ -Locus spielt NF- κ B auch eine Rolle bei der Demethylierung des Gens für die κ leichte Kette, die die Transkription erst ermöglicht und die stadien- und linienspezifisch erfolgt (Kirillov et al., 1996; Lichtenstein et al., 1994). Entgegen anders lautender Vermutungen wird auch die Expression und das Rearrangement der λ leichten Kette durch NF- κ B reguliert (Bendall et al., 2001; Combriato and Klobeck, 2002).

Neben der Regulation der Differenzierung und der Aktivierung von B-Zellen ist NF- κ B auch wichtig für die Kontrolle der Apoptose dieser Zellen. Es konnte sowohl für pro- als auch für anti-apoptotische Prozesse eine Abhängigkeit von NF- κ B gezeigt werden. Die unreife B-Zelllinie WEHI 231 zum Beispiel benötigt c-Rel-enthaltende Komplexe, um nach α -IgM-Behandlung zu überleben (Wu et al., 1996b). Konsistent mit dieser Beobachtung ist, dass c-Rel-defiziente B-Zellen nach LPS- oder α -IgM-Behandlung verstärkt der Apoptose unterlaufen (Tumang et al., 1998). Auch IgM⁺ B-Zellen, denen p50 fehlt, zeigen eine erhöhte Umsatzrate (Grumont et al., 1998). Zielgene von NF- κ B, die die Apoptose in diesen Zellen hemmen, sind unter anderem c-myc und A1 (Grumont et al., 1999; Kuss et al., 1999; Wu et al., 1996a). Im Gegensatz zur Hemmung der Apoptose durch c-Rel und p50 führt die Überexpression von RelA im pro-B-Zellstadium zu vermehrtem Zelltod (Sheehy and Schlissel, 1999).

In der Vergangenheit wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt, um zu erklären, wie die konstitutive NF- κ B-Aktivität in reifen B-Zellen zustande kommt. Dabei gingen die meisten Gruppen davon aus, dass die NF- κ B-Komplexe in reifen B-Zellen wie die induzierbaren p50/RelA-Komplexe durch I κ B α kontrolliert werden. Deswegen musste ein Mechanismus gefunden werden, der die anhaltende NF- κ B-Aktivität trotz I κ B α -Neusynthese erklärt. Dazu gab es verschiedene Hypothesen, von denen aber alle Schwachstellen aufwiesen oder nicht ausreichend bewiesen werden konnten: eine verminderte Halbwertszeit von I κ B α , eine reduzierte Sensitivität der RelB-enthaltenden Komplexe gegenüber der Interaktion mit I κ B α , ein anderer, proteasom-unabhängiger I κ B α -Abbaumechanismus, hypophosphoryliertes I κ B β als Chaperon und ineffizienter Kernexport der NF- κ B-Dimere (Dobrzanski et al., 1994; Fields et al., 2000; Lernbecher et al., 1994; Miyamoto et al., 1994a; Phillips and Ghosh, 1997; Tam et al., 2001).

Mit der Entdeckung, dass p100 während der B-Zellentwicklung von IKK1 phosphoryliert und dadurch zu p52 prozessiert wird, wurde nun ein Mechanismus gefunden, der I κ B α -unabhängig ist und dessen Hemmung *in vivo* in einer Hemmung der B-Zellentwicklung resultiert (Senftleben et al., 2001a). Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass dieser Mechanismus derjenige ist, der die NF- κ B-Aktivität während der B-Zell-Reifung reguliert.

1.8. Beteiligung von NF- κ B an inflammatorischen Reaktionen des Endothels

Endothelzellen, die das kardiovaskuläre System auskleiden, stellen in nichtaktiviertem Zustand eine Barriere zwischen dem Blutstrom und dem darunter liegenden Gewebe dar. Erst wenn die Endothelzellen durch proinflammatorische Stimuli aktiviert werden, ändert sich dies. Dann finden durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren Veränderungen im Genexpressionsmuster statt, die in der Induktion von proinflammatorischen Proteinen wie Adhäsionsmolekülen und Chemokinen resultieren (Pober, 2002).

Diese bewirken in einer kaskadenförmigen Abfolge, dass Leukozyten aus dem Blutstrom zu infiziertem oder verletztem Gewebe auswandern (Abb. 1.7).

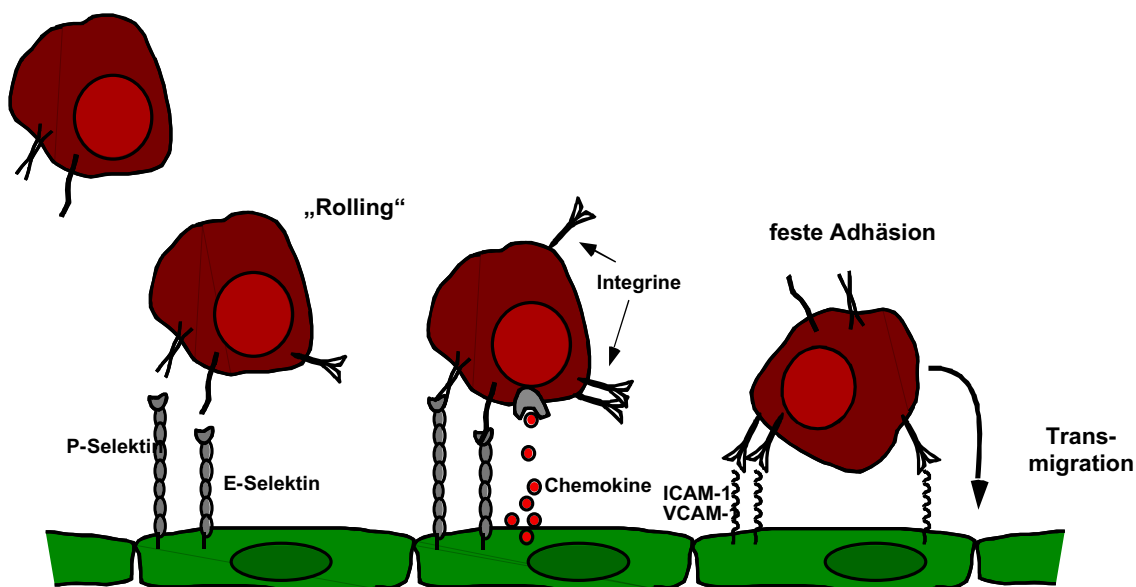


Abb. 1.7: Phasen der Leukozytenrekrutierung aus dem Blut durch Endothelzellen (nach (Ebnet and Vestweber, 1999))

Der erste Schritt dazu ist das „Rolling“, bei dem sich die Leukozyten aus dem zentralen Blutstrom der Gefäßwand nähern und langsam an ihr vorbeirollen (Übersichtsartikel: (Ebnet and Vestweber, 1999; Schurmann, 1997)). Dies wird durch die Selektin-Familie der Adhäsionsmoleküle vermittelt, die mit spezifischen Zuckerresten auf Leukozyten interagiert. In Endothelzellen wird spezifisch E-Selektin gebildet, das

NF- κ B-abhängig exprimiert wird (Collins et al., 1995; Schindler and Baichwal, 1994; Whelan et al., 1991).

Die lockere Assoziation von Leukozyten und Endothel bewirkt die Freisetzung von Chemokinen wie IL-8 durch das Endothel, die eine feste Adhäsion der Leukozyten hervorrufen. Sie tun dies, indem sie Integrine auf den Leukozyten aktivieren. Diese interagieren anschließend mit Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1, die zur Immunglobulin-Superagen-Familie gehören und auf Endothelzellen induzierbar exprimiert werden (Übersichtsartikel: (Ebnet and Vestweber, 1999; Schurmann, 1997)). Die Promotoren von IL-8, ICAM-1 und VCAM-1 enthalten Bindungsstellen für NF- κ B (Ahmad et al., 1995; Collins et al., 1995; Hou et al., 1994; Ledebur and Parks, 1995; Mukaida et al., 1990; Stein and Baldwin, 1993; Weber et al., 1994).

Auf die feste Adhäsion der Leukozyten folgt die Transmigration durch die endotheliale Zellschicht. Dafür verantwortlich ist ein Chemokingradient von IL-8 oder MCP-1, der die Integrinbindung moduliert (Übersichtsartikel: (Ebnet and Vestweber, 1999; Schurmann, 1997)). Auch MCP-1 wird NF- κ B-abhängig exprimiert (Martin et al., 1997; Ueda et al., 1994).

Die Beschreibung dieser Prozesse zeigt, dass NF- κ B ein kritischer Regulator der Endothelaktivierung und der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut ist. Dies gilt auch für pathologische Prozesse, die mit einer Aktivierung des Endothels einhergehen, wie beispielsweise Atherosklerose.

Atherosklerose ist eine chronisch-inflammatorische Krankheit, die durch die komplizierte Interaktion verschiedener Zelltypen wie Makrophagen und glatten Muskelzellen entsteht (Übersichtsartikel: (Collins and Cybulsky, 2001; Glass and Witztum, 2001)). Die Entstehung der Krankheit lässt sich in drei Phasen einteilen: Initiation, Expansion und Progression. Während der Initiation bilden sich Fettschichten unter dem Endothel, die durch die Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut und deren Entwicklung zu LDL-beladenen Makrophagen entstehen und die sich in der Expansionsphase vergrößern. Die Makrophagen treten anschließend mit anderen inflammatorischen Zellen in Wechselwirkung, was zur Progression der Atherosklerose führt. In dieser Phase wandern auch glatte Muskelzellen ein und bilden einen fibrösen Plaque aus Proteinen der extrazellulären Matrix. Wenn sich die Krankheit noch weiter entwickelt, kann dieser Plaque auseinanderbrechen und Moleküle freisetzen, die die Bildung eines Blutgerinnsels fördern.

Eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Atherosklerose spielt die Rekrutierung inflammatorischer Zellen durch das Endothel, die durch NF- κ B-abhängige Adhäsionsmoleküle und Chemokine vermittelt wird. Zum Beispiel wird VCAM-1 nur an Stellen im Endothel exprimiert, wo sich Atherosklerose entwickeln kann und in Mausmodellen für diese Krankheit findet sich VCAM-1-Expression an den Stellen, wo sich atherosklerotische Läsionen befinden (Iiyama et al., 1999). Ähnliches gilt auch für MCP-1: wenn MCP-1-defiziente Mäuse mit Mäusen verkreuzt werden, denen der LDL-Rezeptor fehlt und die daher Atherosklerose entwickeln, sind die Mäuse vor der Krankheit geschützt (Gu et al., 1998). Auch für NF- κ B selbst wurde gezeigt, dass die aktive Form in atherosklerotischen Läsionen vorhanden ist bzw. dass in Regionen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Atherosklerose entwickeln, die Expression von NF- κ B-Untereinheiten erhöht ist (Brand et al., 1996; Hajra et al., 2000; Wilson et al., 2000). Zusätzlich wird NF- κ B durch Faktoren, die die Entwicklung von Atherosklerose fördern, aktiviert, wie beispielsweise durch oxidativen Stress (Übersichtsartikel: (Li and Karin, 1999)).

Neben der Initiation inflammatorischer Reaktionen ist NF- κ B auch an deren Beendigung beteiligt, indem es die Expression anti-inflammatorischer und pro-apoptotischer Gene in den Leukozyten reguliert (Lawrence et al., 2001).

Zusammengefasst zeigt sich, dass das Endothel eine wichtige Rolle in der Homöostase im gesunden Organismus bildet, dass aber eine Überaktivierung des Endothels zu pathologischen Prozessen führen kann. Daran ist NF- κ B beteiligt, indem es die Expression verschiedener, für die Endothelfunktion wichtiger Gene reguliert.

2. Zielsetzung der Arbeit

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der sowohl für die Entwicklung von Zellen, beispielsweise des Immunsystems, als auch für die Reaktion von Zellen auf äußere Reize essentiell notwendig ist.

Mit Hilfe zweier verschiedener genetischer Systeme sollte untersucht werden, wie sich die Hemmung oder die Überaktivierung von NF- κ B auf die Entwicklung und Aktivierung von Zellen auswirkt.

Mit Hilfe des Tet-off-Systems zur konditionalen, gewebespezifischen Expression sollte die B- und T-Zellentwicklung in transgenen Mäusen, die transdominante I κ B-Proteine exprimieren, analysiert werden. Außerdem sollten in *in vitro* prä-B-Zellkulturen definierte Differenzierungsschritte von B-Zellen und deren Beeinflussung durch eine transdominante I κ B α -Mutante untersucht werden.

Unter Verwendung retroviral exprimierter Mutanten der I κ B- und IKK-Proteine sollte die Bedeutung von NF- κ B für die proinflammatorische Aktivierung von Endothelzellen untersucht werden.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung des Einflusses verschiedener I κ B-Mutanten auf die T- und B-Zellentwicklung in transgenen Mäusen basierend auf dem Tet-off-System

NF- κ B wurde zuerst als Transkriptionsfaktor beschrieben, der an den intronischen Enhancer der κ leichten Kette der Immunglobuline bindet (Sen and Baltimore, 1986). In der Folge wurde eine Vielzahl von Studien durchgeführt, die die Bedeutung von NF- κ B für die Entwicklung von lymphoiden Zellen unterstreichen. Jedoch zeigten die Mäuse, denen einzelne NF- κ B-Untereinheiten fehlen, nicht die erwarteten drastischen Effekte auf die Entwicklung von B- und T-Zellen (siehe Einleitung). Daher wurde vermutet, dass eine Redundanz zwischen den verschiedenen NF- κ B-Untereinheiten vorliegen könnte, so dass bei Verlust eines Gens die anderen dessen Funktion übernehmen. Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, dass Mäuse, die für zwei Gene defizient sind, im Allgemeinen einen stärkeren Phänotyp aufweisen als Mäuse, denen nur ein Gen fehlt.

Um die Funktion mehrerer NF- κ B-Dimere gleichzeitig zu hemmen, wurden in dieser Arbeit I κ B-Proteine verwendet, die Mutationen in den für den stimulus-abhängigen Abbau nötigen Serinen tragen. Dadurch ist der Abbau der I κ B-Proteine blockiert und die damit assoziierten NF- κ B-Dimere werden konstitutiv gehemmt. Da die meisten I κ B-Proteine in der Lage sind, mit verschiedenen NF- κ B-Dimeren zu interagieren, sollte dadurch eine breitere Hemmung zu erreichen sein. Außerdem lässt sich mit diesem Ansatz untersuchen, welche Rolle die verschiedenen Inhibitoren bei der Kontrolle der NF- κ B-Aktivität spielen.

Um die Mutanten in Zellen des lymphoiden Systems zu exprimieren, wurde das Tet-off-System verwendet, das eine konditionale und gewebespezifische Expression von Proteinen ermöglicht (Gossen and Bujard, 1992). Dieses System besteht aus zwei Komponenten, dem tTA-Transaktivator und dem Transgen unter der Kontrolle einer Tetrazyklin-Operatorsequenz (Abb. 3.1).

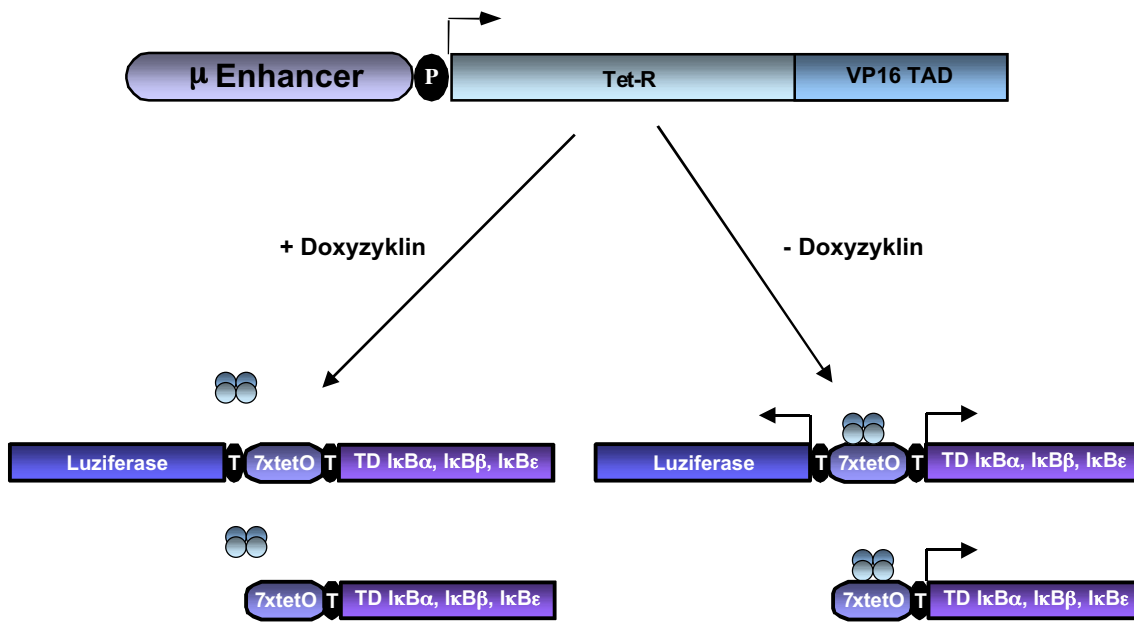


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Tet-off-Systems

Die Expression des tetrazyklin-abhängigen Transaktivators (tTA) wird durch den intronischen Enhancer (μ _Enhancer) der schweren Kette der Immunglobuline und einen minimalen Promotor reguliert. Der Transaktivator setzt sich aus dem Tetrazyklinrepressor und der VP16-Transaktivierungsdomäne zusammen. Das tTA-abhängige Transgen enthält eine heptamerisierte Operatorsequenz (7x tetO), die entweder von einer oder von zwei minimalen Promotorsequenzen des humanen Cytomegalovirus flankiert wird. Durch zwei minimale Promotorsequenzen an beiden Seiten der Operatorsequenz wird eine Koregulation der inserierten cDNA und des Reportergens Luziferase ermöglicht. Der Transaktivator kann in der Abwesenheit von Doxyzyklin an die Operatorsequenz binden. Behandlung mit Doxyzyklin verhindert die Bindung und damit die transkriptionelle Aktivierung.

Der Transaktivator besteht aus zwei Teilen: zum einen der DNA-Bindungsdomäne des Tetrazyklin-Repressors und zum anderen der Transaktivierungsdomäne des humanen Herpes Simplex Virus Typ 1-Transaktivators VP16. Die lymphoid-spezifische Expression des Transaktivators wird durch den intronischen Enhancer der schweren Kette und einen synthetischen lymphoid-spezifischen Promotor, der aus einem synthetischen Oktamermotiv und dem TATA-Element des β -Globingens besteht, bewirkt (Annweiler et al., 1992). Dieser Transaktivator ist in der Lage, in Abwesenheit von Doxyzyklin, einem Tetrazyklin-Derivat, an die multimerisierte Tetrazyklin-Operatorsequenz zu binden und die Expression des Transgens zu steuern. Wenn ein bidirektionaler Promotor verwendet wird, wird durch die Bindung des

Transaktivators sowohl die Expression des Transgens als auch die der Luziferase gesteuert. Wird Doxyzyklin appliziert, kommt es zur Ablösung des Transaktivators von der Operatorsequenz und damit zum Abschalten der Transgen-Expression.

3. 1.1. Charakterisierung der Expressionsstärke des Transgens in verschiedenen tTA/tet κ B α -Kombinationen

Zu Beginn der Arbeit waren in unserem Labor schon verschiedene μ E-tTA-Mauslinien vorhanden, die von Dr. Jochen Heß hergestellt worden waren (Hess et al., 2001). Diese enthalten entweder das tTA-Konstrukt mit der konventionellen VP16-Transaktivierungsdomäne (Linie 1.5) oder zwei Kopien einer minimalen, sauren Domäne, die schwächer transaktivierend wirkt als die konventionelle Domäne, aber dafür die Gefahr möglicher toxischer Nebeneffekte wie das "Squelching" vermindert (Linie 2.1) (Baron et al., 1997). Diese tTA-Linien wurden mit verschiedenen tet κ B α -Linien verkreuzt, die in den Labors von Boehringer Ingelheim in Ridgefield (tet κ B α _1 und 2) bzw. von Dr. Ben-Neriah in Jerusalem (Δ N 44-4) hergestellt worden waren und uns im Rahmen von Kollaborationen zur Verfügung standen. Bei dem κ B α -Transgen handelt es sich im Falle der tet κ B α -Linien um eine Punktmutante des humanen Proteins, die zwei Serin-zu-Alanin-Mutationen an den Positionen 32 und 36 enthält, während das Δ N 44-4-Transgen eine N-terminale Deletionsmutante ohne die ersten 58 Aminosäuren darstellt (Lavon et al., 2000). Dadurch fehlen nicht nur die Phospho-Serinreste, sondern auch die Ubiquitin-Akzeptorstellen (Lys21, 22) sowie eine potentielle Tyrosin-Phosphorylierungsstelle (Tyr 42). Im Falle der tet κ B α -Transgene wurde ein unidirektionaler Promotor verwendet, der ausschließlich die Transgenexpression reguliert, während für das Δ N 44-4-Transgen ein bidirektionaler Promotor verwendet wurde, so dass gleichzeitig Luziferase und Transgen exprimiert werden.

Die durch die Kreuzungen erhaltenen doppeltransgenen (für verschiedene tTA- und tet κ B α -Kombinationen) Nachkommen wurden durch PCR-Analyse identifiziert und zusammen mit wildtyp- und einfachtransgenen Tieren als Negativkontrolle auf die Expression des Transgens in Thymus und Milz untersucht. Dadurch sollte die Linie ermittelt werden, die die höchste Expression des Transgens im Vergleich zum

Ergebnisse

endogenen Protein zeigt. Von dieser Linie wird erwartet, dass sie im Vergleich zu den anderen die stärksten Effekte auf die B- und T-Zellentwicklung zeigt.

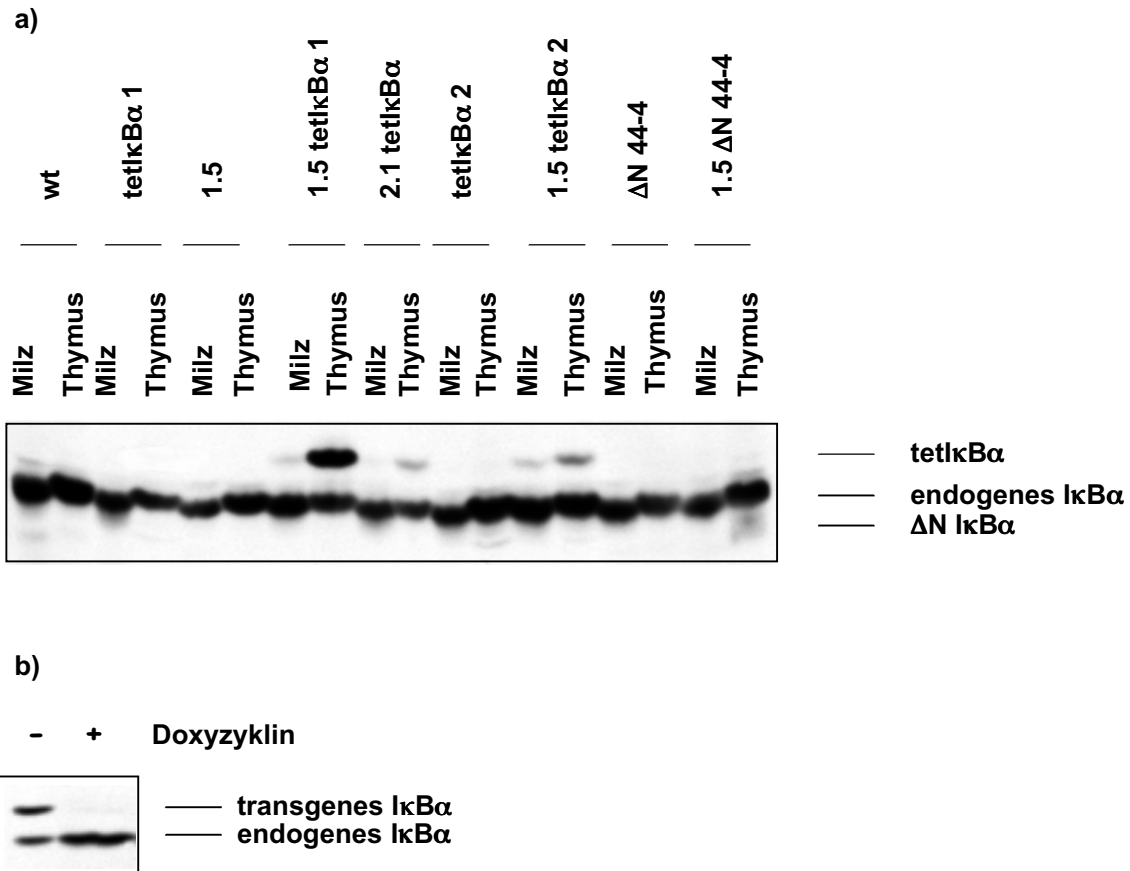


Abb. 3.2: IκBα-Expression in Thymus und Milz der transgenen Tiere

a) Vergleich der verschiedenen Transgenkombinationen

Je 50 µg Proteinextrakt aus Milz bzw. Thymus von Kontrollmäusen (wt), einfach- (tetkBa₁, 1.5, ΔN 44-4) und doppeltransgenen Tieren (1.5 tetkBa₁, 2.1 tetkBa₁, 1.5 ΔN 44-4) wurden über ein 12,5% PAA- Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Danach wurde die Membran mit einem IκBα-spezifischen polyklonalen Antikörper inkubiert, um die Expression des Transgens zu untersuchen. Die Position des endogenen sowie der verschiedenen transgenen Proteine ist angezeigt.

b) Doxyzyklinregulierbarkeit der Transgenexpression

Je 50 µg Proteinextrakt aus dem Thymus 1.5 tetkBa₁-doppeltransgener Tiere, die für drei Tage mit 2mg/ml Doxyzyklin im Trinkwasser behandelt worden waren oder unbehandelt gelassen worden waren, wurden durch Western-Immunoblot-Analyse mit einem polyklonalen IκBα-Antikörper auf die Expression von endogenem und transgenem IκBα getestet.

Das endogene Protein wird in Milz und Thymus in vergleichbaren Mengen exprimiert (Abb. 3.2a). Im Falle der tetkBa₁-doppeltransgenen Tiere zeigt sich, dass das

Ergebnisse

transgene Protein größer als das endogene Protein ist, da es humanen Ursprungs ist. Dagegen ist das transgene Protein der Linie ΔN 44-4 kleiner als das endogene Protein, da es sich hierbei um eine Deletionsmutante handelt. Die Kombination aus dem Transaktivator der Linie 1.5 und dem tet κ B α 1-Transgen erwies sich im Vergleich zu allen anderen Kombinationen als diejenige mit der höchsten Expression im Thymus (Abb. 3.2a). Das transgene Protein wird in etwa gleichen Mengen gebildet wie das endogene Protein. Die Milz weist ebenfalls eine Transgen-Expression auf, die allerdings sehr viel niedriger ist als die im Thymus. Dieses Ergebnis korreliert mit früheren Befunden, die bei der Charakterisierung der verschiedenen tTA-Linien erhoben worden waren. Es konnte gezeigt werden, dass das transgene Protein unter der Kontrolle des verwendeten Promotors in sekundären lymphoiden Organen nur schwach exprimiert wird (Jochen Heß, persönliche Mitteilung). Außerdem ist aus diesem Experiment ersichtlich, dass das Transgen nur exprimiert wird, wenn beide Komponenten des Tet-off-Systems gemeinsam in einer Maus vorliegen, da in den Extrakten aus den einfachtransgenen Tieren das Transgen nicht detektiert werden kann.

Da in den anschließenden Analysen ausschließlich die 1.5 tTA-Maus in Kombination mit tet κ B α verwendet wurde, wird im Folgenden zur Vereinfachung die Bezeichnung tTA/tet κ B α verwendet.

Anschließend wurde im Thymus der tTA/tet κ B α -Maus überprüft, ob die Expression des Transgens durch Doxyzyklin-Behandlung der Mäuse abgeschaltet werden kann (Abb. 3.2b). Der Western-Immunoblot zeigt, dass eine Verabreichung von Doxyzyklin im Trinkwasser für drei Tage ausreicht, um die Expression des Transgens und damit auch eventuelle Effekte auf das lymphoide System komplett abzuschalten. Davon ist die Expression des endogenen Proteins nicht betroffen.

Somit wurde die optimale tTA/tet κ B α -Kombination bestimmt und gezeigt, dass die Transgen-Expression durch Doxyzyklin reguliert werden kann.

3.1.2. Effekt des tTA-abhängigen I κ B α auf die Thymozytenentwicklung und -aktivierung in den transgenen Tieren

Nachdem die Kombination aus 1.5 tTA und tet κ B α als diejenige identifiziert worden war, die zur höchsten Expression des Transgens im Thymus führt, wurden die Thymozyten aus den doppeltransgenen Mäusen detaillierter untersucht. Eine wichtige Funktion von NF- κ B in T-Zellen wurde aufgrund verschiedener Beobachtungen vermutet. Zum einen wird NF- κ B nach T-Zell-Rezeptor- und CD28-Stimulation rasch aktiviert und reguliert dann die Expression verschiedener, für die T-Zell-Funktion wichtiger Gene, z. B. des T-Zell-Wachstumsfaktors IL2 (Chen and Rothenberg, 1993; Jamieson et al., 1991; Maggirwar et al., 1997). Zum anderen ist die Expression verschiedener NF- κ B-Untereinheiten im Thymus sehr hoch (Carrasco et al., 1993; Ivanov and Ceredig, 1992; Sen et al., 1995; Weih et al., 1994). Deshalb sollte mit Hilfe der transgenen Mäuse die Rolle von NF- κ B in T-Zell-Entwicklung und -Aktivierung näher analysiert werden.

Zunächst wurde die Fähigkeit des Transgens untersucht, die NF- κ B-Aktivierung zu blockieren, indem Thymozyten *in vitro* mit den NF- κ B-Aktivatoren PMA, einem Phorbolster, und Ionomycin behandelt wurden, die gleichzeitig auch potente Wachstumsstimulatoren für T-Zellen sind (Abb. 3.3).

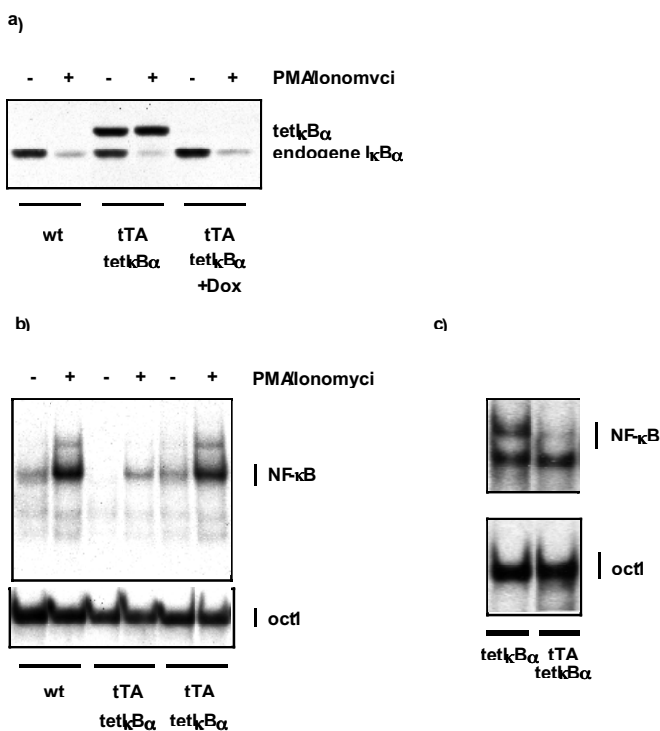


Abb. 3.3: Hemmung der NF- κ B-Aktivierung im Thymus durch transdominantes I κ B α

a) Analyse der I κ B α -Expression in PMA/Ionomycin-stimulierten Thymozyten

Thymozyten aus Kontrollmäusen (wt) und doppeltransgenen Mäusen (tTA/tetI κ B α), die für drei Tage mit 2 mg/ml Doxyzyklin im Trinkwasser behandelt worden waren (+ Dox) oder unbehandelt gelassen worden waren, wurden für 30 Minuten mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (1 μ g/ml) stimuliert, bevor Proteinextrakte hergestellt wurden. 50 μ g Proteinextrakt wurden durch Western-Immunoblot-Analyse mit einem polyklonalen I κ B α -Antikörper auf die Expression des endogenen und des transgenen I κ B α untersucht. Die Position des endogenen und des transgenen Proteins ist markiert.

b) Analyse der NF- κ B-DNA-Bindung in PMA/Ionomycin-stimulierten Thymozyten

Je 5 μ g der in a) beschriebenen Proteinextrakte wurden mit einer I κ B-Sonde auf κ B-bindende Komplexe untersucht (oberer Teil). Die gleichen Extrakte wurden auch auf octamer- bindende Proteine untersucht, um gleiche Proteinladung zu zeigen (unterer Teil).

c) Analyse der konstitutiven NF- κ B-DNA-Bindung im Thymus

Der Thymus aus einfach- (tetI κ B α) und doppeltransgenen (tTA/tetI κ B α) Tieren wurde entnommen und in flüssigem Stickstoff pulverisiert, bevor Gesamtzellextrakte nach dem Standardprotokoll hergestellt wurden. Je 5 μ g der so erhaltenen Extrakte wurden für eine Gelretardationsanalyse mit einer κ B-(oberer Teil) bzw. oct-spezifischen Sonde (unterer Teil) eingesetzt.

Die Stimulation führt zu einem fast vollständigen Abbau des endogenen Proteins innerhalb von 30 Minuten, während das mutante Protein nicht abgebaut werden kann (Abb. 3.3a). Die Expression des transgenen, jedoch nicht des endogenen Proteins kann durch Doxyzyklin-Gabe abgeschaltet werden.

Anschließend wurde mit denselben Extrakten untersucht, ob die Expression des mutanten I κ B α zu einer Hemmung der DNA-Bindung von NF- κ B nach Stimulation führt und ob die DNA-Bindung durch Doxyzyklingabe wiederhergestellt werden kann. Es zeigt sich in den Wildtyp-Zellen bereits eine geringe konstitutive NF- κ B-Aktivität, die durch Stimulation mit PMA und Ionomycin noch weiter gesteigert werden kann (Abb. 3.3b). Sowohl die basale als auch die induzierte NF- κ B-DNA-Bindung sind in den doppeltransgenen Mäusen stark verringert bzw. nicht vorhanden, was die Funktionalität der Mutante in den Thymozyten belegt. Nach Doxyzyklingabe verhalten sich die doppeltransgenen Thymozyten wie die Wildtyp-Zellen.

Da im vorhergegangenen Experiment gezeigt werden konnte, dass die Thymozyten eine konstitutive NF- κ B-Aktivität aufweisen, wurde nun untersucht, ob dies auch auf Extrakte aus dem Thymus direkt, ohne Zwischenkultur, zutrifft. In der Vergangenheit

Ergebnisse

wurde kontrovers diskutiert, in welchen Zellen im Thymus NF- κ B konstitutiv aktiviert ist- in Thymozyten oder dendritischen Zellen. Da das Transgen nur in lymphoiden Zellen exprimiert wird, würde eine Hemmung der konstitutiven Aktivität durch das mutante $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ bedeuten, dass diese auf den T-Zellen beruht und nicht auf den dendritischen Zellen. Wenn Extrakte direkt aus dem Thymus gewonnen werden und die NF- κ B-Aktivität untersucht wird, zeigt sich eine konstitutive DNA-Bindung von NF- κ B in den einfachtransgenen Tieren, die sich wie Wildtyp-Tiere verhalten (Abb. 3c). Diese ist in den doppeltransgenen Tieren komplett blockiert, was die Hypothese bestätigt, dass NF- κ B in den Lymphozyten des Thymus konstitutiv aktiviert ist.

Nachdem gezeigt worden war, dass das Transgen in der Lage ist, NF- κ B im Thymus fast vollständig zu hemmen, wurde nun untersucht, ob diese Hemmung Konsequenzen für die T-Zellentwicklung hat. Zeitgleich mit unseren Untersuchungen war publiziert worden, dass eine transgene Expression einer transdominanten $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Mutante in T-Zellen eine Reduktion der CD8^+ -Population in der TCR^{hi} -Fraktion im Thymus bewirkt, also in den Zellen, die kurz davor stehen, den Thymus zu verlassen und in die Peripherie auszuwandern (Boothby et al., 1997). Um zu überprüfen, ob dieser Phänotyp auch in unseren Mäusen zu beobachten ist, untersuchten wir die Thymozyten aus Wildtyp- und doppeltransgenen Tieren mit einer FACS-Analyse auf die Expression von CD4, CD8 und TCR (Abb. 3.4).

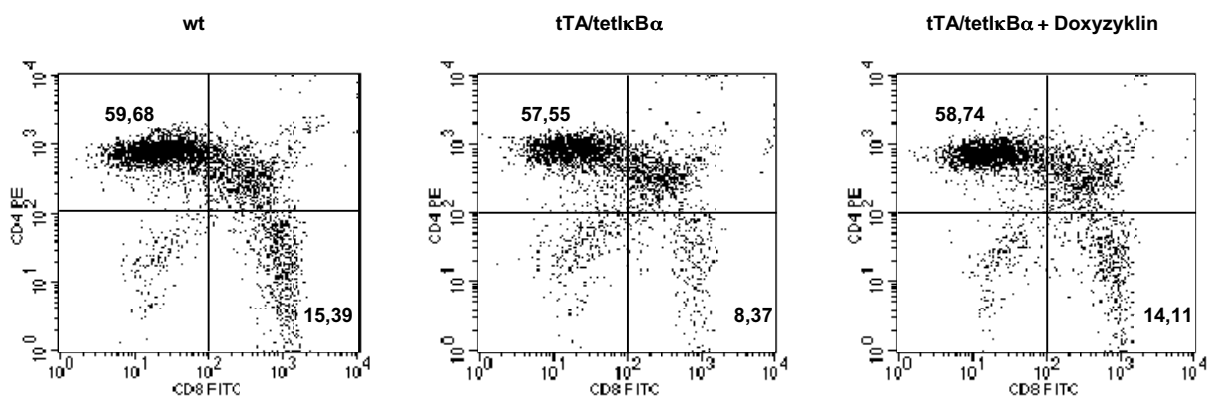


Abb. 3.4: FACS- Analyse der CD4- und CD8-Expression in der TCR^{hi} -Fraktion von wildtyp- und doppeltransgenen Thymozyten

Die Expression von CD4, CD8 und TCR wurde mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern (α -CD4-PE, α -CD8-FITC, α -TCR-Biotin/Streptavidin-Cychrom) untersucht. Gezeigt ist die CD4/CD8-Färbung von TCR^{hi} -Thymozyten, wobei die Zahlen in den jeweiligen Abbildungen die prozentualen Verhältnisse der einzelnen Subpopulationen innerhalb der TCR^{hi} -Zellen repräsentieren. Dargestellt ist

Ergebnisse

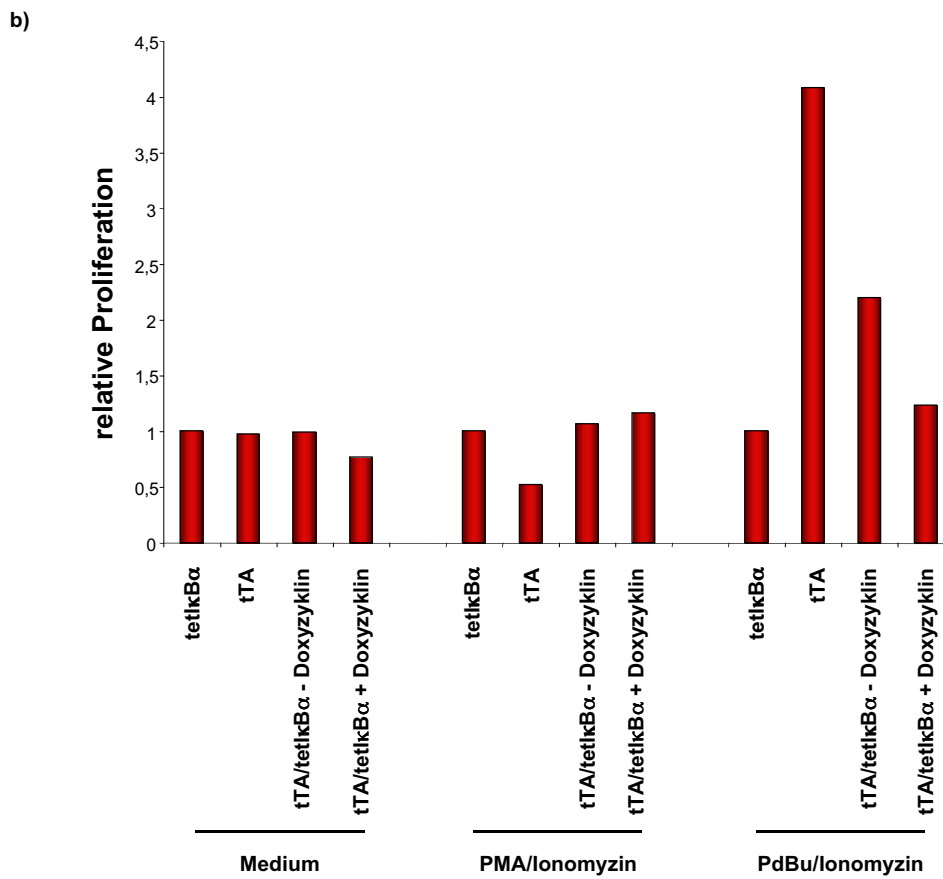
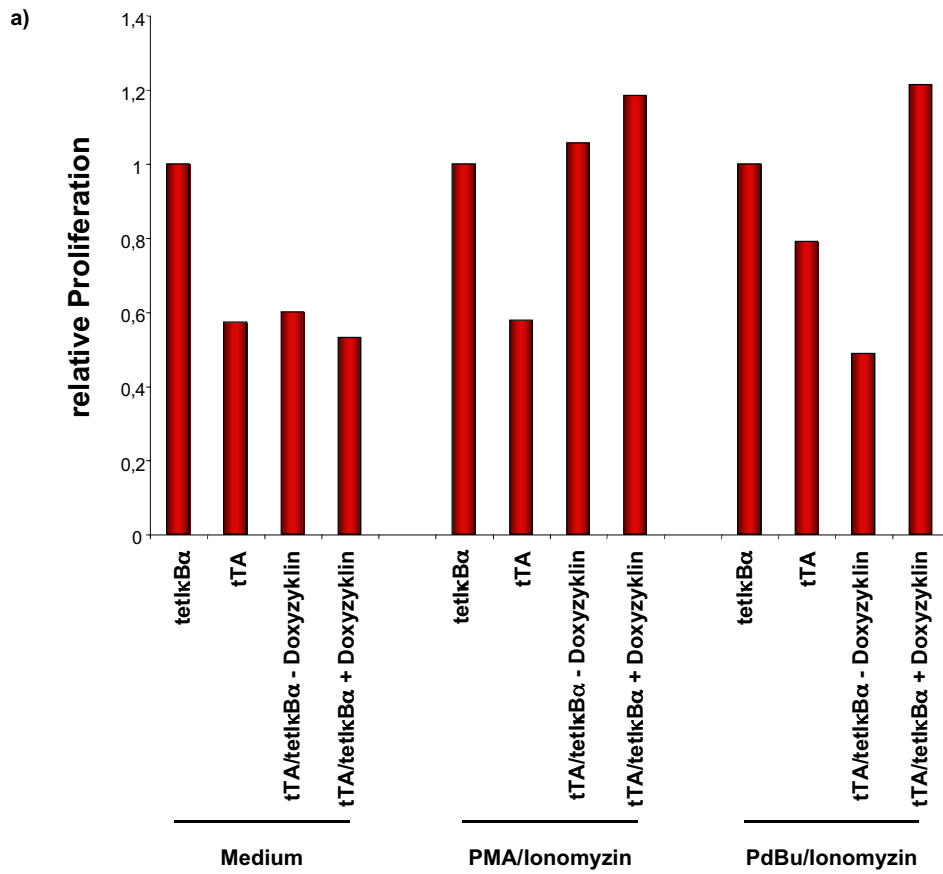
eine repräsentative FACS-Messung. Die Behandlung mit Doxzyklin (2mg/ml Trinkwasser) wurde drei Tage lang durchgeführt.

In der Wildtyp- Maus sind etwa 60% der Thymozyten $CD4^+$ und ca. 16% $CD8^+$, was einem Verhältnis von etwa 4:1 entspricht. Dagegen ist im Thymus der doppeltransgenen Tiere die Zahl der $CD8^+$ -Zellen in der TCR^{hi} -Fraktion um die Hälfte gegenüber der Wildtyp-Maus reduziert, während die $CD4^+$ -Population unbeeinflusst bleibt. Daraus resultiert ein Verhältnis von $CD4^+$ - zu $CD8^+$ -Zellen von 8:1. Dieser Verlust der $CD8^+$ -Zellen in der TCR^{hi} -Fraktion wurde nicht beobachtet, wenn die Mäuse vor der Analyse mit Doxzyklin behandelt worden waren. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass NF- κ B die Etablierung von T-Zell-Populationen im Thymus beeinflusst und seinen stärksten Effekt auf die $CD8^+$ Population ausübt. Dieses Ergebnis ist somit konsistent mit den mittlerweile publizierten Befunden.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Gegenwart des Transgens die *in vitro* Proliferation der Thymozyten beeinflusst. Von anderen Gruppen, die ein T-zellspezifisches $I\kappa B\alpha$ -Transgen bzw. c-Rel-defiziente Mäuse verwendeten, wurde beobachtet, dass eine Beeinträchtigung des NF- κ B-Wegs zu einer reduzierten Proliferation nach Mitogen-Stimulation führt (Boothby et al., 1997; Esslinger et al., 1997; Ferreira et al., 1999; Hettmann et al., 1999; Kontgen et al., 1995).

Thymozyten aus Mäusen der verschiedenen Genotypen, teilweise mit oder ohne Doxzyklin-Behandlung, wurden isoliert und mit zwei verschiedenen Phorbolestern (PMA bzw. PdBu) , jeweils zusammen mit Ionomyzin, behandelt. Die Stimulation mit PMA und Ionomyzin hatte in Wildtyp-Thymozyten den Abbau von $I\kappa B\alpha$ und eine starke Aktivierung von NF- κ B hervorgerufen, wie in Abb. 3.3 gezeigt wurde. Nach 16, 40 und 64 Stunden Stimulationsdauer wurden die Zellen für 8 Stunden mit 3H -Thymidin gepulst, dessen Inkorporation in die DNA gemessen wird. Nach der Ernte wurde der Einbau der Radioaktivität bestimmt. Zur Auswertung wurde die Proliferation der Kontrollzellen ($tetI\kappa B\alpha$) auf den Wert eins gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen.

Ergebnisse



Ergebnisse

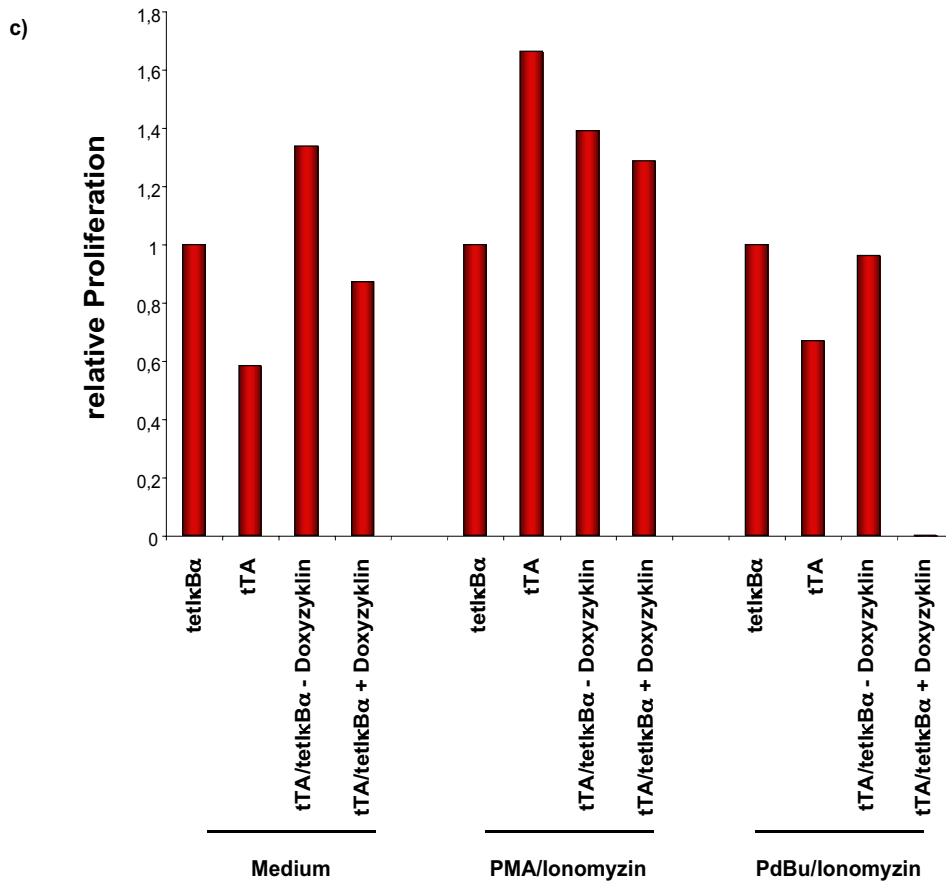


Abb. 3.5: *In vitro* Proliferation von einfach- und doppeltransgenen Thymozyten

Thymozyten aus einfach- und doppeltransgenen Mäusen mit oder ohne Doxyzyklin-Behandlung (3 mg/ml im Trinkwasser für drei Tage) wurden mit Medium, PMA (5 ng/ml) + Ionomycin (0,5 µg/ml) oder PDBu (10 ng/ml) + Ionomycin (0,5 µg/ml) für 16h (a), 40h (b) oder 64h (c) behandelt. Danach wurden die Zellen für weitere acht Stunden mit ^3H -Thymidin gepulst, bevor sie geerntet wurden und die eingebaute Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen wurde. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Nach 24 Stunden zeigt sich kein einheitliches Bild der proliferativen Antwort der Zellen (Abb. 3.5a). Während das Transgen auf die Stimulation mit PMA und Ionomycin keinen Einfluss zu haben scheint, ist die Proliferation der doppeltransgenen Thymozyten nach PdBu/Ionomycin-Stimulation um etwa die Hälfte niedriger als die der Kontrollzellen. Wurden Thymozyten aus doxyzyklin-behandelten doppeltransgenen Mäusen für diese Stimulation verwendet, zeigt sich eine ähnliche Proliferationsrate wie in den einfachtransgenen Thymozyten. Wenn die Proliferation nach 48 bzw. 72 Stunden Stimulation untersucht wird, zeigt sich weder

Ergebnisse

für die Stimulation mit PMA/Ionomycin noch für die mit PdBu/Ionomycin ein eindeutiger Effekt des Transgens (Abb. 3.5b und c). Die doppeltransgenen Thymozyten proliferieren mindestens genauso gut wie die Kontrollzellen und die Doxyzyklin-Behandlung steigert die Proliferationsrate nicht weiter. In weiteren Experimenten wurden andere T-Zellstimuli wie α -CD3/ α -CD28 verwendet, die die normale T-Zellrezeptorstimulation simulieren. Aber auch mit diesen physiologischen Stimuli konnte kein transgen-spezifischer Effekt beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst lässt sich aus den FACS-Daten auf eine Funktion von NF- κ B während der T-Zellentwicklung im Thymus schließen. Dagegen konnte aus den Proliferationsdaten kein eindeutiger Hinweis auf die Beteiligung von NF- κ B an der T-Zellaktivierung erhalten werden. Diese unterschiedlichen Befunde lassen sich womöglich auf den zeitlichen Rahmen der Transgen- Expression zurückführen (siehe Diskussion).

