

Molekulare Charakterisierung der Interaktion des COP9-Signalosoms mit NF- κ B/RelA und I κ B α

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biol. Marc Borgmann
geb. am 2.3.1980 in Warendorf

Gutachter: Prof. Dr. Michael Naumann
Prof. Dr. Claus Scheidereit

eingereicht am: 23.5.2014

verteidigt am: 23.10.2014

Zusammenfassung

Das COP9-Signalosom (CSN) ist ein aus acht Untereinheiten bestehender Proteinkomplex der in allen Eukaryoten vorkommt. Lediglich bei einigen einzelligen Pilzen fehlen Teile des Komplexes. Dieser evolutionär konservierte Komplex weist hohe Homologien zum 19 S Regulator des „Lid“-Komplexes des 26 S Proteasoms auf. Das CSN ist an mehreren zellulären Prozessen, wie die Regulation der Cullin-Ring-Ligasen (CRLs) und der NF- κ B-Signaltransduktion beteiligt. Es wurde bereits gezeigt, dass die Deubiquitylierung von I κ B α durch das CSN reguliert wird. In dieser Dissertation wurde die Interaktion von endogenem I κ B α mit dem CSN-Komplex durch Koimmunpräzipitation aus HeLa-Zellen gezeigt. Anschließend wurde die I κ B α /CSN Interaktion detaillierter durch Expression und Koinkubation der CSN-Untereinheiten mit I κ B α *in vitro* charakterisiert. Durch Koimmunpräzipitation wurde *in vitro* eine direkte Interaktion von CSN1 und CSN3 mit I κ B α entdeckt. Die *in vitro* Interaktionsergebnisse mit CSN1 konnten durch Koimmunpräzipitation von überexprimierten I κ B α mit CSN1 in HeLa-Zellen bestätigt werden. Eine Interaktion von I κ B α und CSN3 konnte in HeLa-Zellen hingegen nicht nachgewiesen werden.

Ferner wurde durch eine Immunpräzipitation gezeigt, dass RelA direkt mit CSN1 und CSN8 *in vitro* interagiert. Zur Bestätigung wurden diese beiden Protein-Protein-Interaktionen in HeLa-Zellen durch ektopische Überexpression beider Interaktionspartner und nachfolgender Immunpräzipitation reproduziert. Um die Bindedomänen zu identifizieren, wurden Deletionsmutanten der Interaktionspartner konstruiert und in vergleichbaren Experimenten analysiert.

Für die Interaktion von CSN1 mit I κ B α konnte durch Interaktionsanalysen die C-terminale Region von CSN1 als essentiell ermittelt werden. Seitens von I κ B α wurden die Ankyrin-„Repeats“ als interagierende Region identifiziert. Die Analyse der RelA/CSN1 Wechselwirkung zeigte, dass die RH-Domäne von RelA und Teile der N-terminalen Region von CSN1 für die Interaktion der beiden Proteine erforderlich sind. Charakterisierungen der RelA/CSN8 Interaktion zeigten, dass seitens RelA Teile der RH-Domäne und die Region zwischen der RH- und der TA2-Domäne in die Wechselwirkung involviert sind und seitens CSN8 die PCI-Domäne, sowie Teile der N-terminalen Region für das Zustandekommen der Interaktion erforderlich sind.

Diese Ergebnisse bilden eine Grundlage für das Verständnis neuer und bereits bekannter Regulationsmechanismen des NF- κ B-Systems durch das CSN, was u.a. ein wichtiges Element für die Erforschung von Entzündungserkrankungen und bestimmten Krebsarten darstellt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Das COP9-Signalosom (CSN)	5
1.1.1	Struktur des CSN-Komplex bei Säugetieren	5
1.1.2	E3-Ubiquitinligasen	8
1.1.3	Funktion des CSN bei der Regulation der E3-Ubiquitinligasen	9
1.1.4	Regulation der Proteinstabilität durch CSN assoziierte Proteine	10
1.2	Das NF- κ B-System	11
1.2.1	Die I κ B Proteinfamilie	12
1.2.2	Der I κ B-Kinase-Komplex (IKK)	16
1.2.3	Die TNF α vermittelte NF- κ B-Aktivierung	16
1.3	Die Funktion des CSN im NF- κ B-System	18
2	Ziele der Arbeit	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Materialien	21
3.1.1	Verbrauchsmaterialien	21
3.1.2	Chemikalien	22
3.1.3	Kits	23
3.1.4	Enzyme	24
3.1.5	DNA-Marker	24
3.1.6	Protein-Marker	25
3.1.7	<i>E. coli</i> -Stämme	25
3.1.8	Plasmide	25
3.1.9	Oligonukleotidprimer	28
3.1.10	Antikörper	30
3.1.11	Medien und Zusätze	30
3.1.12	Puffer und Lösungen	31
3.1.13	Software	34
3.2	Methoden	35
3.2.1	Kultivierung von Bakterien und HeLa-Zellen	35
3.2.2	Bestimmung der Zellzahl	35
3.2.3	Konservierung von Bakterien in Glycerinkulturen	35
3.2.4	Konservieren von HeLa-Zellen	36

3.2.5	Inkubation von HeLa-Zellen mit Cytokinen und Inhibitoren	36
3.2.6	Lyse bakterieller und eukaryotischer Zellen	36
3.2.7	Proteinextraktion aus Zytosol und Zellkern	37
3.2.8	Isolierung, Aufreinigung und Quantifizierung von DNA	39
3.2.9	Gentechnische Methoden	42
3.2.10	Methoden für den DNA-Transfer	47
3.2.11	<i>In vitro</i> Transkription / Translation	50
3.2.12	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	50
3.2.13	Immunpräzipitation	51
3.2.14	Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli	53
3.2.15	Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Schägger	54
3.2.16	Western-Blot	56
4	Ergebnisse	60
4.1	Konstruktion von Expressionsplasmiden	60
4.1.1	Klonierung von $I\kappa B\alpha$, RelA (p65) und CSN kodierenden cDNAs in pENTR-Vektoren	60
4.1.2	Subklonierung von $I\kappa B\alpha$, RelA und CSN codierenden cDNAs zur Expression in <i>E. coli</i> und <i>in vitro</i> Transkription / Translation	61
4.1.3	Subklonierung von $I\kappa B\alpha$, RelA und CSN codierenden cDNAs zur Expression in HeLa-Zellen	63
4.1.4	Klonierung von $I\kappa B\alpha$ -Deletionskonstrukten für <i>in vitro</i> Transkription / Translation	64
4.1.5	Klonierung von RelA-Deletionsmutanten für die <i>in vitro</i> Transkription / Translation mit C-terminaler und interner Deletion	64
4.1.6	Konstruktion der Plasmide für die <i>in vitro</i> Expression von CSN1 und CSN8 Mutanten mit N-terminalen und C-terminalen Deletionen	65
4.2	Interaktion von $I\kappa B\alpha$ mit dem CSN-Komplex	65
4.3	Interaktion von RelA (p65) mit dem CSN-Komplex	72
5	Diskussion	80
5.1	Interaktion von $I\kappa B\alpha$ mit dem CSN-Komplex	80
5.2	Interaktion von RelA (p65) mit dem CSN-Komplex	84
5.3	Ausblick	88
6	Abkürzungen	89

1 Einleitung

1.1 Das COP9-Signalosom (CSN)

Das COP9-Signalosom (CSN) ist ein Proteinkomplex aus acht Untereinheiten, der zuerst in *Arabidopsis thaliana* als Suppressor für lichtabhängige Entwicklung entdeckt wurde (Wei und Deng, 1992). Dieser Proteinkomplex existiert in fast allen Eukaryoten wie Säugetieren (Seeger et al., 1998), Pflanzen (Wei und Deng, 1992), *Caenorhabditis elegans* (Luke-Glaser et al., 2007), *Drosophila melanogaster* (Freilich et al., 1999) und in vielen Hefen (Maytal-Kivity et al., 2003). Bei *Saccharomyces cerevisiae* existieren jedoch starke Abweichungen hinsichtlich der Struktur dieses Komplexes (Maytal-Kivity et al., 2003). Bei Säugetieren wurde es erstmals in menschlichen roten Blutzellen (Seeger et al., 1998) nachgewiesen. Das CSN ist an mehreren biologischen Prozessen wie Embryonalentwicklung, Zellzyklus, T-Zell-Entwicklung, Signaltransduktion, Eizellreifung, Autophagie, „Checkpoint“-Kontrolle bei DNA-Schäden und der Regulation des zirkadianen Rhythmus beteiligt (Wei et al., 2008; Kato und Yoneda-Kato, 2009). Ein „Knock-Out“ des CSN ist bei Mäusen letal, wobei diese bereits im Frühstadium der embryonalen Entwicklung sterben (Lykke-Andersen et al., 2003). Nach dem derzeitigen Kenntnisstand ist die wichtigste Funktion des CSN die Regulierung des ubiquitinabhängigen Proteinabbaus durch das 26 S Proteasom. Die acht Untereinheiten des CSN-Komplexes sind in den verschiedenen eukaryotischen Spezies hoch konserviert. Diese Untereinheiten werden als CSN1 - 8 bezeichnet, wobei CSN1 die größte und CSN8 die kleinste Untereinheit im Komplex ist (Abb. 1.1). Jede der Untereinheiten weist eine hohe Homologie mit den „Lid“-Untereinheiten des 19 S Regulators, der Teil des 26 S Proteasoms ist auf (Henke et al., 1999). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass der CSN-Komplex physisch mit dem 20 S Proteasom interagiert, was zur Vermutung führte, dass es sich beim CSN um einen alternativen „Lid“-Komplex für das Proteasom handeln könnte (Huang et al., 2005). Bei Säugetieren besteht das CSN wie bei den meisten Eukaryoten, aus acht Untereinheiten CSN1 - CSN8. CSN5 (alternative Bezeichnung JAB1) und CSN6 enthalten die MPN (Mpr-Pad1-N-terminal) Domänen und alle übrigen Untereinheiten die PCI (Proteasom, COP9-Signalosom, Initiationsfaktor 3) Domänen (Abb. 1.1). Die genannten Domänen sind außer im CSN in den homologen Proteinkomplexen, darunter dem Proteasom „Lid“, vertreten (Hofmann und Bucher, 1998).

1.1.1 Struktur des CSN-Komplex bei Säugetieren

Eine Besonderheit des CSN bei Säugetieren ist, dass CSN7 in zwei verschiedenen Isoformen existiert. Die beiden Isoformen CSN7a und CSN7b, werden durch zwei separate Gene kodiert

(Olma et al., 2009). Derzeit ist die physiologische Funktion dieser beiden Isoformen nicht bekannt. Auch CSN1 kommt in zwei Isoformen in der Zelle vor. Hier handelt es sich jedoch nur um zwei Splicevarianten einer prä-mRNA. Die erste längere (CSN1_1) und die zweite kürzere (CSN1_2) Isoform unterscheiden sich nur in ihrer N-terminalen Region, die bei der ersten Isoform länger ist und über eine andere Aminosäuresequenz verfügt, als die zweite Isoform (Abb. 1.1) (Spain et al., 1996). Die Funktion und Lokalisation beider Isoformen ist bisher nicht beschrieben.

Durch eine Strukturelektronenmikroskopie konnte ein räumliches Modell des CSN-Komplexes erstellt werden (Enchev et al., 2012), die zeigt, dass die Untereinheiten mit den PCI-Domänen eine gleichmäßige Oberfläche bilden, wobei eine „Bogenstruktur“ entsteht, bei der CSN1, CSN2, CSN3 und CSN4 die Kerneinheit darstellen. CSN7 und CSN8 hingegen sind in den Randbereichen lokalisiert. Die Bogenstruktur wird durch die C-terminalen geflügelten helikalen Subdomänen (Winged-Helix) dieser Untereinheiten geformt, während die N-terminalen Bereiche schleifenähnliche Strukturen bilden. Die CSN-Untereinheiten mit MPN-Domänen CSN5 und CSN6 haben aller Wahrscheinlichkeit nach globuläre Konformationen. Diese Untereinheiten formen einen Überhang entgegengesetzt der PCI-Untereinheiten (Enchev et al., 2012). CSN5 existiert in der Zelle auch außerhalb des Komplexes als Monomer (Wei et al., 2008).

Die PCI-Domänen des CSN

PCI-Domänen wurden ursprünglich als homologe Sequenzen zwischen den Untereinheiten des Proteasom „Lid“-Komplexes, dem CSN und dem eukaryotischen Initiationsfaktor 3 (eIF3)-Komplex definiert (Scheel und Hofmann, 2005; Wei et al., 2004). Sie zeichnen sich durch zwei Subregionen, die N-terminal aus tetratricopetidartigen „Repeats“ mit nur sehr geringer Homologie und durch eine konservierte Anordnung bihelikaler „Repeats“ aus, die in einer „Winged Helix“ enden (Scheel und Hofmann, 2005; Wei et al., 2004). Es wird vermutet, dass die PCI-Domänen das Grundgerüst für die Bildung des CSN-Komplexes, als auch der beiden anderen PCI-Domänen enthaltenden Protein-Komplexe, dem Proteasom-„Lid“ und dem Initiations- und Translationsfaktor eIF3, darstellen (Enchev et al., 2012; Scheel und Hofmann, 2005). Im Falle der CSN1 Untereinheit ist deren PCI-Domäne durch die Interaktion mit CSN2, CSN3 und CSN4 entscheidend an der Bildung des CSN-Komplexes beteiligt (Tsuge et al., 2001).