3.1.3 Effekt des tTA-abhängig exprimierten $\kappa B\alpha$ auf die B-Zell-Differenzierung in den transgenen Mäusen

Neben den Effekten des Transgens auf die T-Zellentwicklung lässt sich mit den transgenen Mäusen auch die Funktion von NF- κ B in der B-Zellentwicklung untersuchen. Bei der Untersuchung der Expressionsniveaus in verschiedenen Organen hatte sich bereits eine Expression des Transgens in der Milz gezeigt (siehe Abb. 3.2a).

In früheren Publikationen war bereits durch Studien mit NF- κ B-defizienten Mäusen eine Funktion von NF- κ B vor allem in den späten Stadien der B-Zell-Entwicklung belegt worden (Doi et al., 1997; Kontgen et al., 1995; Snapper et al., 1996a; Snapper et al., 1996b). Außerdem konnte gezeigt werden, dass zu unterschiedlichen Zeitpunkten der B-Zell-Entwicklung unterschiedliche NF- κ B-Dimere aktiv sind (Grumont and Gerondakis, 1994; Liou et al., 1994).

3.1.3.1. B-Zell-Differenzierung in Knochenmark und Milz der transgenen Mäuse

Zunächst wurden Knochenmark und Milz von wildtyp-, einfach- und doppeltransgenen Tieren auf die Expression von charakteristischen Oberflächenmarkern untersucht, um eventuelle Unterschiede in der B-Zell-Entwicklung aufzuzeigen.

Im Knochenmark lässt sich die frühe Entwicklung von pro/prä-B-Zellen bis hin zu transitionellen B-Zellen, die das Knochenmark verlassen, anhand einer B220/IgM-Färbung verfolgen. Dabei repräsentieren die B220⁺IgM⁻-Zellen die pro/prä-B-Zellfraktion, die B220⁺IgM^{lo}-Zellen die unreifen B-Zellen und die B220⁺IgM^{hi}-Zellen die transitionellen B-Zellen, die bereit sind, das Knochenmark zu verlassen.

Diese Färbung wurde durchgeführt mit Knochenmarkszellen aus wildtyp-, tTA-einfachtransgenen und doppeltransgenen Tieren, die entweder mit Doxzyklin behandelt worden waren oder nicht (Abb. 3.6a). Es zeigte sich, dass ca. 40-45 % der Wildtyp-Zellen den frühen B-Zellstadien entsprechen, während ca. 11-18% reifere B-Zellstadien darstellen. Die doppeltransgenen Tiere zeigen eine B-Zellentwicklung, die mit der der Wildtyp- und einfachtransgenen Tiere vergleichbar ist und die nicht

Ergebnisse

durch Doxyzyklin-Behandlung beeinflusst wird. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das transgene $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ keinen Einfluss auf die frühe B-Zell-Entwicklung hat.

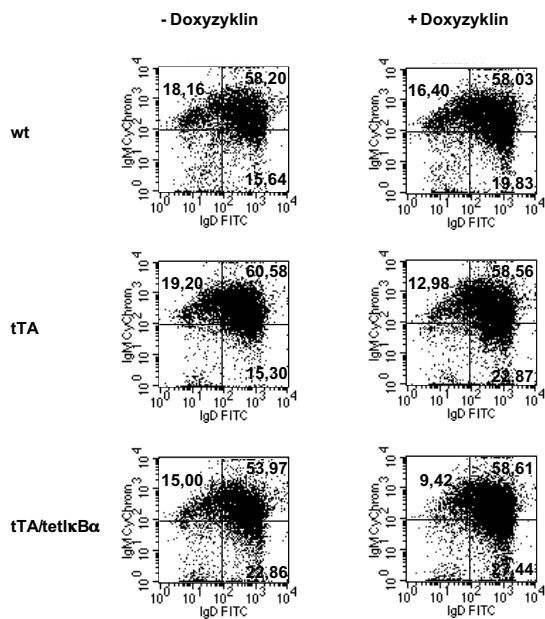
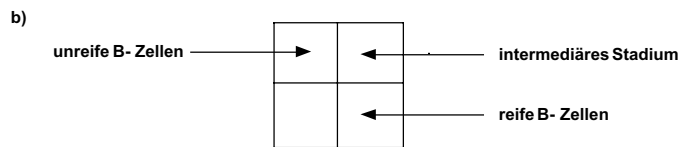
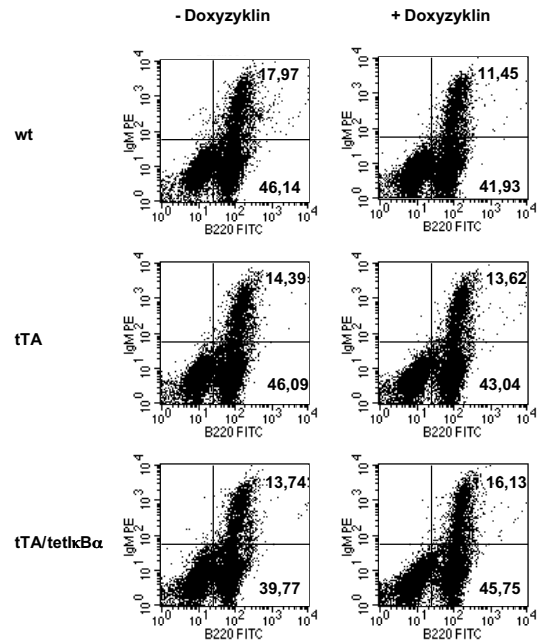
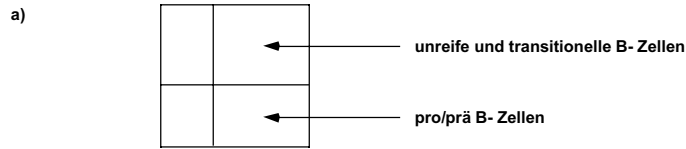


Abb. 3.6: FACS-Analyse der B-Zellentwicklung in Knochenmark und Milz von wildtyp-, einfach- und doppeltransgenen Mäusen

a) Analyse der B-Zellentwicklung im Knochenmark

Mittels FACS-Analyse mit spezifischen Antikörpern (α -IgM-PE, α -B220-FITC) wurden die verschiedenen Subpopulationen im Knochenmark von Mäusen der angegebenen Genotypen untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis, wobei die Zahlen die prozentualen Verhältnisse der einzelnen Subpopulationen darstellen. Die Behandlung mit Doxyzyklin im Trinkwasser (2 mg/ml) erfolgte für drei Tage.

b) Untersuchung der B-Zellentwicklung in der Milz

Die Expression von IgM und IgD in der Milz von Mäusen mit den angegebenen Genotypen wurde mittels FACS-Analyse mit spezifischen Antikörpern (α -IgD-FITC, α -IgM-Biotin/Streptavidin-Cychrom) bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, wobei die Zahlen die prozentualen Verhältnisse der einzelnen Subpopulationen angeben. Die Behandlung mit Doxyzyklin im Trinkwasser (2 mg/ml) erfolgte für drei Tage.

Durch eine IgM/IgD-Färbung kann die B-Zellentwicklung zu reifen Stadien in der Milz untersucht werden. Hierbei repräsentieren die $\text{IgM}^+ \text{IgD}^-$ -Zellen das unreife Stadium, die $\text{IgM}^+ \text{IgD}^+$ -Zellen ein intermediäres Stadium und die $\text{IgM}^- \text{IgD}^+$ -Zellen das reife Stadium. Wenn wildtyp-, tTA-einfachtransgene und doppeltransgene Splenozyten, jeweils mit oder ohne Doxyzyklin-Behandlung, auf die Expression von IgM und IgD untersucht wurden, konnten, ähnlich wie im Knochenmark, keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen und zwischen den doppeltransgenen Zellen in Abwesenheit oder Gegenwart von Doxyzyklin festgestellt werden (Abb. 3.6b). Etwa 15- 20% der Zellen gehörten dem unreifen Stadium an, während 15-22% der reifen B-Zellpopulation entsprachen. Dies kann so interpretiert werden, dass das transgene $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ auch auf die späte B-Zell-Entwicklung in der Peripherie keinen detektierbaren Einfluss ausübt oder aber, dass die Expressionsstärke des Transgens nicht ausreicht, um die B-Zellentwicklung in der Milz bemerkbar zu beeinflussen.

3.1.3.2. *In vitro* Differenzierung von prä-B-Zellen aus tTA/tetI κ B α -transgenen Mäusen

Die fehlenden Effekte des Transgens auf die B-Zellentwicklung in Knochenmark und Milz können sich zum einen mit der Expressionsstärke des Transgens erklären lassen, zum anderen aber auch mit der Plastizität des lymphoiden Systems, die es

Ergebnisse

ermöglicht, in einem bestimmten Rahmen Defekte *in vivo* auszugleichen. Dadurch würden Effekte des Transgens bei der Analyse der Organpopulationen nicht auffallen.

Um dies zu umgehen, wurde ein *in vitro* Differenzierungssystem angewendet, mit dessen Hilfe verschiedene definierte Stufen der frühen B-Zellentwicklung nachvollzogen werden können. Bei diesem System werden prä-B-Zellen aus fötalen Lebern oder Knochenmark des adulten Tieres etabliert. Diese Zellen sind in der Lage, in Gegenwart des Wachstumsfaktors IL7 auf Stromazellen zu proliferieren, ohne zu differenzieren. Sie sind gekennzeichnet durch das D_HJ_H -Rearrangement auf dem Genlocus für die schwere Kette der Immunglobuline und ein charakteristisches Muster an Oberflächenmarkern: sie exprimieren PB76, $V_{pre}B$, c-kit und $\lambda 5$, aber nur geringe Mengen an B220 und BP-1; für CD25, die α -Untereinheit des IL2-Rezeptors, sind sie komplett negativ (Karasuyama et al., 1994; Melchers et al., 1992a; Melchers et al., 1992b; Rolink et al., 1991a; Rolink et al., 1991b; Rolink et al., 1994).

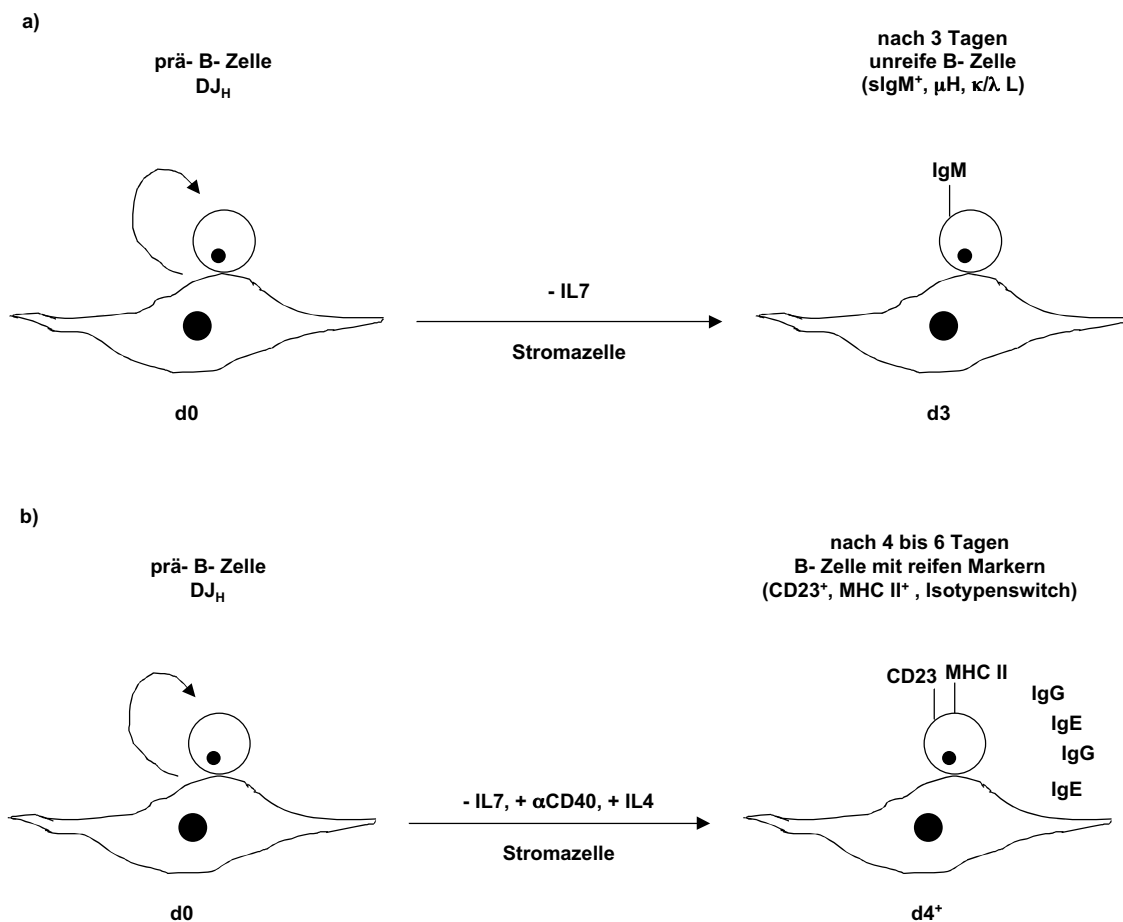


Abb. 3.7: Schematische Darstellung des *in vitro* B-Zelldifferenzierungs-Systems nach Rolink

a) Differenzierung zu unreifen B-Zellen

Die aus fötaler Leber oder adultem Knochenmark isolierten prä-B-Zellen sind in der Lage, in Gegenwart von IL7 auf Stromazellen zu proliferieren ohne zu differenzieren. Wird IL7 entzogen, differenzieren die Zellen zu unreifen B-Zellen, die IgM-positiv sind.

b) Differenzierung zu reifen B-Zellen

Die aus fötaler Leber oder adultem Knochenmark isolierten prä-B-Zellen sind in der Lage, in Gegenwart von IL7 auf Stromazellen zu proliferieren, ohne zu differenzieren. Wird zusätzlich zum IL7-Entzug mit Antikörpern gegen CD40 sowie rekombinatem IL4 stimuliert, differenzieren die Zellen zu reifen B-Zellen, die CD23 und MHC II exprimieren und gleichzeitig Immunglobuline sezernieren.

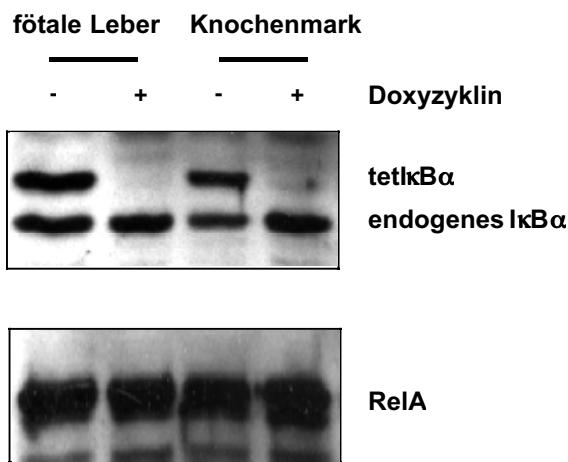
Diese Zellen lassen sich durch dreitägigen IL7-Entzug zu unreifen B-Zellen differenzieren, wodurch die Genloci für die leichte und die schwere Kette rearrangiert werden, so dass es zur Expression von IgM auf der Oberfläche der Zellen kommt, die ein produktives Rearrangement durchgeführt haben (Abb. 3.7a). Außerdem verändert sich auch das Expressionsmuster anderer Oberflächenmarker: die differenzierten Zellen verlieren die Expression von c-kit und $V_{pre}B$, dafür erfolgt eine Induktion der CD25-Expression. Dieses Differenzierungsstadium entspricht dem von unreifen B-Zellen im Knochenmark, die noch nicht mit Antigen in Kontakt gekommen sind. Im Folgenden werden die in Gegenwart von IL7 proliferierenden prä-B-Zellen als "d0"-Zellen bezeichnet, während die Zellen, die durch IL7-Entzug differenziert wurden, "d3"-Zellen genannt werden.

Neben dem gerade beschriebenen Differenzierungsprogramm, das durch IL7-Entzug initiiert wird und zur Bildung von unreifen B-Zellen führt, lassen sich die prä-B-Zellen auch zu einem höheren Reifungsgrad differenzieren, der dem von reifen B-Zellen entspricht. Hierzu werden die prä-B-Zellen zusätzlich zum IL7-Entzug mit Antikörpern gegen CD40 sowie mit rekombinatem IL4 stimuliert (Abb. 3.7b). Dies führt innerhalb von drei bis sechs Tagen zu Zellen, die reifen und aktivierten B-Zellen entsprechen (Rolink et al., 1996). Diese Zellen sind gekennzeichnet durch eine Expression von CD23 und MHCII auf ihrer Oberfläche. Zusätzlich führen diese Zellen das "Isotypenswitching" für den konstanten Teil der schweren Kette zu IgG und IgE durch, ein weiteres Charakteristikum reifer B-Zellen. Im Folgenden werden die Zellen, die derartig differenziert wurden, mit „d4⁺“ bezeichnet.

Ergebnisse

Zur Analyse des Differenzierungspotentials der prä-B-Zellen aus den tTA/tetI κ B α -doppeltransgenen Mäusen wurden Zellen sowohl aus dem Knochenmark als auch aus der fötalen Leber von tTA-einfachtransgenen und tTA/tetI κ B α -doppeltransgenen Mäusen gewonnen. Zunächst wurde die Expression des transgenen Proteins in den doppeltransgenen prä-B-Zellen aus der fötalen Leber und dem Knochenmark im Western-Immunoblot untersucht (Abb. 3.8a).

a)



b)

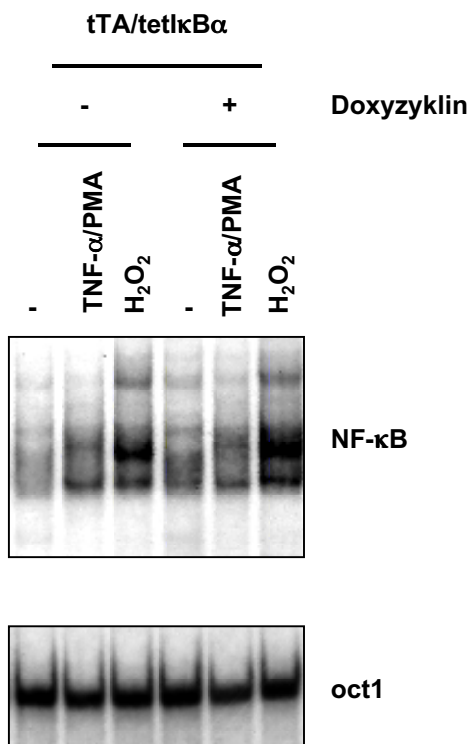


Abb. 3.8: Expression des Transgens und DNA-Bindung von NF- κ B nach Stimulation von mutanten prä-B-Zellen

a) Western-Immunoblot-Analyse der prä-B-Zellkulturen

Je 50 μ g Gesamtzellextrakt aus prä-B-Zellen, die aus fötaler Leber oder adultem Knochenmark isoliert worden waren, wurden über ein 12,5% PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Danach wurde die Membran mit einem κ B α -spezifischen polyklonalen Antikörper inkubiert, um die Expression des Transgens zu untersuchen. Die Position des endogenen und des transgenen Proteins ist angezeigt. Die Doxyzyklin-Behandlung der Zellen erfolgte für mindestens drei Tage mit 3 μ g/ml Doxyzyklin im Medium. Die Menge und Qualität der Extrakte wurde durch den Nachweis von RelA mit einem spezifischen, polyklonalen RelA-Antikörper überprüft.

b) Analyse der DNA-Bindung von NF- κ B in stimulierten prä-B-Zellen

Doppeltransgene prä-B-Zellen aus der fötalen Leber mit oder ohne Doxyzyklin-Behandlung (3 μ g/ml Medium für mindestens drei Tage) wurden für eine Stunde mit TNF- α (80 ng/ml)/PMA (25 ng/ml) bzw. Wasserstoffperoxid (250 μ M) behandelt. Danach wurden Gesamtzellextrakte hergestellt. Je 5 μ g der Proteinextrakte wurden mit einer Ig κ -Sonde auf κ B-bindende Komplexe untersucht (oberer Teil). Die gleichen Extrakte wurden auch auf octamer-bindende Proteine untersucht, um gleiche Proteinladung zu zeigen (unterer Teil).

Es zeigte sich, ähnlich wie im Thymus der doppeltransgenen Tiere, eine etwa gleichstarke Expression des endogenen und des transgenen Proteins. Diese Expressionsstärke ist unabhängig von der Herkunft der prä-B-Zellen. Durch Behandlung der Zellen mit Doxyzyklin kann die Expression des Transgens komplett abgeschaltet werden. In den folgenden Experimenten wurden ausschließlich die prä-B-Zellen aus der fötalen Leber analysiert.

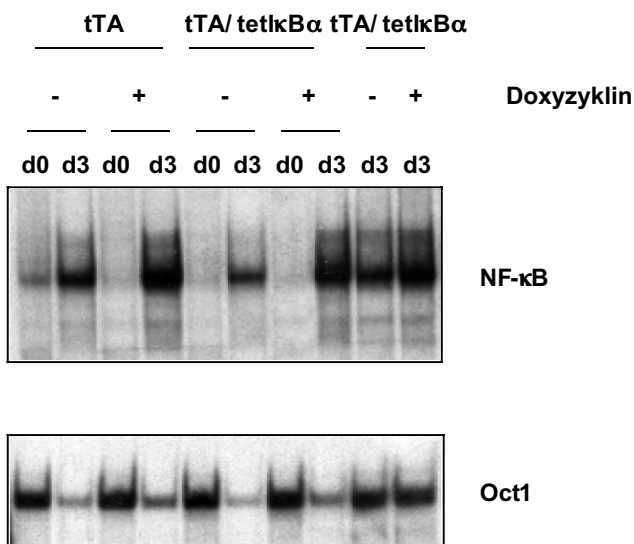
Anschließend wurde untersucht, ob die Expressionsstärke des Transgens ausreicht, um in den prä-B-Zellen eine Hemmung der DNA-Bindung von NF- κ B nach Stimulation mit verschiedenen NF- κ B-Aktivatoren zu erreichen, ähnlich wie das in den Thymozyten der Fall war. Dazu wurden die Zellen für eine Stunde entweder mit TNF- α /PMA oder Wasserstoffperoxid (H₂O₂) behandelt und dann die DNA-Bindung im EMSA bestimmt (Abb. 3.8b). Sowohl TNF- α /PMA als auch Wasserstoffperoxid sind in der Lage, NF- κ B in den prä-B-Zellen zu aktivieren, wobei Wasserstoffperoxid eine stärkere Wirkung hervorruft. Diese NF- κ B-Aktivierung wird kaum durch das Transgen beeinflusst, da auch in den Zellen, die nicht mit Doxyzyklin behandelt worden waren sowohl die basale als auch die induzierte DNA-Bindung nur wenig geringer ist als die in den doxyzyklin-behandelten Zellen. Dies deutet darauf hin,

Ergebnisse

dass die Expression der Mutante nicht ausreicht, um die Induktion von NF- κ B effektiv zu hemmen.

Da die verwendeten Stimulantien aber eine sehr starke Wirkung auf NF- κ B ausüben, die möglicherweise nicht den physiologischen Verhältnissen entspricht, wurden die Zellen anschließend dem Differenzierungsprogramm unterzogen, um zu bestimmen, ob die Expression des Transgens ausreicht, um die *in vitro* B-Zell-Differenzierung, eine physiologische Reaktion, effektiv zu blockieren. Dazu wurden die Zellen zunächst durch dreitägigen IL7-Entzug zu unreifen B-Zellen differenziert. Im Verlaufe dieses Differenzierungsprozesses sterben die meisten Zellen durch Apoptose, wahrscheinlich weil kein produktives Rearrangement erreicht wurde. Von den überlebenden Zellen sind nach drei Tagen ca. 10-15 % positiv für den Oberflächenmarker IgM. Um die Ausbeute an überlebenden sIgM-Zellen auf bis zu 30% zu erhöhen, kann man das anti-apoptotische Protein bcl2 ektopisch exprimieren. Die im folgenden als Wildtyp- Zellen bezeichneten Zellen sind transgen für bcl2, während die mutanten Zelllinien durch Infektion mit einem bcl2-exprimierenden Retrovirus eine erhöhte bcl2-Expression aufweisen.

a)



Ergebnisse

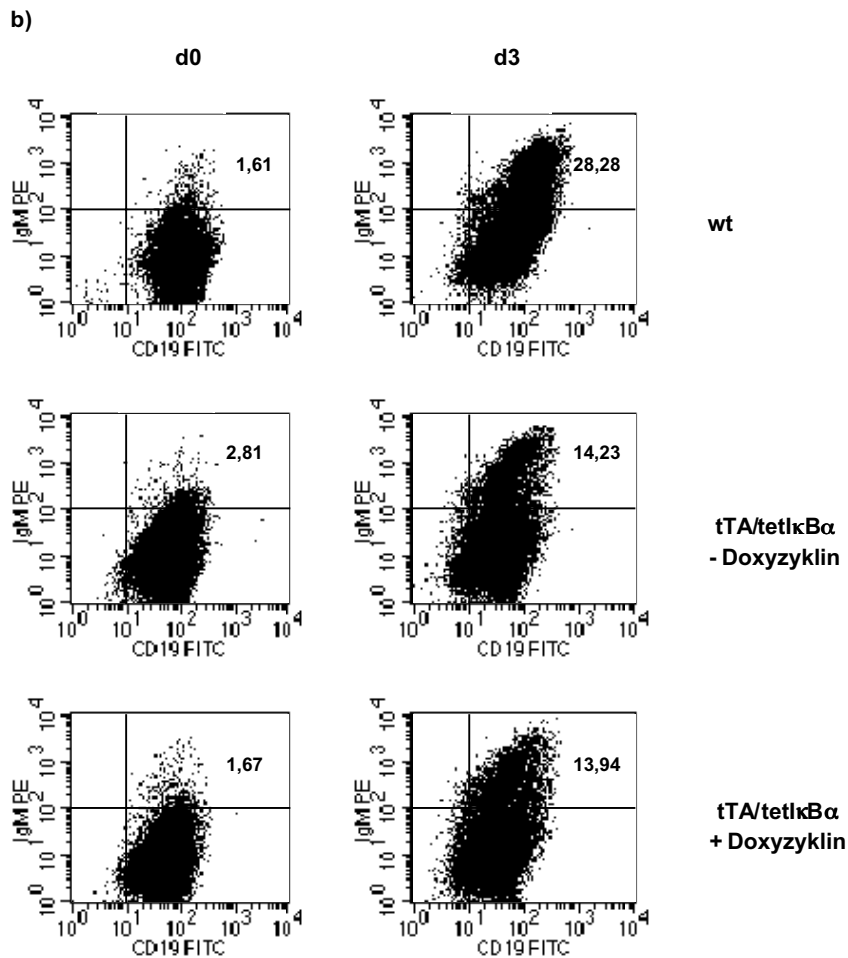


Abb. 3.9: Effekt des transgenen $\kappa B\alpha$ auf die *in vitro* Differenzierung zu unreifen B-Zellen

a) Prä-B-Zellen der angegebenen Genotypen, mit oder ohne Doxyzyklin-Behandlung (3 $\mu\text{g/ml}$ Medium für mindestens drei Tage), wurden durch IL7-Entzug differenziert, bevor Gesamtzellextrakte hergestellt wurden. Je 5 μg der Proteinextrakte wurden mit einer Ig κ -Sonde auf κB -bindende Komplexe untersucht (oberer Teil). Die gleichen Extrakte wurden auch auf octamer-bindende Proteine untersucht, um gleiche Proteinladung zu zeigen (unterer Teil).

b) Prä-B-Zellen der angegebenen Genotypen, mit oder ohne Doxyzyklin-Behandlung (3 $\mu\text{g/ml}$ Medium für mindestens drei Tage) wurden durch IL7-Entzug differenziert. Danach wurden sie mittels FACS-Analyse mit spezifischen Antikörpern (α -CD19-FITC, α -IgM-PE) auf ihren Differenzierungsstatus untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis, wobei die Zahlen den Prozentsatz der differenzierten Subpopulation darstellen.

Zunächst wurde die DNA-Bindung von NF- κB zu Beginn und am Ende der Differenzierung untersucht (Abb. 3.9a). Durch den Differenzierungsprozess wird in den Kontrollzellen eine starke DNA-Bindung von NF- κB induziert, die nach früheren

Untersuchungen hauptsächlich auf RelA-enthaltende Komplexe zurückzuführen ist (Kistler et al., 1998). Auch in den doppeltransgenen Zellen, die nicht mit Doxyzyklin behandelt worden waren, ist eine Induktion der DNA-Bindung zu beobachten, die durch Doxyzyklingabe nur unwesentlich gesteigert werden kann.

Eine physiologische Reaktion der B-Zellen bei der Differenzierung zu unreifen B-Zellen ist die Hochregulation von IgM auf der Oberfläche der differenzierten Zellen. Um zu überprüfen, ob die Expression der Mutante einen Einfluss auf die Differenzierung zu unreifen B-Zellen hat, wurden die prä-B-Zellen durch IL7-Entzug differenziert und anschließend die Expression von IgM durch eine FACS-Analyse bestimmt. Es zeigte sich, dass im Verlaufe der Differenzierung ca. 30% der Wildtyp-Zellen IgM auf der Oberfläche hochregulieren (Abb. 3.9b). In den doppeltransgenen B-Zellen ist die Expression von IgM um die Hälfte auf ca. 14% reduziert. Dies ist aber nicht auf einen transgen-spezifischen Effekt zurückzuführen, da die Zahl der differenzierten B-Zellen nicht durch Doxyzyklin-Behandlung beeinflusst wird. Der Grund hierfür könnten vielmehr unterschiedliche Expressionsstärken von *bcl2* sein.

Die FACS-Analysen sind nach den Ergebnissen des EMSA ein weiterer Hinweis darauf, dass das mutante $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ im verwendeten System keinen entscheidenden Einfluss auf den physiologischen Prozess der frühen B-Zell-Differenzierung ausübt.

Dies könnte zwei Gründe haben: erstens, dass die Expression des Transgens nicht ausreicht, um einen Effekt auf die B-Zell-Differenzierung auszuüben; zweitens, dass der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -kontrollierte NF- κ B-Pool keinen Einfluss auf die B-Zelldifferenzierung zu unreifen B-Zellen ausübt.

Wenn die zweite Möglichkeit zuträfe, könnten immer noch spätere Entwicklungsschritte durch das Transgen beeinflusst sein. Um zu untersuchen, ob dies der Fall ist, wurde auch die Differenzierung zu reifen B-Zellen durchgeführt und die Expression von CD23, einem Marker für reife B-Zellen, mittels einer FACS-Analyse gemessen (Abb. 3.10).

Ergebnisse

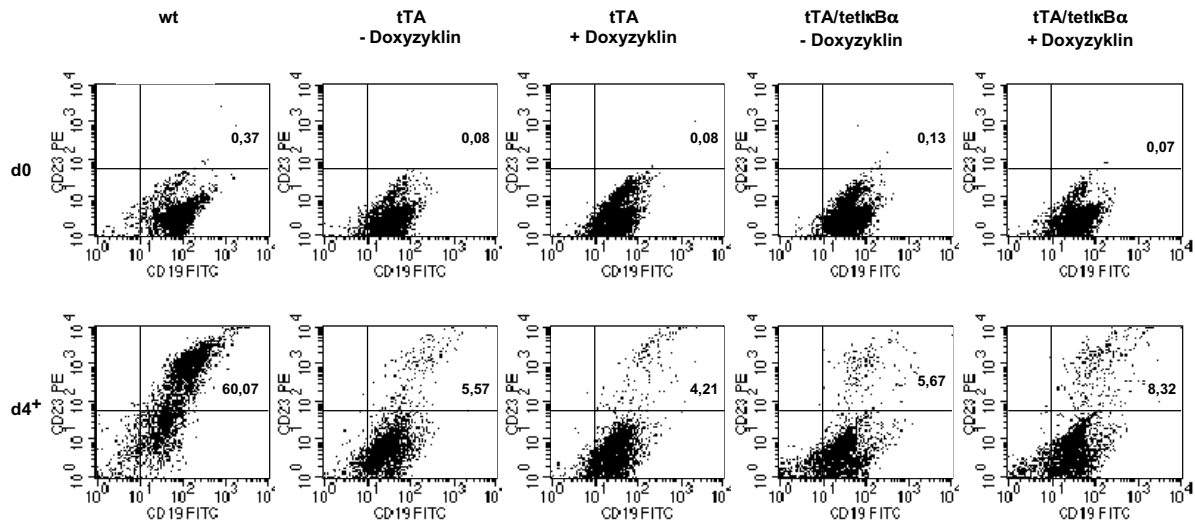


Abb. 3.10: *In vitro* Differenzierung zu reifen B-Zellen in Gegenwart von transdominantem I κ B α

Prä-B-Zellen der angegebenen Genotypen, mit oder ohne Doxyzyklin-Behandlung (3 μ g/ml Medium für mindestens drei Tage) wurden durch IL7-Entzug und α -CD40/IL4--Stimulation differenziert. Danach wurden sie mittels FACS-Analyse mit spezifischen Antikörpern (α -CD19-FITC, α -CD23-PE) auf ihren Differenzierungsstatus untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis, wobei die Zahlen den Prozentsatz der differenzierten Subpopulation darstellen.

Nach vier Tagen Differenzierung exprimieren etwa 60% der Wildtyp-Zellen CD23 auf ihrer Oberfläche. Wie bei der Differenzierung zu unreifen B-Zellen ist auch in diesem Fall der Prozentsatz der differenzierten einfach- und doppeltransgenen Zellen signifikant niedriger als der der Wildtyp- Zellen, was wiederum auf die unterschiedliche bcl2-Expression zurückzuführen ist. Bei der Differenzierung zu reifen B-Zellen sind die Zellen noch mehr auf diesen anti-apoptotischen Faktor angewiesen als bei der Differenzierung zu unreifen Zellen. Etwa 4-6% der einfachtransgenen Zellen exprimieren CD23, was nicht durch die Gabe von Doxyzyklin beeinflusst wird. Bei den doppeltransgenen Zellen zeigt sich ein interessantes Bild: ohne Doxyzyklin-Behandlung weisen etwa gleich viele Zellen eine Expression von CD23 auf wie die einfachtransgenen. Diese Zahl lässt sich durch Doxyzyklin-Behandlung um den Faktor 1,5 steigern. Es ist allerdings unklar, ob dies

Ergebnisse

physiologisch relevant oder durch experimentelle Schwankungen hervorgerufen ist, da in den einfachtransgenen Zellen, die sich wie Wildtyp verhalten sollten, ähnliche CD23-Expressionslevels zu beobachten sind wie in den nicht mit Doxyzyklin behandelten doppeltransgenen Zellen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das transgene $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ weder die Differenzierung zu unreifen noch die zu reifen B-Zellen signifikant beeinflusst.

3.1.3.3. *In vitro* Differenzierung von prä-B-Zellen aus doppeltransgenen Mäusen in einem *ikba*^{-/-} Hintergrund

Da das mutante $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in den B-Zellen weder auf die Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha/\text{PMA}$ noch auf die Differenzierung zu unreifen bzw. reifen B-Zellen einen signifikanten Einfluss ausübte, wurde spekuliert, dass möglicherweise das Expressionslevel des mutanten Proteins im Vergleich zum endogenen Protein in den B-Zellen nicht ausreicht, um Effekte auf die $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung und die B-Zell-Entwicklung zu zeigen.

Um das endogene Gen komplett durch die Mutante zu ersetzen, wurden die doppeltransgenen Mäuse mit $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Mäusen verkreuzt. Wenn das mutante Protein Effekte auf die B-Zell-Entwicklung haben sollte, sollten diese nun sichtbar werden, da es keine mit $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ assoziierten $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Population gibt, die normal aktiviert werden kann. Mäuse, die mit $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Zellen aus der fötalen Leber rekonstituiert worden waren, zeigen eine normale B-Zellentwicklung, allerdings sind sie hyperproliferativ und weisen höhere Levels an bestimmten Immunglobulin-Isotypen auf (Chen et al., 2000). B-Zellen aus der Milz von neugeborenen „knock-out“-Mäusen zeigen eine leicht beschleunigte Entwicklung. Aufgrund dieses beschriebenen Phänotyps der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten B-Zellen sollte ein Block in der B-Zell-Entwicklung in meinem Fall ausschließlich auf die Mutante und nicht auf den Verlust des endogenen Proteins zurückgehen.

Nach der Verkreuzung der doppeltransgenen Mäuse mit den $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Mäusen wurden IL7-abhängige prä-B- Zell-Kulturen verschiedener Genotypen aus den fötalen Lebern etabliert. Zum einen waren dies doppeltransgene Zellen in einem *ikba*^{-/-} Hintergrund (tTA/tet $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ / $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ^{-/-}), zum anderen Zellen, die nur das tet $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Transgen in einem *ikba*^{-/-} Hintergrund (tet $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ / $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ^{-/-}) haben als Kontrolle. Für alle Experimente wurden auch Zellen aus *bcl2*-transgenen Tieren als Wildtyp-Kontrolle verwendet.

In Tabelle 3.1 ist nochmals zusammengefasst, welche Proteine in den verschiedenen Zelllinien exprimiert werden.

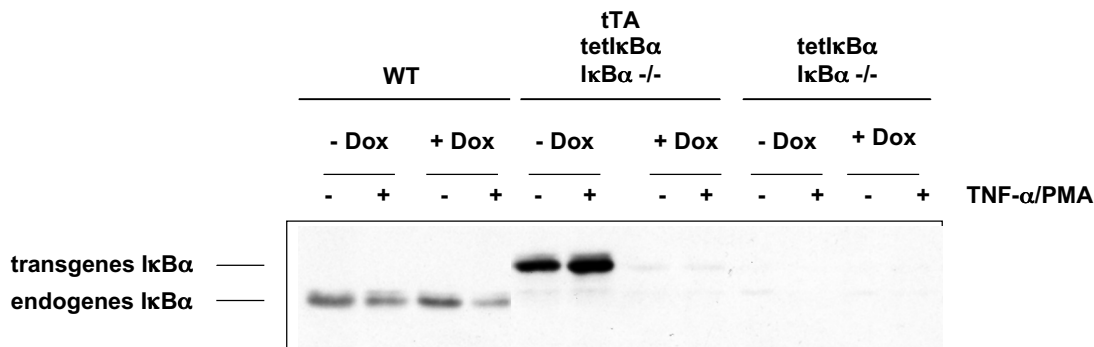
	wt	tTA/tet $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ / $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ^{-/-}	tet $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ / $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ^{-/-}
endogenes $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$	+	-	-
mutantes $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$	-	+	-

Ergebnisse

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der verwendeten Genotypen und der von ihnen exprimierten IκBα-Proteine

Zunächst wurde die Expression des Transgens in den Zellen der verschiedenen Genotypen in Abhängigkeit von Doxzyklin-Behandlung und TNF-α/PMA-Stimulation untersucht (Abb. 3.11a).

a)



b)

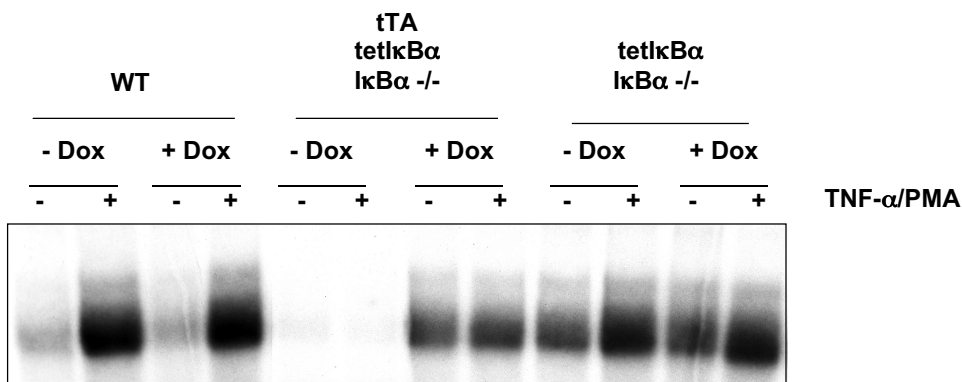


Abb. 3.11: Analyse der IκBα-Expression und der NF-κB-DNA-Bindung in transgenen prä-B-Zellen in einem *ikba*^{-/-} Hintergrund

a) Western-Immunoblot-Analyse der prä-B-Zellkulturen

Die prä-B-Zellen der verschiedenen Genotypen wurden mit Doxzyklin (3 µg/ml in Medium für mindestens drei Tage) behandelt und anschließend mit TNF-α (80 ng/ml) und PMA (25 ng/ml) für eine Stunde stimuliert, bevor Gesamtzellextrakte hergestellt wurden. Je 50 µg Gesamtzellextrakt wurden über ein 12,5% PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Danach wurde die Membran mit einem IκBα-spezifischen polyklonalen Antikörper inkubiert, um die

Ergebnisse

Expression des Transgens zu untersuchen. Die Position des endogenen und des transgenen Proteins ist angezeigt.

b) NF- κ B-DNA-Bindung in den stimulierten prä-B-Zellen

Je 5 μ g der unter a) beschriebenen Extrakte wurden mit einer Ig κ -Sonde auf κ B-bindende Komplexe untersucht.

In den Wildtyp-Zellen wird das endogene I κ B α -Protein innerhalb einer Stunde degradiert, allerdings ist dieser Abbau nicht komplett, bzw. die Resynthese hat bereits eingesetzt. Die Expression des endogenen Proteins wird nicht durch Doxyzyklin-Behandlung beeinflusst. Wie erwartet, wird weder das endogene noch das transgene Protein in den einfachtransgenen Zellen in einem *ikba*^{-/-} Hintergrund exprimiert, während in den doppeltransgenen Zellen in einem *ikba*^{-/-} Hintergrund nur das mutante, aber nicht das endogene I κ B α exprimiert wird. Das mutante Protein wird nach Stimulation nicht abgebaut, aber seine Expression kann durch Doxyzyklin abgeschaltet werden.

Mit denselben Extrakten wurden auch EMSA-Analysen durchgeführt, um zu bestimmen, ob die verschiedenen Genotypen die erwarteten Effekte auf die DNA-Bindung von NF- κ B ausüben (Abb. 3.11b). Die Wildtyp-Zellen zeigen eine niedrige basale DNA-Bindung, die durch die Behandlung mit TNF- α und PMA stark gesteigert werden kann. Die einfachtransgenen Zellen in einem *ikba*^{-/-} Hintergrund zeigen eine höhere Basalaktivität, was wahrscheinlich auf die fehlende Hemmung von NF- κ B zurückzuführen ist und auch schon für Thymozyten und Splenozyten aus I κ B α -defizienten Mäusen beschrieben wurde (Beg et al., 1995). Diese Basalaktivität kann durch TNF- α /PMA-Behandlung weiter gesteigert werden, so dass eine DNA-Bindung wie in den stimulierten Wildtyp-Zellen erreicht wird. Die DNA-Bindung ist weder in den wildtyp- noch in den einfachtransgenen Zellen in einem *ikba*^{-/-} Hintergrund durch Doxyzyklin beeinflusst. Im Gegensatz dazu zeigen die doppeltransgenen prä-B-Zellen in einem *ikba*^{-/-} Hintergrund weder konstitutive noch induzierbare DNA-Bindung in der Abwesenheit von Doxyzyklin. Wurden diese Zellen mit Doxyzyklin behandelt, zeigen sie das gleiche DNA-Bindungsverhalten wie die einfachtransgenen Zellen im *ikba*^{-/-} Hintergrund.

Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass das mutante I κ B α die basale und TNF- α /PMA-induzierte DNA-Bindung von NF- κ B in den prä-B-Zellen komplett hemmen kann, wenn kein endogenes Protein exprimiert wird, wurde untersucht, ob die Mutante die *in vitro* B-Zelldifferenzierung beeinflusst. Dazu wurden die prä-B-Zellen

Ergebnisse

in Gegenwart oder Abwesenheit von Doxzyklin durch IL7-Entzug zu unreifen B-Zellen differenziert und nach drei Tagen die Expression von IgM auf der Oberfläche untersucht (Abb. 3.12).

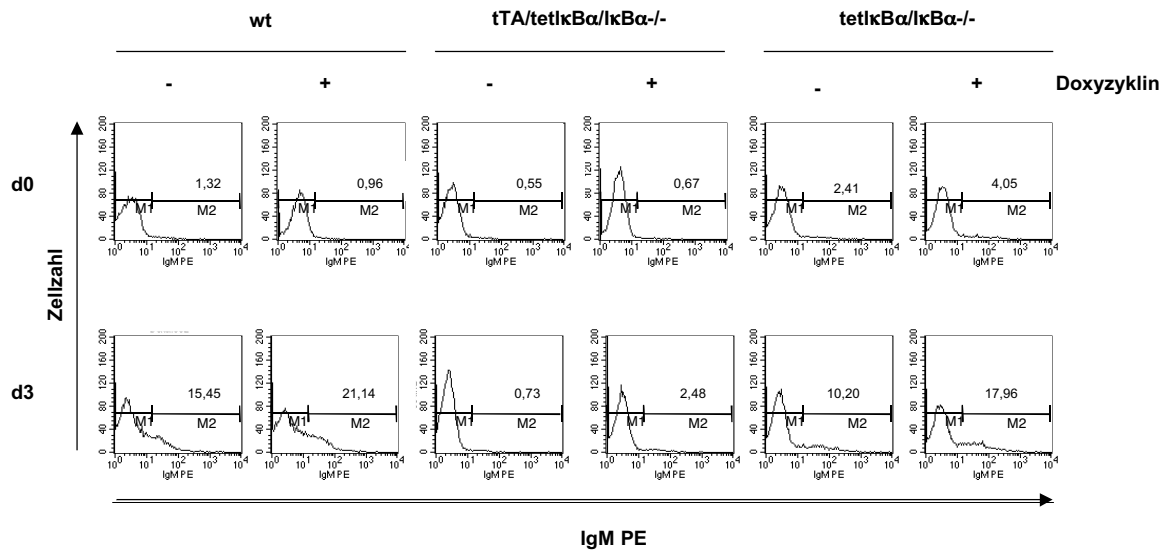


Abb. 3.12: Transdominantes $\kappa B\alpha$ in einem $ikba^{-/-}$ Hintergrund hemmt die *in vitro* Differenzierung zu unreifen B-Zellen

Die Zellen der angegebenen Genotypen wurden durch dreitägigen IL7-Entzug differenziert und anschließend die Oberflächenexpression von IgM mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (α -IgM-PE) untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis, wobei die angegebenen Zahlen den Prozentsatz an differenzierten Zellen darstellen.

Nach IL7-Entzug differenzieren ca. 15 bis 20% der Wildtyp- und einfachtransgenen Zellen in einem $ikba^{-/-}$ Hintergrund zu IgM-exprimierenden Zellen. Dieser Prozess wird nicht signifikant durch die Gabe von Doxzyklin beeinflusst. Dagegen sind die doppeltransgenen Zellen in einem $ikba^{-/-}$ Hintergrund nicht in der Lage, zu unreifen Zellen zu differenzieren. Dieser Entwicklungsblock kann durch die Behandlung mit Doxzyklin zumindest teilweise wieder aufgehoben werden, allerdings ist der Prozentsatz der IgM-positiven Zellen immer noch deutlich niedriger als in der Kontroll-Zellpopulation.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die durch $\kappa B\alpha$ kontrollierte NF- κB -Aktivität wichtig für die Differenzierung von prä-B-Zellen zu unreifen B-Zellen ist.

Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob $\kappa B\alpha$ auch spätere Schritte der B-Zell-Entwicklung kontrolliert, wurden die Zellen mit den verschiedenen Genotypen durch IL7-Entzug und gleichzeitige Stimulation mit Antikörpern gegen CD40 sowie rekombinantes IL4 zu reifen B-Zellen differenziert. Anschließend wurde die Expression von CD23, einem Marker für reife B-Zellen, mittels FACS-Analyse bestimmt (Abb. 3.13).

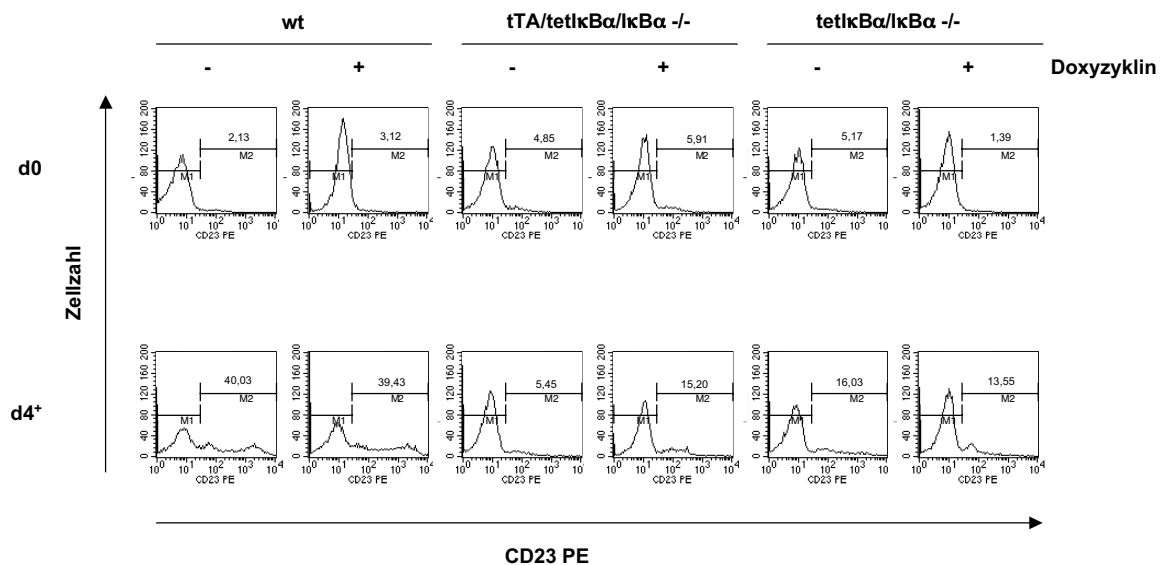


Abb. 3.13: Hemmung der *in vitro* Differenzierung zu reifen B-Zellen durch transdominantes $\kappa B\alpha$ in einem *ikba*^{-/-} Hintergrund

Die Zellen der angegebenen Genotypen wurden durch viertägigen IL7-Entzug bei gleichzeitiger Stimulation mit Antikörpern gegen CD40 und rekombinantes IL4 differenziert und anschließend die Oberflächenexpression von CD23 mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (α -CD23-PE) untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis, wobei die angegebenen Zahlen den Prozentsatz an differenzierten Zellen darstellen.