Durch bioinformatische Erkenntnisse der „Upstream“-Region lassen sich PCI-Domänen in drei verschiedene Unterklassen einteilen, wovon zwei im CSN-Komplex vorkommen (Pick et al., 2009). Fünf Untereinheiten des CSN-Komplexes (CSN1, CSN2, CSN3, CSN4 und CSN7) enthalten „typische“ PCI-Domänen, die über zusätzliche bihelikale „Repeats“ vor der eigentlichen PCI-Domäne verfügen. Diese „Repeats“ werden als PAM (PCI-associated-Module) bezeichnet (Pick et al., 2009).

CSN8 enthält dagegen, abweichend von den anderen Untereinheiten, eine „atypische“ PCI-Domäne. Diese Rpn12-artige „atypische“ PCI-Domäne verfügt im Gegensatz zur „typischen“, PCI-Domäne nur über geringe Sequenzhomologien. Des Weiteren sind auch vor der „atypischen“ PCI-Domäne im Gegensatz zur typischen keine N-terminalen „Repeats“ vorhanden. Die zweite

„atypische“ PCI-Domänen-Unterklasse, die *sac3*-artige „atypische“ PCI-Domäne kommt nicht im CSN-Komplex vor. Proteine mit „atypischer“ PCI-Domäne suchen sich häufig einen speziellen Interaktionspartner mit „typischer“ PCI-Domäne. Im Fall von CSN8 ist das CSN3 (Pick et al., 2009).

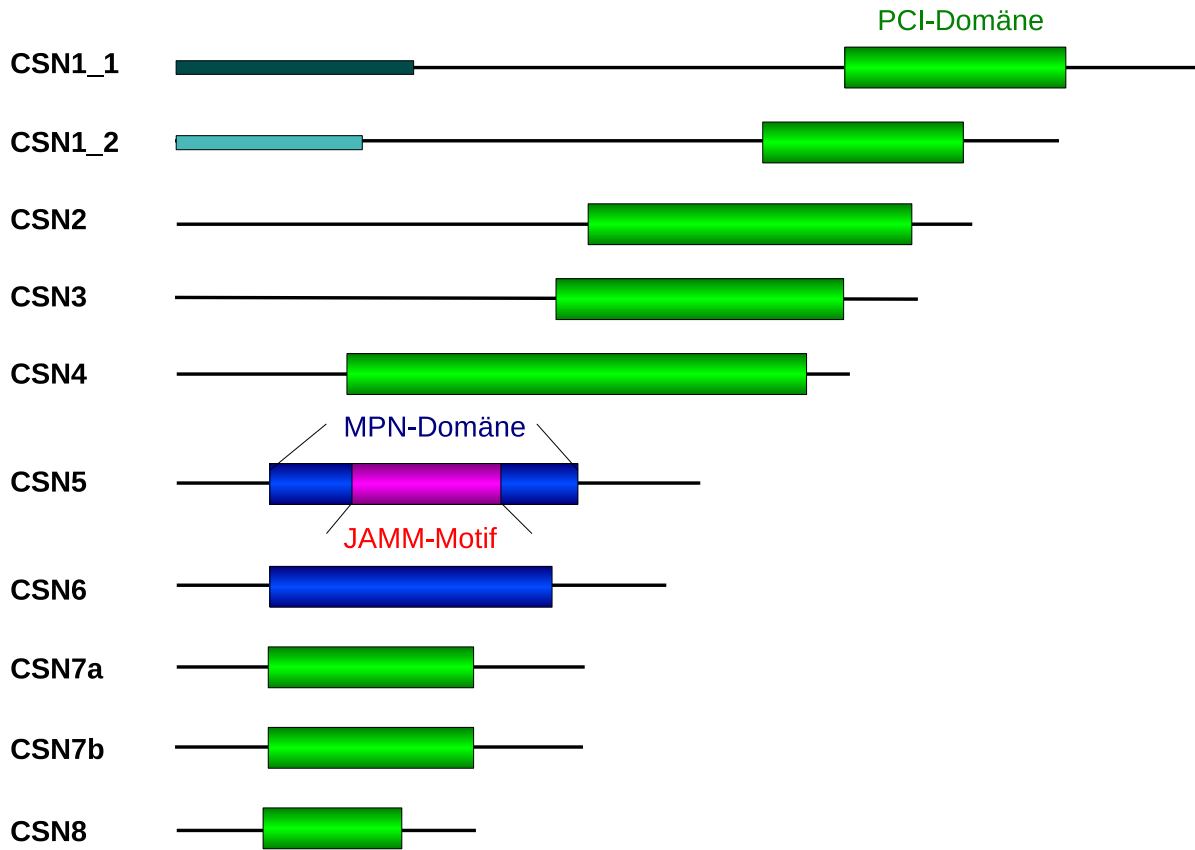


Abb. 1.1: Struktur der einzelnen Untereinheiten des CSN-Komplexes. CSN1/2/3/4/7 und 8 enthalten PCI (Proteasom, CSN, Initiationsfaktor 3)-Domänen (grün) und CSN5 und 6 MPN (Mpr-Pad1-N-terminal)-Domänen (blau). Die MPN-Domäne von CSN5 enthält außerdem das JAMM (Jab1/MPN domain metalloenzyme)-Motiv (magenta). Die beiden CSN1-Isoformen verfügen einen unterschiedlichen N-Terminus (türkis).

Die MPN-Domänen des CSN

MPN-Domänen wurden zuerst im Hefen charakterisiert, woher auch die Bezeichnungen Mpr1 und Pad1 stammen, die Teil des Hefeproteasoms sind (Cope et al., 2002). Neben dem CSN und dem Proteasom enthalten auch Untereinheiten des eIF3-Komplex MPN-Domänen (Wei et al., 2004). Die CSN5 und CSN6 Untereinheiten des CSN-Komplexes verfügen über MPN-Domänen, welche untereinander eine hohe Homologie aufweisen. Die CSN5-MPN-Domäne enthält ein JAMM (JAB1/MPN/Mov34)-Motiv, welches CSN5 (JAB1) eine Metalloproteaseaktivität gibt, mit deren Hilfe durch den CSN-Komplex Culline deneddyliert werden können (Cope et al., 2002). Diese Regulation der Cullin-Ring-Ligasen (CRLs) ist einer der wichtigsten Prozesse, an der das CSN beteiligt ist. Die Deneddylaseaktivität ist jedoch nur vorhanden, wenn CSN5 im

Komplex integriert ist. Monomerers CSN5, das auch in der Zelle vorkommt, hat diese Fähigkeit nicht (Cope et al., 2002). CSN6 verfügt über kein JAMM-Motiv und hat keine Deneddylaseaktivität (Pick et al., 2012).

1.1.2 E3-Ubiquitinligasen

Die E3-Ubiquitinligasen bilden, neben den E1-Ubiquitin aktivierenden und E2-Ubiquitin konjugierenden Enzymen, eine weitere zentrale Komponente, bei der Ubiquitylierung von Proteinen. Die E3-Ligasen geben dem Ubiquitin-Signalweg die Substratspezifität, weshalb in der Zelle, im Gegensatz zu E1- und E2-Ligasen, mehrere hundert verschiedene E3-Ligasen existieren. Während der Ubiquitylierung eines Substrates bildet ein E2-Enzym zusammen mit einer E3-Ligase einen Komplex, wodurch spezifisch auf ein bestimmtes Substrat Ubiquitine übertragen werden. Die E3-Ligasen können in vier verschiedene Gruppen unterteilt werden: Die RING-Finger-E3-Ligasen, die HECT (homolog zum E6-AP C-Terminus)-Domänen-E3-Ligasen, die U-Box-E3-Ligasen und die „RING-BetweenRING-RING“- (RBR)-E3-Ligasen (Nalepa et al., 2006). Alle drei Gruppen verfügen über eine spezielle, für diese Familie typische Proteininteraktionsdomäne, die essentiell zur Bindung des E2-Enzyms und anderen Untereinheiten, sowie zur Bindung des Substrates ist. Bei den RING-Finger-E3-Ligasen gibt es zwei verschiedene Hauptunterklassen. Die einfachen RING-Finger-E3-Ligasen bestehen nur aus einem Peptid, während die Cullin-RING-E3-Ligasen (CRL) aus mehreren Untereinheiten bestehen. Die RING-Domäne ist bei den CRLs im zinkhaltigen RING-Box-Protein (RBX) lokalisiert (Nalepa et al., 2006). Ein Beispiel für diese aus mehreren Untereinheiten bestehenden Komplexe sind die Skp1, Cullin, F-box (SCF) haltigen Komplexe. Neben der RBX-Untereinheit, sind an die Cullin-Untereinheit noch spezielle Proteine (im Fall von SCF1 ein F-Box-Protein) zur Substratspezifität gebunden (Nalepa et al., 2006).

Die HECT-E3-Ligasen wurden zuerst in Verbindung mit der p53-Ubiquitylierung, durch die Ubiquitinligase E6-AP entdeckt (Huibregtse et al., 1995). Der größte Unterschied dieser Ubiquitinligase zu den RING-Finger-E3-Ligasen ist, dass die HECT-Domäne während der Ubiquitylierung mit dem Ubiquitin, ein Thioesterzwischenprodukt bildet. Ansonsten ähnelt der allgemeine Aufbau dem der einfachen RING-Finger-E3-Ligasen (Huang et al., 1999).

Die RBR-E3-Ligasen sind eine weitere wichtige Gruppe der E3-Ligasen. Bekannte Vertreter dieser Gruppe sind z.B. das HOIP (HOIL-1-Interacting-Protein) und die HOIL-1 (Haem-Oxidized IRP2 Ubiquitin-Ligase) die beide Teile des LUBAC (Linear-Ubiquitin-Chain-Assembly-Complex) sind. Alle bisher identifizierten RBR-E3-Ligasen sind komplexe Multidomänenproteine. Typisch für diese Gruppe ist die RBR-Domäne, die sich aus der RING1-Domäne, der BRcat und der Rcat Domäne zusammensetzt, weshalb diese Gruppe gemäß aktueller Erkenntnisse als „RING1-BRcat-Rcat“-E3-Ligasen bezeichnet wird. Die Rcat-Domäne enthält ein katalytisch aktives Cystein, das mit dem Ubiquitin wie bei den HECT-E3-Ligasen, ein Thioesterzwischenprodukt bildet. Diese Gruppe stellt daher funktionell einen Hybrid zwischen den RING-Finger und den HECT-E3-Ligasen da (Spratt et al., 2014).

Die U-Box-E3-Ligasen sind die vierte und kleinste Gruppe der E3-Ubiquitinligasen. Sie äh-

neln strukturell sehr den RING-Finger-E3-Ligasen, komplexieren jedoch keine Zinkionen. Die U-Box-Domäne erhält ihre Struktur allein durch Wasserstoffbrückenbindungen (Hatakeyama et al., 2001).

1.1.3 Funktion des CSN bei der Regulation der E3-Ubiquitinligasen

Die am besten untersuchte Funktion des CSN ist die Regulation der Proteinstabilität durch Deneddylierung der Cullin-RING-E3-Ligasen (CRL) (Lyapina et al., 2001). Des Weiteren ist das CSN an der Regulation der E3-Ubiquitinligase COP1 (Dornan et al., 2004) und an der De-ubiquitinylierung (Schweitzer et al., 2007) beteiligt. Eine Regulation anderer E3-Ligasen konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Zudem ist das CSN auch mit Kinasen assoziiert (Sun et al., 2002; Lykke-Andersen et al., 2003; Orel et al., 2010)

Die CRLs sind die größte Gruppe der E3-Ligasen zu deren Assemblierung als Rückrad bisher alternativ acht verschiedene Culline beschrieben wurden. Zur Zeit sind die Cullin-Untereinheiten (Cul1, 2, 3, 4A, 4B, 5, 7 und 9) bekannt (Skaar et al., 2013). Die Cullin-Untereinheit in der E3-Ligase kann durch das ubiquitinähnliche Protein Nedd8 postranslational modifiziert werden. Diese Modifizierung steigert die enzymatische Aktivität der E3-Ligase (Ohh et al., 2002). Das CSN ist in der Lage durch seine Deneddylaseaktivität das Nedd8 zu entfernen, wodurch die E3-Ligaseaktivität vermindert wird (Abb. 1.2). Für diesen Prozess ist das JAMM-Motiv der CSN5-MPN-Domäne verantwortlich (Lyapina et al., 2001). Dabei entsteht ein Komplex aus dem CSN und der CRL (Enchev et al., 2012). Dieser Prozess unterliegt einem ständigen „Turnover“, der für Funktionalität dieser E3-Ligasen unerlässlich ist (Schwechheimer und Deng, 2001). Außerdem schützt das CSN die E3-Ligase vor Autoubiquitinylierung mit Hilfe der De-ubiquitinyrase USP15 (Hetfeld et al., 2005).