Etwa 40% der Wildtyp-Zellen exprimieren CD23 nach Differenzierung für vier Tage unabhängig von der Behandlung mit Doxyzyklin. Diese Rate ist niedriger im Falle der einfachtransgenen Zellen in einem *ikba*^{-/-} Hintergrund, allerdings zeigt sich die gleiche Tendenz. Diese Zellen lassen sich zu reifen B-Zellen differenzieren, ohne von der Doxyzyklingabe signifikant beeinflusst zu werden. Dagegen ist die Differenzierung der doppeltransgenen Zellen in einem *ikba*^{-/-} Hintergrund fast komplett blockiert. Erst in der Gegenwart von Doxyzyklin sind die Zellen in der Lage, CD23 hochzuregulieren.

Ergebnisse

Dies lässt vermuten, dass $I\kappa B\alpha$ auch spätere Stadien der B-Zell-Entwicklung kontrolliert. Allerdings kann dabei nicht unterschieden werden, ob dies ein direkter Effekt ist oder ob ein früher Entwicklungsschritt, der durch $I\kappa B\alpha$ kontrolliert wird, eine Voraussetzung für die weitere Differenzierung ist.

3.1.4. Etablierung und Charakterisierung von tetI κ B β - und tetI κ B ϵ -transgenen Mauslinien

Neben dem Inhibitorprotein I κ B α , das bereits relativ gut charakterisiert ist, gibt es zwei weitere signalabhängig abgebaute I κ B- Proteine, I κ B β und I κ B ϵ . Sie unterscheiden sich von I κ B α in der Spezifität für bestimmte NF- κ B-Dimere, der Kinetik des Abbaus und der subzellulären Verteilung, besitzen aber dieselben regulatorischen Elemente (siehe Einleitung). Für diese I κ B-Proteine wurde aufgrund verschiedener Befunde eine Beteiligung an der Kontrolle von B- und T-Zellentwicklung postuliert. So konnte gezeigt werden, dass I κ B β degradiert wird, wenn prä-B-Zellen *in vitro* zu unreifen B-Zellen differenziert werden (Kistler et al., 1998). Allerdings wurde hierbei nicht untersucht, ob eine transdominante Mutante von I κ B β diesen Differenzierungsprozess hemmt und somit dieser Abbau auch physiologisch relevant ist. Außerdem scheint I κ B β auch auf die T-Zellentwicklung Einfluss zu nehmen. Mäuse, die eine transdominante Mutante von I κ B β in T-Zellen exprimieren, wiesen eine Reduktion der peripheren T-Zellen auf, insbesondere der CD8⁺ Zellen. Weiterhin ist, ähnlich wie beim I κ B α -Transgen, die Proliferation nach Mitogenstimulation stark gehemmt (Attar et al., 1998).

Für I κ B ϵ -defiziente Mäuse konnte ebenfalls ein Effekt auf die T-Zell-Entwicklung gezeigt werden: sie weisen eine fünfzigprozentige Reduktion der CD44⁻CD25⁺-Thymozytenpopulation auf (Memet et al., 1999).

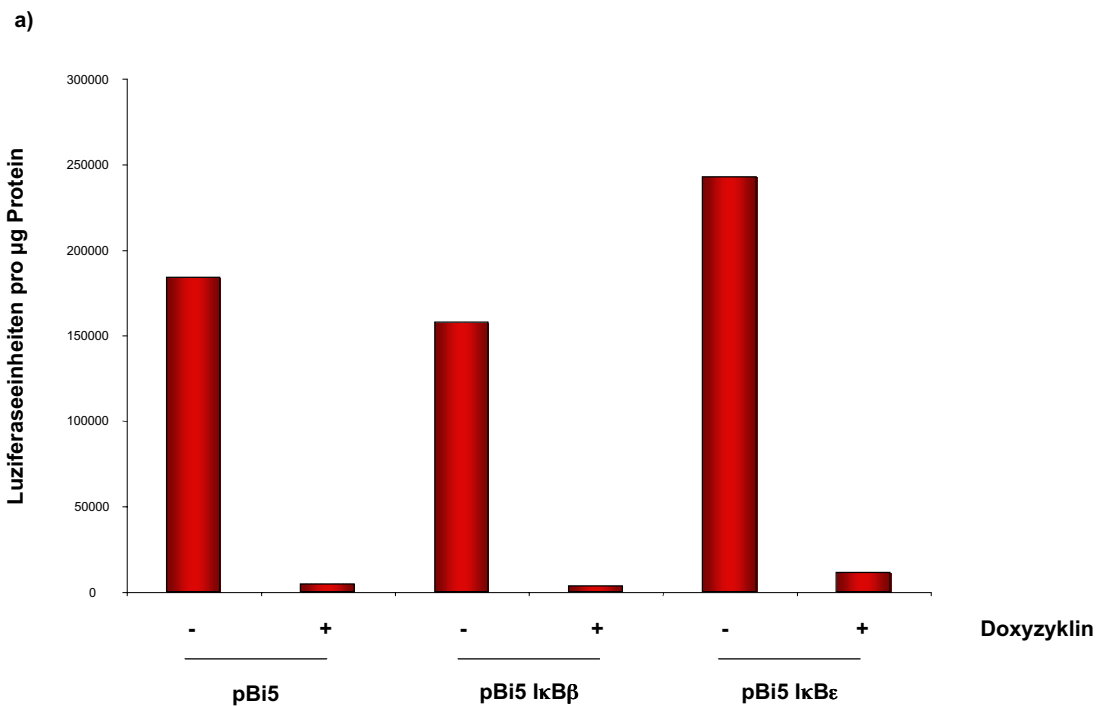
Diese Befunde ließen es interessant erscheinen, die B- und T-Zell-Entwicklung in transgenen Mäusen zu untersuchen, die eine transdominante Mutante von I κ B β bzw. I κ B ϵ lymphoid-spezifisch exprimieren. Wie im Falle der I κ B α -Mutante wurde auch hier das Tet-off-System zur konditionalen, gewebespezifischen Expression der Mutanten verwendet.

Die mutanten cDNAs wurden in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pBi5 kloniert, der aufgrund eines bidirektionalen Promotors die gleichzeitige, doxyzyklin-abhängige Expression des inserierten Gens und des Reportergens Luziferase ermöglicht (siehe Abb. 3.1) (Baron et al., 1995).

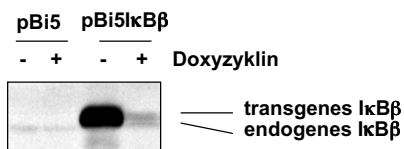
Ergebnisse

3.1.4.1. pBi5 $\kappa B\beta$ und pBi5 $\kappa B\epsilon$ ermöglichen eine konditionale Expression der inserierten Gene und des Luziferasegens

Die doozyklin-abhängige Expression der in den pBi5-Vektor inserierten Mutanten und der Luziferase wurde durch eine transiente Transfektion in HtTA-Zellen überprüft. Diese HtTA-Zellen stellen eine HeLa-Zelllinie dar, die das tTA-Protein stabil unter der Kontrolle des konstitutiv-aktiven CMV-Promotors exprimiert (Gossen and Bujard, 1992). Um zu bestimmen, ob die Expression von Luziferase und inseriertem κB konditional erfolgt, wurde jeweils ein Transfektionsansatz mit und einer ohne Doozyklin (2 μ g/ml) kultiviert.



b)



c)

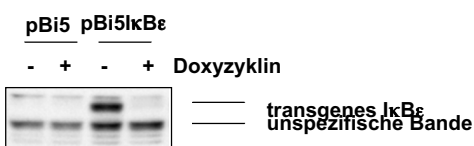


Abb. 3.14: Tetrazyklin-abhängige Expression von Luziferase, $\kappa B\beta$ und $\kappa B\epsilon$ in transient transfizierten HtTA-Zellen

a) HtTA-Zellen wurden mittels einer Kalziumphosphat-Transfektion mit dem parentalen pBi5-Vektor bzw. den pBi5 $\kappa B\beta$ -oder pBi5 $\kappa B\epsilon$ -Expressionsvektoren transient transfiziert und anschließend ohne oder mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin kultiviert. Nach ca. 20 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt. Außerdem wurde mit den Extrakten eine Bradford-Proteinbestimmung durchgeführt und dann aus beiden Messungen die Luziferaseeinheiten pro μg Protein berechnet.

b) und c) Je 50 μg der unter a) beschriebenen Extrakte wurden für einen Western-Immunoblot auf einem 12,5 % PAA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Anschließend wurden die Proteine mit spezifischen, polyklonalen Antikörpern gegen $\kappa B\beta$ (b) und $\kappa B\epsilon$ (c) nachgewiesen. Die Banden für die endogenen und die mutanten Proteine sind angezeigt.

Durch Doxyzyklin konnte die relative Luziferase-Aktivität in den Zellen, die mit den jeweiligen Konstrukten transfiziert worden waren, um den Faktor 40 reguliert werden (Abb. 3.14a). Ebenfalls untersucht wurde, ob die Expression der transgenen κB -Proteine durch Doxyzyklin regulierbar ist. Dazu wurden Western-Immunoblot-Analysen mit Extrakten aus den transfizierten HtTA-Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Expression der transgenen Proteine nur dann stattfindet, wenn die Zellen nicht mit Doxyzyklin behandelt worden waren (Abb. 3.14 b und c). Wurde Doxyzyklin ins Medium gegeben, war die Expression der Transgene fast vollständig unterdrückt. Dies zeigt, dass die beiden pBi5-Konstrukte die doxyzyklin-abhängige Expression sowohl der Luziferase als auch der κB - Proteine ermöglichen.

3.1.4.2. Herstellung und Etablierung von transgenen Mauslinien

Zur Herstellung transgener Mauslinien wurden die beschriebenen Konstrukte durch einen Restriktionsverdau geschnitten, wodurch der bakterielle Anteil größtenteils entfernt wurde. Die erhaltenen Fragmente wurden aufgereinigt und in den Pronukleus befruchteter Oozyten der Mauslinie NMRI injiziert, die anschließend in den Ovidukt pseudoschwangerer Mäuse transferiert wurden (durchgeführt von Hilde Troll, MSZ, Universität Würzburg). Die erhaltenen Nachkommen (56 im Falle von tet $\kappa B\beta$, 77 im Falle von tet $\kappa B\epsilon$) wurden durch Southern-Blot-Analyse mit einer luziferase-spezifischen Sonde auf das Vorhandensein des Transgens überprüft (Daten nicht gezeigt). Es erwiesen sich im Falle von $\kappa B\beta$ fünf, im Falle von $\kappa B\epsilon$ 16

Ergebnisse

Nachkommen als positiv für das Transgen. Diese Mäuse wurden mit Wildtyp-Mäusen verpaart, um zu untersuchen, ob das Transgen keimbahngängig ist.

Konstrukt	Mauslinie	Keimbahngängigkeit
pBi5 $\text{I}\kappa\text{B}\beta$	tet $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ 1	+
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ 2	+
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ 3	+
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ 4	+
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ 5	-
pBi5 $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$	tet $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ 1	+
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ 2	+
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ 3	-
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ 4	+
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ 5	+
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ 6	+
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ 7	-
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ 8	+
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ 9	+
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ 10	+
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ 11	-
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ 12	+
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ 13	+
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ 14	-
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ 15	+
	tet $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ 16	-

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Injektionen der Transgenkonstrukte pBi5 $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ und pBi5 $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$

Aufgeführt ist die Anzahl und Bezeichnung der transgenen “Founder” für die jeweiligen Konstrukte und der Keimbahntransfer nach Verpaarung der entsprechenden “Founder” mit Wildtyp-Mäusen (+ erfolgreicher Keimbahntransfer; - kein erfolgreicher Keimbahntransfer)

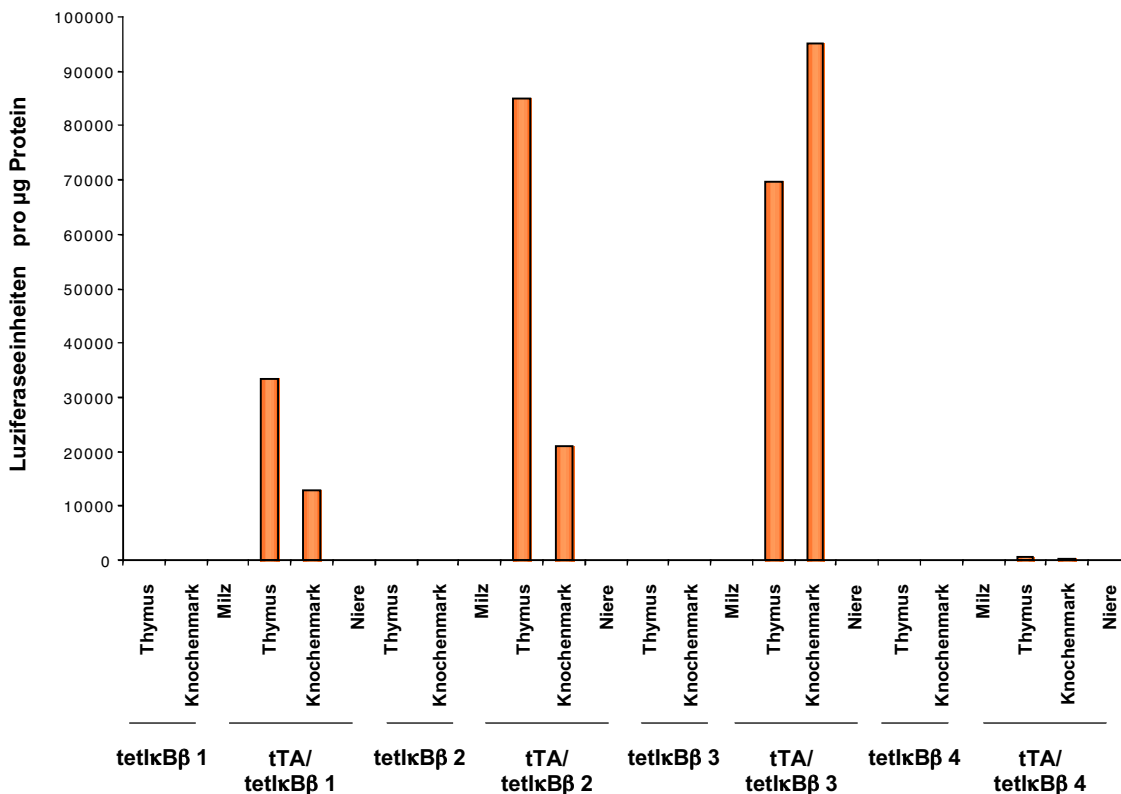
Es stellte sich heraus, dass von den fünf tet $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ - “Foundern” vier das Transgen an die nächste Generation weitergaben, im Falle der 16 tet $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ -“Founder” war bei elf der Keimbahntransfer erfolgreich (Tabelle 3.2).

Ergebnisse

3.1.4.3. Vergleich der Expressionsstärke des Transgens in verschiedenen tTA/tetkB β -Kombinationen

Die verschiedenen keimbahngängigen tetkB β -Linien wurden mit der 1.5-tTA-Linie verkreuzt. Diese hatte sich bereits in den vorhergegangenen Experimenten als diejenige Linie herausgestellt, die die höchste Expression im Thymus hervorruft. Die doppeltransgenen Tiere wurden durch Southern-Blot- bzw. PCR-Analysen identifiziert. Den aus den Verpaarungen resultierenden einfach- und doppeltransgenen Tieren wurden verschiedene lymphoide Organe und die Niere als nichtlymphoides Organ entnommen und zunächst die Luziferase-Aktivität pro μg Protein bestimmt. Dadurch sollten zwei Fragestellungen beantwortet werden: erstens sollte die gewebespezifische und tTA-abhängige Expression des Transgens untersucht werden, und zweitens sollte die tetkB β -Linie bestimmt werden, die in Kombination mit dem 1.5-tTA-Transgen die höchste Expression in den lymphoiden Organen zeigt. Mit dieser Kombination sollten anschließend die funktionellen Analysen durchgeführt werden.

a)



Ergebnisse

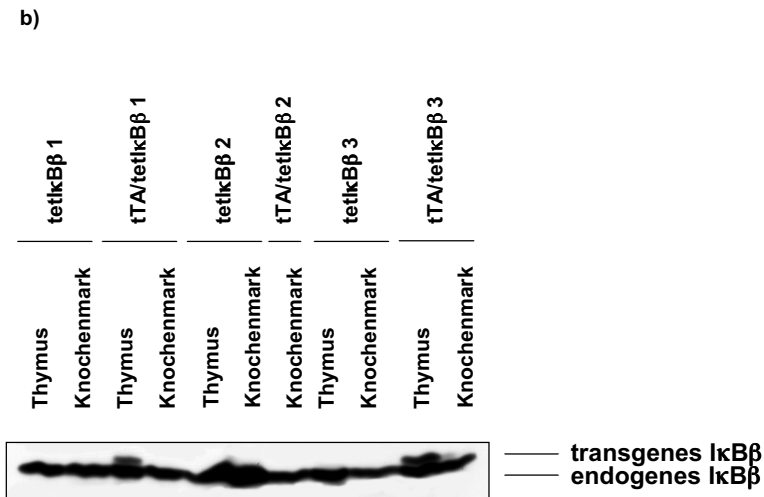


Abb. 3.15: Expression von Luziferase und IkB β in verschiedenen Organen der tetIkB β -“Founder“-Linien

a) Vergleich der Luziferase-Aktivität in Organen aus einfach- und doppeltransgenen Tieren

Aus den angegebenen Organen der einfach- und doppeltransgenen Tiere wurden Gesamtzellextrakte erstellt und danach sowohl die Luziferase-Aktivität als auch der Proteingehalt bestimmt. Daraus wurden die Luziferaseeinheiten pro μg Protein errechnet.

b) Je 100 μg der in a) verwendeten Extrakte aus Thymus und Knochenmark der einfach- und doppeltransgenen Tiere wurden auf einem 12,5% PAA- Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Es folgte der Nachweis mit einem spezifischen, polyklonalen Antikörper gegen IkB β .

Keine der einfachtransgenen Mäuse zeigt in Thymus oder Knochenmark eine Luziferase- Aktivität über dem Hintergrund (Abb. 3.15a). Dies beweist, dass keine tTA-unabhängige, durch Integration bewirkte Expression der Luziferase stattfindet. Die Analyse der doppeltransgenen Tiere ergibt eine signifikante Luziferase-Aktivität in drei der vier untersuchten Linien. Diese ist lymphoid-spezifisch, da in der Niere, im Gegensatz zu Thymus und Knochenmark, keine Luziferase-Aktivität festzustellen ist. Die Milzen der doppeltransgenen Mäuse zeigen eine leicht erhöhte Luziferase-Aktivität, die aufgrund der Skaleneinteilung im Diagramm nicht sichtbar ist.

Im direkten Vergleich der verschiedenen tetIkB β -Linien zeigt sich, dass die Linien zwei und drei eine vergleichbare Expression im Thymus aufweisen, die etwa zwei- bis dreimal so hoch ist wie in der tetIkB β 1-Linie. Die tetIkB β 4-Linie weist keine signifikante Luziferase-Aktivität in Thymus oder Knochenmark auf. Zwischen der

tet κ B β 2- und der tet κ B β 3-Linie bestehen Expressionsunterschiede im Knochenmark: hier weist die tet κ B β 3-Linie eine vier- bis fünffach höhere Luziferase-Aktivität als die tet κ B β 2-Linie auf.

Anschließend wurde die Expression des mutanten κ B β -Proteins im Vergleich zum endogenen Protein im Western-Immunoblot untersucht (Abb. 3.15b). Dazu wurden nur die Extrakte aus Thymus und Knochenmark von einfach- und doppeltransgenen Tieren verwendet, da nur diese Organe eine nennenswerte Luziferase-Expression gezeigt hatten. Das Ergebnis dieser Analyse korreliert mit den Befunden aus der Luziferase-Messung: im Thymus der doppeltransgenen Tiere ist eine Expression des transgenen κ B β zu erkennen, die im Falle der tet κ B β 1-Linie geringer als die des endogenen Proteins ist, im Falle der tet κ B β 3-Linie werden beide Proteine etwa gleich stark exprimiert. Im Knochenmark der tet κ B β 3-Linie ist ebenfalls eine Expression des Transgens zu erkennen, die aber sehr viel geringer als die des endogenen Proteins ist. In keinem der Extrakte aus einfachtransgenen Mäusen ist eine Expression des transgenen κ B β zu erkennen, was darauf hinweist, dass beide Transgene zusammen vorliegen müssen, damit die Mutante exprimiert wird.

Aufgrund der Ergebnisse aus der Messung der Luziferase-Aktivität und dem Western-Immunoblot wurde nur die Linie tet κ B β 3 weiteruntersucht.

3.1.4.4. Effekt des mutanten κ B β auf die B- und T-Zellentwicklung in doppeltransgenen Tieren

In einer ersten FACS-Analyse wurde die B- und T-Zell-Entwicklung in den tTA/tet κ B β 3-transgenen Tieren untersucht. Dazu wurde die IgM- Expression im Knochenmark (Abb. 3.16a), die Expression von CD4 und CD8 im Thymus (Abb. 3.16b) das Verhältnis von B- und T-Zellen in der Milz (Abb. 3.16c) von einfach- und doppeltransgenen Mäusen bestimmt.

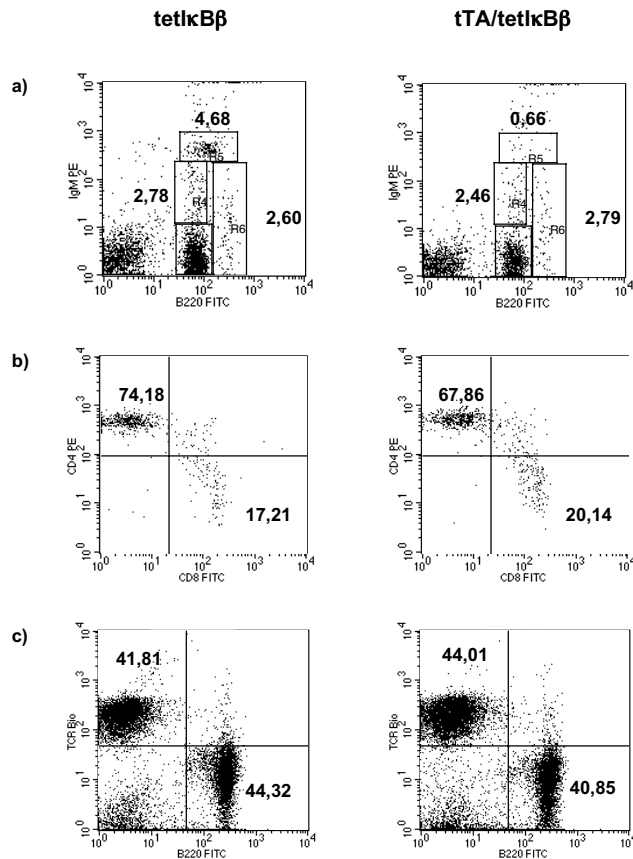


Abb. 3.16: FACS-Analyse von Milz, Knochenmark und Thymus von tetkB β - und tTA/tetkB β -transgenen Mäusen

a) Untersuchung der B-Zellentwicklung im Knochenmark

Mittels FACS-Analyse mit spezifischen Antikörpern (α -IgM-PE, α -B220-FITC) wurden die verschiedenen Subpopulationen im Knochenmark von Mäusen der angegebenen Genotypen untersucht. Die Zahlen stellen die prozentualen Verhältnisse der einzelnen Subpopulationen dar.

b) Analyse der T-Zellentwicklung im Thymus

Die Expression von CD4, CD8 und TCR wurde mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern (α -CD4-PE, α -CD8-FITC, α -TCR-Biotin/Streptavidin-Cychrom) untersucht. Gezeigt ist die CD4/CD8-Färbung von TCR^{hi}-Thymozyten, wobei die Zahlen in den jeweiligen Abbildungen die prozentualen Verhältnisse der einzelnen Subpopulationen innerhalb der TCR^{hi}-Zellen repräsentieren.

c) Analyse des B-/T-Zellverhältnisses in der Milz

Mittels FACS-Analyse mit spezifischen Antikörpern (α -TCR-Bio/Streptavidin-Cychrom, α -B220-FITC) wurde der prozentuale Anteil von B- und T-Zellen in der Milz von Mäusen der angegebenen Genotypen untersucht. Die Zahlen stellen die prozentualen Verhältnisse der einzelnen Subpopulationen dar.

Im Knochenmark der doppeltransgenen Tiere fällt die Reduktion in der Zahl der transitionellen B-Zellen auf, also den B-Zellen, die bereit sind, das Knochenmark zu verlassen und in die sekundären lymphoiden Organe auszuwandern. Diese Reduktion war in verschiedenen Mäusen reproduzierbar. Im Gegensatz liegen im Thymus normale Populationen von CD4- und CD8-positiven Zellen in der TCR^{hi}-Fraktion vor. Hier konnte in einer früheren Publikation eine Reduktion der CD8⁺-Zellen in Mäusen, die das transdominante I κ B β konsitutiv in T-Zellen exprimieren, beobachtet werden (Attar et al., 1998).

Wenn man das Verhältnis von B- und T-Zellen in der Milz von einfach- und doppeltransgenen Tieren vergleicht, sind keine signifikanten Unterschiede in den Populationen erkennbar. Dies weist darauf hin, dass weder die B- noch die T-Zellentwicklung generell durch das transdominante I κ B β gehemmt sind. Es ist allerdings verwunderlich, wie in der Milz fast normale B-Zell-Zahlen festgestellt werden konnten, wenn die Zahl der transitionellen B-Zellen im Knochenmark drastisch reduziert ist. Dies könnte aber auf die Plastizität des lymphoiden Systems zurückzuführen sein, die es erlaubt, den Defekt auszugleichen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die I κ B β -Mutante keine dramatischen Effekte auf die Entwicklung von B- und T-Zellen hervorruft. In der Zukunft muss untersucht werden, ob durch Doxyzyklin-Behandlung die Population der transitionellen B-Zellen wiederhergestellt werden kann.

3.1.4.5. Vergleich der Expressionsstärke des Transgens in verschiedenen tTA/tetI κ B ϵ -Kombinationen

Die gleichen Analysen wie für das tetI κ B β -Transgen wurden auch für das tetI κ B ϵ -Transgen in Kombination mit dem 1.5-Transaktivator durchgeführt. Ähnlich wie zuvor zeigte sich, dass eine signifikante Luziferase-Aktivität nur in den lymphoiden Organen der doppeltransgenen Tiere festzustellen ist (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

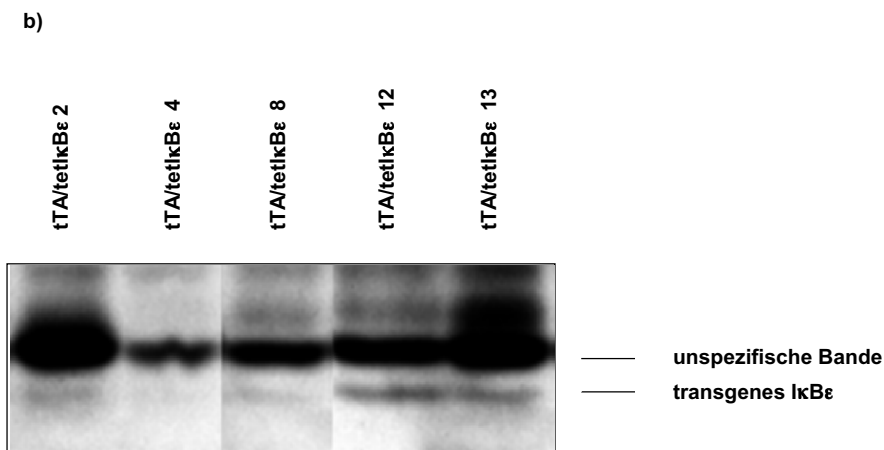
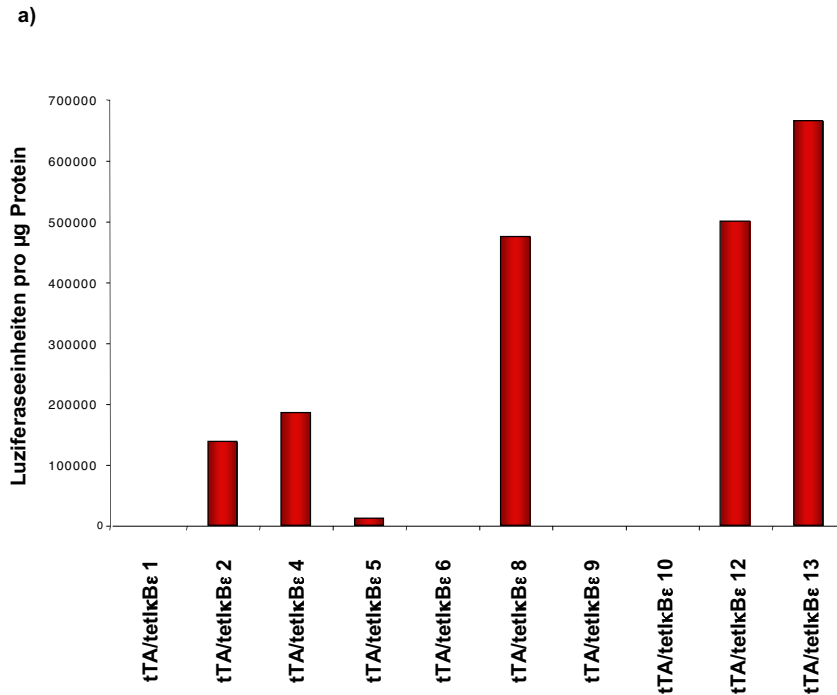


Abb. 3.17: Expression von Luziferase und IkBε im Thymus der verschiedenen tetIkBε-“Founder“-Linien

a) Vergleich der Luziferase-Aktivität im Thymus der verschiedenen doppeltransgenen Linien

Aus dem Thymus der angegebenen doppeltransgenen Linien wurden Gesamtzellextrakte erstellt und danach sowohl die Luziferase-Aktivität als auch der Proteingehalt nach Bradford bestimmt. Daraus wurden die Luziferaseeinheiten pro µg Protein errechnet.

b) Je 100 µg der in a) verwendeten Extrakte der angegebenen Linien wurden auf einem 12,5% PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Es folgte der Nachweis mit einem spezifischen, monoklonalen Antikörper gegen den myc-“Tag“ des Transgens.

Ergebnisse

Bei der Untersuchung der Thymi der doppeltransgenen Tiere wiesen sechs Linien eine signifikante Luziferase-Aktivität auf (Abb. 3.17a), die allerdings von Linie zu Linie stark variiert. Als Linien mit der stärksten Luziferase-Aktivität im Thymus erwiesen sich die Linien 8, 12 und 13. Ebenfalls festzustellen war eine Luziferase-Aktivität im Knochenmark der doppeltransgenen Tiere, die aber geringer war als die im Thymus (Daten nicht gezeigt).

Die Linien mit einer signifikanten Luziferase-Aktivität wurden anschließend einer Western-Immunoblot-Analyse mit einem Antikörper gegen den myc-“Tag” des transgenen tet κ B ϵ unterzogen (Abb. 3.17b). Die kommerziellen Antikörper, die gegen das endogene Protein gerichtet sind und mit deren Hilfe man die Expressionsstärke des transgenen Proteins mit der des endogenen Proteins ähnlich wie bei den tet κ B α - und tet κ B β -Mäusen vergleichen könnte, zeigen mehrere starke unspezifische Banden in der erwarteten Größe des Proteins. Dies macht es schwierig, das transgene Protein zu identifizieren, wenn es nicht massiv überexprimiert wird, weswegen der α -myc-Antikörper verwendet wurde. Auch mit dem myc-spezifischen Antikörper treten unspezifische Banden auf, die aber weniger stark sind. Deswegen konnte in diesem Falle die Bande für das transgene Protein durch Vergleich mit einer Positivkontrolle (transient transfizierte HeLa tTA-Zellen) identifiziert werden. Es zeigte sich eine Bande für das transgene Protein in den Linien 12 und 13, jedoch nicht in den anderen Linien. Dies korrespondiert mit den Ergebnissen aus den Luziferase-Messungen, in denen ebenfalls diese Linien, zusammen mit der Linie acht, die höchste Aktivität zeigten.

Aufgrund der Ergebnisse aus der Messung der Luziferase-Aktivität und des Western-Immunoblots wurde beschlossen, die funktionellen Analysen mit den Linien 12 und 13 durchzuführen.

3.2. Einfluss retroviral transduzierter Mutanten des NF- κ B-Signaltransduktionswegs auf inflammatorische Reaktionen von Endothelzellen

Außer bei der Regulation der Entwicklung von Zellen des Immunsystems wird NF- κ B auch bei der schnellen Reaktion auf äußere Reize, zum Beispiel inflammatorische Stimuli, benötigt. Dazu ist NF- κ B in besonderer Weise geeignet, da es in ruhenden Zellen in inaktiver Form vorliegt, durch extrazelluläre Reize jedoch innerhalb weniger Minuten aktiviert werden kann und die Transkription der erforderlichen Zielgene anschalten kann.

Im folgenden Teil der Arbeit sollte untersucht werden, wie einzelne Komponenten des NF- κ B-Signaltransduktionswegs inflammatorische Reaktionen von Endothelzellen regulieren. Die Aktivierung von Endothelzellen stellt eine wichtige erste Reaktion auf proinflammatorische Reize wie die Zytokine IL-1 und TNF- α dar. Anschließend kommt es zur Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut. Dazu wird in den Endothelzellen die Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 und Chemokinen wie IL-8 und MCP-1 induziert, die zusammen die Adhäsion und Transmigration der Leukozyten zum Entzündungsort bewirken (Ebnet and Vestweber, 1999).

Für die Promotoren von vielen dieser Moleküle konnte gezeigt werden, dass sie Bindungsstellen für NF- κ B enthalten, allerdings war nicht klar, wie stark die Expression dieser Gene von NF- κ B abhängig ist (Pober, 2002).

3.2.1. Retroviraler Gentransfer in die Endothelzellen

Um zu untersuchen, wie stark die proinflammatorische Genexpression von NF- κ B abhängt, wurden neben den bereits beschriebenen Mutanten der I κ B-Proteine auch kinase-inaktive Mutanten der IKK1 (IKK1 KD) und IKK2 (IKK2 KD) sowie eine konstitutiv-aktive Mutante der IKK2, die zwei Serin- zu Glutaminsäure-Mutationen im "activation loop" enthält (IKK2 EE), verwendet. Mit dieser Mutante sollte untersucht werden, ob NF- κ B-Aktivierung alleine ausreicht, um die proinflammatorische Genexpression in Endothelzellen zu aktivieren.

Ergebnisse

Die verschiedenen Mutanten wurden durch retroviralen Gentransfer in die Endothelzellen eingebracht. Diese Strategie war nötig, da Endothelzellen sich nur mit geringer Effizienz transfizieren lassen.

Der verwendete retrovirale Vektor pCFG5 IEGZ wurde von Dr. Dirk Lindemann (vormals Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.



Abb. 3.18: Struktur des verwendeten Retrovirus

Die Expression des inserierten Gens wird nach der Infektion durch den "long terminal repeat" (LTR) des Virus bewirkt. Die interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) bewirkt die gleichzeitige Expression des inserierten Gens und eines GFP-Zeozinresistenz-Fusionsgens.

Dieser Vektor zeichnet sich durch eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) aus, so dass neben der Expression des inserierten Gens auch die Expression eines GFP-Zeozinresistenz-Fusionsgens von derselben RNA ermöglicht wird (Abb. 3.18). Dadurch können die infizierten Zellen sowohl durch Selektion mit dem Antibiotikum Zeozin als auch durch FACS-Analysen bzw. Fluoreszenzmikroskopie anhand der GFP-Expression identifiziert werden. Die an die Expression des inserierten Gens gekoppelte GFP-Expression hat zwei Vorteile: zum einen kann die Anzahl der GFP-positiven Zellen nach der Infektion als Maß für die Transduktionseffizienz verwendet werden, zum anderen kann man infizierte (d.h. GFP-positive) und nichtinfizierte (d.h. GFP-negative) Zellen in einer Population direkt auf unterschiedliche Effekte vergleichen.

Nach der Klonierung der verschiedenen Konstrukte wurde zunächst überprüft, ob die retroviral exprimierte κ B-Proteine NF- κ B-vermittelte Transkription ähnlich effizient hemmen wie die Ausgangsexpressionsvektoren. Dazu wurde eine transiente Transfektion in 293-Nierenepithelzellen durchgeführt. Als Reportergen wurde das Gen für das Enzym Luziferase verwendet, das unter der Kontrolle von drei NF- κ B-Bindungsstellen exprimiert wird (3x κ B luc). Zum Abgleich der Transfektionseffizienz wurde ein lacZ-Reportergen verwendet, das unter der Kontrolle des konstitutiv-

Ergebnisse

aktiven RSV-Promotors exprimiert wird. Um die NF- κ B-abhängige Transkription in diesen Zellen, die keine konstitutive NF- κ B-Aktivität aufweisen, zu aktivieren, wurden Expressionsvektoren für p50 und RelA kotransfiziert. Die Stimulation, die durch p50 und RelA in Abwesenheit eines Inhibitors erreicht wurde, wurde auf den Wert eins gesetzt und die relativen Luziferasewerte der Zellen, die mit den Inhibitoren transfiziert worden waren, darauf bezogen (Abb. 3.19).

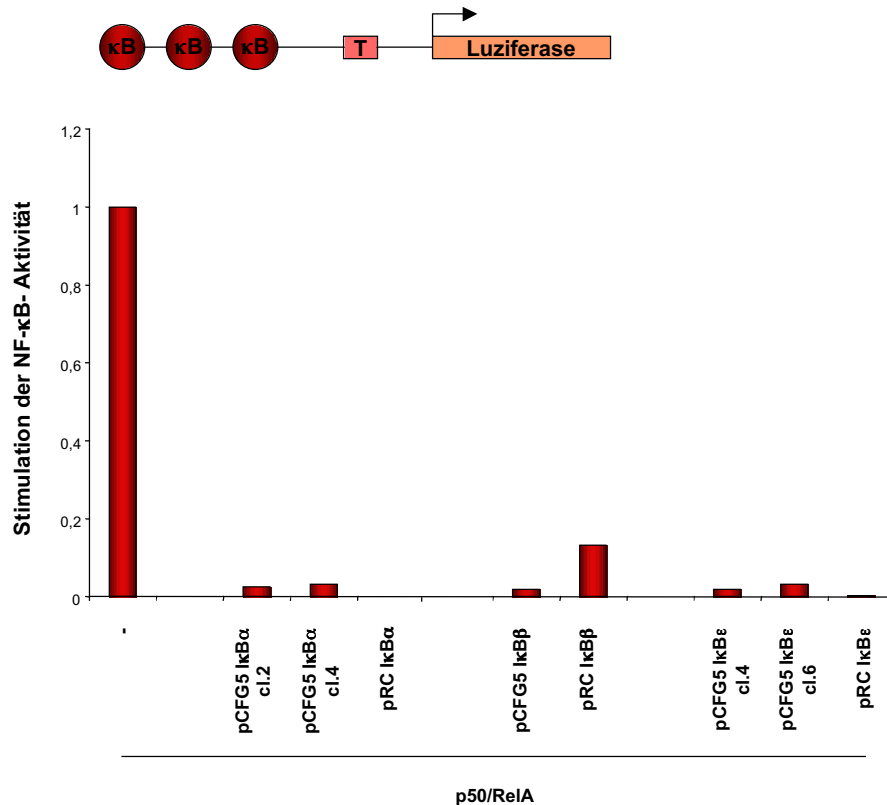


Abb. 3.19: Funktionelle Analyse der retroviralen Konstrukte in transienten Transfektionen

293-Zellen wurden durch eine Kalziumphosphat-Transfektion mit den Reporterkonstrukten 3x κ B luc und RSV lacZ, Expressionsvektoren für p50 und RelA, den Ausgangsexpressionsvektoren bzw. den retroviralen Vektoren für die Inhibitoren transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Luziferase- sowie die β -Galactosidase- Aktivität bestimmt. Daraus wurde die relative Luziferase-Aktivität errechnet. Die relative Luziferase-Aktivität der nur mit p50/RelA transfizierten Zellen wurde auf den Wert eins gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen.

Alle drei Inhibitoren sind unabhängig vom verwendeten Vektor in der Lage, die p50/RelA-vermittelte Transkription stark zu hemmen. Im Falle von I κ B α und I κ B ϵ sind

die Ausgangsplasmide etwas effektiver, im Falle von $I\kappa B\beta$ das retrovirale Plasmid, wobei diese Unterschiede nicht sehr gravierend sind.

Dies zeigt, dass die retroviralen $I\kappa B$ - Konstrukte die NF- κB -Aktivität ähnlich effektiv hemmen wie die Ausgangsplasmide und damit zur Modulation der NF- κB -Aktivität in Endothelzellen verwendet werden können.

Die kinase-inaktiven Mutanten von IKK1 und IKK2 wurden im Labor von Dr. Ingolf Berberich (Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg) und die konstitutiv aktive Mutante der IKK2 von Frau Olga Ritz (Abteilung Physiologische Chemie, Universität Ulm) kloniert und auf ihre Funktionalität überprüft. Wie erwartet, hemmen die kinase-inaktiven Mutanten die Aktivierung von NF- κB , während die konstitutiv-aktive Mutante bereits ohne Stimulus NF- κB aktivieren kann (Daten nicht gezeigt).

3.2.2. Einfluss von transdominantem $I\kappa B\alpha$ auf die TNF- α -induzierte NF- κB -Aktivierung in primären Endothelzellen

Die retroviralen Vektoren wurden mittels Kalziumphosphat-Transfektion in die Produzentenzelllinie Phoenix eingebracht. Nach Selektion mit Zeozin wurde der Überstand dieser Zellen zur Infektion von HUVEC, primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur, verwendet.

Zunächst wurde untersucht, ob das transdominante $I\kappa B\alpha$ in der Lage ist, die NF- κB -Aktivität in diesen Zellen zu hemmen. Dazu wurden die infizierten Zellen für verschiedene Zeitpunkte mit TNF- α behandelt, bevor Extrakte präpariert wurden. Diese Extrakte wurden dann zur Western-Immunoblot-Analyse sowie zur EMSA-Analyse verwendet (Abb. 3.20).

Ergebnisse

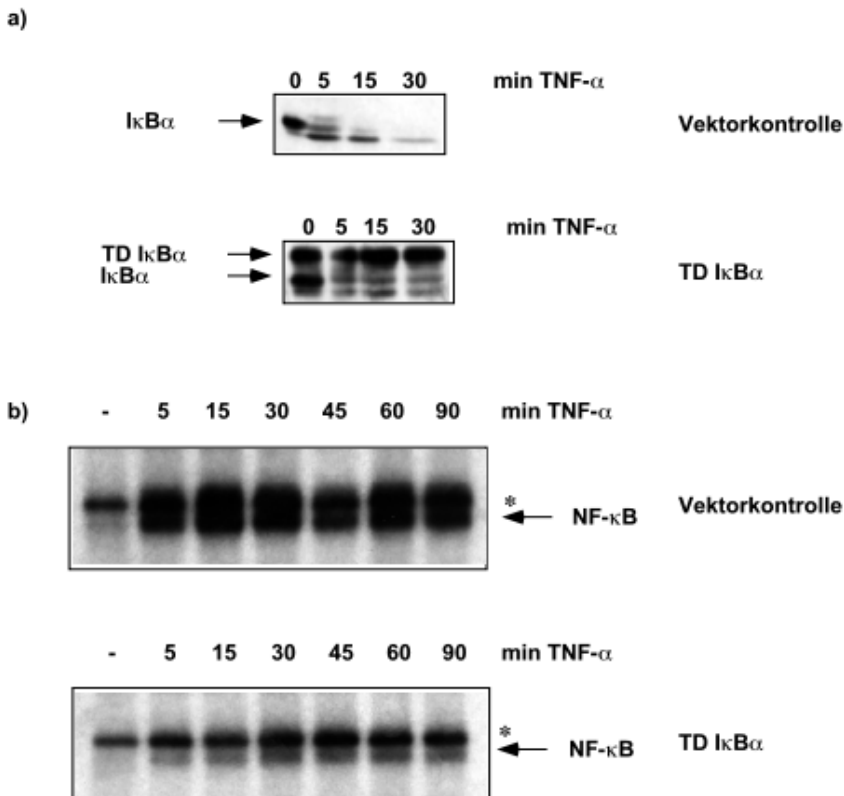


Abb. 3.20: Transdominantes IκBα hemmt die TNF-α-induzierte NF-κB-Aktivierung in HUVEC

a) Western Immunoblot- Analyse der IκBα- Expression in infizierten HUVEC

24h nach der Infektion wurden die Zellen für die angegebenen Zeiträume mit 2ng/ml TNF-α behandelt und danach Gesamtzellextrakte hergestellt. Je 50 µg von diesen wurden über ein 12,5% PAA- Gel aufgetrennt, auf eine PVDF- Membran transferiert und mit spezifischen, polyklonalen Antikörpern gegen IκBα inkubiert. Die Positionen des endogenen und des transdominanten IκBα sind angezeigt.

b) NF-κB- DNA- Bindung nach TNF-α - Stimulation der infizierten HUVEC

Je 5 µg der in a) beschriebenen Extrakte wurden mit einer Igκ- Sonde auf κB- bindende Komplexe untersucht. Der Asterisk markiert eine unspezifische Bande.

Das endogene IκBα wird innerhalb von fünf Minuten TNF-α-Behandlung degradiert. Dieser Abbau ist nach 30 Minuten vollständig (Abb. 3.20a). Im Gegensatz dazu bleibt die Menge des mutanten Proteins während des gesamten Beobachtungszeitraums unverändert. Bereits nach fünf Minuten TNF-α-Behandlung erreichen die Zellen mit dem leeren Vektor das Maximum der DNA-Bindungsaktivität von NF-κB (Abb. 3.20b). Diese bleibt im gesamten Beobachtungszeitraum unverändert. Zellen, die das

transdominante $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ exprimieren, zeigen zu allen Zeitpunkten eine sehr stark reduzierte DNA-Bindung von NF- κ B nach TNF- α -Stimulation. Da die hier untersuchten Zellen eine Mischpopulation von nicht-infizierten und infizierten Zellen darstellen, ist die Restaktivität wahrscheinlich auf die nicht-infizierten Zellen zurückzuführen, die NF- κ B ungehindert aktivieren können. Die transdominanten $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ - und $\text{I}\kappa\text{B}\varepsilon$ -Mutanten zeigten den gleichen Effekt auf die NF- κ B-Aktivierung (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die $\text{I}\kappa\text{B}$ -Mutanten auch in HUVEC in der Lage sind, die NF- κ B-Aktivierung zu hemmen.

3.2.3. Effekt transdominanter $\text{I}\kappa\text{B}$ -Mutanten auf die TNF- α -induzierte Expression proinflammatorischer Proteine

Um zu untersuchen, wie die verschiedenen transdominanten $\text{I}\kappa\text{B}$ -Mutanten die Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen beeinflussen, wurden die infizierten Zellen einen Tag nach der Infektion für ca. 16 Stunden mit TNF- α behandelt, bevor sie im FACS mit spezifischen Antikörpern gegen MCP-1, IL-8, ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin analysiert wurden. Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, sind diese Adhäsionsmoleküle und Chemokine an der Rekrutierung inflammatorischer Zellen aus dem Blut und damit an der Regulation von entzündlichen Prozessen beteiligt.

Zunächst wurden die HUVEC mit Leervektor bzw. transdominantem $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ infiziert. Dabei ergab sich in beiden Ansätzen eine Infektionseffizienz von 60 bis 70% (Abb. 3.21).

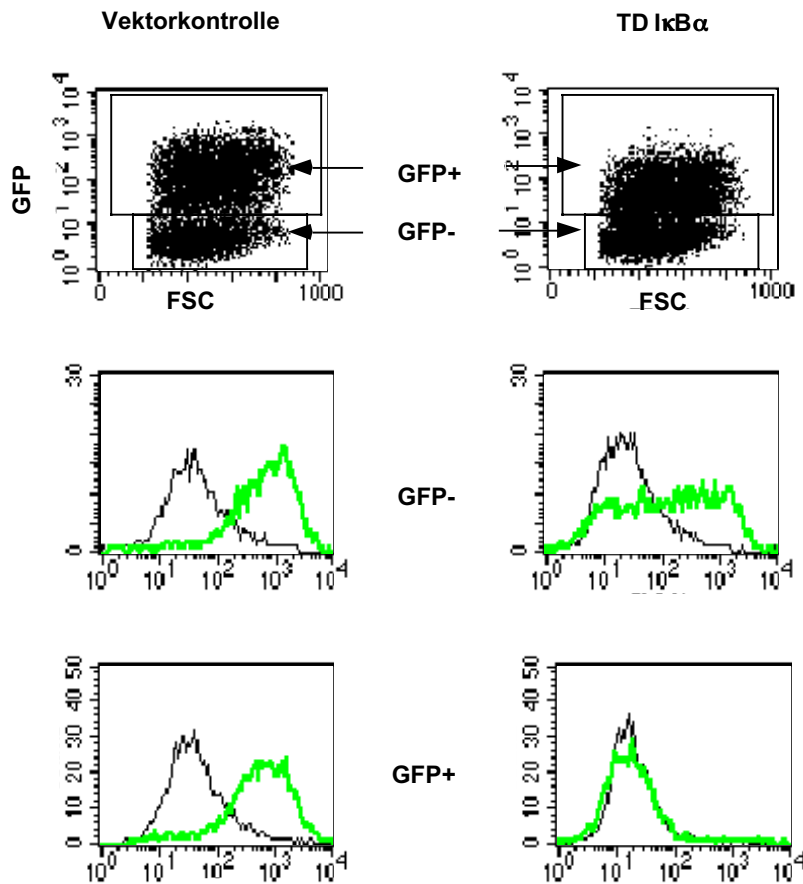


Abb. 3.21: Hemmung der TNF- α -induzierten VCAM-1-Expression durch transdominantes I κ B α

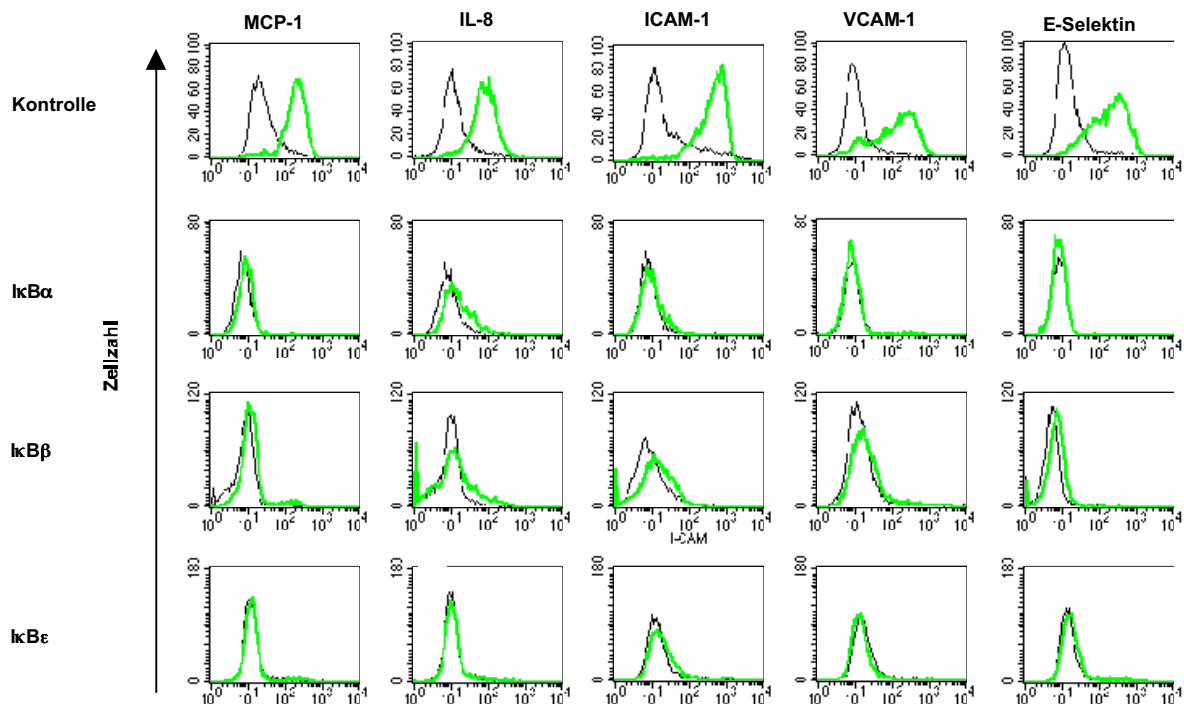
24h nach der Infektion mit der Vektorkontrolle oder einem TD I κ B α -exprimierenden Retrovirus wurden HUVEC mit 2ng/ml TNF- α für weitere 16h stimuliert. Danach wurden die Zellen geerntet und die Expression von VCAM-1 mit spezifischen Antikörpern untersucht. Die infizierte Zellpopulation wurde aufgrund der GFP-Expression identifiziert (obere Reihe). Anschließend wurden die GFP-negativen, nichtinfizierten (mittlere Reihe) und die GFP-positiven, infizierten (untere Reihe) Subpopulationen der mit Leervektor bzw. der I κ B α -Mutante infizierten Zellen im Hinblick auf die VCAM-1-Expression miteinander verglichen. Die schwarze Linie repräsentiert die unstimulierten Kontrollzellen, während die grüne Linie die TNF- α -stimulierten Zellen darstellt.