Ein Beispiel für eine durch Deneddylierung regulierte Cul1 basierte E3-Ligase ist $SCF^{\beta-TRCP}$. Diese CRL ist für die Ubiquitinylierung von zahlreichen verschiedenen Proteinen, darunter $I\kappa B\alpha$, der Transkriptionsfaktor β -Catenin, die Zellzyklusregulatoren EMI1 und CDC25A, sowie der Progesteronrezeptor, verantwortlich (Schweitzer et al., 2007; Petroski und Deshaies, 2005). Ein Beispiel für eine Cul2 basierende E3-Ligase ist die Elongin B/C-Cul2-SOCS1 (ECS) E3-Ligase, durch die unter anderem die Ubiquitinylierung von RelA erfolgt (Maine et al., 2007). Eine weitere Cul2-basierende E3-Ligase die durch Nedd8 modifiziert wird, ist Elongin B/C-Cul2-VHL. Diese VHL-(Von-Hippel-Lindau)-Box haltige E3-Ligase ubiquitinyliert z.B. den Hypoxie-induzierten Faktor-1 α (HIF-1 α) einem Transkriptionsaktivator der für die Reaktion von Zellen auf Hypoxie und die Expression des VEGF-Gens wichtig ist (Tanimoto et al., 2000).

Zwei Beispiele für Cullin-4A-E3-Ligasen, bei denen zudem eine Regulation durch das CSN nachgewiesen wurde, sind der DBB2 und der CSA-Komplex. Diese beiden E3-Ligasen spielen eine wichtige Rolle bei Zellantwort auf DNA-Schäden durch UV-Licht, wobei sie mit der RNA-Polymerase II interagieren (Groisman et al., 2003). Das auch durch das CSN regulierte COP1-Protein nimmt eine besondere Position ein. Dieses Protein kann mit der CUL4A-DDB1-RBX1-DET1-E3-Ligase einen Gesamtkomplex bilden, jedoch verfügt COP1 auch über eine intrinsische E3-Ligase-Aktivität (Marine, 2012).

Trotz seiner zentralen Bedeutung für die Regulation von CRLs ist das CSN nicht der einzige Regulator von E3-Ligasen. Ein weiterer, negativer Regulator für E3-Ligasen ist CAND1. CAND1 bindet spezifisch an die Cullinuntereinheit und blockiert so die Nedd8-Bindestelle, wodurch eine Nedd8-Bindung an die Cullinuntereinheit verhindert wird (Goldenberg et al., 2004).

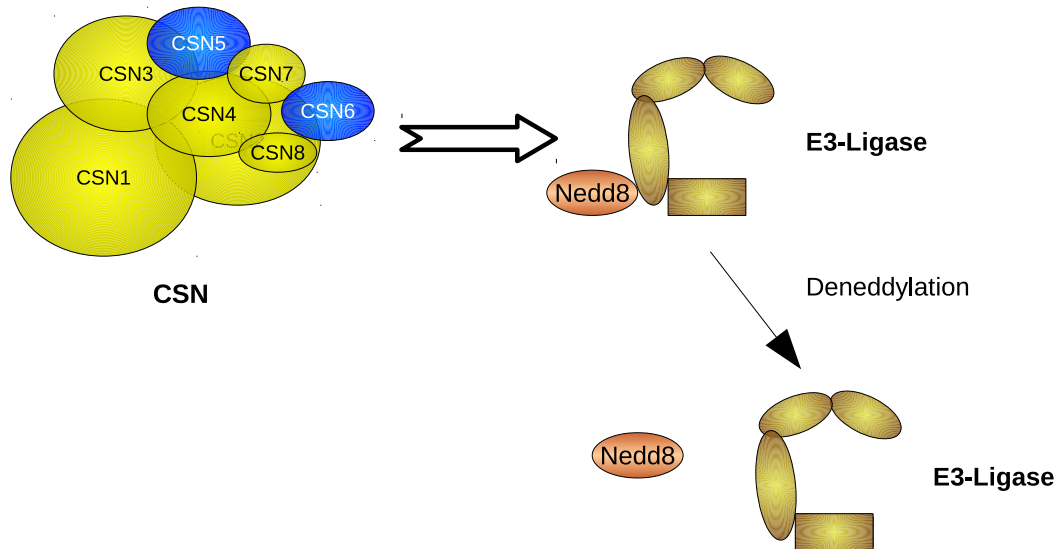


Abb. 1.2: Das CSN inaktiviert Cullin-Ring-E3-Ubiquitinligasen durch Deneddylaton der Cullin-Untereinheit.

1.1.4 Regulation der Proteinstabilität durch CSN assoziierte Proteine

Das CSN ist zusätzlich zu seiner Funktion als negativer Regulator für CRLs, auch an der Deubiquitinylierung von Proteinen beteiligt. Da das CSN über keine eigene Deubiquitinylase-aktivität verfügt, sind externe Deubiquitinylasen erforderlich. Bei Säugetieren wurde USP15 als eine CSN assoziierte Deubiquitinylase (DUB) identifiziert (Zhou et al., 2003). Durch diese Cysteinprotease werden durch E3-Ligasen erzeugte Ubiquitinketten an den jeweiligen Substraten entfernt, wodurch eine proteasomale Degradation verhindert wird (Hetfeld et al., 2005). USP15 ist unter anderem für die Deubiquitinylierung von $I\kappa B\alpha$ nach NF- κ B-Aktivierung verantwortlich (Schweitzer et al., 2007). Zudem stabilisiert USP15 den Tumoursuppressor Adenomatous-Polyposis-Coli (APC), der Bestandteil des Wnt/ β -Catenin Signalwegs ist. Weitere Substrate für USP15 wären die CRL Komponenten zweier CRLs, das RING-Protein Rbx1 und der Substrat-Adapter Keap1, die alle durch den Komplex aus CSN und USP15 stabilisiert werden und so vor Autoubiquitinylierung und Degradation geschützt werden (Hetfeld et al., 2005; Huang et al., 2012). Neben USP15 gibt es vermutlich noch weitere CSN assoziierte DUBs mit ähnlichen Funktionen.

Neben den DUBs ist der Carma1-Bcl10-Malt1 (CBM) Komplex ein transient mit dem CSN assoziierter Komplex. Der CBM-Komplex ist ein wichtiger Regulator der T-Zell-Rezeptor (TCR) induzierten IKK-Aktivierung im NF- κ B-System von T-Zellen (Welteke et al., 2009). Dabei hat

sich gezeigt, das CSN5 als interagierende Untereinheit essentiell ist. Ein „Knock-Down“ von CSN5 oder CSN2 bewirkt eine erhöhte Degradation von Bcl10 (Welteke et al., 2009). Ob Bcl10 durch eine DUB deubiquitinyliert wird, ist nicht bekannt. Durch den CBM-Komplex wird über TRAF6 der IKK-Komplex aktiviert, wobei Malt1 als Paracaspase ebenfalls eine Cysteinprotease ist (Thome et al., 2010). Ein Substrat für Malt1 ist RelB, wobei die Spaltung von RelB dessen proteasomale Degradation induziert um so die Aktivierung des kanonische NF- κ B-Signalweg zu begünstigen (Hailfinger et al., 2011).

1.2 Das NF- κ B-System

Die „Nuclear-Factor“- κ B (NF- κ B)-Familie, auch REL-Proteinfamilie, umfasst eine Gruppe von induzierbaren eukaryotischen Transkriptionsfaktoren. Diese Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindende Homo- oder Heterodimere, die durch die Assoziation zweier Proteine der REL-Familie gebildet werden. Als NF- κ B wird dabei jeder Vertreter dieser Homo- oder Heterodimere bezeichnet. NF- κ B wurde im Jahr 1986 als Bindeprotein für die „Enhancer“-Region des Immunglobulin κ -leichte Kette-Gens in B-Zellen entdeckt (Sen und Baltimore, 1986). Das NF- κ B-System existiert in allen tierischen Zellen, wo es durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli wie Stress, Zytokine, freie Radikale, UV-Strahlung und bakterielle- und virale Antigene aktiviert werden kann (Gilmore, 2006; Perkins, 2007; Gerondakis und Siebenlist, 2010). Somit ist das NF- κ B-System ein wichtiger Teil des Immunsystems. Fehlfunktionen im NF- κ B-System können z.B. zu Entzündungen und Krebs (Gilmore et al., 2002; Ben-Neriah und Karin, 2011), Autoimmunerkrankungen (Hayashi und Faustman, 2000) oder Sepsis (Wratten et al., 2001) führen. Nach der Aktivierung erfolgt immer eine Translokation von NF- κ B in den Zellkern, wo der Transkriptionsfaktor an spezifische Bindestellen innerhalb der chromosomalen DNA bindet und so die Expression bestimmter Gene aktiviert. Das NF- κ B-System besteht aus mehreren Signalwegen. Man unterscheidet zwischen dem kanonischen NF- κ B-Aktivierungsweg, in dem über die Rekrutierung von Adapterproteinen der I κ B Kinase Komplex (IKK) aktiviert wird und dem alternativen Signalweg, wodurch eine Aktivierung der Kinase IKK α über die NF- κ B induzierende Kinase (NIK) erfolgt (Gilmore, 2006). Bestimmte I κ B/REL Komplexe sind typisch für einen dieser beiden Signalwege.

Insgesamt existieren fünf REL-Proteine, RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50) und NF- κ B2 (p52) (Abb. 1.3). Jeweils zwei dieser beiden Untereinheiten bilden einen aktiven Transkriptionsfaktor, wobei verschiedene Kombinationsmöglichkeiten existieren (Neumann und Naumann, 2007; Perkins, 2012). Die REL-Proteine verfügen über hohe Homologien in der Struktur. Sie alle besitzen die Rel-Homologie-Domäne (RHD). RelA, RelB und c-Rel, jedoch nicht p50 und p52, besitzen zusätzlich Transaktivierungsdomänen (Perkins, 2012). Die RHD enthält eine DNA-Binde- und ein Dimerisierungsmotiv und ist daher essentiell für die Funktion und die Struktur der Transkriptionsfaktoren. Die Transaktivierungsdomänen wiederum sind wichtig für die Aktivierung der Gentranskription. Nur NF- κ B-Dimere, in denen mindestens eine Untereinheit eine Transaktivierungsdomäne enthält, aktivieren die Gentranskription (O’Shea und Perkins,

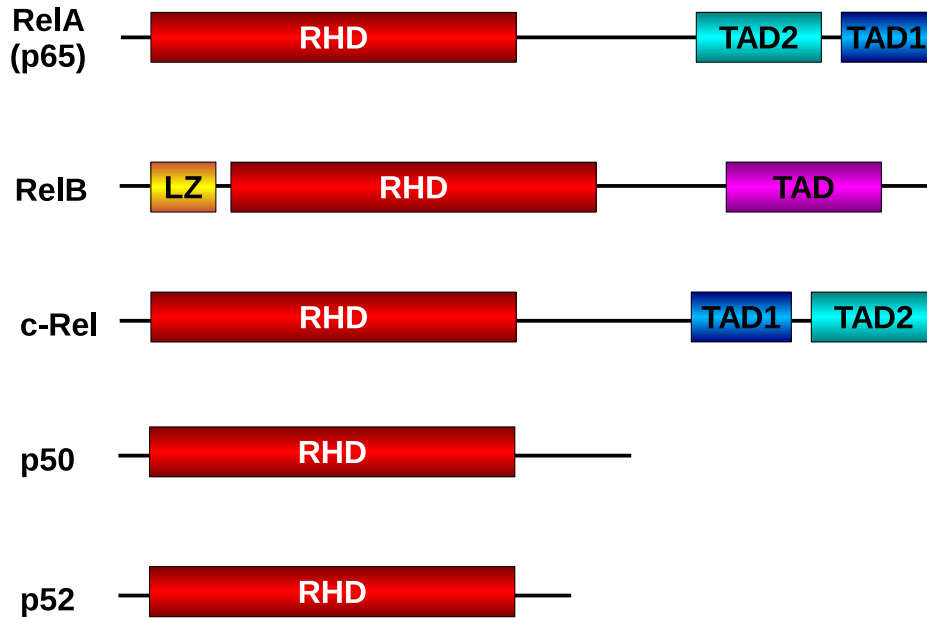


Abb. 1.3: Struktur der REL-Proteine. Alle Transkriptoren enthalten die Rel-Homologie-Domäne (RHD), RelA (p65), RelB und c-Rel außerdem Transaktivierungsdomänen (TAD), RelB zusätzlich einen Leucin-Zipper (LZ).

2008). Die p50 oder p52 Homodimere brauchen die Bindung von Bcl-3 um transkriptionell aktiv zu werden (Hatada et al. 1992). TA-Domänen stellen mögliche Interaktionsdomänen für basale Transkriptionsfaktoren, wie das TATA-Bindeprotein (TBP), den TFIIB, das E1A-Bindeprotein (EP300) und das CREB-Bindeprotein (CBP), dar (O'Shea und Perkins, 2008; Perkins, 2012). p52 und p50 liegen in der Zelle überwiegend in Form von ihrer Vorstufen p100 und p105 vor. Die Generierung von p50 und p52 erfolgt entweder durch partielle phosphorylierungsvermittelte Proteolyse dieser Vorstufen oder während der Translation (Perkins, 2012).

1.2.1 Die I κ B Proteinfamilie

Die Aktivierung von NF- κ B ist eine der ersten Immunantworten der Zelle auf Infektion oder Stress. Diese Signalkaskade kann durch mehrere Zelloberflächenrezeptoren, wie den Tumornekrose-Faktor-Rezeptor 1 (TNFR1), Toll-Like-Rezeptoren (TLR), den Interleukin-1-Rezeptor (IL1R), den T-Zell-Rezeptor (TCR) und den B-Zell-Rezeptor (BCR) aktiviert werden.