Anschließend wurden die infizierte, GFP-positive und die nicht-infizierte, GFP-negative Population beider Ansätze im Hinblick auf die TNF- α -induzierte VCAM-1-Expression miteinander verglichen. Zellen, die mit dem leeren Vektor infiziert worden waren, zeigen sowohl in der GFP-positiven als auch in der GFP-negativen Population

Ergebnisse

eine starke Induktion der VCAM-1-Expression nach TNF- α -Stimulation. Diese ist bei den I κ B α -infizierten Zellen nur in der GFP-negativen Population zu beobachten, obwohl in diesem Falle ein Teil der Population auch nicht in der Lage ist, VCAM-1 effizient zu exprimieren. Dies könnte auf Zellen zurückzuführen sein, die zwar infiziert wurden, aber nur geringe Mengen an GFP exprimieren und dadurch als GFP-negativ angesehen wurden. Im Gegensatz dazu ist die VCAM-1-Induktion in der GFP-positiven Population, also der Population, die das transdominante I κ B α exprimiert, komplett blockiert.

Ähnliche Experimente wurden in der Folge auch mit transdominante I κ B β und I κ B ϵ und weiteren endothelialen Proteinen als Zielgenen durchgeführt (Abb. 3.22a). Allerdings ist hier der Einfachheit halber nur die Analyse der GFP-positiven Population dargestellt.



b)

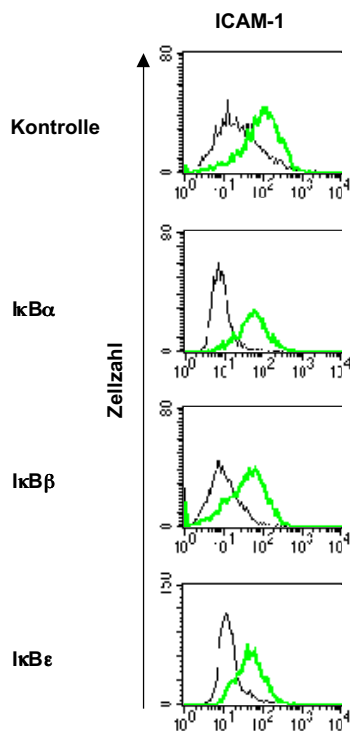


Abb. 3.22: Einfluß transdominanter IκB-Mutanten auf die TNF- α - und IFN γ -induzierte Genexpression in Endothelzellen

a) HUVEC wurden mit den angegebenen transdominanten IκB-Mutanten sowie der Vektorkontrolle infiziert. 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit 2ng/ml TNF- α für weitere 16h (für MCP-1, IL-8, ICAM-1, VCAM-1) bzw. 6h (für E-Selektin) stimuliert. Danach wurden die Zellen geerntet und die intrazelluläre Expression der Chemokine und die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle im FACS gemessen. Die schwarze Linie repräsentiert die unstimulierten Kontrollzellen, während die grüne Linie die TNF- α -stimulierten Zellen darstellt.

b) HUVEC wurden mit transdominanten IκB-Mutanten sowie der Vektorkontrolle infiziert. 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit 25ng/ml IFN γ für weitere 24h stimuliert. Danach wurden die Zellen geerntet und die Oberflächenexpression von ICAM-1 mittels FACS-Analyse bestimmt. Die schwarze Linie repräsentiert die unstimulierten Kontrollzellen, während die grüne Linie die IFN γ -stimulierten Zellen darstellt.

Es zeigte sich, dass die IκB α -Mutante nicht nur die Induktion von VCAM-1, sondern auch die aller anderen untersuchten Proteine komplett hemmt. Ein ähnliches Bild ergab sich auch in Zellen, die mit mutantem IκB β oder IκB ϵ infiziert worden waren. Dies weist darauf hin, dass die Aktivierung von NF- κ B für die Expression aller

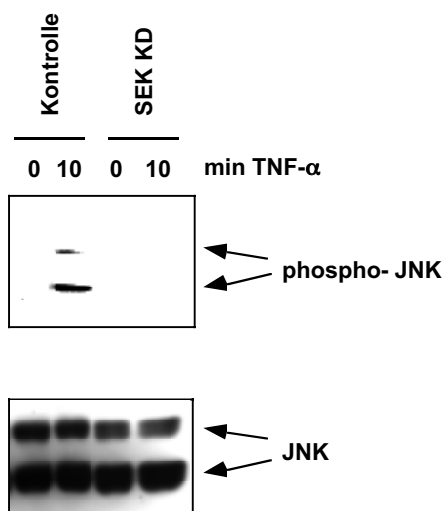
untersuchten Moleküle essentiell ist. Außerdem zeigt es, dass alle I κ B-Proteine in mutierter Form in gleichem Ausmaß in der Lage sind, NF- κ B und die Expression proinflammatorischer Proteine zu hemmen.

Um zu überprüfen, ob diese Hemmung spezifisch für NF- κ B ist oder ob die Expression der Mutanten zu einem generellen Defekt in den Endothelzellen führt, wurden die infizierten Zellen mit IFN- γ behandelt. Dieses Zytokin ist wie TNF- α in der Lage, die Expression von ICAM-1 zu induzieren. IFN- γ benutzt dazu aber nicht den NF- κ B-Signaltransduktionsweg, sondern den JAK/STAT-Weg, der von der Expression der Mutanten nicht betroffen sein sollte. In der Tat zeigte sich, dass die Expression von mutantem I κ B α , I κ B β oder I κ B ϵ die Stimulation der ICAM-1-Expression durch IFN- γ nicht beeinflusst und somit die Hemmung spezifisch für den NF- κ B-Signaltransduktionsweg ist (Abb. 3.22b).

3.2.4. Proinflammatorische Genexpression in Endothelzellen mit einer kinase-inaktiven Mutante von SEK

Neben Bindungsstellen für NF- κ B enthalten viele Gene, die durch proinflammatorische Zytokine induziert werden, auch Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie, zu der verschiedene Untereinheiten wie c-jun, ATF-2 und JunD gehören (Ahmad et al., 1998; Lakshminarayanan et al., 1998; Voraberger et al., 1991). Die Aktivität mehrerer dieser Untereinheiten wird durch die Stresskinase JNK (c-jun N-terminale Kinase) reguliert, die selbst durch die Kinase SEK phosphoryliert wird. Die Aktivität der Kinase wird durch eine Signaltransduktionskaskade ausgehend vom TNF- α -Rezeptor reguliert (Pober, 1998). Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß die TNF- α -induzierte Induktion der untersuchten Proteine von der Aktivität von AP-1 abhängt, wurden die Endothelzellen mit einer kinase-inaktiven Mutante von SEK, die im Labor von Dr. Stephan Ludwig (MSZ, Universität Würzburg) kloniert wurde, infiziert. Zunächst wurde untersucht, ob die Mutante in der Lage ist, JNK nach TNF- α -Stimulation zu phosphorylieren. Dazu wurden die Produzentenzellen für zehn Minuten mit TNF- α behandelt und anschließend eine Western-Immunoblot-Analyse mit einem Antikörper, der spezifisch das phosphorylierte JNK-Protein erkennt, durchgeführt (Abb. 3.23a).

a)



Ergebnisse

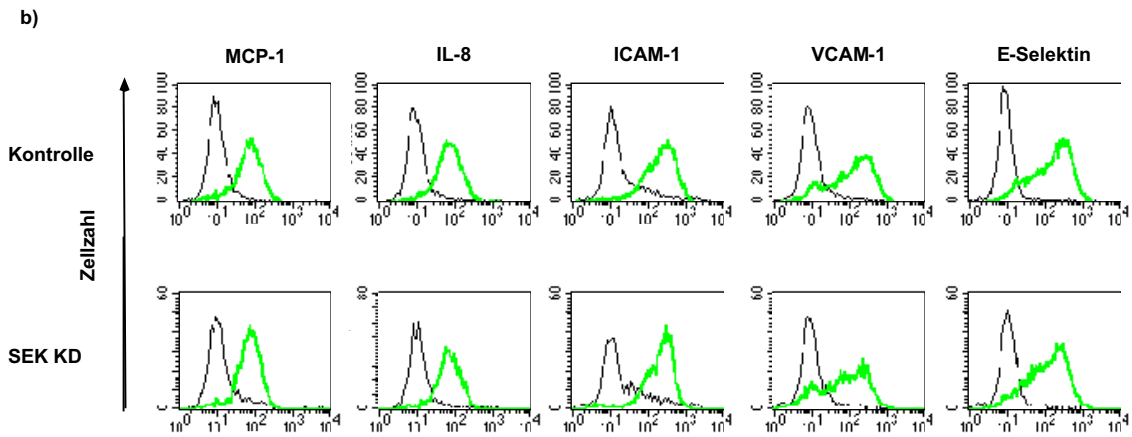


Abb. 3.23: Eine kinase-defiziente SEK-Mutante beeinflusst die proinflammatorische Genexpression in HUVEC kaum

a) Die Produzentenzelllinie, die stabil die SEK KD-Mutante exprimiert, wurde für 10 Minuten mit 80ng/ml TNF- α stimuliert, bevor Gesamtzellextrakte hergestellt wurden. Je 50 μ g dieser Extrakte wurden über ein 12,5 % PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit einem Antikörper, der spezifisch gegen die phosphorylierte Form von JNK gerichtet ist (oberer Teil). Als Kontrolle für die Menge und die Qualität der Extrakte wurde dieselbe Membran mit einem Antikörper gegen die nichtphosphorylierte Form von JNK inkubiert, der JNK1 und JNK2 erkennt (unterer Teil).

b) HUVEC wurden mit der kinase-defizienten SEK-Mutante sowie der Vektorkontrolle infiziert. 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit 2ng/ml TNF- α für weitere 16h (für MCP-1, IL-8, ICAM-1, VCAM-1) bzw. 6h (für E-Selektin) stimuliert. Danach wurden die Zellen geerntet und die intrazelluläre Expression der Chemokine und die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle im FACS gemessen. Die schwarze Linie repräsentiert die unstimulierten Kontrollzellen, während die grüne Linie die TNF- α -stimulierten Zellen darstellt.

Produzentenzellen, die den leeren Vektor enthalten, zeigen eine Phosphorylierung von JNK nach zehn Minuten TNF- α -Stimulation, während Zellen, die die SEK-Mutante exprimieren, keine JNK-Phosphorylierung aufweisen. Um zu zeigen, dass diese Unterschiede nicht auf unterschiedliche Proteinmengen, sondern auf unterschiedliche Kinase-Aktivitäten zurückzuführen sind, wurde die Membran auch mit Antikörpern gegen die nichtphosphorylierte Form von JNK inkubiert (Abb. 3.23a, unterer Teil). Es zeigte sich eine gleiche Proteinmenge in allen Ansätzen, was beweist, dass die Unterschiede im phospho-JNK-Western-Immunoblot tatsächlich auf unterschiedliche Kinase-Aktivitäten zurückzuführen sind und dass die SEK-Mutante funktionell aktiv ist.

Anschließend wurden HUVEC mit der SEK-Mutante infiziert, mit TNF- α stimuliert und die Expression von ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin, MCP-1 und IL-8 im FACS gemessen (Abb. 3.23b). Für alle untersuchten Proteine konnte auch in Gegenwart der Mutante eine signifikante Steigerung der Expression beobachtet werden. Allerdings wurde für VCAM-1 und E-Selektin in allen Experimenten eine etwas geringere Induktion beobachtet, während die anderen Moleküle nicht reproduzierbar beeinflusst waren.

Dies steht im Gegensatz zu den Zellen, die mit den I κ B-Mutanten infiziert worden waren und weist darauf hin, dass der JNK/AP-1-Signalweg im Gegensatz zum NF- κ B-Signalweg nicht essentiell notwendig für die Regulation der proinflammatorischen Genexpression ist.

2.5. Hemmung der TNF- α -induzierten endothelialen Genexpression durch kinase-inaktive Mutanten von IKK1 und IKK2

IKK1 und IKK2 sind die beiden Kinasen im I κ B-Kinase-Komplex, die stimulusabhängig in der Lage sind, die I κ B-Proteine zu phosphorylieren und damit NF- κ B zu aktivieren. Es war noch nicht untersucht worden, welchen Beitrag jede dieser beiden Kinasen zur NF- κ B-Aktivierung in Endothelzellen leistet. Um dies zu analysieren, wurden HUVEC mit Retroviren infiziert, die kinase-inaktive Mutanten von IKK1 oder IKK2 exprimieren und anschließend die TNF- α -induzierte Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen im FACS gemessen.

Ergebnisse

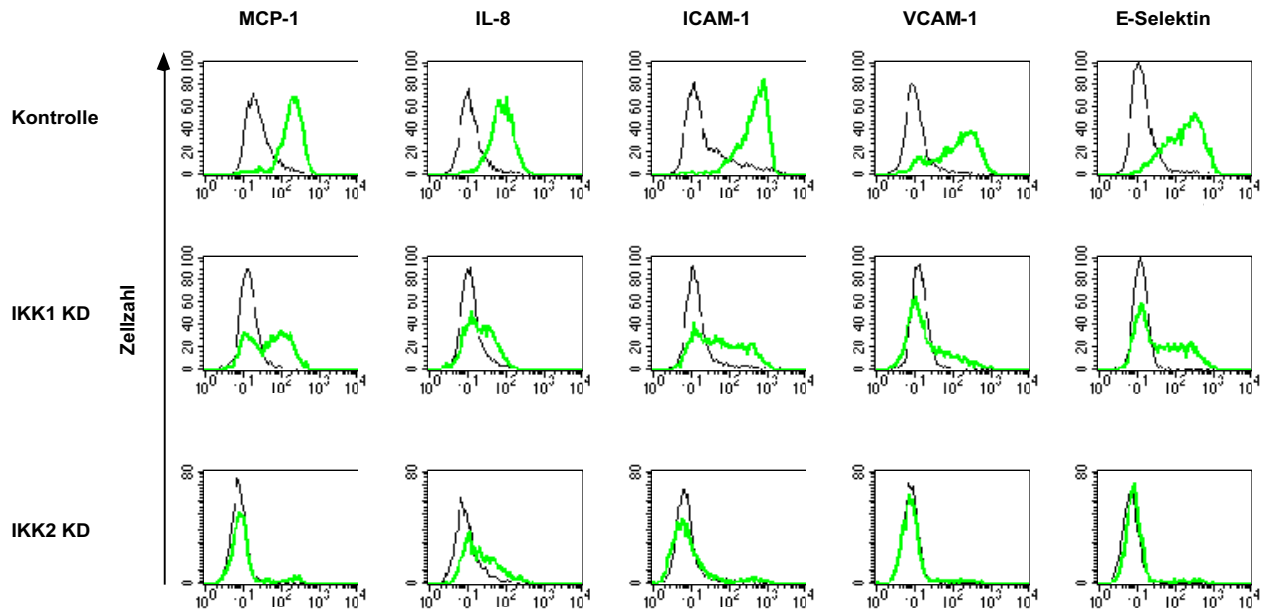


Abb. 3.24: Hemmung der TNF- α -induzierten Genexpression durch kinase-defiziente Mutanten von IKK1 und IKK2

HUVEC wurden mit kinase-defizienten Mutanten der IKK1 oder IKK2 sowie der Vektorkontrolle infiziert. 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit 2ng/ml TNF- α für weitere 16h (für MCP-1, IL-8, ICAM-1, VCAM-1) bzw. 6h (für E-Selektin) stimuliert. Danach wurden die Zellen geerntet und die intrazelluläre Expression der Chemokine und die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle im FACS gemessen. Die schwarze Linie repräsentiert die unstimulierten Kontrollzellen, während die grüne Linie die TNF- α -stimulierten Zellen darstellt.

Die Expression aller untersuchten Moleküle wird durch die kinase-inaktive IKK2 komplett gehemmt (Abb. 3.24). Dagegen variieren die von der IKK1-Mutante ausgeübten Effekte zwischen den Zielgenen: während die Expression von VCAM-1 und IL-8 durch IKK1KD ähnlich stark gehemmt wird wie durch die IKK2-Mutante, wird die Synthese von MCP-1, ICAM-1 und E-Selektin nur teilweise beeinflusst; ein signifikanter Teil der Zellen ist in der Lage, diese Proteine normal zu exprimieren.

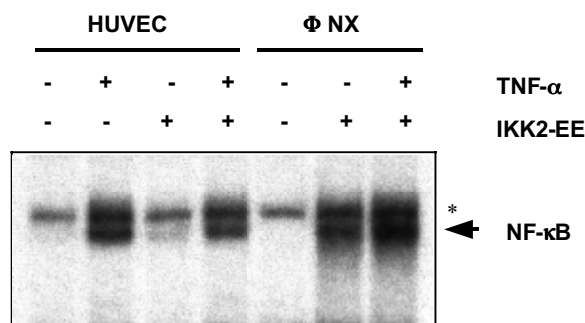
Diese Ergebnisse zeigen, dass die Funktion von IKK2 essentiell für die Induktion aller untersuchten Gene ist und diese nicht durch das Wildtyp-IKK1 ersetzt werden kann. Dagegen ist IKK1 nicht in gleichem Maße für die Induktion aller Gene erforderlich, sondern nur für einen Teil der untersuchten proinflammatorischen Gene.

3.2.6. Eine konstitutiv-aktive IKK2 ist ausreichend, um die Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen zu aktivieren

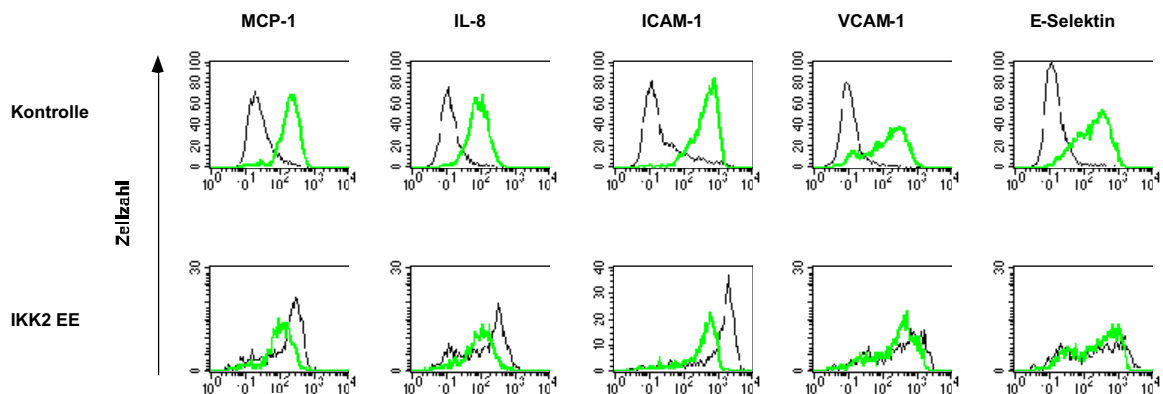
Nachdem im vorhergegangenen Versuch gezeigt worden war, dass die Funktion von IKK2 essentiell für die Expression der untersuchten Gene ist, sollte nun untersucht werden, ob die Expression einer konstitutiv-aktiven Mutante der IKK2 (IKK2 EE) ausreicht, um die Expression dieser Gene anzuschalten.

Zunächst wurde in den stabil transfizierten Phoenix-Zellen und in den infizierten HUVEC untersucht, ob die konstitutiv-aktive Mutante in der Lage ist, die DNA-Bindung von NF- κ B unabhängig von TNF- α zu aktivieren (Abb. 3.25a).

a)



b)



c)

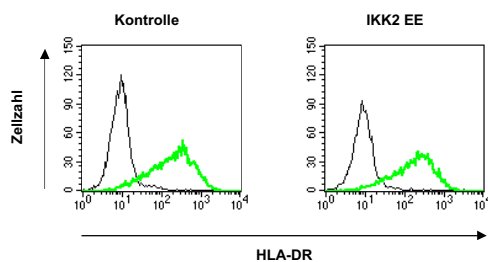


Abb. 3.25: Aktivierung der proinflammatorischen Genexpression durch eine konstitutiv-aktive I κ B-Kinase 2

a) Effekt der konstitutiv-aktiven Kinase auf die NF- κ B-DNA-Bindung

Die stabil transfizierte Produzentenzelllinie sowie mit Leervektor bzw. IKK2 EE infizierte HUVEC wurden für 15 Minuten mit 80ng/ml (Produzentenzelllinie) bzw. 2ng/ml (HUVEC) TNF- α stimuliert oder unstimuliert gelassen. Es folgte die Herstellung von Gesamtzellextrakten, von denen 5 μ g zur Analyse der DNA-Bindung mit einer I κ B-Sonde verwendet wurden. Der Asterisk markiert eine unspezifische Bande.

b) Aktivierung der proinflammatorischen Genexpression durch IKK2 EE

HUVEC wurden mit dem IKK2 EE-Virus bzw. der Vektorkontrolle infiziert. 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit 2ng/ml TNF- α für weitere 16h (für MCP-1, IL-8, ICAM-1, VCAM-1) bzw. 6h (für E-Selektin) stimuliert. Danach wurden die Zellen geerntet und die intrazelluläre Expression der Chemokine und die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle im FACS gemessen. Die schwarze Linie repräsentiert die unstimulierten Kontrollzellen, während die grüne Linie die TNF- α -stimulierten Zellen darstellt.

c) IFN- γ -induzierte HLA- DR-Expression in HUVEC mit einer konstitutiv-aktiven IKK2-Mutante

HUVEC wurden mit dem IKK2 EE-Virus bzw. der Vektorkontrolle infiziert. 24h nach der Infektion wurden die Zellen mit 25ng/ml IFN- γ für weitere 48h stimuliert. Danach wurden die Zellen geerntet und die Oberflächenexpression von HLA- DR im FACS mit spezifischen Antikörpern gemessen. Die schwarze Linie repräsentiert die unstimulierten Kontrollzellen, während die grüne Linie die IFN- γ -stimulierten Zellen darstellt.

In der Produzenten-Zelllinie führt die stabile Expression der IKK2 EE zu einer starken DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B, die durch Zugabe von TNF- α nur noch minimal zu steigern ist. In den HUVEC ist dieser Effekt weniger dramatisch, da nur ein geringer Prozentsatz der Zellen (ca. 10%) infiziert wurde. Dennoch ist die DNA-Bindung von NF- κ B in Zellen, die erfolgreich mit der Mutante infiziert worden waren, konstitutiv erhöht.

Wenn man die mit IKK2 EE infizierten HUVEC auf die Expression der Chemokine und Adhäsionsmoleküle untersuchte, zeigte sich, dass alle untersuchten Gene schon in Abwesenheit von TNF- α aktiviert sind (Abb. 3.25b). Die Stärke der Expression war sogar höher als in den TNF- α -behandelten Kontrollzellen. Wenn die Zellen mit konstitutiv aktiviertem NF- κ B-Weg zusätzlich mit TNF- α behandelt wurden, konnte die Expression der untersuchten Gene nicht weiter stimuliert werden, sondern sie wurde sogar reduziert. In den TNF- α -behandelten Zellen entspricht das Expressionslevel dem in den mit Leervektor infizierten, mit TNF- α behandelten Zellen. Wurde dagegen

Ergebnisse

die Expression von HLA-DR, einem Gen, das durch $\text{IFN}\gamma$ aktiviert wird und keine NF- κ B-Bindungsstellen im Promotor besitzt, untersucht, zeigte sich, dass die Zellen, die IKK2 EE exprimieren, sowohl ohne als auch mit $\text{IFN-}\gamma$ -Stimulation das gleiche Expressionslevel aufweisen wie die Zellen, die nur den Leervektor enthalten (Abb. 3.25c). Dies beweist, dass die konstitutiv-aktive IKK2-Mutante spezifisch auf NF- κ B-abhängige Gene wirkt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression einer konstitutiv-aktiven IKK2-Mutante ausreicht, um die Expression von NF- κ B-abhängigen, proinflammatorischen Genen zu aktivieren.

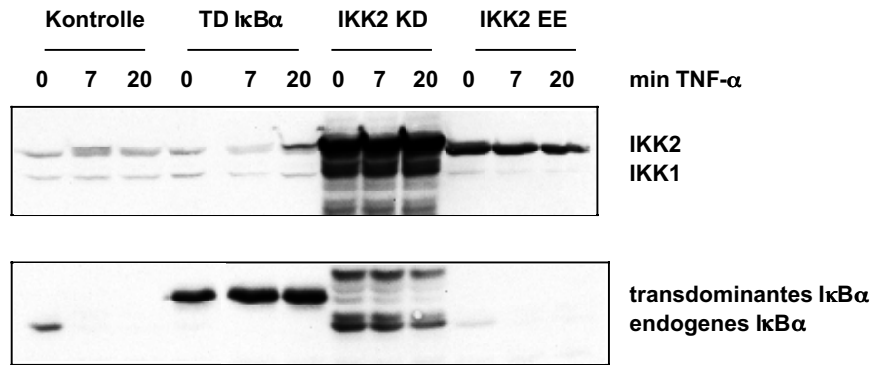
3.2.7. Einfluss von Mutanten des NF- κ B-Signaltransduktionswegs auf inflammatorische Reaktionen von immortalisierten Endothelzellen

Nachdem in den vorausgegangenen Experimenten gezeigt worden war, dass NF- κ B eine wichtige Rolle bei der Regulation der proinflammatorischen Genexpression spielt, sollte in den nachfolgenden Versuchen bestimmt werden, ob Mutanten des NF- κ B-Signaltransduktionswegs Auswirkungen auf physiologische Reaktionen haben, die mit der inflammatorischen Aktivierung des Endothels einhergehen. Wie bereits erwähnt, initiiert die proinflammatorische Aktivierung des Endothels eine Reihe von Reaktionen, die in der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut und deren Migration durch die endotheliale Zellschicht zur entzündlichen Stelle gipfelt. Sowohl für die Adhäsion der Leukozyten an die Endothelzellen als auch für deren Transmigration gibt es experimentelle Systeme, die diese Reaktionen *in vitro* nachstellen und die in der Folge angewendet wurden. Da für diese Versuche eine Zellpopulation benötigt wurde, die zu hundert Prozent die jeweiligen Mutanten exprimiert, wurde anstelle der primären HUVEC, die nur wenige Passagen in Kultur gehalten werden können, die immortalisierte Zelllinie HMEC-1 (humane mikrovaskuläre Endothelzellen aus der Haut) verwendet. Diese wurde aber nicht mit allen Viruskonstrukten infiziert, die für die HUVEC-Analysen verwendet worden waren, sondern lediglich mit den Viren, die transdominantes I κ B α , kinase-inaktive IKK2 bzw. konstitutiv-aktive IKK2 exprimieren.

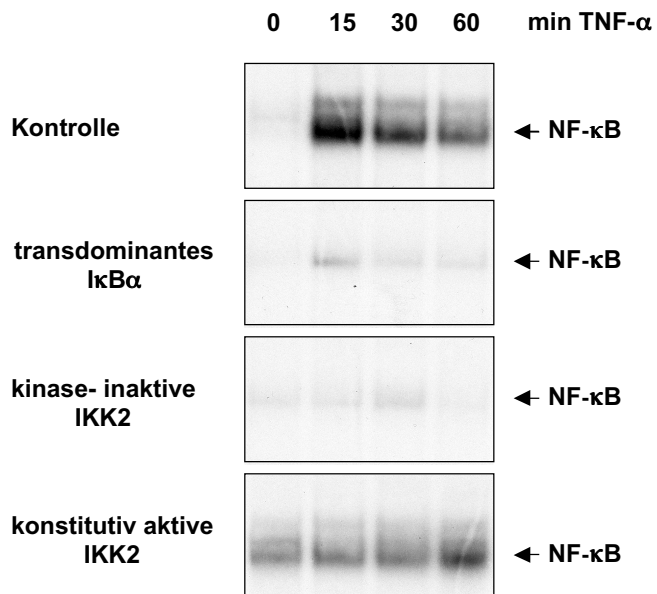
Zunächst wurden diese Zellen wie die HUVEC infiziert und 24 Stunden nach der Infektion durch Behandlung mit Zeozin selektioniert. Nach einer Woche Zeozinbehandlung war die Zellpopulation in der FACS-Analyse zu hundert Prozent GFP-positiv. Um zu untersuchen, ob die HMEC-1-Zellen in ihrem Verhalten nach TNF- α -Stimulation mit den HUVEC vergleichbar sind, wurden sie für verschiedene Zeitpunkte mit TNF- α behandelt und anschließend die Expression der Mutanten, die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B und die Expression der Chemokine und Adhäsionsmoleküle bestimmt (Abb. 3.26).

Ergebnisse

a)



b)



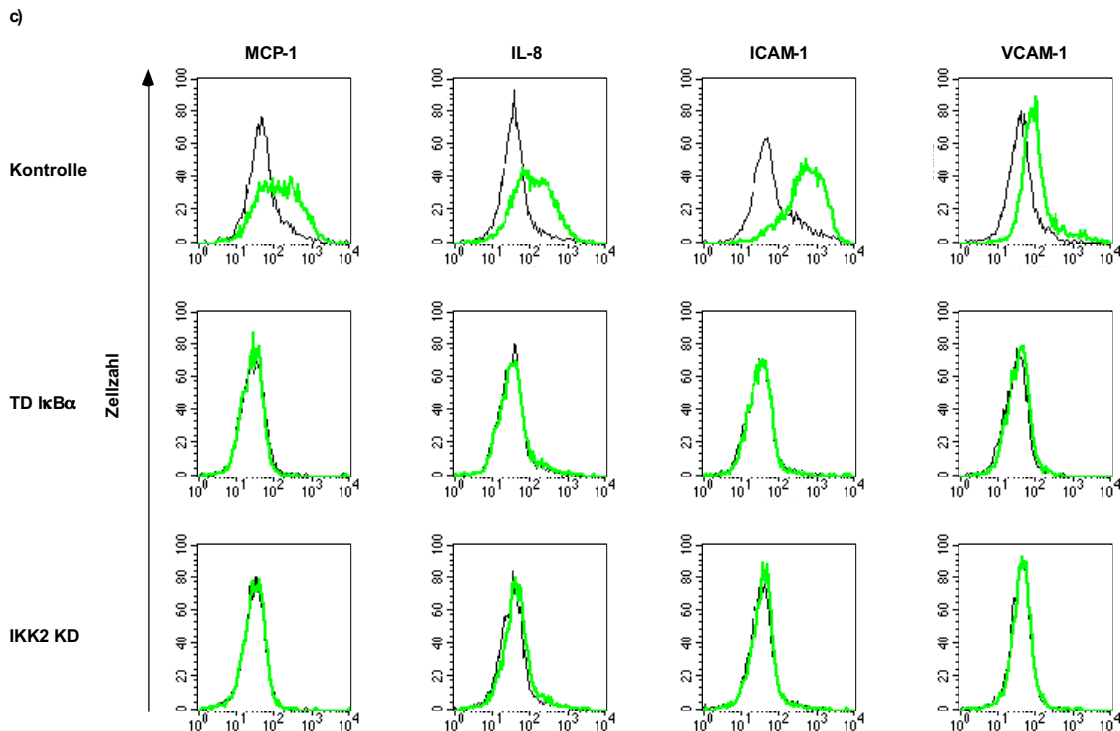


Abb. 3.26: Wirkungen der $\text{I}\kappa\text{B}$ - und IKK2-Mutanten auf die TNF- α -induzierte Aktivierung von HMEC-1

a) Expression der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ - und IKK2-Mutanten während der TNF- α -Stimulation

HMEC-1, die stabil die angegebenen retroviralen Konstrukte exprimieren, wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 10ng/ml TNF- α behandelt und daraufhin Gesamtzellextrakte hergestellt. Je 50 μg von diesen wurden über ein 12,5 %-PAA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese wurde mit spezifischen Antikörpern gegen IKK1/IKK2 (oberer Teil) bzw. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (unterer Teil) inkubiert, um die Mutanten nachzuweisen. Die Positionen von IKK1, IKK2 sowie endogenem und mutantern $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ sind angegeben.

b) Einfluss der Mutanten auf die TNF- α -induzierte NF- κB -Aktivierung

HMEC-1, die stabil die angegebenen retroviralen Konstrukte exprimieren, wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 10ng/ml TNF- α behandelt und daraufhin Gesamtzellextrakte hergestellt. Je 5 μg dieser Extrakte wurden für eine Gelretardationsanalyse mit einer Ig κ -Sonde eingesetzt.

c) FACS-Analyse der infizierten Zellen

HMEC-1, die stabil die angegebenen retroviralen Konstrukte exprimieren, wurden für 16h mit 2 ng/ml TNF- α behandelt. Danach wurden die Zellen geerntet und die intrazelluläre Expression von MCP-1 und IL-8 sowie die Oberflächenexpression von ICAM-1 und VCAM-1 im FACS mit spezifischen Antikörpern gemessen. Die schwarze Linie repräsentiert die unstimulierten Kontrollzellen, während die grüne Linie die TNF- α -stimulierten Zellen darstellt.

TNF- α -Stimulation führt in HMEC-1-Zellen, die mit dem Leervektor infiziert worden waren, zu einem Abbau von I κ B α innerhalb von sieben Minuten und es findet keine Resynthese innerhalb von 20 Minuten statt (Abb. 3.26a). Zellen, die die transdominante I κ B α -Mutante exprimieren, zeigen aufgrund seiner NF- κ B-Abhängigkeit keine Expression des endogenen Proteins; das mutante Protein wird nach TNF- α -Stimulation nicht degradiert. Wenn die kinase-inaktive Mutante der IKK2 in HMEC-1-Zellen überexprimiert wird, kann das I κ B α -Protein nur verzögert und nicht vollständig abgebaut werden, wogegen die konstitutiv-aktive IKK2-Mutante einen konstitutiven, fast vollständigen Abbau von I κ B α bewirkt.

Korrespondierend dazu ist die TNF- α -induzierte DNA-Bindung von NF- κ B in Zellen mit mutantem I κ B α oder IKK2 komplett blockiert, während die Zellen, die IKK2 EE überexprimieren, bereits in Abwesenheit von TNF- α maximale DNA-Bindung zeigen (Abb. 3.26b).

Die FACS-Analyse der TNF- α -behandelten Zellen auf die Expression der Chemokine und Adhäsionsmoleküle zeigt, dass die Zielgene MCP-1, IL-8, ICAM-1 und VCAM-1 in den HMEC-1-Zellen durch TNF- α induziert werden, allerdings in geringerem Maße als in den HUVEC (Abb. 3.26c). E-Selektin dagegen wird in den HMEC-1-Zellen nicht durch TNF- α induziert (Daten nicht gezeigt). Die Expression des transdominanten I κ B α und der IKK2 KD blockiert die TNF- α -stimulierte Expression der untersuchten Moleküle komplett, während die konstitutiv-aktive Mutante der IKK2 zu einer Expression in der Abwesenheit von TNF- α führt, die allerdings auch weniger ausgeprägt ist als in den HUVEC (Daten nicht gezeigt).

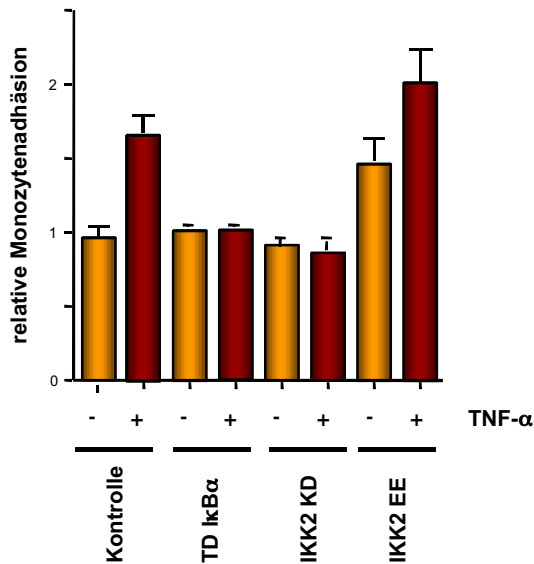
Somit zeigte die Analyse der HMEC-1-Zellen, die stabil die verschiedenen NF- κ B-Mutanten exprimieren, dass sie sich in Bezug auf die NF- κ B-Aktivierung wie auch auf die Induktion der inflammatorischen Proteine ähnlich verhalten wie die HUVEC und damit zur *in vitro* Analyse von inflammatorischen Prozessen geeignet sind.

Mit diesen Zellen wurde ein Adhäsionsassay durchgeführt, mit dem die Adhäsion von Monozyten an die Endothelzellen quantifiziert werden kann. Dazu wurden Monozyten aus peripherem humanem Blut aufgereinigt und dann für 30 Minuten zu TNF- α -stimulierten HMEC-1-Zellen gegeben. Nach der Inkubation wurden nichtadhärierte Monozyten gewaschen, die verbleibenden Zellen lysiert und ein ELISA auf das Enzym Myeloperoxidase durchgeführt, das nur in den Monozyten, nicht aber in den Endothelzellen vorkommt (Abb. 3.27a). Zur Auswertung wurde die Adhäsion an mit

Ergebnisse

Leervektor infizierte, nichtstimulierte Zellen auf den Wert eins gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen.

a)



b)

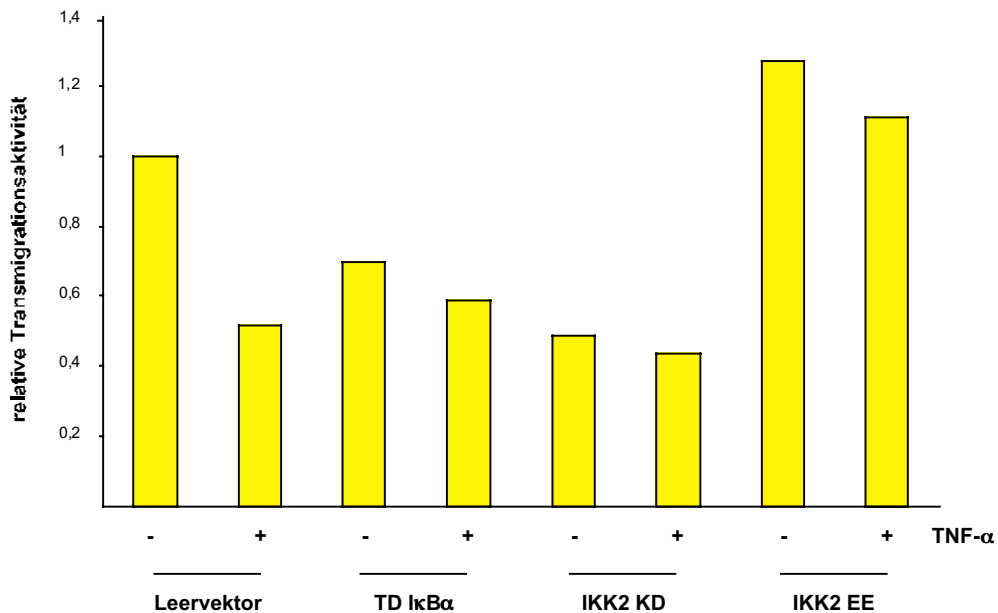


Abb. 3.27: Adhäsion und Transmigration von Monozyten an bzw. durch Endothelzellen, die NF-κB-Mutanten exprimieren

a) Adhäsion von Monozyten an TNF-α-stimuliertes Endothel

Ergebnisse

HMEC-1, die stabil die angegebenen Konstrukte exprimieren, wurden auf 96-Lochplatten ausgesät und mit 2ng/ml TNF- α für 16h stimuliert. Danach wurden die Monozyten zugegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Nachweis der Myeloperoxidase durchgeführt und die Extinktion des Produktes im ELISA-Reader gemessen. Die Extinktion des Ansatzes mit den mit Leervektor infizierten, nichtstimulierten Zellen wurde auf 1 gesetzt und alle anderen Extinktionswerte darauf bezogen.

b) Transmigration von Monozyten durch TNF- α -stimulierte HMEC-1

HMEC-1, die stabil die angegebenen Konstrukte exprimieren, wurden auf Transwell-Filter ausgesät und 24h später für weitere 16h mit 2ng/ml TNF- α stimuliert, bevor die Monozyten zugegeben wurden. Die Transmigration wurde für 4h bei 37°C durchgeführt und anschließend die Zahl der Zellen in der unteren Kammer mit der Neubauer-Kammer bestimmt. Die Zahl der Monozyten, die durch unstimulierte, mit Kontrollvektor infizierte HMEC-1 gewandert sind, wurde auf den Wert eins gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen.

Es zeigte sich, dass TNF- α -Behandlung der leervektor-infizierten Zellen die Adhäsion der Monozyten stimuliert. Diese Stimulation kann in den Zellen, die mit transdominanten I κ B α oder der kinase-inaktiven IKK2 infiziert worden waren, nicht beobachtet werden. Dagegen ist die Adhäsion der Monozyten an Zellen, die IKK2 EE stabil exprimieren, schon in der Abwesenheit von TNF- α erhöht, kann aber durch TNF- α -Stimulation auch noch weiter gesteigert werden. Dies deutet darauf hin, dass NF- κ B für die Adhäsion von Monozyten, die aus dem Blut rekrutiert werden, sowohl notwendig als auch hinreichend ist.

Nach der Adhäsion der Monozyten erfolgt die Transmigration durch die Endothel-Zellschicht zu den Stellen, wo eine Entzündungsreaktion stattfindet. Diese Transmigration kann in einem sogenannten "Transwell"-System *in vitro* simuliert werden. Dabei werden Endothelzellen auf einem Filter ausgesät, der in einen Napf einer 24-Napfplatte inseriert ist. Die Endothelzellen werden dann mit TNF- α stimuliert, bevor die Monozyten auf die Endothelzellen gegeben werden. Nach drei Stunden Inkubationszeit werden die Monozyten, die durch die Endothel-Zellschicht gewandert sind und sich nun in der unteren Kammer befinden, gezählt. Im folgenden Experiment wurde die Zahl der Monozyten, die durch die nichtstimulierten leervektor-infizierten Zellen gewandert sind, auf den Wert eins gesetzt und die anderen Monozytenzahlen darauf bezogen. (Abb. 3.27b).

Vergleicht man zunächst die basale, also die nichtstimulierte Transmigration durch die verschiedenen Endothelzellen, zeigt sich, dass diese im Falle des transdominanten I κ B α und der kinase-inaktiven IKK2 niedriger ist als im Falle der Kontrollzel-

Ergebnisse

len und auch durch TNF- α -Stimulation nicht gesteigert werden kann. Dagegen ist die Transmigration durch IKK2EE-infizierte Endothelzellen im unstimulierten Zustand höher als die durch die Kontrollzellen und sinkt nach TNF- α -Behandlung etwas ab. Dies würde die Annahme bestätigen, dass NF- κ B für die Transmigration von Monozyten sowohl nötig als auch hinreichend ist. Allerdings konnte in den leervektor-infizierten Zellen durch TNF- α -Stimulation nicht wie erwartet eine Steigerung der Transmigrationsaktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen erreicht werden. Da damit die Positivkontrolle für die TNF- α -Stimulation fehlt, ist es schwierig, den Einfluss der Mutanten auf die TNF- α -induzierte Transmigration zu beurteilen.

Auch in weiteren Experimenten, bei denen verschiedene Parameter verändert wurden, konnten keine eindeutigeren Ergebnisse erzielt werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass die aufgrund der FACS-Analysen angestellte Vermutung, dass NF- κ B auch im physiologischen Kontext eine wichtige Rolle spielen könnte, durch die Adhäsionsdaten bestätigt werden konnte, während die Transmigrationsdaten keine eindeutigen Schlussfolgerungen zulassen.

4. Diskussion

4.1. Untersuchung der B- und T-Zellentwicklung mit Hilfe transgener Mäuse

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Bedeutung von NF- κ B für die Entwicklung und Aktivierung von lymphoiden Zellen untersucht. Dazu wurde ein transgenes Maus-Modell verwendet, das auf dem Tet-off-System beruht und die gewebespezifische und konditionale Expression der transgenen I κ B-Proteine erlaubt.

4.1.1. Die transgenen I κ B-Proteine werden nicht stark überexprimiert

Die Analyse der verschiedenen doppeltransgenen Tiere ergab, dass in keiner der tTA/tetI κ B α -Kombinationen eine starke Überexpression des Transgens im Vergleich zum endogenen Protein erreicht werden konnte. Im besten Falle lagen endogenes und mutantes I κ B α im Thymus und in den prä-B-Zellen in etwa gleichen Mengen vor, was bedeutet, dass die Hälfte des zellulären, durch I κ B α kontrollierten NF- κ B-Pools an das mutante, die andere Hälfte an das endogene degradierbare Protein gebunden ist. Dadurch kann auch die Hälfte der NF- κ B-Dimere durch I κ B α -Abbau freigesetzt werden und ihre Funktion erfüllen.

Während der Anfertigung dieser Arbeit gab es verschiedene Publikationen, die in ähnlichen Ansätzen, allerdings nicht mit konditional exprimierten Mutanten, den Einfluss von I κ B α und I κ B β auf die B- und T-Zellentwicklung untersuchten. Dazu wurden andere Promotoren benutzt, um die konstitutive Expression des Transgens steuern.

Im T-Zellsystem wurde entweder der proximale Ick-Promotor oder der CD2-Promotor verwendet. Dadurch wurden verschiedene Expressionsstärken des Transgens erreicht. In einem Fall konnte beobachtet werden, dass eine starke Überexpression des transgenen I κ B α zu einer Reduktion der Expression des endogenen Proteins führt (Ferreira et al., 1999). Dies ist darauf zurückzuführen, dass I κ B α selbst ein NF- κ B-Zielgen ist und damit eine Hemmung von NF- κ B auch die Synthese von I κ B α vermindert (Brown et al., 1993; Ito et al., 1994; Le Bail et al., 1993; Scott et al.,

1993; Sun et al., 1993). Somit ist in den T-Zellen dieser Mäuse das Verhältnis stark zugunsten des Transgens verschoben. Auch das I κ B-gesteuerte I κ B β -Transgen wird im Vergleich zum endogenen Protein stark überexprimiert (Attar et al., 1998). Dagegen wurden aber auch transgene Mauslinien hergestellt, in denen das Verhältnis von mutantern zu endogenem Protein, ähnlich wie in meinem Fall, etwa äquimolar war (Esslinger et al., 1997; Hettmann et al., 1999; Voll et al., 2000). Unabhängig von den Schwankungen des Expressionslevels des Transgens wurden in allen Fällen Effekte auf die T-Zellentwicklung und -aktivierung festgestellt.

In Mäusen, die ein mutantes I κ B α in B-Zellen exprimieren, überstieg die Menge des Transgens nur unwesentlich die Menge des endogenen Proteins (Bendall et al., 1999). Die Transgenexpression beeinflusste nur die Etablierung reifer B-Zellpopulationen in der Milz, während kein Effekt auf die NF- κ B-Aktivität und die B-Zellentwicklung im Knochenmark festgestellt werden konnte.

Die Analyse der verschiedenen tTA/tetI κ B β - und tTA/tetI κ B ϵ -Kombinationen, die im Verlauf der Arbeit hergestellt wurden, ergab ebenfalls keine massive Überexpression des Transgens in den verschiedenen lymphoiden Organen.

Neben dem Expressionsniveau des Transgens wurden die Analysen auch dadurch eingeschränkt, dass das Transgen nicht in allen Stadien der B- und T-Zellentwicklung exprimiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass das tTA-Protein nur in frühen Entwicklungsstadien gebildet wird und nur dann fähig ist, die Expression des Transgens zu steuern (Jochen Heß, persönliche Mitteilung). Dies ist nicht auf eine verminderte Aktivität des verwendeten Promotors in den späteren Phasen der B- und T-Zellentwicklung zurückzuführen, sondern möglicherweise auf eine verminderte Stabilität der tTA-RNA oder des tTA-Proteins in den sekundären lymphoiden Organen. Deshalb konnten in den hier verwendeten Mäusen auch nur die frühen Phasen der lymphoiden Entwicklung untersucht werden. Dies schließt aber nicht aus, dass frühe Differenzierungsdefekte einen Einfluss auf die Etablierung reifer Populationen haben.

Dagegen wurden in ähnlichen Ansätzen Promotoren verwendet, die die Transgenexpression in allen Stadien der B- und T-Zellentwicklung aktivieren.

4.1.2. Die konditionale transgene Expression von I κ B α beeinflusst die Thymozytenentwicklung, nicht jedoch die T-Zellaktivierung

Obwohl das endogene und das transgene I κ B α in gleichen Mengen gebildet werden, konnte eine fast vollständige Hemmung der PMA/Ionomycin-induzierten DNA-Bindung von NF- κ B in Thymozyten beobachtet werden. In vergleichbaren Publikationen dagegen war die DNA-Bindung vollständig durch das transgene I κ B α blockiert (Boothby et al., 1997; Esslinger et al., 1997; Ferreira et al., 1999; Hettmann et al., 1999).

Die Untersuchung der Thymozytenpopulationen ergab eine doozyklinabhängige Reduktion der Zahl der CD8⁺-Zellen im reifsten Thymozytenstadium. Auch von mehreren anderen Gruppen war dieser spezifische Effekt der NF- κ B-Hemmung beschrieben worden (Boothby et al., 1997; Esslinger et al., 1997; Voll et al., 2000). Diese konnten auch zeigen, dass dieser Verlust der CD8⁺-Zellen auf verstärkte Apoptose zurückgeführt werden kann (Boothby et al., 1997). Außerdem wurde mit einer transgenen Mauslinie, die ein NF- κ B-abhängiges Luziferasegen trägt, beobachtet, dass die Luziferase-Aktivität und damit auch die NF- κ B-Aktivität in den CD8⁺-Zellen höher als in den doppeltpositiven und den CD4⁺-Thymozyten ist (Voll et al., 2000). Dies weist auf eine stärkere Abhängigkeit dieser Zellen von einem NF- κ B-vermittelten Signal hin, das aber noch nicht näher charakterisiert werden konnte. Die Reduktion der CD8⁺-Zellen setzt sich in der Peripherie fort, wo sie sogar noch ausgeprägter ist (Boothby et al., 1997; Esslinger et al., 1997; Ferreira et al., 1999; Hettmann et al., 1999; Voll et al., 2000). Dies konnte von mir nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Es reicht also offenbar nicht aus, NF- κ B-Aktivität im Thymus zu hemmen, um dann bei nichtgehemmter NF- κ B-Aktivität einen Effekt in der Peripherie zu beobachten. Vielmehr wird eine kontinuierliche Expression der Mutante in allen Stadien der T-Zellentwicklung benötigt, wie es bei den publizierten Transgenen der Fall war. Dies könnte auf die Plastizität des lymphoiden Systems zurückzuführen sein, die es erlaubt, die CD8⁺-Population in der Peripherie wieder aufzufüllen.

C-Rel-defiziente Mäuse weisen einen Defekt in der T-Zellproliferation auf, entwickeln sich aber normal (Kontgen et al., 1995). Da mit dem I κ B α -Transgen sowohl c-Rel-

als auch RelA-enthaltende Komplexe gehemmt werden, sollte untersucht werden, ob eine Hemmung von NF- κ B die *in vitro* Proliferation von Thymozyten nach Stimulation mit verschiedenen T-zellaktivierenden Substanzen beeinflusst. Dabei zeigte sich kein eindeutiger Effekt des transdominanten κ B α , da nur zu einem Zeitpunkt und nur mit einem Stimulus eine doozyklinabhängige Reduktion der Proliferation durch das Transgen beobachtet werden konnte.

Dagegen hatten mehrere Gruppen, die einen ähnlichen Ansatz verfolgten, durch das transdominante κ B α eine deutliche Hemmung der T-Zellproliferation nach Behandlung mit verschiedenen Stimuli feststellen können (Boothby et al., 1997; Hettmann et al., 1999). Dieser Block konnte auch durch gleichzeitige Behandlung mit dem Wachstumsfaktor IL-2 nur teilweise wieder aufgehoben werden (Boothby et al., 1997). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen aus c-Rel-defizienten Mäusen, bei denen das Fehlen des NF- κ B-abhängigen Wachstumsfaktors IL-2 für die verminderte Proliferation verantwortlich gemacht wurde (Kontgen et al., 1995). Möglicherweise ist dies auf eine spezifische Rolle von RelA zurückzuführen, das in den c-Rel-defizienten Mäusen aktiviert werden kann, aber durch das mutante κ B α gehemmt wird.

Die Diskrepanz zwischen meinen Ergebnissen und den publizierten Daten anderer Gruppen bezüglich der Thymozytenproliferation lässt sich dadurch erklären, dass die Thymozyten *in vitro* zu einfachpositiven T-Zellen differenzieren, in denen das tTA-Transgen nicht mehr vorhanden ist und somit die Mutante nicht mehr exprimiert wird (Jochen Heß, persönliche Mitteilung). Zu Beginn der Kultur liegen noch frühere Entwicklungsstadien vor, allerdings sind diese nicht in der Lage, auf proliferative Stimuli zu reagieren, da hauptsächlich einfachpositive Zellen zur Proliferation angeregt werden (Chang et al., 1991). Deshalb kann man keinen Effekt der κ B α -Mutante auf die Proliferation beobachten.

Die anderen Gruppen, die Effekte des Transgens auch in der Peripherie und auf die Proliferation beobachten konnten, verwendeten entweder den proximalen Ick-Promotor oder den CD2-Promotor. Diese steuern zusammen mit der CD2 3'-Locus-Kontrollregion die Transgenexpression in allen Stadien der Thymozytenentwicklung, aber auch in peripheren T-Zellen (Allen et al., 1992; Carrasco et al., 1996; Perez et al., 1995; Weih et al., 1996). Dagegen können mit dem Transgen unter der Kontrolle

des intronischen Enhancers der schweren Kette nur die ganz frühen Stadien der T-Zellentwicklung untersucht werden, was erklärt, warum zwar dieselben Effekte auf die Thymozytenentwicklung, jedoch nicht auf die Aktivierung reiferer T-Zellen beobachtet wurden.

Die zeitlich beschränkte Transgen-Expression ist auch ein Hindernis für weitere *in vitro* Analysen, die mit der Stimulation von Thymozyten einhergehen, zum Beispiel die Messung der IL-2-Produktion nach mitogener Stimulation. Auch bei diesem Versuch können die Thymozyten zu einfachpositiven T-Zellen reifen, in denen das Transgen nicht exprimiert wird. Andere Gruppen hatten eine drastische Reduktion der IL-2-Produktion durch das $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Transgen feststellen können, was die Ergebnisse aus Studien mit c-Rel-defizienten Zellen bestätigt (Boothby et al., 1997; Hettmann et al., 1999).

Interessanterweise zeigen transgene Mäuse, die dominant-negative Mutanten der IKK2 im Thymus überexprimieren, einen etwas anderen Phänotyp als die $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -transgenen Tiere: sie weisen normale T-Zellpopulationen in Thymus und Milz auf, was im Gegensatz zu den Ergebnissen mit dem $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Transgen steht (Ren et al., 2002a). IKK2-transgene Thymozyten weisen aber proliferative Defekte nach α -CD3-Stimulation auf, die auch mit dem $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Transgen beobachtet werden konnten. Außerdem scheint eine dominant-negative IKK2-Mutante ähnlich wie das transdominante $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ die α -CD3-induzierte Apoptose doppeltpositiver Thymozyten hemmen zu können. Da angenommen wird, dass $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nach T-Zell-Rezeptoraktivierung durch den $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinase-Komplex phosphoryliert wird, ist es verwunderlich, dass $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -transgene Mäuse einen ausgeprägteren Phänotyp haben als die IKK2- und IKK1-transgenen Tiere. Wie diese Unterschiede zustande kommen, ist bisher noch nicht geklärt. Sie könnten aber auf unterschiedliche Expressionsstärken der Transgene und nicht auf richtige physiologische Unterschiede zurückzuführen sein, da die transgene Überexpression von IKK2 nicht ausreichte, um die NF- κ B-Aktivität komplett zu hemmen.

In der Zwischenzeit konnte gezeigt werden, dass NF- κ B auch die Differenzierung der DN Thymozyten beeinflusst: wird NF- κ B in „fetal thymic organ cultures“ (FTOC) oder in transgenen Mäusen gehemmt, ist der Übergang von Phase III zu Phase IV, die mit der Herunterregulation von CD25 einhergeht, blockiert (siehe auch Abb. 1.5; (Bakker

et al., 1999; Voll et al., 2000). Dies ist auf eine fehlende NF- κ B-Aktivierung durch den prä-TCR und damit einhergehende Apoptose zurückzuführen. In Mäusen, die ein NF- κ B-abhängiges Luziferasegen tragen, konnte gezeigt werden, dass zu diesem Zeitpunkt die höchste NF- κ B- Aktivität während der gesamten Entwicklung gemessen werden kann, was die Bedeutung von NF- κ B für diesen Entwicklungsschritt unterstreicht (Voll et al., 2000).

Die tTA/tet κ B α -transgenen Thymozyten wurden auch auf die Expression von CD44 und CD25 untersucht, es konnten aber keine Veränderungen in den Populationen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise konnten auch die meisten Gruppen, die eine Reduktion der CD8⁺-Zellen im Thymus und in der Peripherie beobachten konnten, keine Veränderung der DN Population feststellen (Boothby et al., 1997; Esslinger et al., 1997; Ferreira et al., 1999; Hettmann et al., 1999). Dies könnte möglicherweise auf die Art der Analyse zurückzuführen sein, die nicht zwischen den einzelnen DN Subpopulationen unterschiedet. Wenn sich die Gesamtzahl der DN Thymozyten nicht verändert, würde man dann keinen Effekt beobachten können.

Allerdings konnte auch festgestellt werden, dass sich die Phänotypen der einzelnen Transgene voneinander unterscheiden, obwohl zum Teil dieselbe Mutante und derselbe Promotor verwendet wurden. Dies könnte möglicherweise auf die unterschiedliche genetische Ausstattung der Mäuse zurückzuführen sein, da für die Herstellung der jeweiligen transgenen Mauslinien Eizellen aus unterschiedlichen Mausstämmen verwendet wurden. Deswegen ist es nicht auszuschließen, dass ein und dasselbe mutierte Gen unterschiedliche Wirkungen hervorrufen kann.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass mit den tTA/tet κ B α -transgenen T-Zellen ein Differenzierungsdefekt im Thymus beobachtet werden konnte, was im Einklang mit den Ergebnissen anderer Gruppen steht. Dagegen waren *in vitro* Analysen der T-Zellaktivierung und die Untersuchung späterer Entwicklungsstadien in der Peripherie durch die eingeschränkte Expression des Transgens nicht möglich.

4.1.3. Transdominantes $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ hemmt die *in vitro* B-Zelldifferenzierung, aber nicht die Etablierung normaler B-Zellpopulationen in der Maus

Die B-Zellentwicklung in den tTA/tet $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -transgenen Mäusen wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht.

Dabei zeigte sich *in vivo* kein Effekt auf die Differenzierung der B-Zellen in Knochenmark und Milz. Alle untersuchten Populationen waren mit denen in Wildtyp-Tieren vergleichbar.

Im Gegensatz dazu ist die Population der reifen IgD^{hi} -B-Zellen, also der reifen B-Zellen, sowohl in der Milz wie auch im Knochenmark (rezirkulierende B-Zellen) in Mäusen mit einem konstitutiv exprimierten B-zellspezifischen Transgen reduziert (Bendall et al., 1999). Dagegen waren auch mit diesen transgenen Mäusen keine Effekte auf die frühe B-Zellentwicklung im Knochenmark festgestellt worden.

Der Grund für diese Diskrepanz meiner Ergebnisse mit den mittlerweile publizierten könnte derselbe wie bei den T-Zellen sein: die tet $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Mutante wird nur in den frühen Entwicklungsstadien der B-Zellen exprimiert. Zu dem Zeitpunkt, als die Effekte von der anderen Gruppe festgestellt wurden, war die Expression des Transgens bereits abgeschaltet. Deswegen war es auch nicht möglich, verschiedene andere Analysen mit den B-Zellen durchzuführen. Zum Beispiel wäre auch hier ein Proliferationstest mit B-Zellen aus der Milz interessant gewesen, die auf Behandlung mit LPS oder Bindung des Antigenrezeptors mit einer Steigerung der Proliferation reagieren. Es konnte gezeigt werden, dass $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -transgene B-Zellen eine stark verminderte Proliferation nach Bindung des B-Zellrezeptors, nicht aber nach LPS-Stimulation aufweisen (Bendall et al., 1999).

Das Ergebnis, dass die Expression einer $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Mutante zu einer Reduktion der IgD^+ -Population führt, ist konsistent mit den Studien an NF- κB -defizienten Mäusen, die einen Block in diesem Stadium zeigten (Caamano et al., 1998; Franzoso et al., 1998; Franzoso et al., 1997a; Franzoso et al., 1997b; Grossmann et al., 2000; Kaisho et al., 2001; Pasparakis et al., 2002; Senftleben et al., 2001). Außerdem konnte in diesem Stadium eine erhöhte NF- κB -Aktivität nachgewiesen werden (Feuillard et al., 2000). Allerdings wurde kürzlich auch gezeigt, dass in diesem Stadium der B-Zellentwicklung nicht der Abbau von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, sondern die Prozessierung von p100 die NF- κB -Aktivität kontrolliert (Senftleben et al., 2001). Deswegen sollte ein transdominantes $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ gerade auf diesen Schritt keinen Einfluss ausüben. Es ist aber nicht aus-

zuschließen, dass der Abbau von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in früheren Entwicklungsstadien eine Voraussetzung für spätere Entwicklungsschritte ist.

Außerdem wurde die B-Zellentwicklung auch mit transgenen Mäusen untersucht, die eine dominant-negative Mutante der IKK2 in B-Zellen exprimieren (Ren et al., 2002b). Hier wurden keine Effekte auf die Differenzierung der B-Zellen festgestellt, sondern lediglich auf die Proliferation und die Immunglobulin-Produktion, was im Gegensatz zu den Ergebnissen mit dem transdominanten $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, aber in Einklang mit der p100-Prozessierung, die durch IKK1 vermittelt wird, steht. Allerdings wurde in diesem Ansatz die B-Zellentwicklung im Knochenmark nicht untersucht, so dass nicht festgestellt werden konnte, ob IKK2 möglicherweise frühe Schritte der Differenzierung kontrolliert. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass IKK2 die Aktivierung von B-Zellen z. B. nach Antigenrezeptor-Ligation durch die Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ bewirkt.

Um die frühe B-Zellentwicklung anhand definierter Differenzierungsstadien untersuchen zu können, wurden prä-B-Zellkulturen etabliert und in der Gegenwart des Wachstumsfaktors IL-7 kultiviert.

Eine Western-Immunoblot-Analyse ergab, dass in den prä-B-Zellen, ähnlich wie in den Thymozyten, das transgene Protein etwa genauso stark exprimiert wird wie das endogene $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Allerdings bilden sich in diesen beiden Zelltypen unterschiedliche Effekte der Transgenexpression aus: während in Thymozyten die gebildete Menge der Mutante ausreicht, um stimulus-abhängige NF- κ B-DNA-Bindung effektiv zu hemmen, ist diese in den prä-B-Zellen kaum durch das transdominante $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ beeinflusst. Ein Grund dafür könnten unterschiedliche Halbwertszeiten des $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteins in den beiden Zelltypen sein. Wenn in Thymozyten das endogene $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ rasch abgebaut würde, könnte die Mutante auch rasch mit dem freigesetzten NF- κ B komplexieren. Dagegen könnte die Halbwertszeit in prä-B-Zellen höher sein, so dass die Mutante das endogene Protein in den NF- κ B-Komplexen nicht effizient ersetzen kann. Der basale Abbau von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ wird durch die C-terminale PEST-Domäne reguliert, die von CK II (Casein-Kinase II) phosphoryliert wird (Beauparlant et al., 1996; Lin et al., 1996; McElhinny et al., 1996; Schwarz et al., 1996). Allerdings wurde bisher nicht untersucht, ob sich die basale Umsatzrate in verschiedenen Zelltypen, möglicherweise durch unterschiedliche Aktivität der CK II, unterscheidet. Einzig für

reife B- Zellen konnte eine erhöhte Umsatzrate von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ im Vergleich zu Fibroblasten festgestellt werden, die für die konstitutive NF- κ B- Aktivität in diesen Zellen verantwortlich gemacht wurde (Krappmann and Scheidereit, 1997; Miyamoto et al., 1994).

Auch die differenzierungsabhängige Induktion der DNA-Bindung von NF- κ B wurde durch das Transgen nicht beeinflusst, ebenso wenig wie die Hochregulation von IgM und CD23 nach der Differenzierung.

Wegen der fehlenden Hemmung der stimulus-induzierten DNA-Bindung durch das transdominante $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ wurde vermutet, dass in prä-B-Zellen das Expressionslevel der Mutante im Vergleich zum endogenen Protein nicht ausreicht, um die NF- κ B- Aktivität und damit die durch NF- κ B kontrollierten Differenzierungsschritte signifikant zu beeinflussen. Daher wurden die tTA/tet $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -transgenen Mäuse mit $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Mäusen gekreuzt, so dass als einziges $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Protein die Mutante anwesend und mit den NF- κ B-Dimeren komplexiert war. Wenn $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ einen Einfluss auf die *in vitro* Differenzierung der prä-B-Zellen haben sollte, so sollte dieser in diesen Zellen zutage treten.

Dass die Mutante in diesem System tatsächlich in der Lage ist, NF- κ B effektiv zu hemmen, konnte durch Stimulationsexperimente bewiesen werden, in denen die TNF- α /PMA-induzierte DNA-Bindung durch die Mutante komplett gehemmt wurde und durch Doxyzyklinbehandlung wiederhergestellt werden konnte.

Wenn die IgM-Expression nach IL7-Entzug gemessen wurde, konnte gezeigt werden, dass die Expression des transdominanten $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ diese komplett hemmt.

Ähnliche Befunde wurden in einem anderen B-Zellsystem erhoben (Scherer et al., 1996). Es wurden prä-B-Zellen benutzt, die mit dem Abelson-Leukämie-Virus infiziert worden waren. Diese Infektion führt zu einem Block in der Entwicklung vor dem Rearrangement der κ leichten Kette, da das v-abl-Onkogen sowohl die NF- κ B-Aktivierung als auch die RAG1/RAG2-Expression hemmt (Chen et al., 1994; Cohen et al., 2001; Klug et al., 1994). Im beschriebenen Fall wurde eine temperaturempfindliche Mutante von v-abl verwendet, die eine Induktion der Differenzierung durch Änderung der Temperatur ermöglicht. Alternativ können die Zellen auch mit LPS zur Differenzierung gebracht werden. Diese Zellen wurden mit einer transdominanten $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Mutante stabil transfiziert. Es zeigte sich, dass dieses Protein

die LPS-induzierte Transkription und das Rearrangement der κ leichten Kette hemmt (Scherer et al., 1996).

Ein Manko dieses Systems ist es aber, dass die Zellen unter diesen Bedingungen zu reifen B-Zellen weiterdifferenzieren können. Daher liegt immer eine Mischung von Zellen verschiedener Entwicklungsstadien vor, die schwierig zu charakterisieren sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht überprüft, ob die konditionale Expression der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Mutante zur Hemmung der κ Transkription führt, dies ist aber zu vermuten, da die Expression der κ leichten Kette stark von NF- κ B abhängt und eine Hemmung der IgM-Hochregulation beobachtet werden konnte. Andererseits scheint aber der intronische Enhancer, an den NF- κ B bindet, nicht alleine das Rearrangement und die Expression der κ leichten Kette zu regulieren, da eine Deletion des Enhancers zwar ein stark eingeschränktes Rearrangement, aber eine normale Expression von κ zur Folge hat (Xu et al., 1996). Wenn beide Enhancer der κ leichten Kette fehlen, findet weder Expression noch Rearrangement von κ statt, die Zellen sind aber immer noch in der Lage, λ zu rearrangieren und zu exprimieren (Inlay et al., 2002). Da aber kürzlich auch gezeigt werden konnte, dass NF- κ B auch die Transkription und das Rearrangement der λ leichten Kette reguliert, ist eine komplette Hemmung der IgM-Expression konsistent mit den publizierten Daten (Bendall et al., 2001; Combriato and Klobeck, 2002).

Andererseits wurde aber auch in unserem Labor festgestellt, dass während der *in vitro* Differenzierung zu unreifen Zellen nicht $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, sondern $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ abgebaut wird, was zur persistierenden Freisetzung von p50/RelA-Heterodimeren führt (Kistler et al., 1998). Deshalb würde man eher erwarten, dass die transdominante $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Mutante keinen oder nur geringe Effekte auf den Differenzierungsprozess zu unreifen Zellen hat. Allerdings konnte in „knock-in“-Mäusen eine funktionelle Redundanz zwischen $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ festgestellt werden (Cheng et al., 1998). Wenn $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ unter der Kontrolle des $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Promotors exprimiert wird, sind die transgenen Tiere lebensfähig, zeigen keine phänotypischen Abnormalitäten und weisen in verschiedenen Zelltypen eine ähnliche NF- κ B-Aktivität wie die Wildtyp-Tiere auf. Dies weist darauf hin, dass $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ komplett die Funktionen von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ übernehmen kann.

Auch im hier untersuchten System könnten die beiden Proteine funktionell redundant sein. Für eine Redundanz von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ im Immunsystem spricht auch, dass in

T-Zellen durch mutante $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ - und $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ -Proteine die gleichen Effekte festgestellt werden konnten (Attar et al., 1998; Boothby et al., 1997; Ferreira et al., 1999; Hettmann et al., 1999). Um zu untersuchen, ob die transdominanten $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ - und $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ -Proteine tatsächlich dieselben Effekte hervorrufen, könnte man die prä-B-Zellen aus den tTA/tet $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ -Mäusen analysieren. Allerdings könnte auch hier das Problem auftreten, dass die Expression des Transgens nicht stark genug ist, um die B-Zellentwicklung signifikant zu beeinflussen, da das Verhältnis zwischen endogenem und transgenem $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ ähnlich wie das von endogenem und transgenem $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ist. Dies wird dadurch bestärkt, dass in ersten Analysen der B- und T-Zellpopulationen in den tTA/tet $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ -transgenen Mäusen keine signifikanten Änderungen zu beobachten waren.

Wenn die tTA/tet $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ / $\text{I}\kappa\text{B}\alpha^{-/-}$ -prä-B-Zellen in der Gegenwart von Doxyzyklin zu unreifen B-Zellen differenziert wurden, das die Transgenexpression abschaltet, konnte die IgM-Expression teilweise wiederhergestellt werden. Interessanterweise blieb sie aber signifikant niedriger als in den Kontrollzellen, die kaum beeinflusst von der Anwesenheit von Doxyzyklin waren.

Ein Grund dafür könnte sein, dass die Differenzierung zeitlich verzögert abläuft und deswegen zum Zeitpunkt der Analyse noch keine unreifen B-Zellen vorhanden waren. Dies wiederum könnte eine Folge der verstärkten Expression der prä-B-Zell-Rezeptorgene V_{preB} und $\lambda 5$ sein. Die Expression dieser Gene wird durch NF- κB negativ reguliert, wenn prä-B-Zellen zu unreifen B-Zellen differenzieren (Li et al., 2001). Daher sollten diese Moleküle in den prä-B-Zellen, in denen NF- κB gehemmt ist, verstärkt exprimiert werden. Dies führt zur Steigerung der Proliferation und zur Hemmung der VDJ-Rekombination und damit der Differenzierung (Burrows et al., 2002). Möglicherweise werden die Moleküle nach Doxyzyklingabe erst verzögert abgebaut, so dass sie die effiziente Hochregulation von IgM hemmen.

Wenn die mutanten prä-B-Zellen zu reifen B-Zellen differenziert wurden und die Expression von CD23 untersucht wurde, zeigte sich, dass das transdominante $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ die Expression von CD23 in Abwesenheit von Doxyzyklin komplett hemmt. Dagegen erreichen die doxyzyklin-behandelten Zellen eine CD23-Expression, die mit der der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -defizienten Kontrollzellen vergleichbar ist. Diese komplette Hemmung der Differenzierung zu reifen B-Zellen ist überraschend, da in diesem Entwicklungsschritt

NF- κ B-Dimere freigesetzt werden, die nicht durch I κ B α kontrolliert werden. Dies sind p52/RelB-Dimere, die durch Prozessierung von p100 entstehen (Coope et al., 2002). Deswegen sollte das mutante I κ B α keinen Einfluss auf diesen Differenzierungsschritt haben. In Übereinstimmung damit wurde beobachtet, dass ein transdominantes I κ B α die CD40-induzierte Hochregulation von CD23 nur teilweise blockiert (Hsing and Bishop, 1999). Allerdings wurden in diesem Experiment B-Zellen benutzt, die nach CD40-Ligation nicht wie in meinem Falle RelB-, sondern RelA-, c-Rel- und p50-enthaltende Komplexe freisetzen (Hsing et al., 1997). Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, binden unterschiedliche NF- κ B-Dimere an unterschiedliche Zielsequenzen in den Promotoren der kontrollierten Gene. Der CD23-Promotor enthält zwei mutmaßliche NF- κ B-Bindungsstellen, von denen eine mit höherer Affinität gebunden wird als die andere (Tinnell et al., 1998). Daher wäre es möglich, dass RelB-enthaltende Komplexe an eine Bindungsstelle binden und dies absolut notwendig für die Expression von CD23 ist, während die andere Bindungsstelle von RelA- oder c-Rel-enthaltenden Komplexen gebunden wird und in geringerem Maße zur CD23-Expression beiträgt. So ließe sich erklären, warum das transdominante I κ B α in dem anderen B-Zellsystem die Expression von CD23 nur teilweise hemmt.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass ein transdominantes I κ B α einen Entwicklungsschritt blockiert, der von einem anderen Inhibitor kontrolliert wird, könnte sein, dass ein durch I κ B α kontrolliertes Differenzierungssignal, z. B. die Expression von IgM, die Voraussetzung für die Weiterentwicklung der B-Zellen zu reifen B-Zellen schafft. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die durch Prozessierung entstandenen p52/RelB-Dimere von I κ B α gebunden und dadurch gehemmt werden. Dagegen spricht aber, dass für p52/RelB-Komplexe eine verringerte Affinität zu I κ B α nachgewiesen werden konnte (Dobrzanski et al., 1994; Lernbecher et al., 1994).

Abschließend lässt sich feststellen, dass prä-B-Zellen, die ausschließlich das transdominante I κ B α exprimieren weder zu unreifen noch zu reifen B-Zellen differenzieren können. Dies unterstreicht die Bedeutung von NF- κ B in verschiedenen Stadien der B-Zell-Entwicklung.

4.2. Beteiligung von NF- κ B und AP-1 an inflammatorischen Reaktionen des Endothels

Ziel des zweiten Teils der Arbeit war es, die Bedeutung verschiedener Komponenten des NF- κ B-Signaltransduktionswegs für inflammatorische Reaktionen des Endothels zu untersuchen. Dazu wurden zum einen primäre Endothelzellen, HUVEC, zum anderen immortalisierte Endothelzellen, HMEC-1, mit Retroviren infiziert, die verschiedene I κ B- und IKK-Mutanten exprimieren. Anschließend wurde die Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen sowie die Adhäsion und Transmigration von Monozyten an bzw. durch die endotheliale Zellschicht untersucht.

4.2.1. Hemmung der proinflammatorischen Genexpression durch transdominante I κ B-Proteine

Als der Effekt der mutanten I κ B-Proteine auf die Expression der Adhäsionsmoleküle und Chemokine nach TNF- α -Stimulation untersucht wurde, ergab sich ein sehr einheitliches Bild: alle drei I κ B-Isoformen hemmten die TNF- α -induzierte Expression aller untersuchten Proteine komplett. Dies ist insofern interessant, als dass für die verschiedenen Inhibitoren unterschiedliche Spezifitäten für die verschiedenen NF- κ B-Dimere diskutiert wurden. Demnach sollten I κ B α und I κ B β p50/RelA-enthaltende Dimere effektiv hemmen können, während für I κ B ϵ eine Rolle speziell bei der Kontrolle von c-Rel-enthaltenden Komplexen vermutet wurde (Duckett et al., 1993; Li and Nabel, 1997; Simeonidis et al., 1997; Spiecker et al., 2000; Thompson et al., 1995; Whiteside et al., 1997). Aufgrund seiner präferentiellen Hemmung von c-Rel-enthaltenden Komplexen war auch eine Rolle von I κ B ϵ spezifisch bei der Regulation von ICAM-1 diskutiert worden (Spiecker et al., 2000).

Da durch TNF- α hauptsächlich p50/RelA-Heterodimere freigesetzt werden (Hooft van Huijsduijnen et al., 1993; Lakshminarayanan et al., 1998; True et al., 2000), sollten also zwar I κ B α und I κ B β einen Effekt auf die Expression der untersuchten Gene ausüben, nicht jedoch I κ B ϵ . In transienten Transfektionen des Konstrukts konnte ich aber auch zeigen, dass I κ B ϵ p50/RelA-vermittelte Transkription eines NF- κ B-abhängigen Promotors ebenso effektiv hemmen kann wie I κ B α und I κ B β , was im

Einklang mit den FACS-Ergebnissen steht (Abb. 19). Diese Ergebnisse zeigen auch, dass die Expression von ICAM-1 nicht ausschließlich durch $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$ -gebundene NF- κ B-Komplexe reguliert wird, sondern auch durch Dimere, die an $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ gebunden sind.

Andere Gruppen konnten mit weiteren Mutanten des NF- κ B- Wegs bzw. synthetischen Molekülen eine ähnliche Hemmung der proinflammatorischen Genexpression beobachten. Wenn Endothelzellen mit einer RelA-Mutante infiziert wurden, der die Transaktivierungsdomäne fehlt, war die Expression von E-Selektin, ICAM-1 und IL-8 blockiert (Soares et al., 1998). Eine Hemmung der IL-8-Expression konnte auch mit inaktiven NEMO-Mutanten in myeloiden Zellen beobachtet werden (Le Page et al., 2001). Eine Behandlung von HUVEC mit dem synthetischen Molekül APC0576, das die NF- κ B-vermittelte transkriptionelle Aktivierung hemmt, resultierte in einer verminderten MCP-1- und IL-8-Produktion (Takehana et al., 2002).

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von NF- κ B bei der Regulation der Expression dieser Gene.

4.2.2. Unterschiedliche Beteiligung der $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinasen 1 und 2 an der Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen

Nachdem gezeigt worden war, dass die verschiedenen $\text{I}\kappa\text{B}$ -Isoformen die Expression proinflammatorischer Proteine komplett hemmen, wurde untersucht, inwieweit die beiden $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinasen 1 und 2 an der Induktion dieser Gene beteiligt sind. Dabei zeigte sich, dass IKK2 für die Expression aller untersuchten Gene benötigt wird. Dies wird durch die Befunde einer anderen Gruppe bestätigt, die mit einer dominant-negativen IKK2-Mutante eine Reduktion in der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin beobachten konnte (Oitzinger et al., 2001).

Im Gegensatz dazu beeinflusst IKK1 die Expression nur mancher der untersuchten Moleküle: die kinase-inaktive Mutante hemmt lediglich die Expression von VCAM-1 und IL-8 komplett, die Synthese der anderen untersuchten Moleküle ist nur teilweise reduziert. Aber selbst dies ist überraschend, da in IKK1-defizienten Fibroblasten kein Einfluss auf die TNF- α -vermittelte NF- κ B-Aktivierung beobachtet werden konnte (Hu et al., 1999; Takeda et al., 1999). Deswegen war vermutet worden, dass allein IKK2 die Aktivierung von NF- κ B nach proinflammatorischer Stimulation vermittelt.

Allerdings gab es in letzter Zeit mehrere Publikationen, die zeigten, dass IKK1 für die Induktion bestimmter Gene nach TNF- α -Stimulation benötigt wird. So wurde zum Beispiel herausgefunden, dass in humanen Epithelzellen die TNF- α -induzierte Expression der Cyclooxygenase 2 (COX-2) durch kinase-inaktive Mutanten sowohl der IKK1 als auch der IKK2 in gleichem Ausmaß gehemmt werden kann (Chen et al., 2001b; Chen et al., 2000). Dagegen wird die Expression von ICAM-1 nicht durch die IKK1-Mutante beeinflusst (Chen et al., 2001a). Dies steht im Einklang mit den hier erörterten Befunden, in denen die Expression von ICAM-1 in Gegenwart der kinase-inaktiven IKK1-Mutante noch signifikant durch TNF- α stimuliert werden konnte.

In einer Analyse des Expressionsprofils von embryonalen Fibroblasten, denen IKK1, IKK2 oder IKK γ fehlen und die mit TNF- α stimuliert wurden, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Expression einer Reihe TNF- α -induzierter Gene von der Kinase-Aktivität sowohl der IKK1 als auch der IKK2 abhängt (Li et al., 2002). Interessanterweise wurde in diesen Experimenten auch herausgefunden, dass MCP-1 IKK-1-unabhängig, aber IKK2-abhängig exprimiert wird, was wiederum die Ergebnisse in den HUVEC bestätigt.

Ein Grund für die Beteiligung der IKK1 an der Kontrolle der proinflammatorischen Genexpression entgegen den Daten aus den IKK1-defizienten Mäusen könnte sein, dass IKK1 in der Lage ist, IKK2 in ruhenden und TNF- α -stimulierten Zellen zu phosphorylieren (O'Mahony et al., 2000; Yamamoto et al., 2000). Diese Phosphorylierung führt zur Aktivierung der Kinase-Aktivität von IKK2 (Yamamoto et al., 2000). Eine starke Überexpression der kinase-inaktiven Mutante könnte das Wildtyp-Protein aus dem IKK-Komplex herausschleusen und dadurch die Phosphorylierung und Aktivierung der IKK2 verhindern.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die Phosphorylierung der Transaktivierungsdomäne von RelA nicht effizient ablaufen kann, da diese sowohl IKK1 als auch IKK2 benötigt (Sizemore et al., 2002). Diese Phosphorylierung ist notwendig, um die transkriptionelle Aktivität von RelA-enthaltenden Dimeren zu steigern. Diese Hypothese lässt sich in Einklang mit den FACS-Ergebnissen bringen. Die einzigen Moleküle, die von der Expression der IKK1 KD nicht wesentlich betroffen sind, sind MCP-1 und ICAM-1. Für die Promotoren beider Gene konnte eine bevorzugte Bindung von c-Rel-enthaltenden Komplexen gezeigt werden (Oda et al., 2002; Spiecker et al., 2000). Die Kinase, die c-Rel phosphoryliert, konnte noch nicht

identifiziert werden. Deshalb kann auch noch keine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit die c-Rel-vermittelte Transaktivierung von den I κ B-Kinasen abhängt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die beiden I κ B-Kinasen für die Expression von manchen der untersuchten Proteine redundant sind, während für andere nur die Funktion von IKK2 entscheidend ist.

4.2.3. Eine konstitutiv-aktive IKK2-Mutante reicht aus, um proinflammatorische Genexpression in der Abwesenheit von TNF- α zu aktivieren

Die Verwendung einer konstitutiv-aktiven IKK2-Mutante (IKK2EE) zeigte, dass die Aktivierung von NF- κ B alleine schon ausreicht, um die Expression aller untersuchten inflammatorischen Gene in Abwesenheit von TNF- α voll zu aktivieren (Abb. 25b). Somit ist NF- κ B also nicht nur essentiell, sondern auch ausreichend für die Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen.

Interessanterweise ist die durch IKK2EE erreichte Aktivierung sogar höher als die der TNF- α -behandelten Kontrollzellen. Diese wurde reduziert, wenn die IKK2EE-infizierten Zellen zusätzlich mit TNF- α behandelt wurden.

Für diese Beobachtung gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten (Abb. 4.1): zum einen die Induktion von NF- κ B-Modulatoren durch TNF- α , zum anderen die Konkurrenz mit anderen, TNF- α -induzierten Transkriptionsfaktoren um eine limitierte Menge an Koaktivatoren.

Diskussion

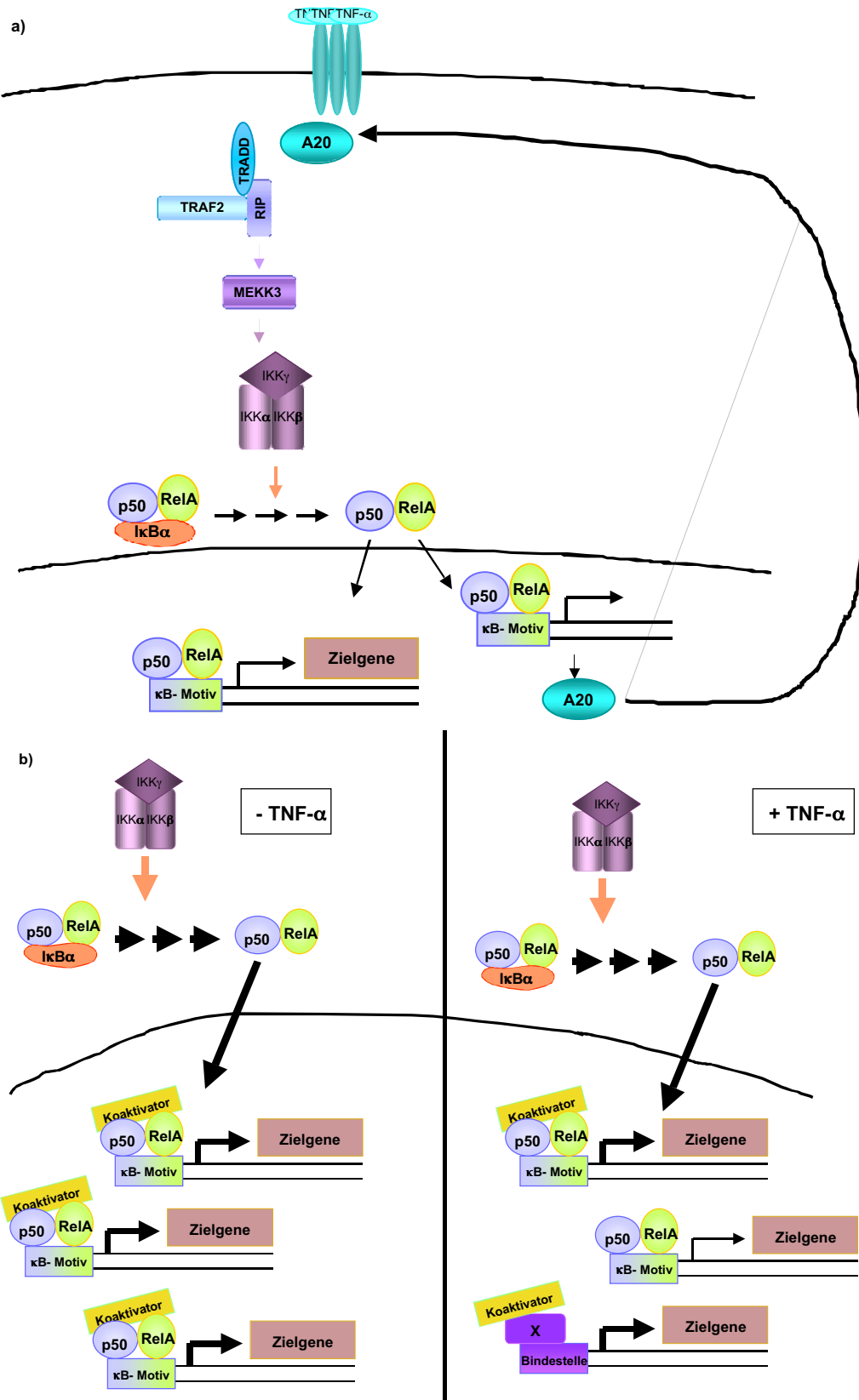


Abb. 4.1: Mögliche Erklärungen für die TNF- α -induzierte Reduktion der IKK2EE-vermittelten Aktivierung von Endothelzellen

- a) Induktion eines inhibitorischen Moleküls
- b) Induktion anderer Transkriptionsfaktoren, die mit NF- κ B um Koaktivatoren konkurrieren

Ein Gen, das durch TNF- α induziert wird und ein negativer Regulator von NF- κ B ist, ist A20, das in HUVEC aufgrund seiner TNF- α -Induzierbarkeit identifiziert wurde (Opipari et al., 1990). Die Expression von A20 ist stark abhängig von NF- κ B (Krikos et al., 1992). Es konnte gezeigt werden, dass A20 in Endothelzellen NF- κ B hemmen kann und dadurch auch die endotheliale Aktivierung verhindert (Cooper et al., 1996; Ferran et al., 1998). Wie dies mechanistisch geschieht, ist noch nicht geklärt, es konnte allerdings gezeigt werden, dass A20 mit TRAF2 und NEMO interagiert, wenn TNF- α an seinen Rezeptor bindet (Song et al., 1996; Zhang et al., 2000). Dadurch könnte es direkt die Aktivität des I κ B-Kinase-Komplexes modulieren. Andererseits kann A20 aber auch die Bindung von TRADD und RIP an den TNF- α -Rezeptor verhindern und somit TNF- α -induzierte Apoptose hemmen (He and Ting, 2002). Die Bedeutung von A20 für die Regulation von NF- κ B wird durch den Phänotyp der A20-defizienten Mäuse unterstrichen: diese sind nicht in der Lage, TNF- α -induzierte NF- κ B-Aktivität zu beenden, was in Entzündungsprozessen, Darmerkrankungen und vorzeitigem Tod resultiert (DiChiara et al., 2000; Lee et al., 2000).

Neben A20 wurde auch für andere anti-apoptotische Gene wie A1, Bcl-2 und Bcl-X_L beschrieben, dass sie NF- κ B und endotheliale Aktivierung hemmen können (Badrichani et al., 1999; Stroka et al., 1999). Allerdings zeigen die „knock-out“-Tiere für diese Gene keine Defekte in der Regulation von Entzündungen, was man erwarten würde, wenn die Proteine an der Beendigung inflammatorischer Reaktionen beteiligt wären (Kamada et al., 1995; Motoyama et al., 1995; Orlofsky et al., 2002; Veis et al., 1993). Im Gegenteil, A1-defiziente Mäuse zeigen sogar eine Verminderung der entzündlichen Antworten, die mit einer erhöhten Apoptose inflammatorischer Zellen einhergeht (Orlofsky et al., 2002). Es ist aber nicht auszuschließen, dass die verschiedenen bcl2-Familienmitglieder funktionell redundant sind und deswegen kein entzündlicher Phänotyp festzustellen ist.

Die durch TNF- α induzierte Expression eines oder mehrerer dieser Proteine könnte die Zellen vor einem zu starken Signal schützen und dafür sorgen, dass NF- κ B

wieder abgeschaltet wird, nachdem es die benötigten Gene ausreichend lange aktiviert hat.

Im Moment wird in unserem Labor ein „Expression Profiling“ durchgeführt, das unter anderem das Ziel hat, weitere Gene zu finden, für deren Expression die NF- κ B-Aktivierung ausreichend ist. Außerdem sollen die Gene bestimmt werden, die durch TNF- α -Behandlung von IKK2EE-infizierten Endothelzellen induziert werden und damit zur negativen Regulation von NF- κ B beitragen könnten.

Eine andere Möglichkeit, wie TNF- α die durch IKK2EE bewirkte Genexpression reduzieren könnte, ist die Induktion weiterer Transkriptionsfaktoren, die mit NF- κ B um die limitierte Zahl von Koaktivatoren konkurrieren. Für NF- κ B konnte gezeigt werden, dass es mit mehreren Koaktivatoren wie CBP und p/CAF interagiert und dass diese Interaktion kritisch für die Transaktivierungsfunktion von NF- κ B, zum Beispiel am E-Selektin-Promotor, ist (Sheppard et al., 1999). Es wurde auch herausgefunden, dass Behandlung von Endothelzellen mit TGF- β zusammen mit TNF- α oder IL-1 β zu einer Reduktion der E-Selektin-Expression führt (DiChiara et al., 2000). Dies wird dadurch bewirkt, dass TGF- β -induzierte Smad-Proteine den Koaktivator CBP von NF- κ B wegtitrieren. Ähnliche Befunde gibt es auch für p53: p53 hemmt die NF- κ B-abhängige Genexpression, wenn es überexprimiert wird, aber umgekehrt reduziert auch überexprimiertes NF- κ B die p53-abhängige Transkription, da beide Faktoren auf die Koaktivatoren p300 und CBP angewiesen sind (Webster and Perkins, 1999).

4.2.4. Der JNK/AP-1-Signalweg spielt nur eine untergeordnete Rolle bei der Kontrolle der proinflammatorischen Genexpression

Ein weiteres interessantes Ergebnis der Endothelzell-Untersuchungen war, dass der MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg über SEK und JNK eine weit weniger wichtige Rolle bei der Regulation inflammatorischer Proteine spielt als bisher angenommen. Es war vermutet worden, dass dafür sowohl NF- κ B als auch AP-1 benötigt werden, da die Promotoren der untersuchten Gene Konsensus-Bindungssequenzen für beide Transkriptionsfaktoren enthalten und beide durch TNF- α aktiviert werden (Collins et al., 1995). In der Tat konnte auch gezeigt werden, dass Mutationen in den AP-1-

Bindungssequenzen die TNF- α -Induzierbarkeit von Reporterkonstrukten reduzieren (Übersichtsartikel: (Pober, 2002)).

Es wurde aber auch herausgefunden, dass durch TNF- α -Behandlung von Endothelzellen die Expression von IL-8 und ICAM-1 hauptsächlich über die κ B-Motive aktiviert wird, während AP-1 eine mehr untergeordnete Rolle spielt (Lakshminarayanan et al., 1998; Roebuck et al., 1995). Außerdem wird die TNF- α -induzierte Expression von E-Selektin durch Dimethylfumarat, das den Eintritt von NF- κ B in den Kern verhindert, aber AP-1 nicht beeinflusst, gehemmt (Loewe et al., 2002; Loewe et al., 2001). Dies weist ebenfalls darauf hin, dass NF- κ B für die Regulation dieses Gens kritischer ist als AP-1.

Diese Befunde, zusammen mit den in dieser Arbeit vorgestellten, weisen darauf hin, dass der JNK/AP-1-Weg weniger eine essentielle als eine modulierende Rolle spielt.

Allerdings ist auch nicht auszuschließen, dass es abgesehen von SEK, die in unseren Versuchen mutiert war, auch andere Möglichkeiten gibt, AP-1 zu aktivieren. Deswegen hätte möglicherweise die Verwendung einer dominant-negativen Mutante von c-jun, also einer Komponente des Transkriptionsfaktors, eine stärkere Beteiligung von AP-1 an der Regulation der inflammatorischen Gene nach TNF- α -Stimulation offenbart. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass adenovirale Überexpression von c-jun und c-fos ausreichend ist, um die Expression von ICAM-1 und MCP-1 in Endothelzellen zu bewirken (Wang et al., 1999).

4.2.5. Die Adhäsion und Transmigration von Monozyten durch die endotheliale Zellschicht wird durch NF- κ B beeinflusst

Die Adhäsion stellt den Schritt dar, in dem sich die Leukozyten aus dem Blut fest an das Endothel anheften und ist somit eine Voraussetzung für die Auswanderung der Zellen in das darunter liegende Gewebe. Die FACS-Analysen hatten gezeigt, dass die für die Adhäsion wichtigen Moleküle VCAM-1 und ICAM-1 NF- κ B-abhängig reguliert sind. Deswegen wurde im nächsten Schritt der Einfluss von NF- κ B-hemmenden und -aktivierenden Mutanten auf die Rekrutierung von Monozyten mit Hilfe von *in vitro* Adhäsions- und Transmigrationsstudien untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Hemmung von NF- κ B die Adhäsion und die basale Transmigration hemmt,

während eine Aktivierung von NF- κ B diese Prozesse schon in der Abwesenheit von TNF- α zu steigern vermag.

Dieses Ergebnis war nach den Expressionsstudien für Chemokine und Adhäsionsmoleküle, die die Adhäsion und Transmigration hauptsächlich kontrollieren, nicht überraschend. Es bestätigt auch die Ergebnisse anderer Gruppen, die eine Hemmung der Adhäsion mit einer kinase-inaktiven IKK2-Mutante bzw. der Transmigration von Neutrophilen durch Salizylat, einen NF- κ B-Hemmstoff, beobachten konnten (Oitzinger et al., 2001; Pierce et al., 1996).

Ein Manko der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente war aber, dass mit den Kontrollzellen keine Steigerung der Transmigrationsaktivität durch TNF- α beobachtet werden konnte.

Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Endothelzellen auf fibronectinbeschichteten Filtern wuchsen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen, die über das Integrin α 5 β 1 an Fibronectin binden, NF- κ B und einige seiner Zielgene aktivieren (Klein et al., 2002). Dazu gehören auch IL-8, VCAM-1, E-Selektin und ICAM-1, also Chemokine und Adhäsionsmoleküle, die maßgeblich an der Rekrutierung von Monozyten beteiligt sind und deren Expression, wie vorher bereits gezeigt, durch die verwendeten Mutanten moduliert wird. Wenn aber in fibronectin-adhären Endothelzellen NF- κ B bereits präaktiviert ist, könnte TNF- α nicht mehr in der Lage sein, die NF- κ B-Aktivität signifikant zu steigern. Dies würde erklären, warum die basale Transmigration, die durch Kontrollzellen vermittelt wird, durch TNF- α nicht weiter steigerbar ist.

Auch der Adhäsionsassay ist davon betroffen, weswegen man auch hier keine starke Steigerung nach TNF- α -Behandlung feststellen kann. Allerdings scheint der enzymatische Assay zur Messung der Adhäsion sensitiver zu sein als das Zählen der transmigrierten Zellen im Mikroskop. Daher kann man zumindest eine geringe Stimulation beobachten.

Um in Zukunft die Transmigrationsexperimente mit einer höheren Effizienz durchführen zu können, gibt es verschiedene Möglichkeiten.

Zum einen könnte man eine andere Oberfläche für die Adhäsion der Endothelzellen wählen, da gezeigt werden konnte, dass eine laminin-beschichtete Oberfläche nur einen geringen Effekt auf die NF- κ B-Aktivität in den Endothelzellen hat, während

eine Poly-L-Lysin-beschichtete Oberfläche NF- κ B überhaupt nicht aktiviert (Klein et al., 2002).

Zum anderen könnte man ein anderes System zur Evaluierung der Transmigrationseffizienz anwenden. Dazu wurde bereits eine Kollaboration mit der Gruppe von P. Petzelbauer in Wien begonnen, die mit Hilfe angefärbter Endothelzellen und Neutrophilen sowie konfokaler Mikroskopie des Transmigrationsvorgangs eine Quantifizierung der migrierten Zellen durchführen kann (Groger et al., 1999).

Abschließend lässt sich feststellen, dass NF- κ B für die Expression proinflammatorischer Moleküle sowohl nötig als auch ausreichend ist. Dadurch beeinflusst NF- κ B auch die physiologischen Prozesse der Adhäsion und Transmigration.

5. Methoden

5.1. Standardmethoden

5.1.1. Zentrifugation

Alle im Folgenden nicht näher erläuterten Zentrifugationsschritte in Eppendorfgefäßen werden in einer Biofuge A der Firma Heraeus bei RT und mit 13.000rpm durchgeführt.