Um eine schnelle Aktivierung gewährleisten zu können, liegen die NF- κ B-Dimere in der Zelle bereits fertig synthetisiert vor. In nicht stimulierten Zellen ist NF- κ B im Zytoplasma an verschiedene NF- κ B-Inhibitoren (I κ Bs) gebunden. Für die NF- κ B abhängige Genexpression ist es zwingend nötig, dass der Transkriptionsfaktor durch Translokation in den Zellkern gelangt, um dort an seine spezifische DNA-Bindestelle zu binden und die Expression von NF- κ B abhängigen Gene zu aktivieren. Diese Translokation wird durch die Mitglieder der I κ B-Protein-Familie kontrolliert. Im zytoplasmatischen Teil der Zelle sind das I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ (Perkins, 2007).

1 Einleitung

Im Zellkern sind vornehmlich Bcl-3 (Dechend et al., 1999), $I\kappa B\zeta$ (Kannan et al., 2011), $I\kappa BNS$ (Hirotani et al., 2005) lokalisiert. Des Weiteren werden die p50/p52 Vorläufer p100 und p105 ebenfalls zu den $I\kappa Bs$ gezählt. Zudem wurde vor einiger Zeit noch ein weiterer nukleärer Regulator $I\kappa B\eta$, entdeckt (Yamauchi et al., 2010). Charakteristisch für alle $I\kappa Bs$ ist das Existenz mehrerer Ankyrin-„Repeats“, die essentiell für die Bindung der $I\kappa Bs$ an die NF- κ -Dimere sind (Vallabhapurapu und Karin, 2009).

$I\kappa B\alpha$

Dieses Protein enthält sechs Ankyrin-„Repeats“, wobei der sechste sich in der Aminosäuresequenz von den fünf anderen stark unterscheidet und in vielen Veröffentlichungen nicht als solcher bezeichnet wird (Jaffray et al., 1995). Die C-terminale Region enthält außerdem überdurchschnittlich viel Prolin, Glutamat, Aspartat, Serin und Threonin (Weil et al., 1997). In unstimulierten Zellen bindet $I\kappa B\alpha$ an RelA und maskiert die „Nuclear-Localization-Signal“-Sequenz (NLS), wodurch die Translokation des p65/p50 Heterodimers in den Zellkern inhibiert wird (Ganchi et al., 1992; Jacobs und Harrison, 1998). Infolge einer Stimulation des kanonischen NF- κ B-Signalwegs wird $I\kappa B\alpha$ durch das Proteasom degradiert und ermöglicht dem RelA/p50 Dimer die Translokation in den Kern, wo es die Expression der durch diesen Transkriptionsfaktor regulierten Gene aktiviert (Ganchi et al., 1992). Dieses ist ein frühes Ereignis innerhalb der Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalweges. $I\kappa B\alpha$ kommt nicht nur im Cytoplasma, vor sondern kann auch in den Kern importiert werden (Tran et al., 1997).

$I\kappa B\beta$

$I\kappa B\beta$ ist ebenfalls ein vornehmlich im Zytosol vorkommender NF- κ B Inhibitor, der wie $I\kappa B\alpha$ in den Kern importiert werden kann (Tran et al., 1997). Dieser Inhibitor verfügt ebenfalls über sechs Ankyrin-„Repeats“, wobei sich zwischen drittem und viertem „Repeat“ eine etwas größere „Spacer“-Region befindet. Die C-terminale Region enthält wie bei $I\kappa B\alpha$ viel Prolin, Glutamat, Aspartat, Serin und Threonin (Weil et al., 1997). Genau wie $I\kappa B\alpha$ kann $I\kappa B\beta$ mit RelA und zusätzlich mit c-Rel interagieren (Rao et al., 2010). Die Degradation von $I\kappa B\beta$, und die damit verbundene Freisetzung des Transkriptionsfaktors, erfolgt allerdings erst zu einem sehr späten Zeitpunkt nach der Stimulation des NF- κ B-Systems. Des Weiteren ist der Degradationsprozess im Vergleich zu $I\kappa B\alpha$ deutlich verlangsamt (Krappmann und Scheiderei, 1997).

$I\kappa B\epsilon$

Der dritte NF- κ B Inhibitor des kanonischen Signalweges ist $I\kappa B\epsilon$. $I\kappa B\epsilon$ verfügt ebenfalls über sechs Ankyrin-„Repeats“ und ist mit 500 Aminosäuren ein deutlich größeres Protein als z.B. $I\kappa B\alpha$ oder β . Weiterhin fehlt die prolin-, glutamat-, aspartat-, serin- und threoninreiche Sequenz (Whiteside et al., 1997).

$I\kappa B\epsilon$ kontrolliert die Aktivität von RelA und c-Rel durch Interaktion und Maskierung der NLS. Infolge andauernder Stimulation wird $I\kappa B\epsilon$ ebenfalls degradiert und setzt das NF- κ B-Dimer

frei. Dieses Ereignis ist eine späte Reaktion auf die Stimulation, deren Zeitpunkt zwischen der Degradation von $I\kappa B\alpha$ und $I\kappa B\beta$ liegt (Whiteside et al., 1997).

Bcl-3

Der Regulationsmechanismus bei den nukleären $I\kappa B$ s unterscheidet sich deutlich von dem der vornehmlich zytosolisch lokalisierten $I\kappa B$ s. Bcl-3 wurde ursprünglich als Protoonkogen in durch B-Zellen verursachte Leukämie entdeckt, jedoch handelt es sich hier um ein Protein der $I\kappa B$ Familie mit hoher Homologie zu $I\kappa B\alpha$. Bcl-3 enthält sieben Ankyrin-„Repeats“, sowie einen prolinreichen N-Terminus und einen prolin/serinreichen C-Terminus (Michel et al., 2001). Dieses Protein verfügt sowohl über inhibitorische, als auch über aktivierende Eigenschaften. Im Zytoplasma verhindert es die Translokation von p50 in den Kern (Naumann et al., 1993). Im Kern wirkt Bcl-3 zusammen mit dem p50 und p52-Homodimer, als Transkriptionsaktivator für NF- κ B regulierte Gene (Dechend et al., 1999; Wulczyn et al., 1992).

$I\kappa B\zeta$

$I\kappa B\zeta$ ist ein 718 Aminosäuren langes Protein und verfügt über eine spezifische N-terminale Lokalisationssequenz, als auch über sieben Ankyrin-„Repeats“ in der C-terminalen Region. Da dieser Inhibitor im Kern lokalisiert ist, entfaltet er seinen inhibitorischen Charakter erst nach der Translokation des p65/p50-Dimers in den Kern. Durch Stimulation mit $TNF\alpha$ oder IL-1 wird außerdem die Expression von $I\kappa B\zeta$ induziert. $I\kappa B\zeta$ bindet an das p65/p50 Dimer im Kern, speziell an p50 und inhibiert so die Aktivität von NF- κ B (Totzke et al., 2006; Yamazaki et al., 2001). Allerdings scheint $I\kappa B\zeta$ auch eine wichtige Rolle bei der Expression von IL-6, IL12 β und Csf2 zu spielen. $I\kappa B\zeta$ „Knock-Out“-Mäuse zeigen keine Induktion der jeweiligen Promotoren bei einer Lipopolysaccharid (LPS) Stimulation (Yamamoto et al., 2004).

$I\kappa BNS$

Ein weiterer im Zellkern lokalisierter NF- κ B-Inhibitor ist $I\kappa BNS$ oder auch $I\kappa B\delta$. Er wurde zuerst aus Zellkernfraktionen von Thymuslysaten extrahiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Apoptose unreifer Thymuszellen (Fiorini et al., 2002). Auch $I\kappa BNS$ enthält sechs Ankyrin-„Repeats“ und ist in der Lage an das p50-Homodimer im Zellkern zu binden. Seine Suppressionseigenschaften, wurden in Verbindung mit der Repression des IL6 Promotors in mit LPS stimulierten Makrophagen charakterisiert (Hirotani et al., 2005). Bisher wurde $I\kappa BNS$ jedoch ausschließlich in Immunzellen charakterisiert.

$I\kappa B\eta$

Ein erst kürzlich entdeckter nukleärer NF- κ B-Inhibitor ist $I\kappa B\eta$. Hierbei handelt es sich um ein 516 Aminosäuren langes Protein mit acht Ankyrin-„Repeats“ und einer „Coiled Coil“-Struktur im Bereich des C-Terminus (Yamauchi et al., 2010). $I\kappa B\eta$ interagiert zudem mit dem p50-Homodimer. Eine Interaktion mit p65 ist bisher nicht nachgewiesen worden. Weiterhin spielt

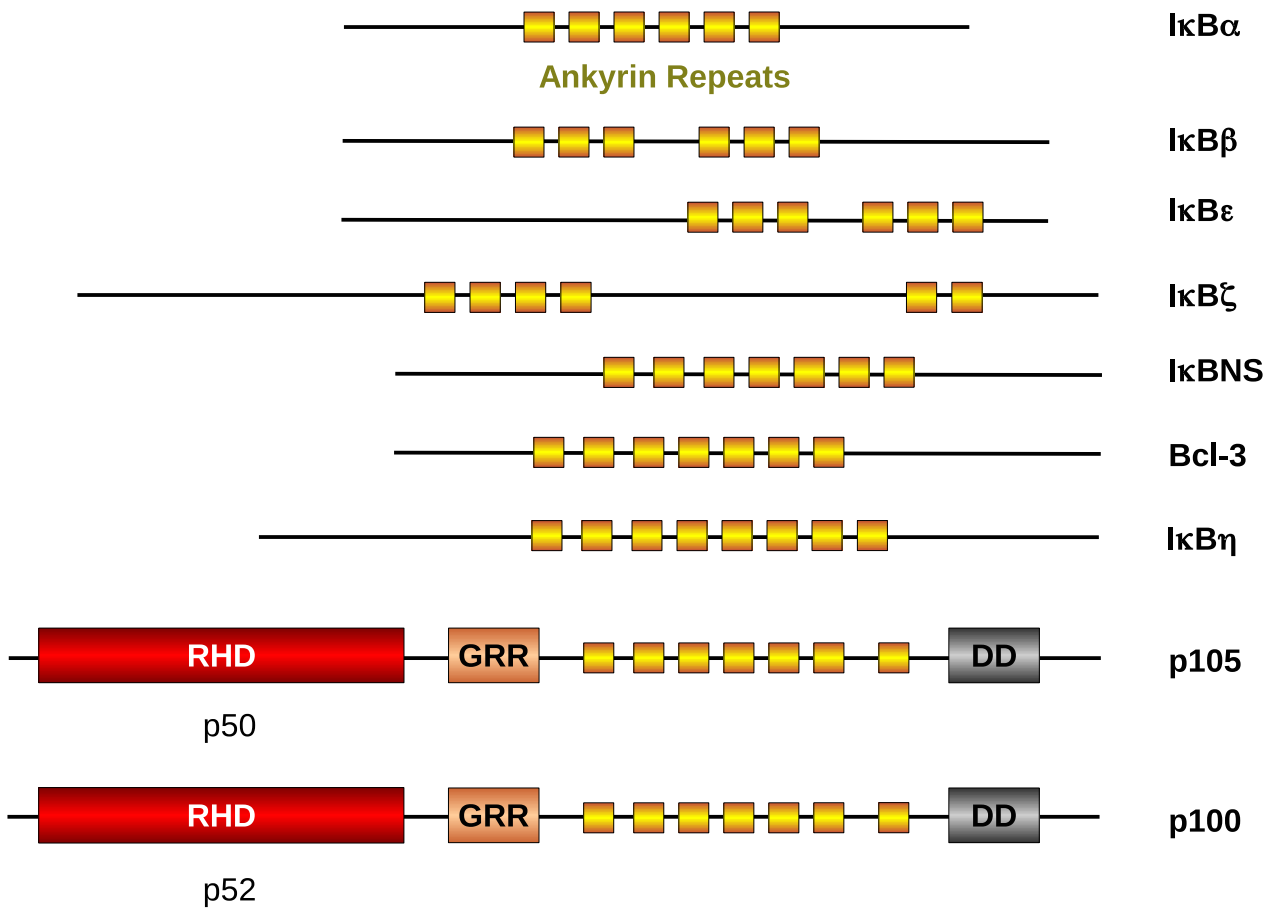


Abb. 1.4: Struktur der Mitglieder der IκB-Proteinfamilie. Alle Proteine enthalten Ankyrin-„Repeats“. Die p50/p52 Vorstufen p105 und p100 außerdem eine Rel-Homologie-Domäne (RHD), eine glycinreiche Region (GRR) und eine Todesdomäne (DD). Die Struktur sowie die Position der Ankyrin-„Repeats“ von IκBη basiert nur auf Vermutungen.

IκBη eine wichtige Rolle bei Expressionsregulation proinflammatorischer Zytokine. Ein siRNA „Knock-Down“ von IκBη reduziert signifikant die Expression von NF-κB abhängen Zytokinen in LPS stimulierten Makrophagen (Yamauchi et al., 2010).

p105 und p100

Die p50 und p52 Vorstufen p105 und p100 werden ebenfalls zu den IκBs gezählt. Der N-terminale Bereich beider Proteine enthält eine RHD für die Bindung an die NF-κB-Bindestellen der DNA. „Downstream“ Richtung C-Terminus befindet sich eine glycinreiche Region (GRR) (Orlan et al., 1999), eine Domäne aus sieben Ankyrin-„Repeats“ und eine Todesdomäne (DD) (Vallabhapurapu und Karin, 2009; Xiao et al., 2001; Hatada et al., 1992). Die Vorläufermoleküle p105 und p100 wirken als Inhibitoren. Die Ankyrin-„Repeats“ vermitteln die Bindung von p105 zu p65, p50 und c-Rel und p100 zu RelB.