5.1.2. Ethanol-Präzipitation von DNA

Es werden jeweils 0,1 Vol. 3M NaOAc pH 5,2 und 2,5 Vol. Ethanol zu einem Ansatz gegeben und kräftig durchmischt. Der Ansatz wird 30min bei -20°C inkubiert und anschließend 10min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Präzipitat einmal mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wird es für 2 min in der Speedvac getrocknet. Danach wird die DNA in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

5.1.3. Isopropanol-Präzipitation von DNA

Nach Zugabe von 0,1 Vol. 3M NaOAc und 0,6 Vol. Isopropanol wird der Ansatz durchmischt und 15min bei RT inkubiert. Es folgen 10min Zentrifugation, danach wird der Überstand abgenommen und das Präzipitat getrocknet.

5.1.4. Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Die DNA-Lösung wird mit dem gleichen Vol. Phenol (wassergesättigt und mit Tris auf pH7,5 eingestellt) versetzt. Danach wird kräftig durchmischt und anschließend für 5min zentrifugiert. Dann wird die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und analog mit dem gleichen Vol. Chloroform extrahiert. Dieser Schritt wird einmal wiederholt und danach wird der Ansatz nach Protokoll 5.1.2 präzipitiert.

5.1.5. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der DNA wird durch die Messung der optischen Dichte (OD) im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt.

Dabei gilt folgende Beziehung:

OD_{260} von 1 entspricht 50 μ g DNA/ml

Die Reinheit der DNA ergibt sich aus dem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} , das nicht unter 1,8 liegen sollte.

5.2. Klonierung von DNA-Fragmenten

5.2.1. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Die Reaktionsbedingungen sowie eingesetzte Enzymmenge und Puffer entsprechen den Angaben der Hersteller der Enzyme (Fa.Amersham; Fa.Biolabs; Fa.Boehringer Mannheim). Bei DNA aus Miniextraktionen wird 20 μ g RNase A zugesetzt. Der Restriktionsverdau wird 1-2 h bei 37°C inkubiert. Danach wird zur Kontrolle ein Aliquot auf ein Agarosegel (1% Agarose; 1x TAE; 10 μ l EtBr-Lsg/100ml) aufgetragen. Der Gel-Lauf beträgt 1-2h bei 80-100V. Die DNA-Banden werden durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

Bei einem analytischen Restriktionsverdau, z. B. zur Identifizierung positiver Bakterienklone, werden nur geringe DNA-Mengen (0,5-2 μ g) eingesetzt, während bei einem präparativen Restriktionsverdau, der zur Herstellung von DNA-Fragmenten zur Klonierung dient, zwischen 20 und 100 μ g DNA eingesetzt werden. Pro μ g DNA werden 3-5U des Restriktionsenzym eingesetzt. Das Gesamtvolumen des Restriktionsansatzes sollte dabei mindestens das Zehnfache des Volumens des Enzyms betragen.

5.2.2. Partialverdau von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA nur partiell zu verdauen benötigt man Bedingungen, bei denen das Restriktionsenzym suboptimal schneidet. Man setzt deshalb nur eine geringe Menge des Enzyms ein und lässt es nur kurze Zeit auf die DNA einwirken. Vor dem präparativen Verdau wird eine Restriktionsreihe durchgeführt, bei der die optimale Enzymmenge und die optimale Dauer des Partialverdaus bestimmt wird.

Im Falle des Hind III-Partialverdaus der Expressionsvektoren für λ CB β und λ CB ϵ wurden 20 μ g Plasmid-DNA mit 20U Hind III für 30min bei 37°C inkubiert.

5.2.3. Die Klenow-Reaktion

Diese Reaktion dient der Überführung von DNA-Fragmenten mit 5'-überhängenden Enden in solche mit „glatten“ Enden. Sie wird durch die große Untereinheit der DNA-Polymerase I („Klenow“-Polymerase) aus *E.coli* katalysiert. Die Reaktion wird nach vorheriger Inaktivierung des Restriktionsenzym durchgeföhrt.

Pipettierschema:

30	µl	Restriktionsfragment
1,5	µl	2,5mM dNTP- Mischung
4	µl	10x Reaktionspuffer
1	µl	„Klenow“- Polymerase
ad 40	µl	H ₂ O

Die Reaktion wird für 1h bei 37°C inkubiert, bevor das Enzym durch Phenol-Chloroform- Extraktion und Ethanolpräzipitation inaktiviert wird.

5.2.4. Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Die Abspaltung terminaler Phosphatgruppen mit einer Alkalischen Phosphatase (CIP=„Calf intestine phosphatase“; Fa.Boehringer Mannheim) wird durchgeföhrt, um eine Religation des linearisierten Vektors zu verhindern.

Pipettierschema:

1-10	µg	linearisierter Vektor
3	µl	10xCIP-Puffer
1	µl	CIP (20U/µl)
ad. 30	µl	H ₂ O

Die Inkubation erfolgt für 30 bis 60 min bei 37°C; nach Ablauf von 20 min wird nochmals 1 µl alkalischer Phosphatase zugegeben.

5.2.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

5.2.5.1. Phenol-Extraktionsmethode

Die Region, die das gewünschte DNA-Fragment bzw. den linearisierten Vektor enthält, wird unter langwelligem UV- Licht (366 nm) aus dem präparativen Agarosegel (1% Agarose; 1xTAE; 3-5µg/ml EtBr) ausgeschnitten und in ein Eppendorfröhrchen mit einem kleinen Loch überführt. Das Gelstück wird zerkleinert, indem es durch das kleine Loch in ein zweites Eppendorfröhrchen zentrifugiert wird (1min; 13000rpm; Eppendorfszentrifuge). Die zerkleinerte Agarose wird mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt, gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach 10-15min Zentrifugation bei RT wird der wässrige Überstand abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform zweimal extrahiert (1min; 13000rpm; Eppendorfszentrifuge). Anschließend wird die DNA durch Ethanolpräzipitation pelletiert und in Wasser oder 1xTE-Puffer aufgenommen.

5.2.5.2 Aufreinigung durch DEAE-Papier

Die DNA-Fragmente bzw. linearisierten Vektoren werden über ein präparatives Agarosegel (1% Agarose; 1xTAE; 3-5µg EtBr/ml) aufgetrennt und anschließend unter langwelligem UV- Licht (366 nm) unterhalb der gewünschten DNA-Bande mit einer Rasierklinge ein Schnitt eingefügt. In diesen wird ein DEAE-Streifen der entsprechenden Größe eingesetzt und die Elektrophorese solange fortgesetzt, bis die DNA vollständig am DEAE-Papier haftet. Anschließend wird das DEAE-Papier in ein Eppendorfröhrchen überführt und mit einem Niedrigsalz-Puffer gewaschen. Die Elution der DNA erfolgt mit einem Hochsalz-Puffer für 30min bei 65°C. Die eluierte DNA wird durch eine Ethanolpräzipitation pelletiert und in Wasser oder 1xTE-Puffer aufgenommen.

5.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren

Vor der Ligation werden gleiche Volumina von linearisiertem Vektor und Insert nebeneinander auf ein Agarose-Gel aufgetragen und die Stärke der Signale miteinander verglichen. Beachtet werden müssen hierbei eventuell auch die unterschiedlichen Größen von Fragmenten und Vektor. Nach dem Abschätzen der Mengenverhältnisse werden dann Vektor und Fragment so eingesetzt, dass das

Insert in zwei- bis fünffachem Überschuss vorliegt. Dabei sollte die DNA-Gesamtmenge 1 µg nicht überschreiten.

Pipettierschema:

2	µl	linearisierter Vektor (10-100ng)
2	µl	DNA-Fragment
2	µl	10xLigase-Puffer
2	µl	100mM ATP
1,5	µl	T4-DNA-Ligase (1-4U/µl)
ad. 20	µl	H ₂ O

Die Inkubation wird über Nacht bei 16°C durchgeführt.

5.2.7. Transformation chemokompetenter Bakterien

5.2.7.1. Transformation von Ligationsansätzen

Auf Eis werden 100-150µl der chemokompetenten Bakterien (*E.coli* Stämme DH5α und JM109 ; beide sind im Labor vorrätig) aufgetaut. Nach vorsichtigem Mischen mit 0,1 bis 1 µg Plasmid-DNA eines Ligationsansatzes erfolgt eine 20-minütige Inkubation auf Eis. Darauf folgt ein Hitzeimpuls für 90sec bei 42°C und nach kurzem Abkühlen des Ansatzes auf Eis die Zugabe von 1ml selektionsfreiem LB-Medium. Anschließend wird der Transformationsansatz 1h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach werden 100µl des Ansatzes (entspricht 10%) direkt auf Agarplatten mit Ampicillin (50 µg/ml) ausplattiert. Die Restmenge wird 10sec zentrifugiert, das Pellet in 50µl LB-Medium aufgenommen und ebenfalls ausplattiert (entspricht 90%). Die Platten werden dann über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Erfolgreich transformierte Zellen, die das entsprechende Resistenzgen tragen, bilden in dieser Zeit Kolonien auf den selektiven Platten.

5.2.7.2. Retransformation mit Plasmid-DNA aus einer Maxi-Extraktion

Wie unter 5.2.7. beschrieben, werden 100-150µg kompetente *E.coli*-Zellen mit 50-100ng Plasmid-DNA gemischt und transformiert. Nach 1h Inkubation bei 37°C wird der komplette 1ml-Ansatz zu 250ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum gegeben. Der Ansatz wird über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler

inkubiert. Die Plasmid-DNA wird dann über eine Maxi-Extraktion (siehe 5.3.1.2) aus den Bakterien gewonnen.

Alternativ kann ein Teil des Retransformationsansatzes auf selektiven Agarplatten ausplattiert werden. Dadurch erhält man Einzelkolonien, mit denen man eine Vorkultur für eine Maxi-Extraktion animpfen kann.

5.3. Isolation von DNA

5.3.1. Plasmidpräparation im großen Maßstab („Maxipräparation“)

Eine Übernachtskultur aus E.coli-Zellen wird in 250ml-Bechern mit einer Beckmann-Zentrifuge für 10min bei 5000rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 7,5ml Lösung 1 resuspendiert und 3min bei RT inkubiert. Anschließend werden 15ml Lösung 2 zugegeben und gut gemischt. Nach 5min Inkubation auf Eis erfolgt die Zugabe von 11,5ml Lösung 3 und erneute Inkubation auf Eis für mindestens 5min. Durch diesen Schritt wird die chromosomale DNA präzipitiert. Danach wird für 10min bei 10.000rpm in der Beckmann-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird durch einen Faltenfilter in ein 50ml-Röhrchen gegeben, in dem schon 20ml Isopropanol vorgelegt sind. Nach kräftigem Durchmischen wird die Plasmid-DNA für 10min bei RT gefällt. Nach einer weiteren 10-minütigen Zentrifugation bei 5000rpm in der Heraeus-Zentrifuge und dem Trocknen des Pellets mit Kimwipes, wird das Präzipitat in 4,3 ml TE-Puffer aufgenommen. Zu dieser DNA-Lösung werden 4,7g CsCl und 400µl EtBr (10mg/ml) gegeben und gründlich durchmischt. Gebildete Präzipitate werden durch zehninütige Zentrifugation (4300rpm; Heraeus) abgetrennt.

Dann wird der Überstand in ein „Quick seal“-Zentrifugenröhrchen (Beckmann) überführt und das Röhrchen zugeschmolzen. Es folgt ein Ultrazentrifugationsschritt von mindestens 4h (60.000rpm, VTI65-Rotor, 20°C). Danach werden zwei durch Ethidiumbromid angefärbte Banden sichtbar, von denen die untere die Plasmid-DNA darstellt. Diese wird mit Hilfe einer 5ml-Spritze aus dem Röhrchen entnommen und somit von chromosomaler DNA (obere Bande) und RNS (unten im Röhrchen) getrennt. Die Plasmid-DNA wird darauf in ein neues „Quick seal“-Röhrchen gegeben, das man mit einer CsCl-Lösung gleicher Dichte (0,85g/ml H₂O) auffüllt. Es folgt ein zweiter Zentrifugationsschritt von mindestens 4h (60.000rpm, VTI65-Rotor, 20°C). Die Plasmidbande wird wieder mit einer 5ml-Spritze in möglichst geringem Volumen abgezogen, in ein 15ml-Röhrchen überführt und mindestens viermal mit wassergesättigtem n-Butanol ausgeschüttelt. Dabei wird jeweils die obere, alkoholische Phase mit dem gelösten Ethidiumbromid verworfen. Dann wird die Lösung mit TE-Puffer auf das dreifache Ausgangsvolumen (Volumen der gezogenen

Bande) gebracht, 0,1 Vol. 3M NaOAc und 2 Vol. Ethanol zugegeben und die DNA für 30min bei -20°C gefällt. Danach wird erneut zentrifugiert (Heraeus, 5000rpm, 10min), das Präzipitat getrocknet und in 500µl TE-Puffer aufgenommen. Anschließend wird der Ansatz in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und noch einmal mit Ethanol präzipitiert, um die Reste von CsCl zu entfernen. Das Präzipitat wird einmal mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet („Speedvac“; 2min) und in 500µl TE-Puffer aufgenommen. 10µl des Ansatzes werden mit 990 µl H₂O verdünnt und für eine photometrische Konzentrationsbestimmung eingesetzt (siehe 5.1.5).

5.3.2. Plasmidpräparation in kleinen Maßstab („Minipräparation“)

Zur Identifizierung von Transformanten, die das gewünschte Plasmid tragen, werden Einzelkolonien von Agarplatten mit einem Zahnstocher in 3ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5ml der Übernachtskultur werden in ein Eppendorfgefäß überführt und durch kurzes Zentrifugieren (15sec) die Bakterien pelletiert. Die Bakterien werden dann durch Vortexen in 100µl Lösung 1 suspendiert. Danach werden 200µl Lösung 2 und nach erneutem Vortexen 150µl Lösung 3 zugegeben. Nach kurzem Mischen wird 2min bei RT inkubiert und dann 2min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein Eppendorfgefäß überführt, in dem bereits 400µl Phenol/Chloroform (1:1/v:v) vorgelegt sind, und für 5sec gemischt (vortexen). Anschließend wird für 1min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß mit 300µl Isopropanol gegeben und die DNA wie unter 5.1.3 beschrieben präzipitiert. Dann wird das Präzipitat in 70% Ethanol gewaschen und 2min zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wird in 100µl TE-Puffer aufgenommen. Zur Analyse der aufgereinigten DNA durch einen Restriktionsverdau werden 10 bis 20 µl Lösung eingesetzt.

5.3.3 Präparation von genomischer DNA

Für die Präparation von genomischer DNA aus Geweben werden die Proben in 500µl TNES-Puffer zusammen mit 400µg Proteinase K für 4-12h bei 56°C lysiert. Zu dem Lysat werden 500µl Phenol/Chloroform (Verhältnis 1:1) zugegeben, gut gemischt und für 5-10min bei 13000rpm zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge). Die genomische DNA im wässrigen Überstand wird durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol gefällt und pelletiert (10min; 13000rpm; Eppendorfszentrifuge). Das Pellet wird mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100µl Wasser oder 1x TE aufgenommen.

5.4. Hybridisierung von DNA in einer Southern- Blot- Analyse

Für die Southern-Blot Analyse werden 10µg genomische DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten und die DNA-Fragmente zusammen mit einem Längenstandard über ein Agarosegel (1% Agarose; 1xTAE; 3-5µg EtBr) aufgetrennt. Nach der Auftrennung wird das Gel fotografiert (UV-Videosystem; Fa.Sony) und die DNA über Vakuum (Vakuum-Blotter; Fa.Appligene) auf eine Nylonmembran (Hybond-N; Fa.Amersham) übertragen. Zunächst wird die DNA mit 0,25N Hcl zerstückelt, bevor sie mit einer Denaturierungslösung und anschließend einer Neutralisierungslösung behandelt wird. Nach dem Transfer werden zunächst die Lage der einzelnen Taschen des Agarosegels mit Bleistift auf die Nylonmembran übertragen und dann die DNA durch UV-Bestrahlung (UV-Crosslinker; Fa.Amersham) irreversibel an die Membran gebunden.

Danach erfolgt die Prähybridisierung in der Hybridisierungslösung für 1 bis 4h (65°C; Hybridisierungsöfen; Fa.Hybaid). Anschließend wird die ³²P-markierte Probe zugegeben und über Nacht hybridisiert (65°C; Hybridisierungsöfen; Fa.Hybaid). Am nächsten Tag werden die Membranen einmal mit Waschlösung 1 und dreimal mit Waschlösung 2 gewaschen. Die Waschschrte erfolgen jeweils für 15min bei 65°C im Hybridisierungsöfen (Fa.Hybaid). Nach einem kurzen Schwenken der Nylonmembranen in 4xSSC werden sie in Frischhaltefolie eingepackt und auf einem Röntgenfilm (-80°C; Verstärkerscreen) oder einem Phospho- Imager- Screen exponiert.

5.5. Radioaktive Markierung von DNA-Proben

5.5.1. Markierung von Oligonucleotiden mit „Klenow“-Polymerase

DNA-Fragmente für die Gelretardationsanalysen werden durch Restriktionsverdau aus Plasmiden isoliert. Die radioaktive Markierung erfolgt über das Auffüllen überhängender Enden mit der „Klenow“-Polymerase.

Pipettierschema für das κ B- Fragment:

3	μ l	κ B- Fragment
5	μ l	10x Reaktionspuffer
2,5	μ l	0,5 mM dGTP-, dCTP, dTTP- Mix
5	μ l	32 P α - dATP (10 μ Ci/ μ l)
2	μ l	Klenow- Polymerase
ad 50	μ l	H ₂ O

Pipettierschema für das oct- Fragment:

2	μ l	oct- Fragment
5	μ l	10x Reaktionspuffer
2,5	μ l	0,5 mM dGTP-, dATP, dTTP- Mix
5	μ l	32 P α - dCTP (10 μ Ci/ μ l)
2	μ l	Klenow- Polymerase
ad 50	μ l	H ₂ O

Der Reaktionsansatz wird für 1h bei RT inkubiert und anschließend aufgereinigt.

5.5.2. Markierung von DNA-Fragmenten durch „Random Priming“

DNA-Sonden für die Southern- Blot- Hybridisierungen werden unter Verwendung des „rediprime“-Kits (Amersham Life Science) nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert.

5.5.3. Aufreinigung radioaktiv markierter Proben

Von den markierten Oligonucleotiden müssen die freien Nucleotide abgetrennt werden. Dies geschieht durch „push columns“ (Stratagene) nach Angaben des Herstellers. Die spezifische Aktivität der Proben nach der Aufreinigung wird über die Cerenkov-Zählung bestimmt.

5.6. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde in Form einer Serviceleistung von R.Krug (MSZ Würzburg) durchgeführt.

5.7. Genotypisierung von transgenen und *IκBα*-defizienten Mäusen

5.7.1. Genotypisierung durch Southern-Blot-Analyse

Die genomische DNA aus Mausschwanzgewebe der *tetIκBβ*- und der *tetIκBε*- Linie wird nach der Beschreibung in Kapitel 5.3.3 hergestellt und 10µg mit BamHI verdaut. Die RNA wird durch Zugaben von 5µg RNase A in den Restriktionsansatz verdaut. Der Nachweis des Transgens erfolgt über das Luziferase- Fragment aus dem BamHI- geschnittenen pBi5- Vektor wie in Kapitel 5.4. beschrieben.

5.7.2. Genotypisierung durch PCR-Analysen

Die genomische DNA aus Mausschwanz- bzw. Embryogewebe wird nach der Beschreibung in Kapitel 5.3.3 hergestellt und 2-3% in die PCR-Reaktion eingesetzt.

Pipettierschema:

2-3	µl	genomische DNA
3	µl	10xPCR-Puffer
3	µl	2mM dNTPs
3	µl	Primer#1 (10pmol)
3	µl	Primer#2 (10pmol)
1	µl	Taq-Polymerase (1U/µl)
ad. 30	µl	H ₂ O

Mauslinie	Primerkombination	Erwartete Größe des Fragments	Hybridisierungstemperatur
1.5 tTA	tTA3/tTA4	350 bp	55°C
2.1tTA	tTA3/tTA4	350 bp	55°C
<i>tetIκBα</i> 1/2	IκBa+/IκBa5	300 bp	53°C
ΔN44-4	IκBa3/IκBa4	800 bp	60°C
<i>ikba</i> ^{-/-}			63°C
Wildtyp	IκBa59wt/IκBa39wt	180 bp	
Mutation	IκBa59wt/IκBa39rec	220 bp	
<i>tetIκBε</i>	5'epsilon/3'epsilon	500 bp	57°C

Der Nachweis der Wildtyp- und Mutanten-Allele der I κ B α - defizienten Mäusen erfolgt in einer PCR-Reaktion. Die Sequenz der Primer ist in Kapitel 6.1.10. angegeben.

Die PCR-Reaktionen werden nach folgendem Schema in einem Thermocycler durchgeführt (Fa.MWG):

1x	94°C	3min
30-40x	Hyb.Temp	40sec
	72°C	1-2min
	94°C	40sec
1x	Hyb. Temp.	1min
	72°C	10min

Nach der Amplifikation werden die Ansätze über ein Agarosegel (1-2% Agarose; 1xTAE; 3-5 μ g EtBr) aufgetrennt und analysiert.

5.8. Herstellung von Proteinextrakten

5.8.1. Proteinextrakte aus Gewebe

5.8.1.1. durch Homogenisieren im Ultra-Turrax

Die verschiedenen Mausgewebe werden präpariert und in 500 μ l Extraktionspuffer homogenisiert (20-30sec; 4°C; Ultra Turrax T25). Nach einer Inkubation für 5-10min auf Eis werden die Extrakte zentrifugiert (10min; 13000rpm; 4°C; Eppendorfszentrifuge) und die Überstände aliquotiert. Ein Teil der Aliquots wird direkt für die Bestimmung der Luziferaseaktivität und Proteinkonzentration verwendet, während der Rest in flüssigem Stickstoff eingefroren und später in Western-Immunoblot Analysen eingesetzt wird. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgt bei -80°C.

5.8.1.2. durch Homogenisieren in flüssigem Stickstoff

Die Organe werden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren. Danach werden sie in einem vorgekühlten Mörser, der auf Trockeneis steht, unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Das Pulver wird in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und mit dem doppelten Volumen Puffer C (supplementiert mit Proteaseinhibitoren, 1mM PMSF, 1mM DTT) versetzt. Danach wird die Mischung

dreimal in flüssigen Stickstoff eingefroren und auf Eis wieder aufgetaut, bevor sie zentrifugiert wird (10min; 13000rpm; 4°C; Eppendorfszentrifuge). Der Überstand wird aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgt bei -80°C.

5.8.2. Proteinextrakte aus Zelllinien

5.8.2.1. Extrakte für Luziferase- und β -Galaktosidase- Messungen

Bei adhärennten Zellen wird das Medium von der Schale abgenommen und die Zellen auf der Schale einmal mit PBS gewaschen, bevor sie in 1 ml PBS mit einem Gummischaber abgelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden.

Suspensionszellen werden in ein Falcon-Röhrchen überführt und pelletiert (5 min; 900 rpm; Heraeus). Anschließend werden sie in 1 ml PBS gewaschen und dabei in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Nach erneuter Zentrifugation (15 sek; 13000 rpm; Eppendorf) werden die Zellen je nach Volumen des Pellets in 50 bis 100 μ l Extraktionspuffer durch Vortexen suspendiert und dabei lysiert. Der Zellaufschluß erfolgt durch Triton-Lyse der Zellen. Danach werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (1 min; 13000 rpm; Eppendorf) entfernt und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Der Überstand kann direkt für Luziferase- und β -Galaktosidase-Messungen eingesetzt oder bei -70°C aufbewahrt werden.

5.8.2.2. Gesamtzellextrakte für Western Blots und Gelretardationsanalysen

Die Zellen werden wie unter 5.8.2.1. beschrieben geerntet und im Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert. Das Zellpellet wird in 3-5 Volumen Dignam Puffer C, der mit 1mM PMSF, 1mM DTT und Proteaseinhibitormischung (nach Empfehlung des Herstellers eingesetzt) supplementiert wurde, suspendiert. Die Zellen durchlaufen nun drei Einfrier-/ Auftauzyklen, wonach sie 5min bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert werden. Ein Einfrier-/ Auftauzyklus umfasst jeweils das Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff und das Auftauen auf Eis. Die Extrakte werden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

5.9. Analyse von Proteinen

5.9.1. Bestimmung der Proteinkonzentration durch eine Bradford-Messung

Die Proteinkonzentration in einem Extrakt wird anhand einer BSA-Eichkurve bestimmt. Dazu wird 1 µl verschiedener BSA-Eichlösungen mit bekannten Proteinkonzentrationen mit 100 µl 0,15 M NaCl versetzt. Anschließend wird 1 ml Bradford-Lösung zugegeben, deren Farbstoff Coomassie Brilliantblau in saurer Lösung Komplexe mit den Proteinen bildet. Dadurch wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffs zu einer Wellenlänge von 595 nm verschoben. Diese Mischung wird für etwa 2 min bei RT inkubiert, bevor im Photometer die optische Dichte bei 595 nm gemessen wird. Die Eichkurve wird erstellt, indem die ermittelten Extinktionswerte über die dazugehörigen, bekannten BSA-Konzentrationen aufgetragen werden. Die Konzentration der Proteinextrakte wird analog dazu unter der Verwendung der Eichkurve bestimmt.

5.9.2. SDS- PAGE

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgt nach der Methode von Lämmli (1970). Die in dieser Arbeit verwendeten Polyacrylamid-Gele bestanden aus einem 10 bis 14%-igen Trenngel und einem 5%-igen Sammelgel.

Die Trenngellösung wird zwischen zwei durch Abstandhalter getrennte Glasplatten gegossen und mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wird das Sammelgel gegossen und in Gegenwart eines geeigneten Kamms polymerisiert.

Die Proteinproben werden mit 1,5 bis 2 Volumen Lämmli-Probenpuffer gemischt und vor dem Auftragen 5 min bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 25mA, bis die Bromphenolblaufront das untere Ende des Gels erreicht hat. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wird eine vorgefärbte Mischung von Eichproteinen (Längenstandard) mit aufgetragen.

5.9.3. Western-Immunoblot

Da die Proteine im Polyacrylamid-Gel nicht mit Antikörpern reagieren können, werden sie elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen.

Die PVDF-Membran wird zunächst nach Herstellervorschrift aktiviert, bevor sie in Transfer-Puffer äquilibriert wird. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgt durch „Naßblot“ für 2h bei 4°C und 0,5A. Danach wird die Membran in PBS gewaschen und unspezifische Bindungen durch einstündige Inkubation in Blockpuffer abgesättigt. Alle nachfolgenden Inkubationsschritte erfolgen bei RT auf einem Horizontalschüttler. Die folgenden Antikörper-Verdünnungen werden ebenfalls in Blockpuffer angesetzt. Der Erstantikörper wird nach dem Blocken in geeigneter Verdünnung (1:750 bis 1:1000) zugegeben und für 1 bis 1,5h zusammen mit der Membran inkubiert. Nach viermaligem Waschen für jeweils 7 min mit PBS-T wird der zweite Antikörper (Ziege-anti-Maus- bzw. Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase; 1:5000- bis 1:7000-Verdünnung) auf die Membran gegeben und für eine Stunde inkubiert. Daraufhin wird der Filter wiederum viermal für 7 min mit PBS-T gewaschen, bevor die Entwicklung des Immunoblots mit dem ECL- System nach Angaben des Herstellers erfolgt. Um die Proteine zu detektieren, wird die Membran einem Röntgenfilm exponiert.

Die an die Proteine gebundenen Antikörper können durch 30-minütige Inkubation bei 50°C mit einem denaturierenden „Strip“-Puffer wieder entfernt werden. Nachdem die Membran zweimal für 10 min mit PBS-T gewaschen worden ist, kann mit neuen Antikörpern inkubiert werden. Dieser Vorgang kann etwa drei- bis viermal mit derselben Membran wiederholt werden.

5.9.4. Gelretardationsanalysen

Gelretardationsanalysen dienen dem Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen. Dazu wird eine radioaktiv markierte Sonde, die ein bestimmtes Bindungsmotiv (hier: κ B- und oct-Motiv) aufweist, mit einem Proteinextrakt inkubiert. Anschließend werden die Protein-DNA-Komplexe in einem Gel von der ungebundenen DNA getrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Die Sonden für die Gelretardationsanalysen werden durch Restriktionsverdau aus Plasmiden gewonnen. Die Markierung der Proben ist oben beschrieben (5.4.1.).

Pipettierschema für die Bindungsreaktion:

2	μ l	10x Bindungspuffer
1,5	μ l	Poly(dIdC) (2mg/ml)
1	μ l	fettsäurefreies BSA(10mg/ml)
1-5	μ l	Proteinextrakt
0,5-1	μ l	32 P- DNA- Fragment (30000- 60000 cpm/ μ l)

ad 20 μ l H_2O

Alle Komponenten werden bei RT gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Die gebildeten Komplexe werden über ein natives Acrylamid-Gel (4%; 0,5x TBE; Laufpuffer: 0,5x TBE) aufgetrennt. Der Gelvorlauf erfolgt 1h bei 140V, der anschließende Gellauf dauert 2,5 bis 3h. Das Gel wird danach für 1h getrocknet (80°C; Vakuumtrockner) und einem Röntgenfilm exponiert.

5.10. Bestimmung von Enzymaktivitäten

5.10.1. Messung der β -Galaktosidase- Aktivität

Die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität dient der Bestimmung der Transfektionseffizienz, da das Gen für die β -Galaktosidase unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors steht und somit die Expression des Enzyms nur von der Transfektionseffizienz abhängt. Dadurch können die Luziferase-Meßwerte einer Transfektion gegeneinander abgeglichen werden.

Ein synthetisches Substrat für das Enzym β -Galaktosidase ist ONPG (Ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktosid). Bei dessen enzymatischer Spaltung entsteht ein gelber Farbstoff, dessen Intensität im Photometer bestimmt werden kann und die die Menge an β -Galaktosidase im Extrakt widerspiegelt.

Pipettierschema:

500	μ l	β -Gal-Assay-Puffer
100	μ l	ONPG (4mg/ml)
20	μ l	Zellextrakt (siehe 5.8.2.1.)

Das Reaktionsgemisch wird bei 37°C inkubiert, bis eine deutliche Gelbfärbung der Lösung erkennbar ist. Zum Abstoppen der Reaktion werden 250 μ l 1M Na_2CO_3 hinzugefügt. Danach kann die Absorption bei einer Wellenlänge von 420nm gemessen werden.

5.10.2. Messung der Luziferase- Aktivität

Das Enzym Luziferase setzt unter ATP-Verbrauch das Substrat Luziferin um, wobei Energie in Form von Photonen frei wird. Die freigesetzte Lichtmenge,

die im Bioluminaten gemessen wird, ist ein Maß für die vorhandene Luciferase-Aktivität (de Wet et al., 1987). Mit Hilfe der Luziferase als Reporterenzym kann die transkriptionelle Aktivität von Promotor- und Enhancer-Konstrukten gemessen werden.

5 µl Zellextrakt (siehe 5.8.2.1.) werden in ein Messröhrchen gegeben, in das der Bioluminat automatisch 50 µl Luziferase-Meßlösung injiziert und die Luziferaseaktivität durch Messung der freigesetzten Lichteinheiten (Messdauer: 15sec) bestimmt. Zusätzlich wird die Hintergrundaktivität ermittelt, die die freigesetzten Lichteinheiten der Messlösung ohne Zugabe des Zellextrakts darstellt. Dieser Nullwert muss bei der Auswertung von den Messdaten abgezogen werden.

Falls zur Transkriptionskontrolle ein β _Gal-Konstrukt kotransfiziert wird, werden die nach 5.10.1. ermittelten β -Galaktosidasewerte mit den Luziferasedaten abgeglichen. Hierzu dividiert man den Mittelwert aus zwei Messungen der Luziferaseaktivität eines Ansatzes durch den Wert der entsprechenden β -Galaktosidase-Aktivität. Man gleicht so Unregelmäßigkeiten in der Transfektionseffizienz zwischen parallel durchgeführten Ansätzen aus.

5.11. Allgemeine Zellkulturtechniken

5.11.1 Zentrifugation von Zellen

Die Zentrifugationsschritte wurden, falls nicht anders vermerkt, in einer Heraeus-Zentrifuge bei 900-1000rpm für 5min durchgeführt.

5.11.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase werden in ein Falcon-Röhrchen überführt und pelletiert (5min, 900rpm, Heraeus). Danach werden sie in 1 ml kaltem Einfriermedium aufgenommen und sofort auf Eis gestellt. Nach 15 bis 30min werden sie in einem Styroporgefäß bei -70°C über Nacht eingefroren. Die Aufbewahrung erfolgt in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen werden die Zellen direkt vom flüssigen Stickstoff in ein 37°C-Wasserbad überführt und nach dem Auftauen in eiskaltem Medium 1:10 verdünnt. Nach der Pelletierung (5min, 900 rpm, Heraeus) werden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in Zellkulturschalen ausgesät.

5.11.3. Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wird eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Nachdem man das Deckglas auf der Zählkammer angebracht hat, gibt man seitlich einen Tropfen Zellsuspension zu. Unter dem Mikroskop zählt man die Zellen, die sich im Großquadrat des Meßkreuzes befinden. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen verdünnt man die Zellsuspension mit Trypanblau. Die toten Zellen färben sich nach ca. 30sec Inkubation blau, während die lebenden weiß bleiben.

Die Lebendzellzahl ergibt sich aus folgender Formel:

Zellzahl/ml = gezählte weiße Zellen pro Großquadrat $\times 10^4$ \times Verdünnung

5.12. Aufzucht von Zellen

5.12.1. Kultivieren von transformierten adhärennten Zellen

Adhärennte Zellen (293, HtTA, Phoenix) werden in DMEM („Dulbecco's Modified Eagles Medium“) gehalten, das mit 10% Fötalem Kälberserum (FCS), 100U/ml Penicillin, 100mg/ml Streptomycin und 1 μ M β -Mercaptoethanol supplementiert wird. Die Zellen werden bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Vor der Passagierung (alle 2-4 Tage) werden die Zellen „trypsiniert“. Dazu wird das Medium entfernt und die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend werden 1 bis 2 ml einer 0,25%igen Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und die Schale für etwa 5min in den Inkubator gestellt. Danach werden die Zellen durch leichtes Schütteln abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und hierbei 1:3 bis 1:20 verdünnt.

5.12.2. Kultivieren der Endothelzellen

Die HUVEC werden in Passage 3 aufgetaut und direkt auf 6- Napfplatten ausgesät. Dies entspricht einer Dichte von ca. 50000 Zellen pro Napf. Sie werden in HUVEC's Mix kultiviert, der sich aus einem Teil supplementiertem EGM und zwei Teilen supplementiertem M199 zusammensetzt. Die Inkubation erfolgt bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre für vier Tage, bevor die Zellen infiziert werden.

Die HMEC-1- Zellen werden in einer Dichte von 1x 10⁶ Zellen pro T75- Flasche in HUVEC's Mix ausgesät und für drei bis vier Tage bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert, bevor sie passagiert werden.

5.12.3. Etablierung und Kultivierung primärer Thymozyten

Der Thymus wird aus der Maus präpariert und Einzelzell- Suspensionen hergestellt, indem er in BSS mit dem Stempel einer 5ml- Spritze über steriles Mull gedrückt wird. Anschließend wird die Zellsuspension zweimal mit BSS gewaschen, bevor die Thymozyten in der gewünschten Dichte ausgesät werden.

5.12.4. Etablierung und Kultivierung primärer prä- B- Zellen

5.12.4.1. Gewinnung von IL7-haltigem Kulturüberstand

J558-Zellen (Dr.A.Rolink; Basel) mit einer stabil integrierten IL7-cDNA werden in IMDM (Iscoves Modified Eagles Medium), das mit 2% FCS; 1x nicht-essentiellen Aminosäuren, 100U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin, 2mM Glutamin, 1,5 ml Primaton und 50µM β-Mercaptoethanol supplementiert wird, kultiviert und alle drei Tage passagiert. Der Überstand wird nach fünftägiger Kultur ohne Passage geerntet, filtriert (0,2µm Filter; Fa.Millipore) und bei -20°C gelagert. Für die Kultur von primären PräB-Zellen wurden 4% dieses Überstandes eingesetzt, was ca. 10000-25000U/ml entspricht.

5.12.4.2. Kultivieren der ST2-Stromazellen

Die Stroma-Zelllinie ST2 wird in IMDM-Medium (siehe 5.12.4.1) in 75cm² Zellkulturflaschen (Fa.Greiner) kultiviert (37°C; 10% CO₂) und alle drei Tage passagiert. ST2-Zellen, die als „feeder“-Zellen für die primären PräB-Zellen eingesetzt werden, werden durch γ-Bestrahlung (3000rad) in ihrem Wachstum gehemmt und 60-70% konfluent verwendet.

Verwendete Zellzahlen der ST2- Zellen:

Zellkulturflasche	Zellzahl
25 cm ²	3x 10 ⁵
75 cm ²	1x 10 ⁶

5.12.4.3 Etablierung und Kultivierung von primären prä- B-Zellen

Fötale Lebern von 15-17 Tage alten Embryonen werden isoliert und in IMDM-Medium (siehe 5.12.4.1) mit 2% IL7-Überstand überführt. Einzelzell-Suspensionen werden nach der Methode in Kapitel 5.12.3. hergestellt und die Zellzahl der Suspension bestimmt. $1-3 \times 10^6$ Zellen werden in eine 25cm^2 Zellkulturflasche (Fa.Renner oder Fa.Greiner) mit bestrahlten ST2-Stromazellen überführt und nach 5-7 Tagen Kultur bei 37°C und 10% CO_2 sind die ersten prä- B- Zellkolonien unter dem Mikroskop sichtbar.

Das Kultivieren der primären prä-B-Zellen erfolgt auf bestrahlten ST2-Stromazellen nach dem folgenden Schema:

Zellkulturflasche	Zellzahl	IMDM-Medium (2% IL7)
25cm^2	1×10^6	7ml
75cm^2	3×10^6	20ml

Nach dreitägiger Kultur in IL7-haltigem SF-Medium erhöht sich die Zellzahl um den Faktor 10-20 und die primären prä- B-Zellen werden erneut passagiert. Das Ablösen der primären prä- B-Zellen von den ST2- Zellen erfolgt durch vorsichtiges Klopfen.

5.12.4.4. Doxyzyklin- Behandlung der prä- B- Zellen

Die Zellen werden für mindestens drei Tage mit $3\mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin behandelt.

5.13. Transfektionen und Infektionen von Zellen

5.13.1. Kalziumphosphat-Transfektion adhärenter Zellen

Diese Methode wurde zur Transfektion der 293- und HtTA- Zellen angewandt. 10-20 μg Plasmid-DNA werden durch Ethanol-Präzipitation (siehe 5.1.2.) gefällt, in der Sterilbank getrocknet und anschließend in $225\ \mu\text{l}$ H_2O gelöst. Danach wird die DNA in einem Polystyrenröhrchen mit $25\ \mu\text{l}$ 2,5M CaCl_2 -Lösung gemischt, bevor $225\ \mu\text{l}$ 2x HBS-Lösung unter kontinuierlichem Vortexen langsam zugegeben werden. Dadurch bilden sich Calciumphosphat-DNA-Kopräzipitate, die unter dem Mikroskop sichtbar sind. Diese Mischung wird für 20 min bei RT inkubiert, bevor das Präzipitat

direkt auf die Schale mit den Zellen getropft wird. Für Luziferase-Assays wird das Präzipitat bis zur Ernte der Zellen nach etwa 20h im Medium belassen.

5.13.2. Stabile Transfektion der Phoenix-Zellen

Die Phoenix- Zellen werden mit der Kalziumphosphat- Methode (siehe 5.13.1.) transfiziert. Fünf Minuten vor Zugabe des Präzipitats zu den Zellen werden die Zellen mit 25µM Chloroquin behandelt, um die DNA- Aufnahme zu erhöhen. 24 Stunden nach der Transfektion wird das Medium gewechselt und mittels Fluoreszenzmikroskopie die Transfektionseffizienz anhand der GFP- Expression bestimmt. Anschließend werden die Zellen zur Selektion für eine Woche mit 1 mg/ml Zeozin behandelt.

5.13.3. Infektion der HUVEC- und HMEC-1- Zellen mit retroviralen Überständen

Am Tag vor der Infektion werden die stabil transfizierten Phoenix- Zellen mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro 10cm- Schale in 7 ml HUVEC's Mix- Medium ausgesät. Am Tag der Infektion wird das Medium (= viraler Überstand) von den Phoenix- Zellen abgenommen, durch einen 0,45 µm Sterilfilter (Schleicher & Schüll) filtriert und mit 5 µg/ml Polybren versetzt. Die Phoenix- Zellen werden mit 7ml frischem HUVEC's Mix- Medium versorgt. Anschließend werden jeweils 2 ml des Überstandes zu jedem Napf der Sechs- Napf- Platte gegeben, nachdem das Medium von den Endothelzellen entfernt wurde. Danach werden die Sechs- Napf- Platten für drei Stunden bei 2000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wird das Medium gewechselt. Der gesamte Vorgang wird am nächsten Tag wiederholt.

Ein bis zwei Tage nach der zweiten Infektion wird die Effizienz der Infektion durch FACS- Analyse oder Fluoreszenzmikroskopie der GFP- Expression bestimmt. Die HUVEC werden zwei Tage nach der zweiten Infektion für die FACS- Analyse verwendet, die HMEC-1 werden zur Selektion zwei Tage nach der Infektion mit 200 µg/ml Zeozin versetzt. Nach etwa einer Woche Zeozinbehandlung sind alle Zellen grün und können für Analysen verwendet werden.

5.14. Differenzierung der prä-B-Zellen

5.14.1. Infektion der prä-B-Zellen mit einem bcl2-Retrovirus

GP-Mix-Zellen, die stabil bcl2-Retroviren produzieren, wurden freundlicherweise von Dr. Meinrad Busslinger (Wien) zur Verfügung gestellt. Sie werden für die Infektion unbestrahlt mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen pro T25- Flasche ausgesät. Einen Tag später werden die prä-B-Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen auf die GP-Mix-Zellen gegeben und für drei Tage auf ihnen wachsen gelassen. Anschließend erfolgt die Selektion der infizierten Zellen mit 2mM Histidinol für etwa zwei Wochen. Während der Selektion werden ST2-Zellen verwendet, die ein Histidinol-Resistenzgen tragen (von Helmut Laumen hergestellt).

5.14.2. Differenzierung der prä-B-Zellen durch IL7-Entzug

Die Differenzierung der prä-B-Zellen wird durch dreimaliges Waschen in IL7-freiem Medium ausgelöst. Die Zellen werden dann auf γ -bestrahlten ST2-Zellen in den folgenden Dichten ausgesät:

Zellkulturflasche	Zellzahl	IMDM-Medium (ohne IL7)
25cm ²	1×10^7	7ml
75cm ²	3×10^7	20ml

Die Zellen werden für drei Tage in IL7-freiem Medium kultiviert. Anschließend erfolgt die Abtrennung der toten Zellen durch einen Ficoll-Gradienten (2000 rpm; 20 min; ohne Bremse).

5.14.3. Differenzierung der prä-B-Zellen durch IL7-Entzug mit gleichzeitiger Stimulation mit α -CD40 und rekombinantem IL4

Die Zellen werden wie unter 5.14.2. beschrieben gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift werden die Zellen mit 10% α - CD40 (aus der Hybridomlinie FGK45.5 aufgereinigt; im Labor vorrätig) und 2% IL4 in 15ml Gesamtvolumen auf ST2- Zellen ausgesät. Die Zellzahlen entsprechen denen in 5.14.2. Die Zellen werden für vier Tage in IL7- freiem Medium mit α - CD40 und IL4 kultiviert. Anschließend erfolgt die

Abtrennung der toten Zellen durch einen Ficoll- Gradienten (2000 rpm; 20 min; ohne Bremse).

5.14.4. Gewinnung des IL4- haltigen Kulturüberstands

Das verwendete IL4 stammt aus dem Kulturüberstand von X63- Zellen, die im Labor von Dr. Ton Rolink (Basel) stabil mit einer IL4- cDNA transfiziert wurden und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Sie werden in IMDM (Iscoves Modified Eagles Medium), das mit 2% FCS; 1x nicht-essentiellen Aminosäuren, 100U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin, 2mM Glutamin, 1,5 ml Primaton und 50µM β-Mercaptoethanol supplementiert wird, kultiviert und alle drei Tage passagiert. Der Überstand wird nach fünftägiger Kultur ohne Passage geerntet, filtriert (0,2µm Filter; Fa.Millipore) und bei -20°C gelagert. Für die Differenzierung der primären prä-B- Zellen werden 2% dieses Überstandes eingesetzt.

5.15. Proliferationsmessung primärer Thymozyten

Die Thymozyten werden wie in 5.12.3. beschrieben isoliert und 2×10^4 Zellen pro Napf einer 96- Napf- Platte in RPMI, das mit 5% FCS, 2mM Glutamin, 100U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 50µM β-Mercaptoethanol supplementiert wurde, sowie dem jeweiligen Stimulus ausgesät. Nach 16, 40 und 64 Stunden erfolgt ein Puls mit 0,5 µCi/ml ^3H - Thymidin für weitere acht Stunden, bevor die Zellen im „Elisaharvester“ geerntet werden. Die Messung der eingebauten Radioaktivität erfolgt im β- Counter.

5.16. FACS-Analysen

5.16.1. FACS-Analysen von Organen

FACS-Analysen wurden verwendet, um die Verteilung von Subpopulation der Lymphozyten in verschiedenen lymphatischen Organen anhand spezifischer Oberflächenmarker nachzuweisen. Die verwendeten fluoreszenz-markierten Antikörper sind in Kapitel 6.1.6 aufgelistet.

Zunächst werden die Organe aus den Mäusen präpariert und in 5ml FACS-Puffer (1xPBS; 1% BSA; 0,1% Natriumazid) Einzelzell-Suspensionen hergestellt. Dies erfolgt für Thymus und Milz, indem die Gewebe mit dem Stempel einer 5ml Spritze

über ein ca. 1cm² großes Mullstück gerieben werden. Zusätzlich werden die Zellen der Milz über einen Ficoll- Gradienten (Fa.Cedarlane) nach den Angaben des Herstellers zentrifugiert, um die Lymphozyten anzureichern. Die Zellsuspension aus dem Knochenmark wird hergestellt, indem die Ober- und Unterschenkelknochen mit 1ml FACS-Puffer und einer SubQ-Spritze (Fa.Beckton-Dickinson) durchspült werden. Die Zellsuspensionen aus den verschiedenen Organen werden pelletiert (5min; 1000rpm; Heraeus-Zentrifuge), in 1ml FACS-Puffer aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (siehe 5.11.3.). 2-5 x 10⁵ Zellen werden in ein Eppendorfröhrchen mit 1ml FACS-Puffer gegeben, pelletiert (3min; 3000rpm; Eppendorfszentrifuge) und mit 10µg/ml Fc-Block (Fa.Pharmingen) inkubiert (5min; 4°C). Anschließend werde ein Antikörpermix mit den entsprechenden fluoreszenz- bzw. Biotin-markierten Antikörpern (2,5 µg/ml Endkonzentration) zugegeben und die Zellen abgedunkelt inkubiert (20-30min; 4°C). Danach werden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 500µl FACS-Puffer aufgenommen und die Fluoreszenz in einem FACSCalibur (Fa.Becton Dickinson) gemessen. Bei Anwesenheit von Biotin-markierten Antikörpern wird nach dem Waschen mit FACS-Puffer CyChrom-markiertes Streptavidin (0,8 µg/ml Endkonzentration) zugegeben und die Zellen abgedunkelt inkubiert (20-30min; 4°C). Anschließend wird zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, die Zellen in 500µl FACS-Puffer aufgenommen und die Fluoreszenz in einem FACSCalibur (Fa.Becton Dickinson) gemessen.

5.16.2. FACS- Analysen von prä- B- Zellen

Die prä- B- Zellen werden nach der Aufreinigung über einen Ficoll- Gradienten in FACS- Puffer (1x PBS, 2% FCS) aufgenommen und zweimal mit FACS- Puffer gewaschen. Anschließend werden die Zellen für 5 Minuten mit Fc- Block (10µg/ml) inkubiert, bevor die entsprechenden fluoreszenz- bzw. Biotin-markierten Antikörpern (2,5 µg/ml Endkonzentration) zugegeben und die Zellen abgedunkelt inkubiert (20-30min; 4°C) werden. Danach werden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 500µl FACS-Puffer aufgenommen und die Fluoreszenz in einem FACSCalibur (Fa.Becton Dickinson) gemessen. Bei Anwesenheit von Biotin-markierten Antikörpern wird nach dem Waschen mit FACS-Puffer CyChrom-markiertes Streptavidin (0,8 µg/ml Endkonzentration) zugegeben und die Zellen abgedunkelt inkubiert (20-30min; 4°C). Anschließend wird zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, die Zellen in 500µl FACS-Puffer aufgenommen und die Fluoreszenz in einem FACSCalibur (Fa.Becton Dickinson) gemessen.

5.16.3. Intrazelluläre FACS- Färbung von HUVEC und HMEC-1

Für die FACS- Messung der Chemokinexpression müssen die Zellen über Nacht mit 2µM Monensin behandelt werden, das die Sekretion der Chemokine verhindert.

Für die FACS- Analyse wird das Medium von den Endothelzellen entfernt und diese mit PBS gewaschen, bevor sie mit Trypsin von der Platte abgelöst werden. Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und dann in kaltem 4% Paraformaldehyd (0,5 ml Paraformaldehyd pro 5×10^5 Zellen) für 20 Minuten bei 4°C inkubiert, um die Zellen zu fixieren. Anschließend werden die Zellen gewaschen und in 4ml SAP-Puffer/1% FCS resuspendiert, um die Zellmembran zu permeabilisieren. Nach Zentrifugation werden 100 µl Antikörper (1: 500 in SAP- Puffer verdünnt) pro Probe zugegeben und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit SAP- Puffer/1% FCS gewaschen, bevor sie mit dem zweiten Antikörper (Ziege- anti- Maus, biotinyliert; 1: 200 in SAP- Puffer/1% FCS verdünnt) 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach dreimaligem Waschen mit SAP- Puffer/1% FCS erfolgt die Farbreaktion mit Cychrom- gekoppeltem Streptavidin (1: 250 in SAP- Puffer/1% FCS verdünnt). Dazu werden die Zellen für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die Fluoreszenz in einem FACSCalibur (Fa. Becton Dickinson) gemessen.