Durch Stimulation des NF-κB-Signalweges wird p105 komplett degradiert und das p50 Homodimer bzw. das p65/p50 Heterodimer, kann in den Kern translozieren (Heissmeyer et al., 2001).

Die Todesdomäne von p105 ist essentiell für diese stimulationsabhängige Proteolyse. Deletionen oder Punktmutationen in dieser Domäne führen zu einer drastischen Reduzierung der Phosphorylierung, der proteasomalen Degradation und der Bindung des IKK-Komplexes mit dem p105 ebenfalls interagiert (Beinke et al., 2002). Des Weiteren kann aus p105 durch partielle Degradation (Processing) p50 bereitgestellt werden (Rape und Jentsch, 2002). Für diesen Prozess ist die GRR zwischen der RHD und den Ankyrin-„Repeats“ essentiell und stellt ein Stoppsignal für die proteasomale Degradation dar (Orian et al., 1999). Zusätzlich reguliert auch an p105 gebundenes p50 diese partielle Degradation negativ (Cohen et al., 2001). Die Degradation von p100 erfolgt bei der Stimulation des alternativen NF- κ B-Signalweges. Durch die Degradation von p100 ist RelB in der Lage in den Zellkern zu wandern und als Heterodimer mit p50 und p52 als Transkriptionsaktivator zu wirken (Müller und Siebenlist, 2003). Auch p100 kann durch „Processing“ bis zur GRR degradiert werden, so dass p52 entsteht. Die p100 Todesdomäne übernimmt ebenfalls eine wichtige Funktion beim p100 „Processing“. Wird diese Domäne deletiert, führt das zu einem konstitutiven „Processing“ von p100 zu p52 (Xiao et al., 2001).

1.2.2 Der I κ B-Kinase-Komplex (IKK)

Die Phosphorylierung von I κ B wird durch den IKK-Komplex, einen zytosolischen Multi-Protein-Komplex, der zwei Serin/Threonin-Kinasen, IKK α und IKK β , und das regulatorische Protein NEMO (IKK γ) enthält, katalysiert (Chen et al., 1996). Die beiden katalytischen Untereinheiten enthalten je eine Kinasedomäne, ein „Helix-Loop-Helix“-Motiv (HLH) und einen Leucin-Zipper. Das HLH von IKK β enthält zwei Serine die unter dem Einfluß einer TNF α oder IL-1 Stimulation phosphoryliert werden (Delhase et al., 1999). Die Aminosäuresequenz von IKK α und IKK β ist zu 50% identisch (Israël, 2009). IKK α enthält außerdem noch ein NLS, da es auch im Zellkern vorkommt und dort wichtige Funktionen übernimmt (Sil et al., 2004). IKK α und IKK β bilden zusammen über den Leucin-Zipper ein Dimer, während die dritte Untereinheit des Komplexes NEMO, an die beiden C-terminalen Enden von IKK α und IKK β bindet (Israël, 2009). NEMO ist als regulatorische Untereinheit des IKK-Komplexes für die Aktivierung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs unabdingbar. Dieses 46 kDa Protein besteht aus einem N-terminalen Teil, der für die Interaktion mit IKK α und IKK β wichtig ist, sowie zwei „Coiled-Coil“-Strukturen einen Leucin-Zipper und einer Zinkfingerstruktur am C-Terminus (Israël, 2009).

1.2.3 Die TNF α vermittelte NF- κ B-Aktivierung

Eine der am besten untersuchten Aktivierungen des kanonischen NF- κ B-Signalweges, ist die Antwort auf die Stimulation des TNFR1 durch TNF α . Der TNFR1-Rezeptor ist ein Vertreter der TNFR Superfamilie, die aus 23 bekannten Todesrezeptoren besteht (Schütze et al., 2008). Alle diese Rezeptoren verfügen über Todesdomänen. Der trimerbildene TNFR1 wird in nahezu allen Zelltypen exprimiert (Schütze et al., 2008). Jedoch handelt es sich beim TNFR1 nicht um einen reinen Todesrezeptor. Anders als viele andere Mitglieder dieser Rezeptorfamilie, wird über diesen Rezeptor vornehmlich das Überleben der Zelle durch dessen aktivierende Eigen-

schaften auf den NF- κ B-Signalweg koordiniert (Hsu et al., 1996). Der Rezeptor kann sowohl in der Zellmembran, als auch internalisiert in Vesikeln vorkommen (Schütze et al., 2008).

Die Signalkaskade beginnt mit der Bindung des trimeren Liganden TNF α an den in der Zellmembran lokalisierten TNFR1-Rezeptor. Nach Bindung des Liganden an das Rezeptortriemer kommt es zu einer Komplexbildung mit TRADD (TNFR-associated via Death-Domain) und den Adapterproteinen TNFR-associated Factor 2 (TRAF-2) und TRAF5, dem Rezeptor-Interagierenden-Protein (RIP) 1 und den „Cellular-Inhibitors-of-Apoptosis“ (cIAP) 1 und 2 (Wen-Ming, 2013). Die cIAPs wirken als E3-Ligasen und ubiquitinylieren mehrere Komponenten des TNFR-Komplexes, darunter RIP1 mit über das Lysin 63 (K63) verknüpften Ubiquitin-Ketten (Bertrand et al., 2008). RIP1 wird nach Aktivierung des TNFR1 zusätzlich zu K63 auch über Lysin 48 (K48), Lysin 11 (K11) und linear (M1) konjugierte Ubiquitinketten modifiziert (Gerlach et al., 2011). Das führt zur ubiquitinabhängigen Rekrutierung des „Linear-Ubiquitin-Chain-Assembly-Complex“ (LUBAC) und des TGF- β -aktivierenden-Kinase (TAK1)-Komplex und des IKK-Komplexes (Bianchi und Meier, 2009). TAK1 wird durch die ubiquitinbindenden Adapterproteine TAB2 und TAB3 am aktivierten TNFR1 rekrutiert (Bianchi und Meier, 2009). Der LUBAC-Komplex setzt sich wiederum aus den Untereinheiten HoIL1, HoIP und SHARPIN zusammen (Tokunaga et al., 2011). Durch Bindung der K63-Ubiquitinketten an die Ubiquitininteraktionsdomänen von HoIP (Haas et al., 2009), TAB2 (Kanayama et al., 2004) und NEMO (Rahighi et al., 2009) erfolgt die Rekrutierung der drei Komplexe. Der aktivierte TAK1-Komplex aktiviert anschließend den IKK-Komplex durch Phosphorylierung von IKK β , während LUBAC NEMO linear (M1) polyubiquitinyliert was zu einer Aktivierung des IKK-Komplexes durch Änderung seiner Konformation beiträgt (Haas et al., 2009; Tokunaga et al., 2009). An der Formierung der M1-Ubiquitinylierung ist die SHARPIN-Untereinheit als Stabilisator des LUBAC-Komplexes entscheidend beteiligt, während HoIP als katalytische Untereinheit fungiert (Tokunaga et al., 2011; Ikeda et al., 2011). Der aktivierte IKK-Komplex phosphoryliert I κ B α , was zur K48-Ubiquitinylierung von I κ B α durch die E3-Ubiquitin-Ligase SCF β^{TrCP} und seinem nachfolgenden Abbau durch das 26 S Proteasom führt (Henkel et al., 1993; Alkalay et al., 1995). Dadurch wird zuvor mit I κ B α assoziiertes NF- κ B freigesetzt, insbesondere das p65/p50-Heterodimer und kann in den Zellkern translozieren um an seine spezifischen NF- κ B-DNA-Erkennungsstellen zu binden. Die Bindung des p65/p50-Heterodimers an spezifische Promotoren induziert die Expression bestimmter NF- κ B-abhängiger Gene (Silverman und Maniatis, 2001), einschließlich des für I κ B α kodierenden Gens *NFKBIA*, was in einer *de novo* Synthese von I κ B α resultiert, so dass I κ B α von Neuem die Funktion als Inhibitor übernehmen kann (Sun et al., 1993).

Aktive p65/p50 Heterodimere können über verschiedene Wege inaktiviert werden. Eine Möglichkeit ist die proteasomale Degradation von RelA im Zellkern. Dazu wird RelA unter dem Einfluss von IKK α am Serin 486 phosphoryliert (Geng et al., 2009; Lawrence et al., 2005). Das phosphorylierte RelA kann daraufhin mit Hilfestellung der Histonacetyltransferase GCN5 durch die COMMD1 abhängige ECS^{SOCS1} Ubiquitinligase ubiquitinyliert werden (Maine et al., 2007; Mao et al., 2009). Diese E3-Ligase enthält neben der SOCS1-Untereinheit auch Elongin

B und C, sowie Cul2. Das COMMD1 („Copper-Metabolism-Murr1-Domain-1“) Protein bindet dabei gleichzeitig an die E3-Ligase und an die RHD der REL-Proteine. Für eine effiziente Ubiquitinylierung von RelA ist die Assoziation von zwei COMMD1 Proteinen erforderlich. Zudem interagiert COMMD1 unabhängig voneinander mit der CUL2 und der SOCS1-Untereinheit der E3-Ligase (Maine et al., 2007). Nach der Ubiquitinylierung kann RelA degradiert werden und so die Transkription der durch diesen Transkriptionsfaktor regulierten Gene gestoppt werden. Es muß allerdings deutlich erwähnt werden, dass nur ein relativ kleiner Teil des zellulären Pools von RelA wirklich degradiert wird. Durch die Stimulation ändert sich die Gesamtmenge an RelA in der Zelle kaum. Eine Abnahme der Menge an RelA ist praktisch nur im Zellkern nachweisbar (Maine et al., 2007). Neben einer Ubiquitinylierung von RelA über K48-verknüpfte Ubiquitinketten konnte nach einer Stimulation auch K63-konjugiertes Ubiquitin nachgewiesen werden. (Li et al., 2012). Die Ubiquitin vermittelte Degradation von RelA ist daher nicht der einzige Weg der NF- κ B Inaktivierung. Auch I κ B α vermittelter nukleärer Export und weitere Regulationsmechanismen spielen dort eine Rolle (Arenzana-Seisdedos et al., 1997).

1.3 Die Funktion des CSN im NF- κ B-System

Eine Funktion des CSN im NF- κ B-System ist die der Stabilisierung von I κ B α nach der NF- κ B Aktivierung. Nach der Stimulation des kanonischen NF- κ B-Signalweges wird I κ B α durch die CRL SCF β^{TrCP} ubiquitinyliert und im Proteasom degradiert (Henkel et al., 1993; Alkalay et al., 1995). Das neusynthetisierte I κ B α ist jedoch immer noch dem Effekt der Stimulation ausgesetzt was zur Folge hat, dass es abermals phosphoryliert und ubiquitinyliert wird. Um zu verhindern, dass I κ B α auch abgebaut wird, interagiert das COP9-Signalosom mit I κ B α und deubiquitinyliert dieses durch die CSN assoziierte Deubiquitinylase USP15 (Schweitzer et al., 2007). Dadurch bleibt I κ B α stabil und kann von neuem als Inhibitor für das p65/p50 NF- κ B-Heterodimer fungieren. Bei einem „Knock-Down“ der CSN2-Untereinheit, deren verminderte Expression auch eine Mengenänderung der anderen CSN-Untereinheiten in gleicher Weise nach sich zieht (Naumann et al., 1999), ist die Menge an *de novo* synthetisierten I κ B α deutlich vermindert (Schweitzer et al., 2007).

Eine weitere Funktion übernimmt das CSN bei der Phosphorylierung von I κ B α durch den IKK-Komplex, wo das CSN als NF- κ B-Inhibitor fungiert. Das CSN interagiert mit IKK α und β , wobei die CSN5-Untereinheit mit IKK α und die Untereinheiten CSN3/4 und 5 mit IKK β interagieren. In diesem Fall übernimmt das CSN noch einmal die Rolle eines negativen Regulators. Entscheidend ist dabei die Funktion von CSN5. Eine transiente Überexpression von CSN5 führt zu einer verminderten basalen NF- κ B-Aktivität, während ein CSN5 „Knock-Down“ zu einer Erhöhung führt. Dieser Effekt ist abhängig von der CSN5-MPN-Domäne welche die Cul1-Untereinheit von SCF β^{TrCP} deneddyliert und dadurch SCF β^{TrCP} inaktiviert (Orel et al., 2010).

IKK α und IKK β sind beide in der Lage CSN5 zu phosphorylieren. Eine Interaktion zwischen CSN5 und dem jeweiligen IKK-Interaktionspartner führt somit zu einer Autophosphorylierung

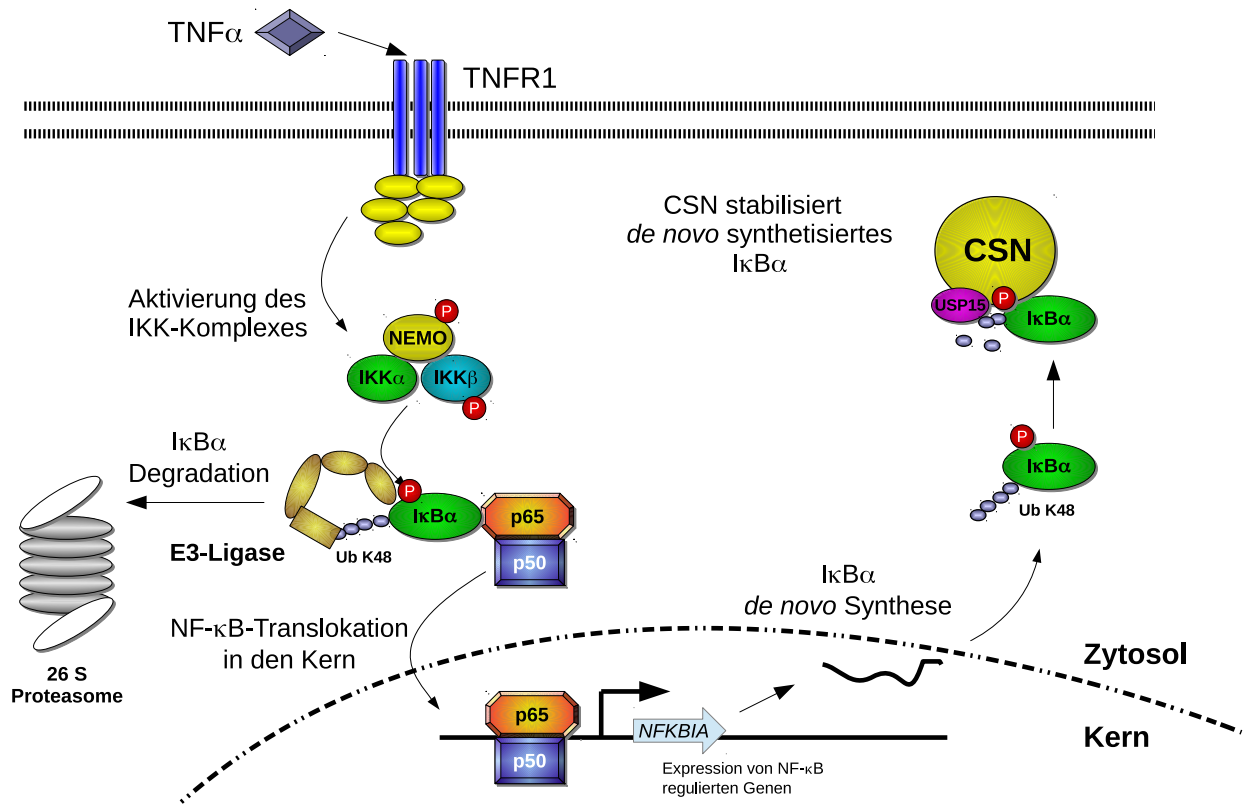


Abb. 1.5: Bei der TNF α induzierten NF- κ B-Aktivierung, stabilisiert das CSN *de novo* synthetisiertes I κ B α durch Deubiquitinierung über die CSN-assoziierte DUB USP15.

der IKKs und stellt so einen bidirektionalen Regulationsmechanismus dar. Bei einer Stimulation mit TNF α dissoziiert der CSN-Komplex vom IKK-Komplex ab. Die Stimulation bewirkt außerdem eine proteasomale Degradation von CSN5, was die Eigenschaft von CSN5 als NF- κ B-Suppressor in nicht stimulierten Zellen fundiert (Orel et al., 2010).

Auch die γ Untereinheit des IKK-Komplexes NEMO steht unter Einfluss des CSN. CSN3 interagiert mit NEMO und übt ebenfalls inhibitorische Eigenschaften auf NF- κ B aus. Eine Überexpression von CSN3 hat eine verminderte NF- κ B-Aktivität als Antwort auf eine TNF α -Stimulation zur Folge, wohingegen die NF- κ B-Aktivierung durch IL-1 β inhibiert wird. Ein CSN3 „Knock-Down“ führt dagegen zu einer Verstärkung der NF- κ B-Aktivität bei einer TNF α Stimulation. Auf die IL-1 induzierte NF- κ B Aktivierung hat der CSN3 „Knock-Down“ keinen Einfluss (Hong et al., 2001). Die Interaktion von CSN3 mit NEMO wurde ebenfalls im Rahmen der Arbeit von Orel et al. (2010) bestätigt. Ansonsten sind in der Literatur noch weitere Interaktionen des CSN / von CSN-Untereinheiten mit Komponenten des NF- κ B-Signalwegs beschrieben, denen jedoch bisher keine physiologische Relevanz zugeordnet werden konnte.

2 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit hatte zum Ziel CSN-Interaktionspartner aus dem NF- κ B-System zu charakterisieren. Diese Erkenntnisse können sowohl als Basis für die Erforschung neuer Regulationsmechanismen, aber auch zu einem besseren Verständnis bereits bekannter Mechanismen dienen. Zunächst sollte die schon bekannte Interaktion zwischen dem NF- κ B Inhibitor α ($I\kappa B\alpha$) und dem CSN genauer analysiert werden. Dabei sollte als erster Schritt die Interaktion von $I\kappa B\alpha$ und dem CSN mit endogenen Proteinen nachgewiesen werden. Den nächsten Schritt stellte dann eine genauere Charakterisierung dieser Interaktion dar, wobei die in die Interaktion involvierten Proteindomänen identifiziert werden sollten. Dazu sollte eine Interaktion zwischen $I\kappa B\alpha$ und jeder einzelnen CSN-Untereinheit *in vitro* analysiert werden. Nach einem erfolgreichen Nachweis der Interaktionen *in vitro* sollte diese Wechselwirkung unter zellulären Bedingungen mit ektopisch überexprimiertem $I\kappa B\alpha$ und der hypothetischen CSN-Untereinheit belegt werden. Anschließend sollten die Interaktionsdomänen beider Interaktionspartner bestimmt werden. Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Interaktion zwischen RelA (p65) und dem CSN. Da RelA zur Terminierung seiner transkriptionalen Aktivität im Zellkern teilweise degradiert wird und das CSN vermutlich an der Regulation dieses Prozesses beteiligt ist, sollte untersucht werden, ob eine direkte Interaktion mit dem CSN und RelA zustande kommen kann. Diese hypothetische Interaktion sollte wie bei $I\kappa B\alpha$, zunächst *in vitro* mit jeder einzelnen CSN-Untereinheit nachgewiesen werden. Nach einem erfolgreichen *in vitro* Nachweis sollten diese Interaktionsdaten auch auf zellulärer Ebene verifiziert werden. Nach erfolgreicher Verifizierung sollten ebenfalls die Interaktionsdomänen bestimmt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Bezugsquelle
Cronex 5 Röntgenfilm	Agfa
Criterion Fertiggele	Biorad
Criterion Leerkassetten	Biorad
Einmalküvetten	Brand
Filterspitzen (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l)	PEQLAB
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Kanülen (0,45 x 23 mm)	Braun
Kryogefäße (2 ml)	Greiner
Nitrozellulosemembran (0,2 μ m)	Whatman
Parafilm M	Roth
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml, 0,25 ml)	Roth
PCR-Stripes	Brand
PCR-96 Well Platten	Biorad
Petrischalen (10 cm)	Greiner
Pipettenspitzen	Gilson
Pipetten (10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner
Pipetten (1 ml, 5 ml, 25 ml, 50 ml, 50 ml)	TPP
PP-Tube (10 ml, 50 ml) (BlueCap)	Greiner
PVDF-Membran (0,45 μ m, 0,2 μ m)	Millipore
Reaktionsgefäße (2 ml 1,5 ml)	Eppendorf
Spritzen (1 ml)	Braun
Sterilfilter (0,2 μ m)	Millipore
Zellkulturschalen (10 ml) und Flaschen (75 cm ²)	Greiner
Zellschaber	Greiner

3.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Qualität	Bezugsquelle
Acrylamid/Bis-Acrylamid Lsg. (30 %) 29:1	für Mol. Biologie	AppliChem
Acrylamid/Bis-Acrylamid Lsg. (40 %) 19:1	für Elektrophorese	Roth
AEBSF Hydrochlorid		AppliChem
Amoniumpersulfat	für Mol. Biologie	AppliChem
Ampicillin Na-Salz	für Mikrobiologie	Roth
Agarose	Standard	PEQLAB
Bradford-Protein-Reagenz		Biorad
Bromphenolblau		Sigma
Calciumchlorid Dihydrat	z.A.	Merck
Chloroform	z.A.	Sigma
Dikaliumhydrogenphosphat	z.A.	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	z.A.	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	für Zellkultur	Sigma
Dulbecco's PBS (DPBS) o. Ca + Mg		PAA
Ethanol	vergällt	Th. Geyer
Ethidiumbromid	z.A.	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	z.A.	Merck
Ethylenglukol		Fluka
Eisessig	z.A.	Merck
Fötales Kälberserum (FCS)		PAA
Glutraldehyd	reinst	AppliChem
Glycerin	wasserfrei	AppliChem
Glycin	für Mol. Biologie	AppliChem
HEPES (1 M)		PAA
IGEPAL CA-630 (NP40)	für Mol. Biologie	Sigma
Isopropanol	reinst	Th. Geyer
Kaliumacetat	reinst	Roth
Kaliumchlorid	z.A.	AppliChem
Kanamycinsulfat		Sigma
LB-Agar (Luria/Miller)		Roth
LB-Medium (Luria/Miller)		Roth
Magnesiumchlorid Hexahydrat	reinst	Roth
Methanol	z.A.	Th. Geyer
β -Mercaptoethanol		Sigma
Magnesiumsulfat	reinst.	AppliChem
MG132		Merck
Milchpulver	Blot-Qualität	Roth
Natriumchlorid	z.A.	Roth

Chemikalie	Qualität	Bezugsquelle
Natriumdodecylsulfat		Serva
Natriumfluorid	z.A.	Sigma
Natriumhydroxid	85 % z.A.	Roth
Natriumorthovanadat	90 %	Sigma
Natriumpyrophosphat		Sigma
dNTPs (100 mM)		Thermo Scientific
Rinderserumalbumin		PAA
RPMI 1640 Medium + L-Glutamin + Phenolrot		PAA
PenStrep 100x		PAA
Proteaseinhibitor Tabletten		Roche
Salzsäure	37 %	Merck
TEMED	für Elektrophorese	Sigma
Tumor-Nekrose-Faktor α		R&D Systems
Tricin		Roth
Tris	reinst	AppliChem
Triton X-100	für Mol. Biologie	Sigma
Tween 20		Roth
Trypanblau		unbekannt

3.1.3 Kits

Kit	Bezugsquelle
Amersham Western ECL	GE Healthcare
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAprep HighSpeed Maxi Kit	Qiagen
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel
pENTR TM /SD/D-TOPO [®] Cloning Kit	Life Technologies
PURExpress <i>In Vitro</i> Protein Synthesis Kit	New England Biolabs
Effectene Transfection Reagent	Qiagen
JetPrime	Polyplus Transfection
Super Signal West Pico	Thermo Scientific

3.1.4 Enzyme

3.1.4.1 PCR

Enzym	Aktivität	Bezugsquelle
SAWADY Taq DNA Polymerase	5 U/ μ l	PEQLAB
DreamTaq Green DNA-Polymerase	5 U/ μ l	Thermo Scientific
Phusion [®] High Fidelity DNA Polymerase	5 U/ μ l	Thermo Scientific

3.1.4.2 Restriktionsenzyme

Enzym	Aktivität	Bezugsquelle
<i>Ava</i> I	20 U/ μ l	New England Biolabs
<i>Bam</i> HI	20 U/ μ l	New England Biolabs
<i>Eco</i> RI	20 U/ μ l	New England Biolabs
<i>Eco</i> RV	10 U/ μ l	New England Biolabs
<i>Hind</i> III	20 U/ μ l	New England Biolabs
<i>Nhe</i> I	10 U/ μ l	New England Biolabs
<i>Hpa</i> I	5 U/ μ l	New England Biolabs
<i>Hinc</i> II	10 U/ μ l	New England Biolabs
<i>Nco</i> I	10 U/ μ l	New England Biolabs
Puffer für Restriktionsenzyme (1-4)		New England Biolabs

3.1.4.3 sonstige Enzyme

Enzym	Aktivität	Bezugsquelle
Quick T4-DNA-Ligase	1 U/ μ l	New England Biolabs
LR Clonase II Mix		Life Technologies
0,5 % Trypsin-EDTA %		Life Technologies

3.1.5 DNA-Marker

Marker	Bezugsquelle
DNA-Ladder 100 bp Extended	MBBL
DNA-Ladder 250 bp	MBBL
DNA-Ladder 2 log	New England Biolabs

3.1.6 Protein-Marker

Marker	Bezugsquelle
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Life Technologies
Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder	Thermo Scientific

3.1.7 *E. coli*-Stämme

Stamm	relevante Eigenschaften	Quelle
DH5 α	<i>recA1</i> Δ <i>lacU169</i> ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i>	Bethesda Research Laboratories
TOP10	<i>F</i> ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> – <i>hsdRM</i> – <i>mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara</i> – <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i> λ ⁻	Life Technologies
Mach1 TM -T1 ^R	<i>F</i> ⁻ ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>hsdR</i> (<i>r_K</i> – <i>m_K</i> ⁺) Δ <i>recA1398</i> <i>endA1</i> <i>tonA</i>	Life Technologies
ccdB Survival TM 2 T1 ^R	<i>F</i> ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> – <i>hsdRM</i> – <i>mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara</i> – <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i> <i>fhuA</i> :: <i>IS2</i>	Life Technologies