5.16.4. Oberflächenfärbung von HUVEC und HMEC-1

Für die FACS- Analyse wird das Medium von den Endothelzellen entfernt und diese mit PBS gewaschen, bevor sie mit Trypsin von der Platte abgelöst werden. Das Trypsin wird mit einer gleichen Menge PBS/10% FCS inaktiviert und die Zellsuspension zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen für 30 Minuten bei 4°C mit PBS/1% BSA inkubiert. Danach werden die Zellen pelletiert und in 100µl Antikörperlösung (1. Antikörper 1: 100 verdünnt in PBS/1% BSA/2% Normalserum aus der Ziege) für 1h bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS/1% BSA gewaschen, bevor sie mit dem zweiten Antikörper (1: 200 on PBS/1% BSA verdünnt) für 45 Minuten bei 4°C inkubiert werden. Danach erfolgen wieder drei Waschschrte und die Farbreaktion mit Cychrom- gekoppeltem Streptavidin (1: 250 in PBS/1% BSA verdünnt). Anschließend wird noch zweimal mit PBS gewaschen und die Fluoreszenz in einem FACSCalibur (Fa. Becton Dickinson) gemessen.

5.17. Aufreinigung von Monozyten aus dem peripheren Blut

Die Monozyten werden aus „Buffy Coats“ aufgereinigt. Je 30 ml des Blutes werden zunächst auf einen Ficoll- Gradienten (20 ml) geladen und 35 Minuten bei 1700 rpm ohne Bremse zentrifugiert (Raumtemperatur). Die Monozytenbande wird abgenommen und die Zellen mit Spinner- Medium gewaschen, wobei jeweils zwei Monozytenbanden vereinigt werden (1500 rpm, 10 min, 4°C). Danach werden jeweils zwei Pellets vereinigt und nochmals mit Spinner- Medium gewaschen (900 rpm, 10 min, 4°C). Anschließend werden alle Zellen vereinigt und ein Aliquot zur Bestimmung der Zellzahl verwendet. Die Zellzahl wird dann auf $5-8 \times 10^8$ Zellen in 3 ml eingestellt und die Aliquots auf präformierte Percollgradienten (13,5 ml Percoll, 15 ml Spinner-Medium, 1,5 ml 10 x Earles; bei 12000 rpm, 12 min, 20 °C ohne Bremse präformiert) aufgetragen. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 1700 rpm für 40 Minuten (Raumtemperatur; ohne Bremse), bevor die Monozytenbanden getrennt abgenommen werden. Diese werden mit Spinner- Medium gewaschen (10 min, 1500 rpm, 4°C), bevor je zwei Pellets vereinigt werden. Anschließend werden diese nochmals mit Spinner- Medium gewaschen (10 min, 900 rpm, 4°C), vereinigt und dann gezählt. Die aufgereinigten Monozyten werden mit einer Dichte von 2×10^8 Zellen in 100 ml McCoy's Medium in einem sterilen Teflonsäckchen eingeschweißt und über Nacht bei 7% CO₂ und 37 °C kultiviert.

5.18. Adhäsionsassay

Zwei Tage vor der Durchführung des Adhäsions- Assays werden 96- Napf-Platten für 30 min mit Fibronectin (50 µl 50 µg/ml- Lösung je Loch) beschichtet, bevor die verschiedenen Endothel- Zellen in einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro Loch ausgesät werden. Diese Zellen werden für zwei Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Etwa 16 Stunden vor Versuchsbeginn werden die Zellen mit 2ng/ml TNF- α stimuliert.

Am Versuchstag wird das Medium von den HMEC-1- Zellen entfernt und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Monozyten (nach 5.17. aus dem peripheren Blut aufgereinigt) mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro 100µl Medium (HUVEC's Mix) auf die endotheliale Zellschicht pipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wird das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, bevor 50 µl Dodecyltrimethylammoniumbromid (25mg pro 5ml PBS; frisch angesetzt) zugesetzt werden. Dann lässt man die Platte für 30 min bei Raumtemperatur stehen, um die Zellen zu lysieren. Anschließend werden 250 µl 0,2mg/ml ortho- Dianisidine (in PBS gelöst, kurz vor Gebrauch mit 0,4µM H₂O₂

versetzt) zugegeben und die Mischung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Extinktion bei 450 nm im ELISA- Reader gemessen wird.

5.19. Transmigrationsassay

Zwei Tage vor Durchführung des Versuchs werden die Transwell-Filter (5 µm Porendurchmesser, Costar) für 30 min mit Fibronectin (50 µl 50 µg/ml- Lösung je Filter) beschichtet und anschließend die HMEC-1-Zellen in einer Dichte von $3,25 \times 10^5$ Zellen pro Filter ausgesät. Anschließend erfolgt die Inkubation für zwei Tage bei 37°C und 5% CO₂.

Am Versuchstag werden je 600 µl Medium (HUVEC's Mix) in der unteren Kammer (24-Napf-Suspensionsplatte) vorgelegt. Das Medium wird von den Endothelzellen entfernt und diese zweimal mit PBS gewaschen. Danach werden jeweils 2×10^6 Monozyten (nach 5.17. aus dem peripheren Blut aufgereinigt) in 100 µl Medium (HUVEC's Mix) in die obere Kammer einpipettiert und der Ansatz für 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wird die Suspensionskulturplatte für 30 min auf Eis gestellt, um die Monozyten abzulösen, bevor diese wie in 5.11.3. beschrieben gezählt werden.

6. Materialien

6.1. Allgemein verwendete Materialien

6.1.1. Chemikalien

APS	Kalium-di-hydrogenphosphat	Natriumhydroxid
Bromphenolblau	Di-Kaliumhydrogenphosphat	Paraformaldehyd
Butanol	Kalziumchlorid	Phenol
Cäsiumchlorid	Magnesiumchlorid	Phosphorsäure
Chloroform	Magnesiumsulfat	PMSF
DMSO	β -Mercaptoethanol	Salzsäure
DTT	Methanol	Saponin
EDTA	Natriumacetat	Stickstoff, flüssig
Ethanol	Natriumazid	TEMED
Ethidiumbromid	Natriumcarbonat	Tris-Base
Glyzerin	Natriumchlorid	Triton-X-100
Glyzin	Natriumcitrat	Tween-20
HEPES	Natriumdodecylsulfat	Xylencyanol
Isopropanol	Natriumhydrogencarbonat	
Kaliumacetat	Natrium-di-hydrogenphosphat	
Kaliumchlorid	Di-Natriumhydrogenphosphat	

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Fa.Merck; Fa.Roth; Fa.Roche Biochemicals; Fa.BIO RAD; Fa.GIBCO BRL; Fa.Pharmacia; Fa.Riedel de Haen; Fa.Serva; Fa.Sigma; Fa.Applichem; Fa.Fluka.

6.1.2. Allgemein verwendete Puffer und Lösungen

DNA-Farbmarker	15%	Glycerin
	10%	Ficoll
	40mM	EDTA
	0,2%	Xylencyanol
	0,2%	Bromphenolblau
10xPBS pH 7,2	87,65g	Natriumchlorid
	2g	Kaliumchlorid

Materialien

	11,7g	Di-Natriumhydrogenphosphat
	2,4g	Natrium-di-hydrogenphosphat
	ad. 1l	H ₂ O
1M Phosphatpuffer	85g	Di-Natriumhydrogenphosphat
	4ml	85% ortho-Phosphorsäure
	ad. 1l	H ₂ O
20xSSC	3M	Natriumchlorid
	0,3M	Natriumcitrat
50xTAE	242g	Tris-Base
	57,2ml	Essigsäure
	37g	EDTA
	ad. 1l	H ₂ O
10xTBE	1M	Tris-Base
	1M	Borsäure
	20mM	EDTA pH8,0
1xTE	10mM	Tris/HCl pH7,5
	1mM	EDTA pH 8,0
1xBSS	100ml	10xBSSI
	100ml	10xBSSII
	ad. 1l	H ₂ O
1xBSSI	5,55mM	Glukose
	0,44mM	KH ₂ PO ₄
	1,34mM	Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O
	0,03mM	Phenolrot
	ad. 1l	H ₂ O
1xBSSII	1,27mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O
	5,36mM	KCl

Materialien

137mM	NaCl
1mM	MgCl ₂ x6H ₂ O
0,8mM	MgSO ₄ x7H ₂ O
ad.	1l H ₂ O

6.1.3. Reagenzien

Acrylamid/Methyl- Bisacrylamid (37,5:1)	Fa.Applichem	Glukose	Fa.Applichem
Agarose	Fa.GIBCO BRL	³ H- Thymidin	Fa.Amersham
Ampicillin	Fa.Applichem		
BSA	Fa.Roche Biochemicals	1kb-ladder	Fa.Gibco BRL
Chloroquin	Fa.Sigma	Liquemin	Von Abt. Dermatolo- gie, Ulm zur Verfü- gung gestellt
Coomasie Brilliant Blue G250	Fa.Serva	Lympholyte-M	Fa.Cedarlane
Desoxyribonukleotid e	Fa.Roth und GeneCraft	Magermilchpulver	Applichem
Dodecyltrimethylam- -moniumbromid	Fa.Sigma	Monensin	Fa.Sigma
Doxyzyklin	Fa.Sigma	ortho- Dianisidine	Fa.Sigma
FACS-Flow	Fa. Becton Dickinson	³² P-markierte Nukleotide (dCTP, dATP)	Fa.Amersham
FACS-Rinse	Fa. Becton Dickinson	Polybren	Fa.Sigma
FACS-Safe	Fa. Becton Dickinson	prestained Proteinmarker	Fa.Sigma
Fibronektin	Fa. Collaborative Biomedical Products	Proteinase- Inhibitoren „complete mini“	Fa. Roche Biochemicals
		Trypanblau	Fa. Gibco BRL

6.1.4. stimulierende Substanzen

H ₂ O ₂	Fa. Applichem	PdBu	Von AG Schimpl (Virologie Würzburg) zur Verfügung gestellt
IFN- γ	Fa. Peprotech	PMA	Fa. Sigma
Ionomycin	Fa. Calbiochem	TNF- α	Fa. R&D Systems

6.1.5. Antibiotika

Ampicillin	Fa. Applichem	Histidinol	Fa. Sigma
Doxyzyklin	Fa. Sigma	Zeozin	Fa. Invitrogen

6.1.6. Antikörper

Für Western-Immunoblot:

α - I κ B α	Fa. Santa Cruz Biotechnology
α - I κ B β	
α -I κ B ϵ	
α - RelA	
α - IKK1/2	
α - JNK	
α - phospho- JNK	Fa. New England Biolabs
α - myc 9E10	Von AG Rapp (MSZ Würzburg) zur Verfügung gestellt
Peroxidase- gekoppelter Esel-anti-Kaninchen	Fa. Dianova
Peroxidase- gekoppelter Ziege-anti-Maus	Fa. Dianova

Für FACS- Analysen:

α - CD4 PE	Fa. Pharmingen
α - CD8 FITC	
α - TCR bio	

α - B220 FITC

α - IgM Bio

α - IgD FITC

α - CD19 FITC

α - CD23 PE

α - MCP-1

α - IL8

Fc- Block

Streptavidin- Cychrom

α - VCAM-1

Fa. Dianova

α - E- Selektin

Biotin- gekoppelter Ziege-anti-Maus- Anti-
körper

Normalserum (Ziege)

α - ICAM-1

Fa. Immunotech

α - IgM PE

Fa. Southern Biotechnologies

α - HLA- DR

Von AG Kämpgen (Dermato-
logie Würzburg) zur Verfü-
gung gestellt

6.1.7. Enzyme

Die Reaktionsbedingungen wurden nach den Angaben der jeweiligen Enzymhersteller gewählt.

Restriktionsendonukleasen (Fa.Biolabs; Fa.Amersham und Fa.Roche Biochemicals)

Klenow-Polymerase (Fa. USB)

T4-DNA-Ligase (Fa.Amersham)

CIP (Fa. Roche Biochemicals)

Taq-DNA-Polymerase (Fa.GeneCraft und Fa.Pharmacia)

Proteinase K (Fa.Sigma)

RNase A (Fa.Sigma)

6.1.8. Größenstandards

1kb ladder (Fa.GIBCO BRL)
prestained Proteinmarker (Fa. Sigma)

6.1.9. Gebrauchsfertige Kits

ECL-System (Fa.Amersham)
rediprime II (Fa.Amersham)

6.1.10. Primer

tTA3	GGCACCATACTCACTTTTGC	Genotypisierung von μ EG1.1-1.5 und μ EG2.1 Mäusen
tTA4	CTTGTCGTAATAATGGCGGC	Genotypisierung von μ EG1.1-1.5 und μ EG2.1 Mäusen
IkBa+	ACCATGGACTACAAAGACGATGACG	Genotypisierung der tetIkB α 1/2- Mäuse
IkBa5	GTTGTTCTGGAAGTTGAGGAAAGC	Genotypisierung der tetIkB α 1/2- Mäuse
IkBa3	GGAGCAGAAGCTGATATCCGAGGAAGATCT	Genotypisierung der Δ N44-4- Mäuse
IkBa4	CTGGATCCAACGTCAGACGCTGGCCT	Genotypisierung der Δ N44-4- Mäuse
Ikba59wt	CAGCCCCGCACAGCCATGTTTCAG	Genotypisierung der IkB α -defizienten Mäuse
Ikba39wt	CATGGAGTCCAGGCCGCTGTCGTG	Genotypisierung der IkB α -defizienten Mäuse
Ikba39rec	TCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGT	Genotypisierung der IkB α - defizienten Mäuse
5'epsilon	CCAGTGGTAAGACAGCGCTGCA	Genotypisierung der tetIkB ϵ - Mäuse
3'epsilon	CCCTGAAAACCTTTGCCCCCTCC	Genotypisierung der tetIkB ϵ - Mäuse

6.1.11. Vektoren und Plasmide

pBi5	Bidirektionales tetrazyk- linabhängiges Konstrukt	AG Prof. Dr. Bujard (Heidelberg)
I κ B α mut, p50, RelA		Prof. Dr. Baeuerle (München)
I κ B β mut, I κ B ϵ mut		AG Dr. Israel (Paris)
3x κ B luc	NF- κ B- abhängiges Luziferasegen	im Labor von Prof. Wirth kloniert
RSV lacZ	Konstitutiv exprimiertes β - Galaktosidasegen	
pCFG5 IEGZ	retroviraler Vektor	AG Dr. Lindemann (Dresden)
pCFG5 IEGZ IKK1/2 KD		AG Dr. Berberich (Würzburg)
pCFG5 IEGZ IKK2 EE		im Labor von Prof. Wirth kloniert
pCFG5 IEGZ SEK KD		AG Dr. Ludwig (Würzburg)

6.1.12. Biologische Materialien

Bakterienstämme (<i>E. coli</i>)	DH5 α JM109	
Zelllinien	HtTA	HeLa-Zellen (humane Cervix- Karzinomzellen), stabil transfiziert mit einem konstitutiv exprimierten tTA
	293	Humane Nierenepithelzellen
	Amphotrophe Phoenix	293-Zellen, die stabil die Verpackungsplasmide gag und env exprimieren
	ST2	Maus-Stroma-Zelllinie aus dem Knochenmark (etabliert im Labor von Dr.A.Rolink)
	ST2 his	ST2-Zellen, die ein Histidinolresistenzgen stabil exprimieren (von Helmut Laumen im Labor Wirth hergestellt)
	GP-Mix	Maus-Stromazellen, die stabil ein bcl2- Retrovirus exprimieren (aus dem Labor von Dr. Busslinger, Wien)
	J558 IL7	Maus-Plasmazytom-Zelllinie, stabil transfiziert mit einer IL7-cDNA (aus dem Labor vn Dr. Rolink, Basel)
	X63 IL4	Maus-Myelomzelllinie, stabil transfiziert mit einer IL4- cDNA
	HMEC-1	Humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie (aus dem

Materialien

Labor von Dr. Gerke, Münster)

primäre prä-B-Zelllinien	wt	Etabliert aus einer bcl2- transgenen Maus (aus dem Labor von Dr. Rolink, Basel)
	tTA	Etabliert aus einer tTA-transgenen Maus
	tTA/tetI κ B α	Etabliert aus einer tTA- und tetI κ B α -doppeltransgenen Maus
	tTA/tetI κ B α /I κ B α ^{-/-}	Etabliert aus einer tTA- und tetI κ B α -doppeltransgenen Maus, der das endogene I κ B α fehlt
	tetI κ B α /I κ B α ^{-/-}	Etabliert aus einer tetI κ B α -transgenen Maus, der das endogene I κ B α fehlt
primäre Thymozyten	tetI κ B α	Etabliert aus einer tetI κ B α -transgenen Maus
	tTA	Etabliert aus einer tTA-transgenen Maus
	tTA/tetI κ B α	Etabliert aus einer tTA- und tetI κ B α -doppeltransgenen Maus

HUVEC: von der Firma Cell Systems (St. Katharinen) bezogen und in Passage 3 verwendet

“Buffy Coats”: von der Blutspendezentrale des Bayerischen Roten Kreuzes (Wiesentheid) bezogen

Mauslinien	1.5 tTA	tTA-Transgen unter der Kontrolle des μ E Enhancers
	2.1 tTA	tTA-Transgen unter der Kontrolle des μ E Enhancers
	tet I κ B α 1	unidirektionales Transgen für die tetrazyklin-abhängige Regulation des mutierten (S32/36A) I κ B α
	tet I κ B α 2	unidirektionales Transgen für die tetrazyklin-abhängige Regulation des mutierten (S32/36A) I κ B α
	Δ N44-4	bidirektionales Transgen für die tetrazyklin-abhängige Regulation des mutierten (N- terminale Deletion) I κ B α und Luziferase
	I κ B α ^{-/-}	I κ B α -defiziente Mauslinie

Materialien

tetI κ B β 1-5	bidirektionales Transgen für die tetrazyklin-abhängige Regulation des mutierten (S19/23A) I κ B β und Luziferase
tetI κ B ϵ 1-16	bidirektionales Transgen für die tetrazyklin-abhängige Regulation des mutierten (S18/22A) I κ B ϵ und Luziferase

Durch Verpaarung der hier aufgeführten Mauslinien entstehen doppeltransgene Linien für tTA und die jeweiligen tet- Transgene. Durch zusätzliche Verpaarung der tTA/tetI κ B α -transgenen Mäuse mit I κ B α - defizienten Mäusen entstehen Mäuse, denen das endogene I κ B α fehlt, die aber das mutante I κ B α exprimieren.

6.1.13. Membranen und Filter

DEAE-Papier	Fa.Sigma
Faltenfilter	Fa. Schleicher & Schuell
Hybond-N	Fa. Amersham
PVDF	Fa.Millipore
3MM Whatman Papier	Fa. Schleicher & Schuell

6.2. Spezielle Puffer und Lösungen

6.2.1. Kultivierung von Bakterien

LB-Medium	10g Trypton
	5g Hefe-Extrakt
	5g NaCl
	ad. 1l H ₂ O

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

Alle für die Herstellung von Medien verwendeten Komponenten wurden von den Firmen Applichem, Gibco BRL und Becton Dickinson bezogen.

6.2.2. Aufreinigung von Plasmid-DNA

Lösung 1 50 mM Glukose
 25 mM Tris-HCl pH 8,0
 10 mM EDTA pH 8,0

Lösung 2 0,2 M NaOH
 1% SDS

Lösung 3 3 M KOAc
 115 ml Essigsäure
 ad. 1l H₂O

6.2.3. Aufreinigung von genomischer DNA

TNES-Puffer 50 mM Tris/HCl pH7,5
 100 mM EDTA pH 8,0
 100 mM NaCl
 1% SDS

6.2.4. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen durch DEAE-Papier

Hochsalzpuffer 50 mM Tris/HCl pH 8,0
 1 M NaCl
 10 mM EDTA pH 8,0

Niedrigsalzpuffer 50 mM Tris/HCl pH 8,0
 0,15 M NaCl
 10 mM EDTA pH 8,0

6.2.5. Hybridisierung von Nukleinsäuren

Denaturierungslösung 0,5 M NaOH
 1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung 0,5 M Tris/HCl pH 7,5

Materialien

	1,5 M NaCl
Phosphatpuffer	85 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 4ml Orthophosphorsäure (85%) ad. 1l H_2O
Hybridisierungslösung	7% SDS 0,5 M Phosphatpuffer (pH 7,2) 1 mM EDTA pH 8,0
Waschlösung 1	40 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) 1 mM EDTA pH 8,0 5% SDS
Waschlösung 2	40 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) 1 mM EDTA pH 8,0 1% SDS

6.2.6. Herstellung von Proteinextrakten

Extraktionspuffer Gewebe	100 Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mM 2 mM EDTA pH 8,0 10% Glyzerin 1% Triton-X-100 2 mM DTT
Extraktionspuffer Zellen	100 Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mM 0,2% Triton-X-100 1 mM DTT
Puffer C	20 mM HEPES 0,42 M NaCl 1,5 mM MgCl_2 0,2 mM EDTA pH 8,0 25% Glyzerin

6.2.7. Bradford- Proteinbestimmung

Bradford-Lösung	100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250
	50 ml Ethanol abs.
	100 ml Phosphorsäure (85%)
	ad. 1l H ₂ O

Lösung durch einen Faltenfilter filtrieren

6.2.8. SDS-PAGE

upper gel buffer 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
 0,4 % SDS

lower gel buffer 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
 0,4 % SDS

1x SDS-Laufpuffer 25 mM Tris
 192 mM Glyzin
 0,1 % SDS

Lämmli- Probenpuffer 0,125 M Tris/HCl pH 6,8
 20 % Glyzerin
 4 % SDS
 10 % β- Mercaptoethanol
 0,004 % Bromphenolblau

6.2.9. Western-Immunoblot

Western Transfer Puffer 12 g Tris
 57,6 g Glyzin
 800 ml Methanol
 ad. 4l H₂O

Stripping- Puffer 3,45 ml β- Mercaptoethanol
 50 ml SDS (20%)
 31,25 ml Tris/HCl pH 6,7 (1M)

Materialien

6.2.13. Luziferase-Assay

2x Luziferase-Assay-Puffer	40 mM Trizin
	2,14 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$
	5,4 mM MgSO_4
	0,2 mM EDTA
Luziferase-Reaktionspuffer	50 ml 2x Luziferase-Assay-Puffer
	3 ml DTT (1M)
	500 μl CoenzymA (54mM)
	2 ml Luziferin (25 mM)
	530 μl ATP (0,1 M)
	ad. 100 ml H_2O

Luziferin und CoenzymA wurden von der Firma Applichem bezogen, $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$ und Trizin von der Firma Merck, ATP wurde von der Firma Sigma bezogen.

6.2.14. FACS-Analysen

FACS-Puffer (Gewebe)	1x PBS
	1 % BSA
	0,1 % NaN_3
FACS-Puffer (prä-B-Zellen)	1x PBS
	2 % FCS
SAP-Puffer	1x PBS
	0,1 % Saponin
	0,05 % NaN_3

6.3. Material für Zellkulturarbeiten

6.3.1. Plastikmaterial

6-, 24-, 96-Napf-Platten	Fa. Falcon
--------------------------	------------

Materialien

Einfrierröhrchen	Fa. Greiner, Nunc
Gewebekulturflaschen (25cm ² und 75cm ²)	Fa. Falcon, Greiner
Gewebekulturschalen (94mm und 145mm)	Fa. Falcon, Greiner
Petrischalen	Fa. Falcon, Greiner
Sterilfilter 0,2µm, 0,45µm	Fa. Schleicher & Schuell, Millipore
Teflonfolie	Fa. Heraeus
Transwell-Filter	Fa. Costar
Zentrifugenröhrchen	Fa. Falcon

6.3.2. Medien

BBE	Fa. CellSystems
DMEM	Fa. Gibco BRL, Pan Biotech
10x MEM-Earle	Fa. Biochrom
EGM	Fa. CellSystems
FCS	Fa. Pan Biotech
Gentamycin-Amphotericin	Fa. CellSystems
Glutamin	Fa. Gibco BRL, Pan Biotech
IMDM	Fa. Gibco BRL, Pan Biotech
Liquemin	Von der Abt. Dermatologie (Uni Ulm) zur Verfügung gestellt
Lympholyte-M	Fa. Cedarlane, PAA
M199	Fa. PAA
McCoy's	Fa. Biochrom
β- Mercaptoethanol	Fa. Sigma
nichtessentielle Aminosäuren (NEAA)	Fa. Gibco BRL, Pan Biotech
Penicillin/Streptomycin	Fa. Gibco BRL, Pan Biotech
Percoll	Amersham Pharmacia
Primaton	Fa. Quest International, von Dr. Rolink (Basel) zur Verfügung gestellt
RPMI	Fa. Gibco BRL
MEM- Spinner	Fa. Seromed
Trypsin	Fa. Gibco BRL, Pan Biotech
Einfriermedium	10 % DMSO 40 % FCS 50 % Zuchtmedium (supplementiert)

Materialien

M199 komplett 500 ml M199
 50 ml FCS
 0,5 ml Gentamycin-Amphotericin
0,666 ml BBE
 0,1 ml Liquemin

HUVEC's Mix: 1 Teil EGM (nach Angaben des Herstellers supplementiert) : 2 Teile M199 komplett (siehe oben)

6.4. Verbrauchsmaterialien

Abstandhalter + Kämmen	Im MSZ von Herrn Tietsch angefertigt
„push columns“	Fa. Stratagene
FACS- Röhrchen	Fa. Falcon
Frischhaltefolie	Fa. Melitta
Gelschlitten + - kammern	Im MSZ von Herrn Tietsch angefertigt
Glasplatten	Im MSZ von Herrn Tietsch angefertigt
Gummischaber	Fa. Sarstedt
Hybridisierungsröhren	Fa. Hybaid
Küvetten (Kristallglas)	Fa. Hellma
Küvetten (Plastik)	Fa. Brand
Mörser + Pistill	Fa. Hartenstein
Mull	von Abt. Dermatologie (Uni Ulm) zur Verfügung gestellt
Neubauer-Zählkammer	Fa. GLW
Percollröhrchen	Fa. Oak-Ridge
Pipettenspitzen (10µl; 200µl; 1ml)	Fa. Gilson
Plastikpipetten (1ml; 2ml; 5ml; 10ml; 25ml)	Fa. Greiner und Fa. Renner
Polycarbonröhrchen/Quickseals (5ml)	Fa. Beckmann
Röhrchen zur Messung der Luziferase- Aktivität	Fa. Greiner
Röntgenfilme	Fa. Fuji
Spritzen und Kanülen	Fa. Braun Melsungen
SubQ-Spritzen	Fa. Becton Dickinson
Zentrifugenröhrchen (0,1ml, 0,5ml, 1,5ml und 2,2ml)	Fa. Eppendorf

6.5. Geräte

Analysenwaagen	Fa. Sartorius
Beckmann- Zentrifuge	Fa. Beckmann
Bestrahlungsgerät	Fa. Nuclear Data Inc.
Bidest-Anlage	Fa. Millipore
Biofuge A	Fa. Heraeus
Brutschränke (Bakterien, Zellen)	Fa. Heraeus
Eismaschine	Fa. Scotsman
Elisa- Harvester	Fa. Dunn Labortechnik
ELISA- Reader	Fa. Molecular Devices
Entwicklermaschine	Fa. Kodak
FACSCalibur	Fa. Becton Dickinson
Feinwaage	Fa. Scaltec
Fluoreszenzmikroskop	Fa. Improvision
Gefrierschränke (-20, - 80°C)	Fa. Liebherr, Kendro
Glaspipetten	Fa. Brand
Heizblock	Fa. Roth
Horizontalschüttler	Fa. New Brunswick Scientific, GFL
Hybridisierungsöfen	Fa. Hybaid
Kühlschränke	Fa. Liebherr
Kurzzeitmesser	Fa. Hartenstein, VWR International
Lumat	Fa. Berthold
Magnetrührer	Fa. Heidolph, IKA
Mikropipetten (P2; P10; p100; P200; P1000)	Fa. Gilson
Mikroskop	Fa. Leica
Nassblotapparatur	Fa. BIO RAD
pH-Meter	Fa. Knick
Phospho- Imager BAS2000	Fa. Fuji
Photometer	Fa. Pharmacia, Hitachi
Pipetboys (Zellkultur, Labor)	Fa. Hirschmann, Roth
Schüttelinkubator	Fa. New Brunswick Scientific

Materialien

Spannungsgeräte	Fa. Desaga, BIO RAD
Speedvac	Fa. Bachenhofer
Sterilbank	Fa. Heraeus
Thermocycler	Fa. MWG
Ultra- Turrax T25	Fa. Janke & Kunkel
Ultrazentrifuge + Vti65-Rotor	Fa. Beckmann
UV- Anlage	Fa. Herolab
UV- Crosslinker	Fa. Amersham
UV-Videosystem	Fa. Sony
Vakuum- Blotter	Fa. Appligene
Vakuumtrockner	Fa. Bachenhofer
Vorrichtung für push columns	Fa. Stratagene
Vortex	Fa. Scientific Industries
Wasserbad	Fa. GFL
β- Counter	Fa. Canberra Packard

6.6. Datenverarbeitung

Für die Auswertung der verschiedenen Meßdaten und Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurde ein Power Macintosh G4 Rechner mit dem Betriebssystem OS X verwendet (Fa.Apple). Folgende Programme wurden dabei angewandt:

Acrobat Reader 5.0
Adobe Photoshop 5.0
Canvas 3.5 und 6.0
CellQuest (Fa.Becton Dickinson)
Endnote 6.0
Excel für OS X
Internet Explorer 5.2
OligoNet Order 1.0
Word für OS X

7. Abkürzungen:

Nicht aufgeführt werden international gebräuchliche Abkürzungen des SI-Systems.

AP-1	activator protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin 5' Triphosphat
BAFF	B cell-activating factor
BBE	Rinderhirnextrakt ("bovine brain extract")
Bcl	B-Zell-Lymphom ("B-cell lymphoma")
bp	Basenpaare ("base pairs")
BSA	Rinderserumalbumin ("bovine serum albumin")
BTC	basaler Transkriptionskomplex
CBP	CREB binding protein
cDNA	komplementäre DNA
CD	Clusters of differentiation
CK II	Caseinkinase II
CMV	Cytomegalovirus
cpm	"counts per minute"
CTP	Cytosin 5' Triphosphat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxyzyklin
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemoluminescence
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E- Selektin	Endotheliales Selektin
ELISA	enzyme linked immunoabsorbent assay
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence associated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum ("fetal calf serum")
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FTOC	fetal thymic organ cultures
GFP	green fluorescent protein
GSK3 β	Glycogen synthase kinase-3beta
GTP	Guanosin 5' Triphosphat
HAT	Histonacetyltransferase

Abkürzungen und Symbole

HBS	HEPES-buffered saline
HDAC	Histondeacetylase
HLA-DR	Human leukocyte antigen-DR
HMEC	Human microvascular endothelial cells
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
I κ B	Inhibitor κ B
ICAM	Intercellular adhesion molecule-1
IFN γ	Interferon-gamma
Ig	immunoglobulin
Ig κ	κ leichte Kette der Immunglobuline
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IRES	Internal ribosome entry site
JNK	c-jun N-terminal kinase
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
KD	Kinase-dead
LacZ	β -Galaktosidase
LB	L-Broth Medium
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LT β	Lymphotoxin-beta
LTR	Long terminal repeat
luc	Luziferase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
μ E	intronischer Immunoglobulinenhancer
MEKK	Mitogen-aktivierte Kinase Kinase
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	"messenger"-RNA
MSZ	Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung
NAK	NF- κ B activating kinase
NEAA	non-essential amino acids
NEMO	NF- κ B essential modulator
NES	Nuclear export sequence
NF- κ B	Nuclear factor κ B
NIK	NF- κ B inducing kinase
NLS	Nuclear localisation sequence
NTP	Nucleotide

Abkürzungen und Symbole

ONPG	Ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktosidase
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate buffered saline
p/CAF	p300/CBP activated factor
PCR	Polymerase chain reaction
PdBu	Phorbol-12,13-dibutyrat
pdIdC	Poly-desoxy-Inosin desoxy-Cytidin
PE	Phycoerythrin
PKA	CAMP-abhängige Proteinkinase
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RHD	Rel homology domain
RIP	Receptor-interacting protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ("revolutions per minute")
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur
SAP	Saponin
SEK	Stress-activated protein kinase/ERK kinase
Tbk	TANK-binding kinase
TCR	T cell receptor
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
tetO	Tet-Operatorsequenz
Th	T helper
TNF- α	Tumour necrosis factor-alpha
TRADD	TNFR1-associated death domain
TRAF	TNF-receptor associated factor
tTA	tetrazyklin-abhängiger Transaktivator
TTP	Thymidin 5'Triphosphat
UV	Ultraviolett
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
Wt	wildtype
ZMBH	Zentrum für Molekularbiologie Heidelberg

8. Literatur

- Agou, F., Ye, F., Goffinont, S., Courtois, G., Yamaoka, S., Israel, A. and Veron, M. (2002) NEMO trimerizes through its coiled-coil C-terminal domain. *J Biol Chem*, **277**, 17464-17475.
- Ahmad, M., Marui, N., Alexander, R.W. and Medford, R.M. (1995) Cell type-specific transactivation of the VCAM-1 promoter through an NF-kappa B enhancer motif. *J Biol Chem*, **270**, 8976-8983.
- Ahmad, M., Theofanidis, P. and Medford, R.M. (1998) Role of activating protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*, **273**, 4616-4621.
- Alcamo, E., Hacohen, N., Schulte, L.C., Rennert, P.D., Hynes, R.O. and Baltimore, D. (2002) Requirement for the NF-kappaB family member RelA in the development of secondary lymphoid organs. *J Exp Med*, **195**, 233-244.
- Allen, J.M., Forbush, K.A. and Perlmutter, R.M. (1992) Functional dissection of the Ick proximal promoter. *Mol Cell Biol*, **12**, 2758-2768.
- Annweiler, A., Muller, U. and Wirth, T. (1992) Functional analysis of defined mutations in the immunoglobulin heavy-chain enhancer in transgenic mice. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1503-1509.
- Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M.S., Bachelier, F., Thomas, D. and Hay, R.T. (1995) Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Cell Biol*, **15**, 2689-2696.
- Ashburner, B.P., Westerheide, S.D. and Baldwin, A.S., Jr. (2001) The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol Cell Biol*, **21**, 7065-7077.
- Attar, R.M., Bravo, H.D., Raventos-Suarez, C., Durham, S.K. and Bravo, R. (1998) Expression of constitutively active IkbB in T cells of transgenic mice: persistent NF-kB activity is required for T-cell immune responses. *Molecular and Cellular Biology*, **18**, 477-487.
- Badrichani, A.Z., Stroka, D.M., Bilbao, G., Curiel, D.T., Bach, F.H. and Ferran, C. (1999) Bcl-2 and Bcl-XL serve an anti-inflammatory function in endothelial cells through inhibition of NF-kappaB. *J Clin Invest*, **103**, 543-553.
- Bakker, T.R., Renno, T. and Jongeneel, C.V. (1999) Impaired fetal thymocyte development after efficient adenovirus-mediated inhibition of NF-kappa B activation. *J Immunol*, **162**, 3456-3462.
- Baron, U., Freundlieb, S., Gossen, M. and Bujard, H. (1995) Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res*, **23**, 3605-3606.
- Baron, U., Gossen, M. and Bujard, H. (1997) Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2723-2729.
- Beauparlant, P., Lin, R. and Hiscott, J. (1996) The role of the C-terminal domain of I kappa B alpha in protein degradation and stabilization. *J Biol Chem*, **271**, 10690-10696.
- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T. and Baltimore, D. (1995a) Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev*, **9**, 2736-2746.
- Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S. and Baltimore, D. (1995b) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature*, **376**, 167-170.
- Bell, S., Matthews, J.R., Jaffray, E. and Hay, R.T. (1996) I(kappa)B(gamma) inhibits DNA binding of NF-kappaB p50 homodimers by interacting with residues that contact DNA. *Mol Cell Biol*, **16**, 6477-6485.
- Ben-Neriah, Y. (2002) Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol*, **3**, 20-26.
- Bendall, H.H., Sikes, M.L., Ballard, D.W. and Oltz, E.M. (1999) An intact NF-kappa B signaling pathway is required for maintenance of mature B cell subsets. *Mol Immunol*, **36**, 187-195.
- Bendall, H.H., Sikes, M.L. and Oltz, E.M. (2001) Transcription factor NF-kappa B regulates Ig lambda light chain gene rearrangement. *J Immunol*, **167**, 264-269.
- Bonnard, M., Mirtsos, C., Suzuki, S., Graham, K., Huang, J., Ng, M., Itie, A., Wakeham, A., Shahinian, A., Henzel, W.J., Elia, A.J., Shillinglaw, W., Mak, T.W., Cao, Z. and Yeh, W.C. (2000) Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription. *Embo J*, **19**, 4976-4985.
- Boothby, M.R., Mora, A.L., Scherer, D.C., Brockman, J.A. and Ballard, D.W. (1997) Perturbation of the T lymphocyte lineage in transgenic mice expressing a constitutive repressor of nuclear factor (NF)-kappaB. *J Exp Med*, **185**, 1897-1907.
- Bours, V., Franzoso, G., Azarenko, V., Park, S., Kanno, T., Brown, K. and Siebenlist, U. (1993) The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell*, **72**, 729-739.

- Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Brandl, R., Knuechel, R., Page, M., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P.A. and Neumeier, D. (1996) Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest*, **97**, 1715-1722.
- Brockman, J.A., Scherer, D.C., McKinsey, T.A., Hall, S.M., Qi, X., Lee, W.Y. and Ballard, D.W. (1995) Coupling of a signal response domain in I kappa B alpha to multiple pathways for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol*, **15**, 2809-2818.
- Brown, K., Park, S., Kanno, T., Franzoso, G. and Siebenlist, U. (1993) Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 2532-2536.
- Burkly, L., Hession, C., Ogata, L., Reilly, C., Marconi, L.A., Olson, D., Tizard, R., Cate, R. and Lo, D. (1995) Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature*, **373**, 531 - 536.
- Burrows, P.D., Stephan, R.P., Wang, Y.H., Lassoued, K., Zhang, Z. and Cooper, M.D. (2002) The transient expression of pre-B cell receptors governs B cell development. *Semin Immunol*, **14**, 343-349.
- Bushdid, P.B., Brantley, D.M., Yull, F.E., Blaeuer, G.L., Hoffman, L.H., Niswander, L. and Kerr, L.D. (1998) Inhibition of NF- κ B activity results in disruption of the apical ectodermal ridge and aberrant limb morphogenesis. *Nature*, **392**, 615-618.
- Caamano, J.H., Perez, P., Lira, S.A. and Bravo, R. (1996) Constitutive expression of Bc1-3 in thymocytes increases the DNA binding of NF-kappaB1 (p50) homodimers in vivo. *Mol Cell Biol*, **16**, 1342-1348.
- Caamano, J.H., Rizzo, C.A., Durham, S.K., Barton, D.S., Raventos-Suarez, C., Snapper, C.M. and Bravo, R. (1998) Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *J Exp Med*, **187**, 185-196.
- Carrasco, D., Ryseck, R.P. and Bravo, R. (1993) Expression of relB transcripts during lymphoid organ development: specific expression in dendritic antigen-presenting cells. *Development*, **118**, 1221-1231.
- Carrasco, D., Rizzo, C.A., Dorfman, K. and Bravo, R. (1996) The v-rel oncogene promotes malignant T-cell leukemia/lymphoma in transgenic mice. *Embo J*, **15**, 3640-3650.
- Carrasco, D., Cheng, J., Lewin, A., Warr, G., Yang, H., Rizzo, C., Rosas, F., Snapper, C. and Bravo, R. (1998) Multiple hemopoietic defects and lymphoid hyperplasia in mice lacking the transcriptional activation domain of the c-Rel protein. *The Journal of Experimental Medicine*, **187**, 973-984.
- Chang, J.F., Thomas, C.A., 3rd and Kung, J.T. (1991) Mitogen-induced IL-2 production and proliferation at defined stages of T helper cell development. *J Immunol*, **147**, 860-866.
- Chen, C., Chou, C., Sun, Y. and Huang, W. (2001a) Tumor necrosis factor alpha-induced activation of downstream NF-kappaB site of the promoter mediates epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. Involvement of PKCalpha, tyrosine kinase, and IKK2, but not MAPKs, pathway. *Cell Signal*, **13**, 543-553.
- Chen, C.C., Sun, Y.T., Chen, J.J. and Chang, Y.J. (2001b) Tumor necrosis factor-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression via sequential activation of ceramide-dependent mitogen-activated protein kinases, and I kappa B kinase 1/2 in human alveolar epithelial cells. *Mol Pharmacol*, **59**, 493-500.
- Chen, C.C., Sun, Y.T., Chen, J.J. and Chiu, K.T. (2000) TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression in human lung epithelial cells: involvement of the phospholipase C-gamma 2, protein kinase C-alpha, tyrosine kinase, NF-kappa B-inducing kinase, and I-kappa B kinase 1/2 pathway. *J Immunol*, **165**, 2719-2728.
- Chen, C.L., Singh, N., Yull, F.E., Strayhorn, D., Van Kaer, L. and Kerr, L.D. (2000a) Lymphocytes lacking I kappa B-alpha develop normally, but have selective defects in proliferation and function. *J Immunol*, **165**, 5418-5427.
- Chen, C.L., Yull, F.E., Cardwell, N., Singh, N., Strayhorn, W.D., Nanney, L.B. and Kerr, L.D. (2000b) RAG2^{-/-}, I kappa B-alpha^{-/-} chimeras display a psoriasiform skin disease. *J Invest Dermatol*, **115**, 1124-1133.
- Chen, D. and Rothenberg, E.V. (1993) Molecular basis for developmental changes in interleukin-2 gene inducibility. *Mol Cell Biol*, **13**, 228-237.
- Chen, F.E., Huang, D.B., Chen, Y.Q. and Ghosh, G. (1998a) Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature*, **391**, 410-413.
- Chen, G., Cao, P. and Goeddel, D.V. (2002) TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell*, **9**, 401-410.
- Chen, G. and Goeddel, D.V. (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, **296**, 1634-1635.
- Chen, L., Fischle, W., Verdin, E. and Greene, W.C. (2001) Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science*, **293**, 1653-1657.
- Chen, Y.Q., Ghosh, S. and Ghosh, G. (1998b) A novel DNA recognition mode by the NF-kappa B p65 homodimer. *Nat Struct Biol*, **5**, 67-73.

- Chen, Y.Y., Wang, L.C., Huang, M.S. and Rosenberg, N. (1994) An active v-abl protein tyrosine kinase blocks immunoglobulin light-chain gene rearrangement. *Genes Dev*, **8**, 688-697.
- Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D. and Maniatis, T. (1995) Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*, **9**, 1586-1597.
- Cheng, J.D., Ryseck, R.P., Attar, R.M., Dambach, D. and Bravo, R. (1998) Functional redundancy of the nuclear factor kappa B inhibitors I kappa B alpha and I kappa B beta. *J Exp Med*, **188**, 1055-1062.
- Chiao, P.J., Miyamoto, S. and Verma, I.M. (1994) Autoregulation of I κ B α activity. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **91**, 28-32.
- Ciechanover, A., Gonen, H., Bercovich, B., Cohen, S., Fajerman, I., Israel, A., Mercurio, F., Kahana, C., Schwartz, A.L., Iwai, K. and Orian, A. (2001) Mechanisms of ubiquitin-mediated, limited processing of the NF-kappaB1 precursor protein p105. *Biochimie*, **83**, 341-349.
- Claudio, E., Brown, K., Park, S., Wang, H. and Siebenlist, U. (2002) BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappaB2 in maturing B cells. *Nat Immunol*, **3**, 958-965.
- Cohen, L., Henzel, W.J. and Baeuerle, P.A. (1998) IKAP is a scaffold protein of the I kappa B kinase complex. *Nature*, **395**, 292-296.
- Cohen, S., Orian, A. and Ciechanover, A. (2001) Processing of p105 is inhibited by docking of p50 active subunits to the ankyrin repeat domain, and inhibition is alleviated by signaling via the carboxyl-terminal phosphorylation/ubiquitin-ligase binding domain. *J Biol Chem*, **276**.
- Collins, T. and Cybulsky, M.I. (2001) NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*, **107**, 255-264.
- Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D. and Maniatis, T. (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *Faseb J*, **9**, 899-909.
- Combrato, G. and Klobeck, H.G. (2002) Regulation of human Ig lambda light chain gene expression by NF-kappa B. *J Immunol*, **168**, 1259-1266.
- Coope, H.J., Atkinson, P.G., Huhse, B., Belich, M., Janzen, J., Holman, M.J., Klaus, G.G., Johnston, L.H. and Ley, S.C. (2002) CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *Embo J*, **21**, 5375-5385.
- Cooper, J.T., Stroka, D.M., Brostjan, C., Palmethofer, A., Bach, F.H. and Ferran, C. (1996) A20 blocks endothelial cell activation through a NF-kappaB-dependent mechanism. *J Biol Chem*, **271**, 18068-18073.
- Coux, O. and Goldberg, A.L. (1998) Enzymes catalyzing ubiquitination and proteolytic processing of the p105 precursor of nuclear factor kappaB1. *J Biol Chem*, **273**, 8820-8828.
- 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.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y. and Karin, M. (1999) Positive and negative regulation of I kappa B kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science*, **284**, 309-313.
- Denk, A., Wirth, T. and Baumann, B. (2000) NF-kappaB transcription factors: critical regulators of hematopoiesis and neuronal survival. *Cytokine Growth Factor Rev*, **11**, 303-320.
- Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M. and Liu, Z. (2000) The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*, **12**, 419-429.
- Devin, A., Lin, Y., Yamaoka, S., Li, Z., Karin, M. and Liu, Z. (2001) The alpha and beta subunits of I kappa B kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF. *Mol Cell Biol*, **21**, 3986-3994.
- de Wet, J.R., Wood, K.V., de Luca, M., Helinski, D.R. and Subramani, S. (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 725-737.
- DiChiara, M.R., Kiely, J.M., Gimbrone, M.A., Jr., Lee, M.E., Perrella, M.A. and Topper, J.N. (2000) Inhibition of E-selectin gene expression by transforming growth factor beta in endothelial cells involves coactivator integration of Smad and nuclear factor kappaB-mediated signals. *J Exp Med*, **192**, 695-704.
- DiDonato, J., Mercurio, F., Rosette, C., Wu-Li, J., Suyang, H., Ghosh, S. and Karin, M. (1996) Mapping of the inducible I kappa B 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 I kappa B kinase that activates the transcription factor NF-kappaB [see comments]. *Nature*, **388**, 548-554.
- Dobrzanski, P., Ryseck, R.-P. and Bravo, R. (1994) Differential interactions of Rel-NF- κ B complexes with I κ B α determine pools of constitutive and inducible NF- κ B activity. *EMBO J.*, **13**, 4608-4616.

- Doi, T.S., Marino, M.W., Takahashi, T., Yoshida, T., Sakakura, T., Old, L.J. and Obata, Y. (1999) Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2994-2999.
- Doi, T.S., Takahashi, T., Taguchi, O., Azuma, T. and Obata, Y. (1997) NF-kappa B RelA-deficient lymphocytes: normal development of T cells and B cells, impaired production of IgA and IgG1 and reduced proliferative responses. *J Exp Med*, **185**, 953-961.
- Drier, E.A., Huang, L.H. and Steward, R. (1999) Nuclear import of the Drosophila Rel protein Dorsal is regulated by phosphorylation. *Genes Dev*, **13**, 556-568.
- Duckett, C.S., Perkins, N.D., Kowalik, T.F., Schmid, R.M., Huang, E.S., Baldwin, A.S., Jr. and Nabel, G.J. (1993) Dimerization of NF-KB2 with RelA(p65) regulates DNA binding, transcriptional activation, and inhibition by an I kappa B-alpha (MAD-3). *Mol Cell Biol*, **13**, 1315-1322.
- Ebnet, K. and Vestweber, D. (1999) Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem Cell Biol*, **112**, 1-23.
- Esslinger, C.W., Jongeneel, C.V. and MacDonald, H.R. (1998) Survival-independent function of NF-kappaB/Rel during late stages of thymocyte differentiation. *Mol Immunol*, **35**, 847-852.
- Esslinger, C.W., Wilson, A., Sordat, B., Beermann, F. and Jongeneel, C.V. (1997) Abnormal T lymphocyte development induced by targeted overexpression of IkappaB alpha. *J Immunol*, **158**, 5075-5078.
- Fenwick, C., Na, S.Y., Voll, R.E., Zhong, H., Im, S.Y., Lee, J.W. and Ghosh, S. (2000) A subclass of Ras proteins that regulate the degradation of IkappaB. *Science*, **287**, 869-873.
- Ferran, C., Stroka, D.M., Badrichani, A.Z., Cooper, J.T., Wrighton, C.J., Soares, M., Grey, S.T. and Bach, F.H. (1998) A20 inhibits NF-kappaB activation in endothelial cells without sensitizing to tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *Blood*, **91**, 2249-2258.
- Ferreira, V., Sidenius, N., Tarantino, N., Hubert, P., Chatenoud, L., Blasi, F. and Korner, M. (1999) In vivo inhibition of NF-kappa B in T-lineage cells leads to a dramatic decrease in cell proliferation and cytokine production and to increased cell apoptosis in response to mitogenic stimuli, but not to abnormal thymopoiesis. *J Immunol*, **162**, 6442-6450.
- Feuillard, J., Memet, S., Goudeau, B., Lilienbaum, A., Schmidt-Ullrich, R., Raphael, M. and Israel, A. (2000) In vivo identification of lymphocyte subsets exhibiting transcriptionally active NF-kappaB/Rel complexes. *Int Immunol*, **12**, 613-621.
- Fields, E.R., Seufzer, B.J., Oltz, E.M. and Miyamoto, S. (2000) A switch in distinct I kappa B alpha degradation mechanisms mediates constitutive NF-kappa B activation in mature B cells. *J Immunol*, **164**, 4762-4767.
- Fiorini, E., Schmitz, I., Marissen, W.E., Osborn, S.L., Touma, M., Sasada, T., Reche, P.A., Tibaldi, E.V., Hussey, R.E., Kruisbeek, A.M., Reinherz, E.L. and Clayton, L.K. (2002) Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF-kappa B inhibitor. *Mol Cell*, **9**, 637-648.
- Fognani, C., Rondi, R., Romano, A. and Blasi, F. (2000) cRel-TD kinase: a serine/threonine kinase binding in vivo and in vitro c-Rel and phosphorylating its transactivation domain. *Oncogene*, **19**, 2224-2232.
- Fong, A. and Sun, S.C. (2002) Genetic evidence for the essential role of beta-transducin repeat-containing protein in the inducible processing of NF-kappa. *J Biol Chem*, **277**, 22111-22114.
- Fong, A., Zhang, M., Neely, J. and Sun, S.C. (2002) S9, a 19 S Proteasome Subunit Interacting with Ubiquitinated NF-kappa B2/p100. *J Biol Chem*, **277**, 40697-40702.
- Franzoso, G., Carlson, L., Poljak, L., Shores, E.W., Epstein, S., Leonardi, A., Grinberg, A., Tran, T., Scharton-Kersten, T., Anver, M., Love, P., Brown, K. and Siebenlist, U. (1998) Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *J Exp Med*, **187**, 147-159.
- Franzoso, G., Carlson, L., Scharton-Kersten, T., Shores, E.W., Epstein, S., Grinberg, A., Tran, T., Shacter, E., Leonardi, A., Anver, M., Love, P., Sher, A. and Siebenlist, U. (1997a) Critical roles for the Bcl-3 oncoprotein in T cell-mediated immunity, splenic microarchitecture, and germinal center reactions. *Immunity*, **6**, 479-490.
- Franzoso, G., Carlson, L., Xing, L., Poljak, L., Shores, E.W., Brown, K.D., Leonardi, A., Tran, T., Boyce, B.F. and Siebenlist, U. (1997b) Requirement for NF-kappa B in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev*, **11**, 3482-3496.
- Fujita, T., Nolan, G.P., Liou, H.C., Scott, M.L. and Baltimore, D. (1993) The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev*, **7**, 1354-1363.
- Gerondakis, S., Strasser, A., Metcalf, D., Grigoriadis, G., Scheerlinck, J.Y. and Grumont, R.J. (1996) Rel-deficient T cells exhibit defects in production of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3405-3409.