3.1.8 Plasmide

3.1.8.1 Plasmide für die Expression in *E. coli* und in vitro Transkription / Translation

Plasmid	relevante Eigenschaften	Quelle
pENTR/SD/D-TOPO [®]	TOPO [®] Cloning kompatibler Gateway TM Entry Vektor mit SD	Life Technologies
pDEST14	Gateway TM kompatible Expressionsvektor	Life Technologies
pDEST14-ikba-c-Myc	pDEST14 mit <i>NFKBIA</i> cDNA-ORF + c-Myc	diese Arbeit
pDEST14-p65-c-Myc	pDEST14 mit <i>RELA</i> cDNA-ORF + c-Myc	diese Arbeit
pDEST14-CSN1_1-FLAG	pDEST14 mit 1. <i>GPS1</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pDEST14-CSN1_2-FLAG	pDEST14 mit 2. <i>GPS1</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pDEST14-CSN2-FLAG	pDEST14 mit <i>COPS2</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pDEST14-CSN3-FLAG	pDEST14 mit <i>COPS3</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pDEST14-CSN4-FLAG	pDEST14 mit <i>COPS4</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pDEST14-CSN5-FLAG	pDEST14 mit <i>COPS5</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pDEST14-CSN6-FLAG	pDEST14 mit <i>COPS6</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pDEST14-CSN7a-FLAG	pDEST14 mit <i>COPS7A</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pDEST14-CSN7b-FLAG	pDEST14 mit <i>COPS7B</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pDEST14-CSN8-FLAG	pDEST14 mit <i>COPS8</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit

3.1.8.2 Plasmide für die Expression von Deletionsmutanten

Plasmid	relevante Eigenschaften	Quelle
pDEST14-CSN1_1-FLAG 1-461	pDEST14-CSN1_1-FLAG Plasmid mit deletiertem C-Terminus	diese Arbeit
pDEST14-CSN1_1-FLAG 1-361	pDEST14-CSN1_1-FLAG Plasmid mit deletierter PCI-Domäne + C-Terminus	diese Arbeit
pDEST14-CSN8-FLAG 1-151	pDEST14-CSN8-FLAG Plasmid mit deletiertem C-Terminus	diese Arbeit
pDEST14-CSN8-FLAG 1-67	pDEST14-CSN8-FLAG Plasmid mit deletierter PCI-Domäne + C-Terminus	diese Arbeit
pDEST14-CSN8-FLAG 68-151	CSN8-PCI-Domäne + FLAG	diese Arbeit
pDEST14-ikba-c-Myc- 1-287	pDEST14-ikba-c-Myc Plasmid mit deletiertem C-Terminus	diese Arbeit
pDEST14-ikba-c-Myc- 1-245	pDEST14-ikba-c-Myc Plasmid mit deletiertem C-Terminus + ANK6	diese Arbeit
pDEST14-ikba-c-Myc- 1-211	pDEST14-ikba-c-Myc Plasmid mit deletiertem C-Terminus + ANK5-6	diese Arbeit
pDEST14-ikba-c-Myc- 1-172	pDEST14-ikba-c-Myc Plasmid mit deletiertem C-Terminus + ANK4-6	diese Arbeit
pDEST14-ikba-c-Myc- 1-139	pDEST14-ikba-c-Myc Plasmid mit deletiertem C-Terminus + ANK3-6	diese Arbeit
pDEST14-ikba-c-Myc- 1-103	pDEST14-ikba-c-Myc Plasmid mit deletiertem C-Terminus + ANK2-6	diese Arbeit
pDEST14-ikba-c-Myc- 1-73	pDEST14-ikba-c-Myc Plasmid mit deletiertem C-Terminus + ANK1-6	diese Arbeit
pDEST14-p65-c-Myc- 1-521	pDEST14-p65-c-Myc Plasmid mit deletierter TA1-Domäne	diese Arbeit
pDEST14-p65-c-Myc- 1-428	pDEST14-p65-c-Myc Plasmid mit deletierter TA1 + TA2-Domäne	diese Arbeit
pDEST14-p65-c-Myc- 1-306	pDEST14-p65-c-Myc Plasmid mit deletierter TA2/TA1/Linker-Domäne	diese Arbeit
pDEST14-p65-c-Myc- Δ 38-259	pDEST14-p65-c-Myc Plasmid mit Deletion in RHD	diese Arbeit

3.1.8.3 Plasmide für die Expression in Säugerzellen

Plasmid	relevante Eigenschaften	Quelle
pcDNA TM 3	Expressionsvektor	Life Technologies
pcDNA TM 3.2-V5-DEST	Gateway TM kompatibler Expressionsvektor	Life Technologies
pcDNA3.1-CSN1_1	pcDNA TM 3.1 mit 1. <i>GPS1</i> cDNA + His/T7/Xpress-Tag	Dubiel, W.
pcDNA3-CSN1-FLAG	pcDNA TM 3 mit 2. <i>GPS1</i> cDNA-ORF + FLAG	Naumann, M.
pcDNA3-CSN2-FLAG	pcDNA TM 3 mit <i>COPS2</i> cDNA-ORF + FLAG	Naumann, M.
pcDNA3.1-CSN4	pcDNA TM 3.1 mit <i>COPS4</i> cDNA-ORF + His/T7/Xpress-Tag	Dubiel, W.
pcDNA3-CSN5-FLAG	pcDNA TM 3 mit <i>COPS5</i> cDNA-ORF + FLAG	Naumann, M.
pSG5-CSN6-czz	pSG5 mit <i>COPS5</i> cDNA-ORF + Protein A	Dubiel, W.
pcDNA3.1-CSN7a-FLAG	pcDNA TM 3 mit <i>COPS7A</i> cDNA-ORF + FLAG	Dubiel, W.
pcDNA3-ikba-His/T7	pcDNA TM 3 mit <i>NFKBA</i> cDNA-ORF + His/T7	Naumann, M.
pcDNA3-p65-His/T7	pcDNA TM 3 mit <i>RELA</i> cDNA-ORF + His/T7	Naumann, M.
pCMV6-Entry-COPS3	pCMV6-Entry mit <i>COPS3</i> cDNA-ORF + C-terminaler c-Myc/FLAG-Tag	Origene
pCMV6-XL4-CSN7b	pCMV6-XL4 mit <i>COPS7B</i> cDNA-ORF	Origene
pCMV6-Entry-COPS8	pCMV6-Entry mit <i>COPS3</i> cDNA-ORF + C-terminaler c-Myc/FLAG-Tag	Origene
pcDNA3.2-CSN1_1-FLAG	pcDNA TM 3.2-V5-DEST mit 1. <i>GPS1</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pcDNA3.2-CSN1_2-FLAG	pcDNA TM 3.2-V5-DEST mit 2. <i>GPS1</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pcDNA3.2-CSN2-FLAG	pcDNA TM 3.2-V5-DEST mit <i>COPS2</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pcDNA3.2-CSN3-FLAG	pcDNA TM 3.2-V5-DEST mit <i>COPS3</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pcDNA3.2-CSN4-FLAG	pcDNA TM 3.2-V5-DEST mit <i>COPS4</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pcDNA3.2-CSN5-FLAG	pcDNA TM 3.2-V5-DEST mit <i>COPS5</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pcDNA3.2-CSN6-FLAG	pcDNA TM 3.2-V5-DEST mit <i>COPS6</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pcDNA3.2-CSN7a-FLAG	pcDNA TM 3.2-V5-DEST mit <i>COPS7A</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pcDNA3.2-CSN7b-FLAG	pcDNA TM 3.2-V5-DEST mit <i>COPS7B</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit
pcDNA3.2-CSN8-FLAG	pcDNA TM 3.2-V5-DEST mit <i>COPS8</i> cDNA-ORF + FLAG	diese Arbeit

Plasmid	relevante Eigenschaften	Quelle
pcDNA3.2-ikba-c-Myc	pcDNA TM 3.2-V5-DEST mit <i>NFKBIA</i> cDNA-ORF + c-Myc-Tag	diese Arbeit
pcDNA3.2-p65-c-Myc	pcDNA TM 3.2-V5-DEST mit <i>RELA</i> cDNA-ORF + c-Myc-Tag	diese Arbeit

3.1.9 Oligonukleotidprimer

3.1.9.1 Klonierung von kompletten cDNAs

Primer	Sequenz (5' → 3')
CSN1_1_FLAG-for	CACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTATGAGGG ATAGCTCGGCCCCAGCTCGGCCT
CSN1_2_FLAG-for	CACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTATGCCGC TGCCGGTTCAGGTGTTTA
CSN1-rev	TCACATGTTGGTGCTCATCCGGGAC
CSN2_FLAG-for	CACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTATGTCTG ACATGGAGGATGATTTCA
CSN2-rev	TTAAGCCAGTTTACTGACTACAGCCTG
CSN3_FLAG-for	CACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTATGGCGT CTGCCCTGGAGCAGTTCG
CSN3-rev	TCAAGAATAACTGGATGGTTTGTTCCTGAATCATCT
CSN4_FLAG-for	CACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTATGGCGG CAGCCGTGCGACAGG
CSN4-rev	TCACTGAGCCATCTGGGCTTCCATGG
CSN5_FLAG-for	CACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTATGGCGG CGTCCGGGAGCGGTAT
CSN5-rev	TTAAGAGATGTTAATTTGATTAAACAGTTTATCCTTAATAA CCTGAG
FCSN5_GA-for	CACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTGCTGCCA GCGGCTCTGGCATGGCCCAGAAA
FCSN5_GA-rev	TCATCAAGAGATGTTGATCTGGTTGAACAG
CSN6_FLAG-for	CACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTATGGCGG CGGCGGCGGCGGCGGCTG
CSN6-rev	TCAGAAAAAGAGCCCGCGCATTCTCCTGC
CSN7a_FLAG-for	CACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTATGAGTG CGGAAGTGAAGGTGACAGGGC
CSN7a-rev	TCAATTCGACTTGGACCAAATCTTGGCG
CSN7b_FLAG-for	CACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTATGGCAG GGGAACAGAAACCCTCAA
CSN7b-rev	CTAGTGGCGGCTGGAGACCAGACCTTTCAC

Primer	Sequenz (5' → 3')
CSN8_FLAG-for	CACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTATGCCAG TGGCGGTGATGGCGGAAA
CSN8-rev	TCAGTTTTCAAGGAAAGCCACATAATCCGTC
ikba_Myc-for	CACCATGGAACAAAAATTAATTTCTGAAGAAGATTTAATGT TCCAGGCGGCCGAGCGCCCCC
ikba-rev	TCATAACGTCAGACGCTGGCCTCCA
RelA_Myc-for	CACCATGGAACAAAAATTAATTTCTGAAGAAGATTTAATGG ACGAACTGTTCCCCCTCATOTTCCC
RelA-rev	TTAGGAGCTGATCTGACTCAGCAGG

3.1.9.2 Klonierung von trunkierten cDNAs

Primer	Sequenz (5' → 3')
FLAG-for	CACCATGGACTACAAAGACGATGA
CSN1_dC-rev	TATTCATTAGTCCCGGGCGTATAGGATCT
CSN1_dPCI-rev	TATTCATTACTCCAGCTCCAAGAACAAC
CSN8_dC-rev	TATTCATTATTGTTCTAATATGCCTTTCA
CSN8_dPCI-rev	TATTCATTATTGTTCTAATATGCCTTTCA
CSN8_pci-for	CACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTAATTCTGA ACTTGGGGGAAT
CSN8_pci-rev	TATTCATTATTGTTCTAATATGCCTTTCA
ikba_domain-for	CACCATGGAACAAAAATTAATTTCTGAAGAAGA
ikba_dC-rev	TATTCATTATTCTAGTGTCAGCTGGCCCA
ikba_dANK6-rev	TATTCATTATCTGTTGACATCAGCCCCAC
ikba_dANK5-rev	TATTCATTAAGCATTGACATCAGCACCCA
ikba_dANK4-rev	TATTCATTAGAGGTGCGGGGTGGTGCAGGACTGAGT
ikba_dANK3-rev	TATTCATTAGAGCTCAGGATCACAGCCAGCTCCCAG
ikba_dANK2-rev	TATTCATTAGAAGGCCAGGTCTCCCTTCACCTGGCG
ikba_dANK1-rev	TATTCATTACTCGGTGAGCTGCTGCTTCCAGGGC
RelA_dTA1-rev	TATTCATTACGGGGCCCCCAGTGGAGCAG
RelA_dTA2-rev	TATTCATTACTTGGGGGCAGGTGGGGCCA
RelA_dlink-rev	TATTCATTAATATGTCCTTTTACGTTTCTCC

3.1.9.3 Konstruktion der RelA-RHD-Deletionsmutante

Primer	Sequenz (5' → 3')
RelA_part1	TACGCAGACCCCAGCCTGCAGGC
RelA_part2	GTCCTTGGTGACCAGGGAGATGCG

Alle Oligonukleotidprimer wurden von BioTeZ Berlin Buch oder Eurofins MWG Operon synthetisiert.