- Gerritsen, M.E., Williams, A.J., Neish, A.S., Moore, S., Shi, Y. and Collins, T. (1997) CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2927-2932.
- Ghosh, G., van Duyne, G., Ghosh, S. and Sigler, P. (1995) Structure of the NF- κ B p50 homodimer bound to a κ B site. *Nature*, **373**, 303-310.
- Ghosh, S. and Karin, M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, **109 Suppl**, S81-96.
- Glass, C.K. and Witztum, J.L. (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*, **104**, 503-516.
- Gossen, M. and Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5547-5551
- Grigoriadis, G., Zhan, Y., Grumont, R.J., Metcalf, D., Handman, E., Cheers, C. and Gerondakis, S. (1996) The Rel subunit of NF-kappaB-like transcription factors is a positive and negative regulator of macrophage gene expression: distinct roles for Rel in different macrophage populations. *Embo J*, **15**, 7099-7107.
- Groger, M., Matsumura, T., Kohrgruber, N., Maurer, D., Wolff, K. and Petzelbauer, P. (1999) A standardized, a computer-assisted in vitro assay for the assessment of neutrophil transmigration across endothelial monolayers. *J Immunol Methods*, **222**, 101-109.
- Grossmann, M., Metcalf, D., Merryfull, J., Beg, A., Baltimore, D. and Gerondakis, S. (1999) The combined absence of the transcription factors Rel and RelA leads to multiple hemopoietic cell defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11848-11853.
- Grossmann, M., O'Reilly, L.A., Gugasyan, R., Strasser, A., Adams, J.M. and Gerondakis, S. (2000) The anti-apoptotic activities of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression. *Embo J*, **19**, 6351-6360.
- Grumont, R.J. and Gerondakis, S. (1994) The subunit composition of NF- κ B complexes changes during B-cell development. *Cell Growth & Diff.*, **5**, 1321-1331.
- Grumont, R.J., Rourke, I.J. and Gerondakis, S. (1999) Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 400-411.
- Grumont, R.J., Rourke, I.J., O'Reilly, L.A., Strasser, A., Miyake, K., Sha, W. and Gerondakis, S. (1998) B lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor kappaB1 (NF- kappaB1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. *J Exp Med*, **187**, 663-674.
- Gu, L., Okada, Y., Clinton, S.K., Gerard, C., Sukhova, G.K., Libby, P. and Rollins, B.J. (1998) Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*, **2**, 275-281.
- Hajra, L., Evans, A.I., Chen, M., Hyduk, S.J., Collins, T. and Cybulsky, M.I. (2000) The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9052-9057.
- Harhaj, E.W., Maggirwar, S.B., Good, L. and Sun, S.C. (1996) CD28 mediates a potent costimulatory signal for rapid degradation of IkappaBbeta which is associated with accelerated activation of various NF-kappaB/Rel heterodimers. *Mol Cell Biol*, **16**, 6736-6743.
- He, K.L. and Ting, A.T. (2002) A20 inhibits tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced apoptosis by disrupting recruitment of TRADD and RIP to the TNF receptor 1 complex in Jurkat T cells. *Mol Cell Biol*, **22**, 6034-6045.
- Heissmeyer, V., Krappmann, D., Hatada, E.N. and Scheidereit, C. (2001) Shared pathways of IkappaB kinase-induced SCF(betaTrCP)-mediated ubiquitination and degradation for the NF-kappaB precursor p105 and IkappaBalpha. *Mol Cell Biol*, **21**, 1024-1035.
- Heissmeyer, V., Krappmann, D., Wulczyn, F.G. and Scheidereit, C. (1999) NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes. *Embo J*, **18**, 4766-4778.
- Hess, J., Nielsen, P.J., Fischer, K.D., Bujard, H. and Wirth, T. (2001) The B lymphocyte-specific coactivator BOB.1/OBF.1 is required at multiple stages of B-cell development. *Mol Cell Biol*, **21**, 1531-1539.
- Hettmann, T., DiDonato, J., Karin, M. and Leiden, J.M. (1999) An essential role for nuclear factor kappaB in promoting double positive thymocyte apoptosis. *J Exp Med*, **189**, 145-158.
- Hoeflich, K.P., Luo, J., Rubie, E.A., Tsao, M.S., Jin, O. and Woodgett, J.R. (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature*, **406**, 86-90.
- Hooft van Huijsduijnen, R., Pescini, R. and DeLamarter, J.F. (1993) Two distinct NF-kappa B complexes differing in their larger subunit bind the E-selectin promoter kappa B element. *Nucleic Acids Res*, **21**, 3711-3717.
- Horwitz, B.H., Scott, M.L., Cherry, S.R., Bronson, R.T. and Baltimore, D. (1997) Failure of lymphopoiesis after adoptive transfer of NF-kappaB-deficient fetal liver cells. *Immunity*, **6**, 765-772.

- Hou, J., Baichwal, V. and Cao, Z. (1994) Regulatory elements and transcription factors controlling basal and cytokine-induced expression of the gene encoding intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11641-11645.
- Hsing, Y. and Bishop, G.A. (1999) Requirement for nuclear factor-kappaB activation by a distinct subset of CD40-mediated effector functions in B lymphocytes. *J Immunol*, **162**, 2804-2811.
- Hsing, Y., Hostager, B.S. and Bishop, G.A. (1997) Characterization of CD40 signaling determinants regulating nuclear factor-kappa B activation in B lymphocytes. *J Immunol*, **159**, 4898-4906.
- Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R. and Karin, M. (1999) Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science*, **284**, 316-320.
- Hu, Y., Baud, V., Oga, T., Kim, K.I., Yoshida, K. and Karin, M. (2001) IKKalpha controls formation of the epidermis independently of NF-kappaB. *Nature*, **410**, 710-714.
- Huang, T.T., Kudo, N., Yoshida, M. and Miyamoto, S. (2000) A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalpha complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1014-1019.
- Huxford, T., Huang, D.B., Malek, S. and Ghosh, G. (1998) The crystal structure of the IkappaBalpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation. *Cell*, **95**, 759-770.
- Iiyama, K., Hajra, L., Iiyama, M., Li, H., DiChiara, M., Medoff, B.D. and Cybulsky, M.I. (1999) Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res*, **85**, 199-207.
- Inlay, M., Alt, F.W., Baltimore, D. and Xu, Y. (2002) Essential roles of the kappa light chain intronic enhancer and 3' enhancer in kappa rearrangement and demethylation. *Nat Immunol*, **3**, 463-468.
- Iotsova, V., Caamano, J., Loy, J., Yang, Y., Lewin, A. and Bravo, R. (1997) Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nature Med.*, **3**, 1285-1289.
- Ishikawa, H., Carrasco, D., Claudio, E., Ryseck, R.P. and Bravo, R. (1997) Gastric hyperplasia and increased proliferative responses of lymphocytes in mice lacking the COOH-terminal ankyrin domain of NF-kappaB2. *J Exp Med*, **186**, 999-1014.
- Ishikawa, H., Claudio, E., Dambach, D., Raventos-Suarez, C., Ryan, C. and Bravo, R. (1998) Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p)105 precursor (NF-kappaB1) but expressing p50. *J Exp Med*, **187**, 985-996.
- Ito, C.Y., Kazantsev, A.G. and Baldwin, A.S., Jr. (1994) Three NF-kappa B sites in the I kappa B-alpha promoter are required for induction of gene expression by TNF alpha. *Nucleic Acids Res*, **22**, 3787-3792.
- Ito, K., Barnes, P.J. and Adcock, I.M. (2000) Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol*, **20**, 6891-6903.
- Ivanov, V. and Ceredig, R. (1992) Transcription factors in mouse fetal thymus development. *Int Immunol*, **4**, 729-737.
- Jacobs, M.D. and Harrison, S.C. (1998) Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell*, **95**, 749-758.
- Jamieson, C., McCaffrey, P.G., Rao, A. and Sen, R. (1991) Physiologic activation of T cells via the T cell receptor induces NF-kappa B. *J Immunol*, **147**, 416-420.
- Johnson, C., Van Antwerp, D. and Hope, T.J. (1999) An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpha. *Embo J*, **18**, 6682-6693.
- Kaisho, T., Takeda, K., Tsujimura, T., Kawai, T., Nomura, F., Terada, N. and Akira, S. (2001) IkappaB kinase alpha is essential for mature B cell development and function. *J Exp Med*, **193**, 417-426.
- Kamada, S., Shimono, A., Shinto, Y., Tsujimura, T., Takahashi, T., Noda, T., Kitamura, Y., Kondoh, H. and Tsujimoto, Y. (1995) bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine. *Cancer Res*, **55**, 354-359.
- Kanegae, Y., Tavares, A.T., Belmonte, J.C.I. and Verma, I.M. (1998) Role of Rel/NF-kappaB transcription factors during the outgrowth of the vertebrate limb. *Nature*, **392**, 611-614.
- Kang, S.M., Tran, A.C., Grilli, M. and Lenardo, M.J. (1992) NF-kappa B subunit regulation in nontransformed CD4+ T lymphocytes. *Science*, **256**, 1452-1456.
- Karasuyama, H., Rolink, A., Shinkai, Y., Young, F., Alt, F.W. and Melchers, F. (1994) The expression of Vpre-B/lambda 5 surrogate light chain in early bone marrow precursor B cells of normal and B cell-deficient mutant mice. *Cell*, **77**, 133-143.
- Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB 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.
- Kayagaki, N., Yan, M., Seshasayee, D., Wang, H., Lee, W., French, D.M., Grewal, I.S., Cochran, A.G., Gordon, N.C., Yin, J., Starovasnik, M.A. and Dixit, V.M. (2002) BAFF/BLyS Receptor 3 Binds the B

- Cell Survival Factor BAFF Ligand through a Discrete Surface Loop and Promotes Processing of NF-kappaB2. *Immunity*, **17**, 515.
- Kelliher, M.A., Grimm, S., Ishida, Y., F., K., Stanger, B.Z. and P., L. (1998) The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity*, **8**, 297-303.
- Kirillov, A., Kistler, B., Mostoslavsky, R., Cedar, H., Wirth, T. and Bergman, Y. (1996) A role for nuclear NF-kappaB in B-cell-specific demethylation of the Igk locus. *Nature Genetics*, **13**, 435-441.
- Kistler, B., Rolink, A., Marienfeld, R., Neumann, M. and Wirth, T. (1998) Induction of nuclear factor-kappa B during primary B cell differentiation. *J Immunol*, **160**, 2308-2317.
- Klein, S., de Fougères, A.R., Blaikie, P., Khan, L., Pepe, A., Green, C.D., Kotliansky, V. and Giancotti, F.G. (2002) Alpha 5 beta 1 integrin activates an NF-kappa B-dependent program of gene expression important for angiogenesis and inflammation. *Mol Cell Biol*, **22**, 5912-5922.
- Klement, J.F., Rice, N.R., Car, B.D., Abbondanzo, S.J., Powers, G.D., Bhatt, P.H., Chen, C.H., Rosen, C.A. and Stewart, C.L. (1996) Ikb-alpha deficiency results in a sustained NF-kappaB response and severe widespread dermatitis in mice. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 2341-2349.
- Klug, C.A., Gerety, S.J., Shah, P.C., Chen, Y.Y., Rice, N.R., Rosenberg, N. and Singh, H. (1994) The v-abl tyrosine kinase negatively regulates NF-kappa B/Rel factors and blocks kappa gene transcription in pre-B lymphocytes. *Genes Dev*, **8**, 678-687.
- Kontgen, F., Grumont, R.J., Strasser, A., Metcalf, D., Li, R., Tarlinton, D. and Gerondakis, S. (1995) Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev.*, **9**, 1965-1977.
- Krappmann, D. and Scheidereit, C. (1997) Regulation of NF-kappa B activity by I kappa B alpha and I kappa B beta stability. *Immunobiology*, **198**, 3-13.
- Krikos, A., Laherty, C.D. and Dixit, V.M. (1992) Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem*, **267**, 17971-17976.
- Kuss, A.W., Knodel, M., Berberich-Siebelt, F., Lindemann, D., Schimpl, A. and Berberich, I. (1999) A1 expression is stimulated by CD40 in B cells and rescues WEHI 231 cells from anti-IgM-induced cell death. *Eur J Immunol*, **29**, 3077-3088.
- Lakshminarayanan, V., Drab-Weiss, E.A. and Roebuck, K.A. (1998) H2O2 and tumor necrosis factor-alpha induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells. *J Biol Chem*, **273**, 32670-32678.
- Lavon, I., Goldberg, I., Amit, S., Landsman, L., Jung, S., Tsuberi, B.Z., Barshack, I., Kopolovic, J., Galun, E., Bujard, H. and Ben-Neriah, Y. (2000) High susceptibility to bacterial infection, but no liver dysfunction, in mice compromised for hepatocyte NF-kappaB activation. *Nat Med*, **6**, 573-577.
- Lawrence, T., Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R. and Willoughby, D.A. (2001) Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med*, **7**, 1291-1297.
- Le Bail, O., Schmidt-Ullrich, R. and Israel, A. (1993) Promoter analysis of the gene encoding the I kappa B-alpha/MAD3 inhibitor of NF-kappa B: positive regulation by members of the rel/NF-kappa B family. *Embo J*, **12**, 5043-5049.
- Ledebur, H.C. and Parks, T.P. (1995) Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. *J Biol Chem*, **270**, 933-943.
- Lederer, J.A., Liou, J.S., Kim, S., Rice, N. and Lichtman, A.H. (1996) Regulation of NF-kappa B activation in T helper 1 and T helper 2 cells. *J Immunol*, **156**, 56-63.
- Lee, E.G., Boone, D.L., Chai, S., Libby, S.L., Chien, M., Lodolce, J.P. and Ma, A. (2000) Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science*, **289**, 2350-2354.
- Lee, S.H. and Hannink, M. (2002) Characterization of the nuclear import and export functions of I kappa B(epsilon). *J Biol Chem*, **277**, 23358-23366.
- Lee, S.K., Kim, J.H., Lee, Y.C., Cheong, J. and Lee, J.W. (2000) Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors, as a novel transcriptional corepressor molecule of activating protein-1, nuclear factor-kappaB, and serum response factor. *J Biol Chem*, **275**, 12470-12474.
- Le Page, C., Popescu, O., Genin, P., Lian, J., Paquin, A., Galipeau, J. and Hiscott, J. (2001) Disruption of NF-kappa B signaling and chemokine gene activation by retroviral mediated expression of IKK gamma/NEMO mutants. *Virology*, **286**, 422-433.
- 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.
- Lernbecher, T., Muller, U. and Wirth, T. (1993) Distinct NF-kappa B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation. *Nature*, **365**, 767-770.

- Li, J., Peet, G.W., Balzarano, D., Li, X., Massa, P., Barton, R.W. and Marcu, K.B. (2001) Novel NEMO/IkappaB kinase and NF-kappa B target genes at the pre-B to immature B cell transition. *J Biol Chem*, **276**, 18579-18590.
- Li, N. and Karin, M. (1999) Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *Faseb J*, **13**, 1137-1143.
- Li, Q., Estepa, G., Memet, S., Israel, A. and Verma, I.M. (2000) Complete lack of NF-kappaB activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation. *Genes Dev*, **14**, 1729-1733.
- Li, Q., Van Antwerp, D., Mercurio, F., Lee, K.F. and Verma, I.M. (1999a) Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science*, **284**, 321-325.
- Li, X., Massa, P.E., Hanidu, A., Peet, G.W., Aro, P., Savitt, A., Mische, S., Li, J. and Marcu, K.B. (2002) IKKalpha, IKKbeta and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappa B mediated inflammatory response program. *J Biol Chem*.
- Li, Y., Kang, J., Friedman, J., Tarassishin, L., Ye, J., Kovalenko, A., Wallach, D. and Horwitz, M.S. (1999b) Identification of a cell protein (FIP-3) as a modulator of NF-kappaB activity and as a target of an adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1042-1047.
- Li, Z. and Nabel, G.J. (1997) A new member of the I κ B protein family, I κ B ϵ , inhibits RelA (p65)-mediated NF- κ B transcription. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6184-6190.
- Lichtenstein, M., Keini, G., Cedar, H. and Bergman, Y. (1994) B cell-specific demethylation: a novel role for the intronic κ chain enhancer sequence. *Cell*, **76**, 913-923.
- Lin, L., DeMartino, G.N. and Greene, W.C. (1998) Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. *Cell*, **92**, 819-828.
- Lin, L. and Ghosh, S. (1996) A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol Cell Biol*, **16**, 2248-2254.
- Lin, R., Beauparlant, P., Makris, C., Meloche, S. and Hiscott, J. (1996) Phosphorylation of IkappaBalpha in the C-terminal PEST domain by casein kinase II affects intrinsic protein stability. *Mol Cell Biol*, **16**, 1401-1409.
- Ling, L., Zhaodan, C. and Goeddel, D.V. (1998) NF- κ B-inducing kinase activates IKK-a by phosphorylation of Ser-176. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3792-3797.
- Liou, H.C., Jin, Z., Tumang, J., Andjelic, S., Smith, K.A. and Liou, M.L. (1999) c-Rel is crucial for lymphocyte proliferation but dispensable for T cell effector function. *Int Immunol*, **11**, 361-371.
- Liou, H.C., Nolan, G.P., Ghosh, S., Fujita, T. and Baltimore, D. (1992) The NF-kappa B p50 precursor, p105, contains an internal I kappa B-like inhibitor that preferentially inhibits p50. *Embo J*, **11**, 3003-3009.
- Liou, H.C., Sha, W.C., Scott, M.L. and Baltimore, D. (1994) Sequential Induction of NF- κ B/Rel Family Proteins during B-Cell Terminal Differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 5349-5359.
- Loewe, R., Holnthoner, W., Groger, M., Pillinger, M., Gruber, F., Mechtcheriakova, D., Hofer, E., Wolff, K. and Petzelbauer, P. (2002) Dimethylfumarate inhibits TNF-induced nuclear entry of NF-kappa B/p65 in human endothelial cells. *J Immunol*, **168**, 4781-4787.
- Loewe, R., Pillinger, M., de Martin, R., Mrowietz, U., Groger, M., Holnthoner, W., Wolff, K., Wiegrebe, W., Jirovsky, D. and Petzelbauer, P. (2001) Dimethylfumarate inhibits tumor-necrosis-factor-induced CD62E expression in an NF-kappa B-dependent manner. *J Invest Dermatol*, **117**, 1363-1368.
- Maggirwar, S.B., Harhaj, E.W. and Sun, S.C. (1997) Regulation of the interleukin-2 CD28-responsive element by NF-ATp and various NF-kappaB/Rel transcription factors. *Mol Cell Biol*, **17**, 2605-2614.
- Makris, C., Godfrey, V.L., Krahn-Senfleben, G., Takahashi, T., Roberts, J.L., Schwarz, T., Feng, L., Johnson, R.S. and Karin, M. (2000) Female mice heterozygous for IKK gamma/NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder incontinentia pigmenti. *Mol Cell*, **5**, 969-979.
- 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.
- Malek, S., Chen, Y., Huxford, T. and Ghosh, G. (2001) IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem*, **276**, 45225-45235.
- Martin, A.G. and Fresno, M. (2000) Tumor necrosis factor-alpha activation of NF-kappa B requires the phosphorylation of Ser-471 in the transactivation domain of c-Rel.PG. *J Biol Chem*, **275**, 24383-24391.
- Martin, T., Cardarelli, P.M., Parry, G.C., Felts, K.A. and Cobb, R.R. (1997) Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1. *Eur J Immunol*, **27**, 1091-1097.
- Matsushima, A., Kaisho, T., Rennert, P.D., Nakano, H., Kurosawa, K., Uchida, D., Takeda, K., Akira, S. and Matsumoto, M. (2001) Essential role of nuclear factor (NF)-kappaB-inducing kinase and

- inhibitor of kappaB (IkappaB) kinase alpha in NF-kappaB activation through lymphotoxin beta receptor, but not through tumor necrosis factor receptor I. *J Exp Med*, **193**, 631-636.
- May, M.J., D'Acquisto, F., Madge, L.A., Glockner, J., Pober, J.S. and Ghosh, S. (2000) Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex. *Science*, **289**, 1550-1554.
- McElhinny, J.A., Trushin, S.A., Bren, G.D., Chester, N. and Paya, C.V. (1996) Casein kinase II phosphorylates I kappa B alpha at S-283, S-289, S-293, and T-291 and is required for its degradation. *Mol Cell Biol*, **16**, 899-906.
- McKinsey, T.A., Brockman, J.A., Scherer, D.C., Al-Murrani, S.W., Green, P.L. and Ballard, D.W. (1996) Inactivation of IkappaBbeta by the tax protein of human T-cell leukemia virus type 1: a potential mechanism for constitutive induction of NF-kappaB. *Mol Cell Biol*, **16**, 2083-2090.
- Meffre, E., Casellas, R. and Nussenzweig, M.C. (2000) Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol*, **1**, 379-385.
- Melchers, F., Haasner, D., Karasuyama, H., Reininger, L. and Rolink, A. (1992a) Progenitor and precursor B lymphocytes of mice. Proliferation and differentiation in vitro and population, differentiation and turnover in SCID mice in vivo of normal and abnormal cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, **182**, 3-12.
- Melchers, F., Haasner, D., Streb, M. and Rolink, A. (1992b) B-lymphocyte lineage-committed, IL-7 and stroma cell-reactive progenitors and precursors, and their differentiation to B cells. *Adv Exp Med Biol*, **323**, 111-117.
- Memet, S., Laouini, D., Epinat, J.C., Whiteside, S.T., Goudeau, B., Philpott, D., Kayal, S., Sansonetti, P.J., Berche, P., Kanellopoulos, J. and Israel, A. (1999) IkappaBepsilon-deficient mice: reduction of one T cell precursor subspecies and enhanced Ig isotype switching and cytokine synthesis. *J Immunol*, **163**, 5994-6005.
- Mercurio, F., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Young, D.B., Li, J.W., Pascual, G., Motiwala, A., Zhu, H., Mann, M. and Manning, A.M. (1999) IkappaB kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. *Mol Cell Biol*, **19**, 1526-1538.
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Li, J.W., Young, D.B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A. and Rao, A. (1997) IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science*, **278**, 860-866.
- Merika, M., Williams, A.J., Chen, G., Collins, T. and Thanos, D. (1998) Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell*, **1**, 277-287.
- 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.
- Miosge, L.A., Blasioli, J., Blery, M. and Goodnow, C.C. (2002) Analysis of an Ethylnitrosourea-generated Mouse Mutation Defines a Cell Intrinsic Role of Nuclear Factor kappaB2 in Regulating Circulating B Cell Numbers. *J Exp Med*, **196**, 1113-1119.
- Miyamoto, S., Chiao, P.J. and Verma, I.M. (1994a) Enhanced degradation is responsible for constitutive NF- κ B activity in mature murine B-cell lines. *Mol.Cell.Biol.*, **14**, 3276-3282.
- Miyamoto, S., Schmitt, M.J. and Verma, I.M. (1994b) Qualitative changes in the subunit composition of κ B-binding complexes during murine B-cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5056-5060.
- Miyawaki, S., Nakamura, Y., Suzuka, H., Koba, M., Yasumizu, R., Ikehara, S. and Shibata, Y. (1994) A new mutation, aly, that induces a generalized lack of lymph nodes accompanied by immunodeficiency in mice. *Eur J Immunol*, **24**, 429-434.
- Moore, N.C., Girdlestone, J., Anderson, G., Owen, J.J. and Jenkinson, E.J. (1995) Stimulation of thymocytes before and after positive selection results in the induction of different NF-kappa B/Rel protein complexes. *J Immunol*, **155**, 4653-4660.
- Mora, A., Youn, J., Keegan, A. and Boothby, M. (2001) NF-kappa B/Rel participation in the lymphokine-dependent proliferation of T lymphoid cells. *J Immunol*, **166**, 2218-2227.
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K.A., Sawa, H., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S. and et al. (1995) Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science*, **267**, 1506-1510.
- Mukaida, N., Mahe, Y. and Matsushima, K. (1990) Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J Biol Chem*, **265**, 21128-21133.
- Müller, C.W., Rey, F.A., Sodeoka, M., Verdine, G.L. and Harrison, S.C. (1995) Structure of the NF- κ B p50 homodimer bound to DNA. *Nature*, **373**, 311-317.
- Naumann, M. and Scheidereit, C. (1994) Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations. *Embo J*, **13**, 4597-4607.

- Neumann, M., Grieshammer, T., Chuvpilo, S., Kneitz, B., Lohoff, M., Schimpl, A., Franza, B.R., Jr. and Serfling, E. (1995) RelA/p65 is a molecular target for the immunosuppressive action of protein kinase A. *Embo J*, **14**, 1991-2004.
- O'Mahony, A., Lin, X., Gelezianus, R. and Greene, W.C. (2000) Activation of the heterodimeric I κ B kinase alpha (IKK α)-IKK β complex is directional: IKK α regulates IKK β under both basal and stimulated condition. *Mol Cell Biol*, **20**, 1170-1178.
- O'Sullivan, B.J., MacDonald, K.P., Pettit, A.R. and Thomas, R. (2000) RelB nuclear translocation regulates B cell MHC molecule, CD40 expression, and antigen-presenting cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11421-11426.
- Ochoa-Garay, J., Kaye, J. and Coligan, J.E. (1998) Nuclear factor kappaB is required for peptide antigen-induced differentiation of a CD4+CD8+ thymocyte line. *J Immunol*, **160**, 3835-3843.
- Oda, T., Ueda, A., Shimizu, N., Handa, H. and Kasahara, T. (2002) Suppression of monocyte chemoattractant protein 1, but not IL-8, by alprazolam: effect of alprazolam on c-Rel/p65 and c-Rel/p50 binding to the monocyte chemoattractant protein 1 promoter region. *J Immunol*, **169**, 3329-3335.
- Oitzinger, W., Hofer-Warbinek, R., Schmid, J.A., Koshelnick, Y., Binder, B.R. and de Martin, R. (2001) Adenovirus-mediated expression of a mutant I κ B kinase 2 inhibits the response of endothelial cells to inflammatory stimuli. *Blood*, **97**, 1611-1617.
- Opipari, A.W., Jr., Boguski, M.S. and Dixit, V.M. (1990) The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. *J Biol Chem*, **265**, 14705-14708.
- Orian, A., Gonen, H., Bercovich, B., Fajerman, I., Eytan, E., Israel, A., Mercurio, F., Iwai, K., Schwartz, A.L. and Ciechanover, A. (2000) SCF(beta)-TrCP ubiquitin ligase-mediated processing of NF-kappaB p105 requires phosphorylation of its C-terminus by I κ B kinase. *Embo J*, **19**, 2580-2591.
- Orian, A., Schwartz, A.L., Israel, A., Whiteside, S., Kahana, C. and Ciechanover, A. (1999) Structural motifs involved in ubiquitin-mediated processing of the NF-kappaB precursor p105: roles of the glycine-rich region and a downstream ubiquitination domain. *Mol Cell Biol*, **19**, 3664-3673.
- Orian, A., Whiteside, S., Israel, A., Stancovski, I., Schwartz, A.L. and Ciechanover, A. (1995) Ubiquitin-mediated processing of NF-kappa B transcriptional activator precursor p105. Reconstitution of a cell-free system and identification of the ubiquitin-carrier protein, E2, and a novel ubiquitin-protein ligase, E3, involved in conjugation. *J Biol Chem*, **270**, 21707-21714.
- Orlofsky, A., Weiss, L.M., Kawachi, N. and Prystowsky, M.B. (2002) Deficiency in the anti-apoptotic protein A1-a results in a diminished acute inflammatory response. *J Immunol*, **168**, 1840-1846.
- Pahl, H.L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, **18**, 6853-6866.
- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L. and Maniatis, T. (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell*, **78**, 773-785.
- Pasparakis, M., Courtois, G., Hafner, M., Schmidt-Supprian, M., Nenci, A., Toksoy, A., Krampert, M., Goebeler, M., Gillitzer, R., Israel, A., Krieg, T., Rajewsky, K. and Haase, I. (2002a) TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature*, **417**, 861-866.
- Pasparakis, M., Schmidt-Supprian, M. and Rajewsky, K. (2002b) I κ B Kinase Signaling Is Essential for Maintenance of Mature B Cells. *J Exp Med*, **196**, 743-752.
- Perez, P., Lira, S.A. and Bravo, R. (1995) Overexpression of RelA in transgenic mouse thymocytes: specific increase in levels of the inhibitor protein I κ B α . *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3523-3530.
- Perkins, N.D., Felzien, L.K., Betts, J.C., Leung, K., Beach, D.H. and Nabel, G.J. (1997) Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science*, **275**, 523-527.
- Pettit, A.R., Quinn, C., MacDonald, K.P., Cavanagh, L.L., Thomas, G., Townsend, W., Handel, M. and Thomas, R. (1997) Nuclear localization of RelB is associated with effective antigen-presenting cell function. *J Immunol*, **159**, 3681-3691.
- Phillips, R.J. and Ghosh, S. (1997) Regulation of I κ B beta in WEHI 231 mature B cells. *Mol Cell Biol*, **17**, 4390-4396.
- Pierce, J.W., Read, M.A., Ding, H., Luscinskas, F.W. and Collins, T. (1996) Salicylates inhibit I kappa B-alpha phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J Immunol*, **156**, 3961-3969.
- Pober, J.S. (1998) Activation and injury of endothelial cells by cytokines. *Pathol Biol (Paris)*, **46**, 159-163.
- Pober, J.S. (2002) Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res*, **4 Suppl 3**, S109-116.
- Pohl, T., Gugasyan, R., Grumont, R.J., Strasser, A., Metcalf, D., Tarlinton, D., Sha, W., Baltimore, D. and Gerondakis, S. (2002) The combined absence of NF-kappa B1 and c-Rel reveals that overlapping

- roles for these transcription factors in the B cell lineage are restricted to the activation and function of mature cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4514-4519.
- Prajapati, S. and Gaynor, R.B. (2002) Regulation of I κ B kinase (IKK) γ /NEMO function by IKK β -mediated phosphorylation. *J Biol Chem*, **277**, 24331-24339.
- Régnier, C., Song, H.Y., Gao, X., Goeddel, D.V., Cao, Z. and Rothe, M. (1997) Identification and characterization of an I κ B kinase. *Cell*, **90**, 373-383.
- Ren, H., Schmalstieg, A., van Oers, N.S. and Gaynor, R.B. (2002a) I-kappa B kinases alpha and beta have distinct roles in regulating murine T cell function. *J Immunol*, **168**, 3721-3731.
- Ren, H., Schmalstieg, A., Yuan, D. and Gaynor, R.B. (2002b) I-kappa B kinase beta is critical for B cell proliferation and antibody response. *J Immunol*, **168**, 577-587.
- Roebuck, K.A., Rahman, A., Lakshminarayanan, V., Janakidevi, K. and Malik, A.B. (1995) H₂O₂ and tumor necrosis factor- α activate intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene transcription through distinct cis-regulatory elements within the ICAM-1 promoter. *J Biol Chem*, **270**, 18966-18974.
- Rodriguez, M.S., Thompson, J., Hay, R.T. and Dargemont, C. (1999) Nuclear retention of I κ B α protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor κ B transcriptional activation. *J Biol Chem*, **274**, 9108-9115.
- Rolink, A., Kudo, A. and Melchers, F. (1991a) Long-term proliferating early pre-B-cell lines and clones with the potential to develop to surface immunoglobulin-positive, mitogen-reactive B-cells in vitro and in vivo. *Biochem Soc Trans*, **19**, 275-276.
- Rolink, A., Melchers, F. and Andersson, J. (1996) The SCID but not the RAG-2 gene product is required for S μ -S ϵ heavy chain class switching. *Immunity*, **5**, 319-330.
- Rolink, A., Streb, M. and Melchers, F. (1991b) The kappa/lambda ratio in surface immunoglobulin molecules on B lymphocytes differentiating from DHJH-rearranged murine pre-B cell clones in vitro. *Eur J Immunol*, **21**, 2895-2898.
- Rolink, A.G., Reininger, L., Oka, Y., Kalberer, C.P., Winkler, T.H. and Melchers, F. (1994) Repopulation of SCID mice with long-term in vitro proliferating pre-B-cell lines from normal and autoimmune disease-prone mice. *Res Immunol*, **145**, 353-356.
- Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G. and Karin, M. (1998) IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature*, **395**, 297-300.
- Rudolph, D., Yeh, W.C., Wakeham, A., Rudolph, B., Nallainathan, D., Potter, J., Elia, A.J. and Mak, T.W. (2000) Severe liver degeneration and lack of NF- κ B activation in NEMO/IKK γ -deficient mice. *Genes Dev*, **14**, 854-862.
- 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.
- Salmeron, A., Janzen, J., Soneji, Y., Bump, N., Kamens, J., Allen, H. and Ley, S.C. (2001) Direct phosphorylation of NF- κ B1 p105 by the I κ B kinase complex on serine 927 is essential for signal-induced p105 proteolysis. *J Biol Chem*, **276**, 22215-22222.
- Scherer, D.C., Brockman, J.A., Bendall, H.H., Zhang, G.M., Ballard, D.W. and Oltz, E.M. (1996) Corepression of RelA and c-Rel inhibits immunoglobulin κ gene transcription and rearrangement in precursor B lymphocytes. *Immunity*, **5**, 563-574.
- Schindler, U. and Baichwal, V.R. (1994) Three NF- κ B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor α -induced expression. *Mol Cell Biol*, **14**, 5820-5831.
- Schmidt-Suppran, M., Bloch, W., Courtois, G., Addicks, K., Israel, A., Rajewsky, K. and Pasparakis, M. (2000) NEMO/IKK γ -deficient mice model incontinentia pigmenti. *Mol Cell*, **5**, 981-992.
- Schmidt-Ullrich, R., Aebischer, T., Hulsken, J., Birchmeier, W., Klemm, U. and Scheidereit, C. (2001) Requirement of NF- κ B/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendices. *Development*, **128**, 3843-3853.
- Schurmann, G. (1997) [Cell adhesion. Molecular principles and initial implications for surgery]. *Chirurg*, **68**, 477-487.
- Schwarz, E.M., Van Antwerp, D. and Verma, I.M. (1996) Constitutive phosphorylation of I κ B α by casein kinase II occurs preferentially at serine 293: requirement for degradation of free I κ B α . *Mol Cell Biol*, **16**, 3554-3559.
- Scott, M.L., Fujita, T., Liou, H.C., Nolan, G.P. and Baltimore, D. (1993) The p50 subunit of NF- κ B regulates I kappa B by two distinct mechanisms. *Genes Dev*, **7**, 1266-1276.
- Sears, C., Olesen, J., Rubin, D., Finley, D. and Maniatis, T. (1998) NF- κ B p105 processing via the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, **273**, 1409-1419.
- Sen, J., Venkataraman, L., Shinkai, Y., Pierce, J.W., Alt, F.W., Burakoff, S.J. and Sen, R. (1995) Expression and induction of nuclear factor- κ B-related proteins in thymocytes. *J. Immunol*, **154**, 3213-3221.
- 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. (2001a) Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science*, **293**, 1495-1499.
- Senftleben, U., Li, Z.W., Baud, V. and Karin, M. (2001b) IKK β is essential for protecting T cells from TNF α -induced apoptosis. *Immunity*, **14**, 217-230.
- Sha, W.C., Liou, H.C., Tuomanen, E. and Baltimore, D. (1995) Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell*, **80**, 321-330.
- Sheehy, A.M. and Schlessel, M.S. (1999) Overexpression of RelA causes G1 arrest and apoptosis in a pro-B cell line. *J Biol Chem*, **274**, 8708-8716.
- Sheppard, K.A., Rose, D.W., Haque, Z.K., Kurokawa, R., McInerney, E., Westin, S., Thanos, D., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K. and Collins, T. (1999) Transcriptional activation by NF- κ B requires multiple coactivators. *Mol Cell Biol*, **19**, 6367-6378.
- Shinkura, R., Kitada, K., Matsuda, F., Tashiro, K., Ikuta, K., Suzuki, M., Kogishi, K., Serikawa, T. and Honjo, T. (1999) Alymphoplasia is caused by a point mutation in the mouse gene encoding NF- κ B-inducing kinase. *PG - 74-7. Nat Genet*, **22**, 74-77.
- Silverman, N. and Maniatis, T. (2001) NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev*, **15**, 2321-2342.
- Simeonidis, S., Liang, S., Chen, G. and Thanos, D. (1997) Cloning and functional characterization of mouse IkappaBepsilon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14372-14377.
- Simeonidis, S., Stauber, D., Chen, G., Hendrickson, W.A. and Thanos, D. (1999) Mechanisms by which IkappaB proteins control NF- κ B activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 49-54.
- Sizemore, N., Lerner, N., Dombrowski, N., Sakurai, H. and Stark, G.R. (2002) Distinct roles of the Ikappa B kinase alpha and beta subunits in liberating nuclear factor kappa B (NF- κ B) from Ikappa B and in phosphorylating the p65 subunit of NF- κ B. *J Biol Chem*, **277**, 3863-3869.
- Smahi, A., Courtois, G., Vabres, P., Yamaoka, S., Heuertz, S., Munnich, A., Israel, A., Heiss, N.S., Klauck, S.M., Kioschis, P., Wiemann, S., Poustka, A., Esposito, T., Bardaro, T., Gianfrancesco, F., Ciccodicola, A., D'Urso, M., Woffendin, H., Jakins, T., Donnai, D., Stewart, H., Kenwrick, S.J., Aradhya, S., Yamagata, T., Levy, M., Lewis, R.A. and Nelson, D.L. (2000) Genomic rearrangement in NEMO impairs NF- κ B activation and is a cause of incontinentia pigmenti. The International Incontinentia Pigmenti (IP) Consortium. *Nature*, **405**, 466-472.
- Snapper, C.M., Rosas, F.R., Zelazowski, P., Moorman, M.A., Kehry, M.R., Bravo, R. and Weih, F. (1996a) B cells lacking RelB are defective in proliferative responses, but undergo normal B cell maturation to Ig secretion and Ig class switching. *J.Exp.Med.*, **184**, 1537-1541.
- Snapper, C.M., Zelazowski, P., Rosas, F.R., Kehry, M.R., Tian, M., Baltimore, D. and Sha, W.C. (1996b) B cells from p50/NF- κ B knockout mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line CH transcription, and Ig class switching. *J. Immunol.*, **156**, 183-191.
- Soares, M.P., Muniappan, A., Kaczmarek, E., Koziak, K., Wrighton, C.J., Steinhauslin, F., Ferran, C., Winkler, H., Bach, F.H. and Anrather, J. (1998) Adenovirus-mediated expression of a dominant negative mutant of p65/RelA inhibits proinflammatory gene expression in endothelial cells without sensitizing to apoptosis. *J Immunol*, **161**, 4572-4582.
- Song, H.Y., Rothe, M. and Goeddel, D.V. (1996) The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF- κ B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6721-6725.
- Spiecker, M., Darius, H. and Liao, J.K. (2000) A functional role of I kappa B-epsilon in endothelial cell activation. *J Immunol*, **164**, 3316-3322.
- Staal, F.J., Weerkamp, F., Langerak, A.W., Hendriks, R.W. and Clevers, H.C. (2001) Transcriptional control of T lymphocyte differentiation. *Stem Cells*, **19**, 165-179.
- Stein, B. and Baldwin, A.S., Jr. (1993) Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF- κ B. *Mol Cell Biol*, **13**, 7191-7198.
- Stephens, R.M., Rice, N.R., Hiebsch, R.R., Bose, H.R., Jr. and Gildea, R.V. (1983) Nucleotide sequence of v-rel: the oncogene of reticuloendotheliosis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 6229-6233.
- Strasser, A., Grumont, R.J., Stanley, M.L. and Gerondakis, S. (1999) The transcriptional regulator Rel is essential for antigen receptor-mediated stimulation of mature T cells but dispensable for positive and negative selection of thymocytes and T cell apoptosis. *Eur J Immunol*, **29**, 928-935.
- Stroka, D.M., Badrichani, A.Z., Bach, F.H. and Ferran, C. (1999) Overexpression of A1, an NF- κ B-inducible anti-apoptotic bcl gene, inhibits endothelial cell activation. *Blood*, **93**, 3803-3810.
- Sun, S.-C., Ganchi, P.A., Ballard, D.W. and Greene, W.C. (1993) NF- κ B controls expression of inhibitor I κ B: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*, **259**, 1912-1915.

- Takeda, K., Takeuchi, O., Tsujimura, T., Itami, S., Adachi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Yoshikawa, K., Terada, N. and Akira, S. (1999) Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK α . *Science*, **284**, 313-316.
- Takehana, K., Konishi, A., Oonuki, A., Noguchi, M., Fujita, K., Iino, Y. and Kobayashi, T. (2002) APC0576, a novel inhibitor of NF- κ B-dependent gene activation, prevents pro-inflammatory cytokine-induced chemokine production in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **293**, 945-952.
- Tam, W.F., Lee, L.H., Davis, L. and Sen, R. (2000) Cytoplasmic sequestration of rel proteins by IkappaB α requires CRM1-dependent nuclear export. *Mol Cell Biol*, **20**, 2269-2284.
- Tam, W.F., Wang, W. and Sen, R. (2001) Cell-specific association and shuttling of IkappaB α provides a mechanism for nuclear NF- κ B in B lymphocytes. *Mol Cell Biol*, **21**, 4837-4846.
- Tanaka, M., Fuentes, M.E., Yamaguchi, K., Durnin, M.H., Dalrymple, S.A., Hardy, K.L. and Goeddel, D.V. (1999) Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF- κ B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity*, **10**, 421-429.
- Thompson, J.E., Phillips, R.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Ghosh, S. (1995) I κ B- β regulates the persistent response in a biphasic activation of NF- κ B. *Cell*, **80**, 573-582.
- Tinnell, S.B., Jacobs-Helber, S.M., Sterneck, E., Sawyer, S.T. and Conrad, D.H. (1998) STAT6, NF- κ B and C/EBP in CD23 expression and IgE production. *Int Immunol*, **10**, 1529-1538.
- Tojima, Y., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., Karin, M. and Nakanishi, M. (2000) NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature*, **404**, 778-782.
- True, A.L., Rahman, A. and Malik, A.B. (2000) Activation of NF- κ B induced by H(2)O(2) and TNF-alpha and its effects on ICAM-1 expression in endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **279**, L302-311.
- Tumang, J.R., Owyang, A., Andjelic, S., Jin, Z., Hardy, R.R., Liou, M.L. and Liou, H.C. (1998) c-Rel is essential for B lymphocyte survival and cell cycle progression. *Eur J Immunol*, **28**, 4299-4312.
- Ueda, A., Okuda, K., Ohno, S., Shirai, A., Igarashi, T., Matsunaga, K., Fukushima, J., Kawamoto, S., Ishigatsubo, Y. and Okubo, T. (1994) NF- κ B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J Immunol*, **153**, 2052-2063.
- Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R. and Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*, **75**, 229-240.
- Voll, R.E., Jimi, E., Phillips, R.J., Barber, D.F., Rincon, M., Hayday, A.C., Flavell, R.A. and Ghosh, S. (2000) NF- κ B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development. *Immunity*, **13**, 677-689.
- Voraberger, G., Schafer, R. and Stratowa, C. (1991) Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J Immunol*, **147**, 2777-2786.
- Wang, N., Verna, L., Hardy, S., Forsayeth, J., Zhu, Y. and Stemerman, M.B. (1999) Adenovirus-mediated overexpression of c-Jun and c-Fos induces intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **19**, 2078-2084.
- Weber, C., Erl, W., Pietsch, A., Strobel, M., Ziegler-Heitbrock, H.W. and Weber, P.C. (1994) Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor- κ B mobilization and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals. *Arterioscler Thromb*, **14**, 1665-1673.
- Webster, G.A. and Perkins, N.D. (1999) Transcriptional cross talk between NF- κ B and p53. *Mol Cell Biol*, **19**, 3485-3495.
- Weih, D.S., Yilmaz, Z.B. and Weih, F. (2001) Essential role of relb in germinal center and marginal zone formation and proper expression of homing chemokines. *J Immunol*, **167**, 1909-1919.
- Weih, F., Carrasco, D. and Bravo, R. (1994) Constitutive and inducible Rel/NF- κ B activities in mouse thymus and spleen. *Oncogene*, **9**, 3289-3297.
- Weih, F., Carrasco, D., Durham, S.K., Barton, D.S., Rizzo, C.A., Ryseck, R.-P., Lira, S.A. and Bravo, R. (1995) Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF- κ B/Rel family. *Cell*, **80**, 331-340.
- Weih, F., Durham, S.K., Barton, D.S., Sha, W.C., Baltimore, D. and Bravo, R. (1997a) p50-NF- κ B complexes partially compensate for the absence of RelB: severely increased pathology in p50(-/-)relB(-/-) double-knockout mice. *J Exp Med*, **185**, 1359-1370.
- Weih, F., Lira, S.A. and Bravo, R. (1996) Overexpression of RelB in transgenic mice does not affect I kappa B alpha levels: differential regulation of RelA and RelB by the inhibitor protein. *Oncogene*, **12**, 445-449.
- Weih, F., Warr, G., Yang, H. and Bravo, R. (1997b) Multifocal defects in immune responses in RelB-deficient mice. *J Immunol*, **158**, 5211-5218.

- Whelan, J., Ghera, P., Hooft van Huijsduijnen, R., Gray, J., Chandra, G., Talabot, F. and DeLamarter, J.F. (1991) An NF kappa B-like factor is essential but not sufficient for cytokine induction of endothelial leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Nucleic Acids Res*, **19**, 2645-2653.
- Whiteside, S.T., Epinat, J.-C., Rice, N.R. and Israel, A. (1997) I κ B ϵ , a novel member of the I κ B family, controls RelA and cRel NF- κ B activity. *EMBO J.*, **16**, 1413-1426.
- Whiteside, S.T. and Israel, A. (1997) I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol*, **8**, 75-82.
- Wilson, S.H., Caplice, N.M., Simari, R.D., Holmes, D.R., Jr., Carlson, P.J. and Lerman, A. (2000) Activated nuclear factor-kappaB is present in the coronary vasculature in experimental hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, **148**, 23-30.
- Woronicz, J.D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M. and Goeddel, D.V. (1997) IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK [see comments]. *Science*, **278**, 866-869.
- Wu, L., D'Amico, A., Winkel, K.D., Suter, M., Lo, D. and Shortman, K. (1998) RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity*, **9**, 839-847.
- Wu, M., Arsur, M., Bellas, R.E., FitzGerald, M.J., Lee, H., Schauer, S.L., Sherr, D.H. and Sonenshein, G.E. (1996a) Inhibition of c-myc expression induces apoptosis of WEHI 231 murine B cells. *Mol Cell Biol*, **16**, 5015-5025.
- Wu, M., Lee, H., Bellas, R.E., Schauer, S.L., Arsur, M., Katz, D., FitzGerald, M.J., Rothstein, T.L., Sherr, D.H. and Sonenshein, G.E. (1996b) Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *Embo J*, **15**, 4682-4690.
- Xiao, G., Cvijic, M.E., Fong, A., Harhaj, E.W., Uhlik, M.T., Waterfield, M. and Sun, S.C. (2001a) Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha. *Embo J*, **20**, 6805-6815.
- Xiao, G., Harhaj, E.W. and Sun, S.C. (2001b) NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell*, **7**, 401-409.
- Xu, Y., Davidson, L., Alt, F.W. and Baltimore, D. (1996) Deletion of the Ig kappa light chain intronic enhancer/matrix attachment region impairs but does not abolish V kappa J kappa rearrangement. *Immunity*, **4**, 377-385.
- Yamada, T., Mitani, T., Yorita, K., Uchida, D., Matsushima, A., Iwamasa, K., Fujita, S. and Matsumoto, M. (2000) Abnormal immune function of hemopoietic cells from alymphoplasia (aly) mice, a natural strain with mutant NF-kappa B-inducing kinase. *J Immunol*, **165**, 804-812.
- Yamamoto, Y. and Gaynor, R.B. (2001) Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest*, **107**, 135-142.
- Yamamoto, Y., Kim, D.W., Kwak, Y.T., Prajapati, S., Verma, U. and Gaynor, R.B. (2001) IKKgamma/NEMO facilitates the recruitment of the IkappaB proteins into the IkappaB kinase complex. *J Biol Chem*, **276**, 36327-36336.
- Yamamoto, Y., Yin, M.J. and Gaynor, R.B. (2000) IkappaB kinase alpha (IKKalpha) regulation of IKKbeta kinase activity. *Mol Cell Biol*, **20**, 3655-3666.
- 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.
- Yamazaki, S., Muta, T. and Takeshige, K. (2001) A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kappaB in the nuclei. *J Biol Chem*, **276**, 27657-27662.
- Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z. and Su, B. (2001) The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol*, **2**, 620-624.
- Yeh, W.-C., Shahinian, A., Speiser, D., Kraunus, J., Billia, F., Wakeham, A., de la Pompa, J.L., Ferrick, D., Hum, B., Iscove, N., Ohashi, P., Rothe, M., Goeddel, D. and Mak, T.W. (1997) Early lethality, functional NF- κ B activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity*, **7**, 715-725.
- Yin, L., Wu, L., Wesche, H., Arthur, C.D., White, J.M., Goeddel, D.V. and Schreiber, R.D. (2001) Defective lymphotoxin-beta receptor-induced NF-kappaB transcriptional activity in NIK-deficient mice. *Science*, **291**, 2162-2165.
- Yujiri, T., Sather, S., Fanger, G.R. and Johnson, G.L. (1998) Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. *Science*, **282**, 1911-1914.
- Zandi, E., Chen, Y. and Karin, M. (1998) Direct phosphorylation of I κ B by IKK α and IKK β : discrimination between free and NF- κ B-bound substrate. *Science*, **281**, 360-363.

Literatur

- Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M. and Karin, M. (1997) The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell*, **91**, 243-252.
- Zhang, G. and Ghosh, S. (2001) Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest*, **107**, 13-19.
- Zhang, S.Q., Kovalenko, A., Cantarella, G. and Wallach, D. (2000) Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity*, **12**, 301-311.
- 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.
- Zhong, H., SuYang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Ghosh, S. (1997) The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell*, **89**, 413-424.
- Zhong, H., Voll, R.E. and Ghosh, S. (1998) Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell*, **1**, 661-671.

9. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass diese Dissertation noch in keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegen hat.

Würzburg, den

Andrea Lasar