3.1.10 Antikörper

Antikörper	Spezies	Katalog Nr.	Bezugsquelle
anti-c-Myc	Kaninchen	A190-105A	Bethyl
anti-c-Myc	Maus	11667149001	Roche
anti-CSN3	Kaninchen	ST1043-100UG	Calbiochem
anti-CSN5	Kaninchen	sc-9074	Santa Cruz
anti-ERK1/2	Kaninchen	sc-154	Santa Cruz
anti-FLAG-M2	Maus	F 1804	Sigma
anti-HDAC1	Kaninchen	sc-7872	Santa Cruz
anti-I κ B α	Kaninchen	sc-271	Santa Cruz
anti-p65	Kaninchen	sc-372	Santa Cruz
anti-T7	Maus	69522-3	Novagene
anti-Maus IgG (H+L)-HRPO SekAK	Esel	715-035-150	Dianova
anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRPO SekAK	Esel	711-035-152	Dianova
anti-Maus IgG, leichte Kette-HRPO SekAK	Ziege	115-035-174	Dianova
anti-Kaninchen IgG, leichte Kette-HRPO SekAK	Ziege	211-032-171	Dianova

3.1.11 Medien und Zusätze

LB (Luria/Miller) Flüssigmedium: 25 g LB-Medium
mit MilliQ-H₂O auf 1 l auffüllen

LB (Luria/Miller) Festmedium: 40 g LB-Agar
mit MilliQ-H₂O auf 1 l auffüllen

Glycerinkultur: 65 % (v/v) Glycerin
0,1 M MgSO₄
0,025 M Tris
pH 8 mit NaOH einstellen
mit MilliQ-H₂O auf 80 ml auffüllen

RPMI-Komplettmedium: 500 ml RPMI 1640
5 ml HEPES
10 % (v/v) FCS
5 ml PenStrep 100x

RPMI-serumreduziert: 500 ml RPMI 1640
5 ml HEPES
0,5 % (v/v) FCS

Einfriermedium für Säugerzellen: FCS 90 %
DMSO 10 %

Antibiotika:

Antibiotikum	<i>E. coli</i> [$\mu\text{g/ml}$]	Säugerzellen [ml/l]
Ampicillin (Ap)	100	-
Kanamycin (Km)	50	-
Pen/Strep (PS) 100x	-	10

3.1.12 Puffer und Lösungen

Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer 50x (pH 8,4): 2 M Tris
50 mM EDTA
1 M Eisessig
mit MilliQ-H₂O auf 1 l auffüllen

DNA-Ladepuffer (10x): 5,7 ml 87 % (v/v) Glycerin
40 mg Bromphenolblau
10 mM EDTA
10 ml MilliQ-H₂O

DNA-Fällung

Kaliumacetatlösung: 3 M Kaliumacetat
Mit Eisessig auf pH 5,2 einstellen
autoklavieren

Transformation

CaCl₂-Lösung: 100 mM Calciumchlorid
autoklavieren

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl auf pH 8,8 einstellen
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris-HCl auf pH 6,8 einstellen
SDS-Page Probenpuffer (4x) (8ml):	200 mM Tris-HCl 40 % (v/v) Glycerin 28 mM SDS 2 mg Bromphenolblau mit MilliQ-H ₂ O auf 8 ml auffüllen
Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer (10x):	248 mM Tris-HCl 1,92 mM Glycin 1 % (w/v) SDS
Tricingelpuffer:	3 M Tris-HCl auf pH 8,45 einstellen
Tris-Tricin-SDS-Laufpuffer (10x):	1 M Tris 1 M Tricin 1 % (w/v) SDS

Western-Blot

Transferpuffer 10x:	250 mM Tris 1,92 M Glycin
Transferpuffer 1x:	25 mM Tris 0,192 mM Glycin 10 % (v/v) Methanol
TBS 10x (pH 7,4):	200 mM Tris 1,37 M NaCl
TBST 1x:	TBS 1x + 0,05 % (v/v) Tween 10

3 Material und Methoden

Stripping Lösung stark (pH 6,7) (Millipore): 62,5 mM Tris-HCl
2 % (w/v) SDS
vor Gebrauch hinzugeben
100 mM β -Mercaptoethanol

Stripping Lösung mild (Abcam) (pH 2,2): 200 mM Glycin
0,1 (w/v) % SDS
1 % (v/V) Tween 20

RIPA (Radioimmunopräzipitationsansatz)-Lyse

RIPA Lysepuffer (pH 7,5): 50 mM Tris Base
5 mM EDTA
150 mM NaCl
10 mM K_2HPO_4
10 % (v/v) Glycerin
1 % (v/v) Triton X-100
0,05 % (w/v) SDS

vor Gebrauch hinzugeben:
1 mM Na_3VO_3
1 mM Na_2Mo_4
20 mM NaF
10 mM Na-Pyrophosphat
0,5 mM AEBSF
20 mM 2-Phosphoglycerat
1x Proteaseinhibitoren-Mix/Roche

Natriumorthovanadat Stammlösung pH 10: 100 mM Na_3VO_4

Kern/Zytosolfraktionierung

Puffer A (pH 7,9): 10 mM Tris-HCl
10 mM KCl
1,5 mM $MgCl_2$
10 mM K_2HPO_4
10 % (v/v) Glycerin

frisch hinzugeben:
0,5 mM DTT
0,5 mM AEBSF

3 Material und Methoden

1 mM Na₃VO₄
10 mM NaF
1x Proteaseinhibitoren-Mix/Roche

Puffer C (pH 7,9): 20 mM Tris-HCl
420 mM NaCl
1,5 mM MgCl₂
0,2 mM EDTA
10 mM K₂HPO₄
10 % (v/v) Glycerin

frisch hinzugeben:
0,5 mM DTT
0,5 mM AEBSF
1 mM Na₃VO₄
10 mM NaF
1x Proteaseinhibitoren-Mix/Roche

Immunpräzipitation

IP-Puffer pH 7,4: 20 mM Tris-HCl
150 mM NaCl
2 mM EDTA
0,05 % (v/v) Triton-X 100

frisch hinzugeben:
2 mM Na₃VO₃
20 mM NaF
1x Proteaseinhibitor-Mix/Roche

3.1.13 Software

Software	Quelle	Zweck
Vector NTI	Life Technologies	Sequenzanalyse / In-silico Cloning / Primerdesign
SnapGene Viewer	GSL Biotech	Sequenzanalyse
L ^A T _E X 2 _ε	Lamport, L.	Textverarbeitung
GIMP	Mattis, P. und Kimball, S.	Bildbearbeitung
LibreOffice	The Document Foundation	Grafiken

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von Bakterien und HeLa-Zellen

E. coli wurde mit LB-Flüssig- und Festmedium (Tabelle unter 3.1.11) bei 37 °C kultiviert. Die Inkubation bei 37 °C erfolgte bei den Festmedien in einem 37 °C Trockenbrutschank (Hereaus), während die Flüssigmedien in einem 37 °C Schüttler (Hereaus) inkubiert wurden. Antibiotika wurden falls die Stämme über Antibiotikaresistenzen verfügen, dem Medium vor der Inkubation zugesetzt.

Die HeLa-Zellen wurden in RPMI-Komplettmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit angezogen (Hereaus HERAcell). Die TNF α -Stimulation und die Inkubation der Zellen mit MG132 erfolgte in serumreduziertem RPMI Medium (0,1 % FCS).

- Zum Umsetzen der vollständig konfluenten Zellen wurden diese zunächst 2x mit 20 ml vorgewärmten Dulbecco's PBS (DPBS) (75 cm² Zellkulturflasche) gespült.
- Danach wurden die Zellen durch Inkubation mit 1,5 ml Trypsin (75 cm² Zellkulturflasche) bei 37 °C und 5 % CO₂ + 95 % Luftfeuchtigkeit, für 5 min von der Flasche abgelöst.
- Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von 20 ml vorgewärmten Komplettmedium inaktiviert.
- Die Zellen wurden für 5 min bei 500*g zentrifugiert (Heraeus Zentrifuge, Schwingrotor) und das Pellet in 20 ml vorgewärmten Komplettmedium resuspendiert.
- Zur Stammkultivierung wurden in einer 75 cm² Flasche 3 ml der Zellsuspension mit 17 ml vorgewärmten Komplettmedium ergänzt. Bei Verwendung von anderen Kultivierungsgefäßen wurde die Zellzahl der Suspension (3.2.2) bestimmt und die Zellen in der für das Experiment erforderlichen Zelldichte eingesät.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl in Zellsuspensionen kann mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Dazu wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit einer Typanblaulösung (0,4 % w/v) gemischt und 10 μ l seitlich zwischen die Zählkammer und das Deckglas pipettiert. Nun wurden die Zellen unter dem Mikroskop auf 4 großen Quadraten gezählt. Die toten Zellen, wo der Farbstoff in die Zellen diffundiert war, sind nicht mitgezählt nicht worden. Die Lebendzellzahl wurde mit Hilfe der folgenden Formel ermittelt:

$$\frac{\text{Gezählter Wert} \cdot 10^5}{\text{Gezählte Quadrate} \cdot \text{Verdünnung}} = \text{Zellen/ml}$$

3.2.3 Konservierung von Bakterien in Glycerinkulturen

In Glycerinkulturen lassen sich bakterielle Zellen über lange Zeit bei -80 °C oder -20 °C lagern. Dazu wurden die Zellen bis zur mittleren logarithmischen Phase angezogen. Anschließend

wurden 400 μl der Kultur mit 600 μl der Glycerin-Kultur-Lösung gemischt. Die Glycerinkultur wurde in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.4 Konservieren von HeLa-Zellen

Säugerzellen lassen sich durch Einfrieren in FCS mit DMSO konservieren. Als Ausgangsmaterial diente hier eine vollständig konfluente 75 cm^2 Zellkulturflasche.

- Die durch Trypsin vom Zellkulturgefäß gelösten Zellen, wurden in 2 ml Zelleinfriermedium resuspendiert.
- Die resuspendierten Zellen wurden auf zwei vorgekühlte Kryogefäße verteilt und anschließend in einer Gefrierbox für Zellen (Nalgene) bei -80°C eingefroren.
- Nach zwei Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Revitalisieren der eingefrorenen Zellen erfolgte nach folgendem Schema:

- Die eingefrorenen Zellen im Kryogefäß wurden in einem 37°C Wasserbad aufgetaut.
- Die Zellsuspension wurde in 10 ml RPMI Kompletmedium gegeben und bei $500\times g$ pelletiert (Heraeus Zentrifuge, Schwingrotor).
- Der Mediumüberstand wurde entfernt und die das Zellpellet in 20 ml frischem RPMI Kompletmedium resuspendiert, in eine 75 cm^2 überführt und anschließend bei 37°C , 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.
- Nach einem Tag konnten die Zellen für Experimente verwendet werden.

3.2.5 Inkubation von HeLa-Zellen mit Cytokinen und Inhibitoren

Damit die HeLa-Zellen besser auf die $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation ansprechen, wurden die Zellen am Abend, jedoch mindestens 4 Stunden vor der geplanten Stimulation auf Serum reduziertes Medium (0,1 % FCS) gesetzt, nachdem zuvor die Zellen eine Konfluenz von 80 - 90 % aufwiesen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ stimuliert. Bei Experimenten mit Verwendung des Proteasominhibitors MG132 wurden die HeLa-Zellen mindestens eine Stunde vor der Ernte bzw. Stimulation mit 25 μM MG132 inkubiert, ebenfalls in serumreduziertem Medium.

3.2.6 Lyse bakterieller und eukaryotischer Zellen

3.2.6.1 Kochlyse

Durch die Kochlyse wurden *E. coli*-Zellen durch hohe Temperaturen aufgeschlossen. Dafür wurde eine Kolonie mit einer Pipettenspitze, von einer Agar-Platte abgenommen und in 200 μl Wasser gelöst. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 100°C im Heizblock gekocht und gevortext. Das Lysat diente z.B. als Template für eine PCR-Reaktion die für das „Screening“ der einzelnen *E. coli*-Klone nach einer Klonierung angewandt wurde.

3.2.6.2 Alkalische Lyse

Durch alkalische Lyse wurden Zellen durch Inkubation mit Natronlauge und SDS lysiert. SDS denaturiert hierbei die Proteine und die Natronlauge die DNA. Die chromosomale DNA bildet nach der Renaturierung, durch Neutralisierung der Lösung mit Kaliumacetat ein Knäuel, was mit den Zelltrümmern abzentrifugiert wird. Im Überstand bleibt die Plasmid-DNA übrig. Diese Methode wurde bei der Isolierung kleiner Mengen von Plasmid-DNA aus Bakterien angewandt.

3.2.6.3 RIPA (Radioimmunpräzipitationsansatz)-Lyse

Bei der RIPA-Lyse wurden die Zellen sowohl durch Detergenzien, als auch das mechanische Einwirken von starken Scherkräften lysiert. Diese Form der Lyse wurde ausschließlich für Säugerzellen verwendet. Der Ablauf sah bei Verwendung von 10 cm Zellkulturschalen folgendermaßen aus:

- Die Zellen wurden 2x mit 10 ml Dulbecco's PBS (DPBS) bei RT gewaschen.
- Auf die Platte wurde 500 μ l kaltem RIPA-Lysepuffer gegeben.
- Die Zellen wurden mit einem Zellschaber, von der Platte auf Eis abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt.
- Die Zellsuspension wurde für 10 min auf Eis inkubiert.
- Anschließend wurden die Zellen durch achtmaliges rauf- und runterziehen der Suspension mit einer Kanüle lysiert.
- Das Lysat wurde für 10 min bei 13.000*g in einer Eppendorffzentrifuge (4 °C) zentrifugiert
- Den Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen.

3.2.7 Proteinextraktion aus Zytosol und Zellkern

Die Extraktion von löslichen Proteinen aus dem Zytosol und dem Kern erfolgte durch Verwendung eines hypotonen und eines hypertonen Lysepuffers. Zuerst wurden die Zellen mit dem hypotonen Lysepuffer A mit Detergenzien (Puffertabelle unter 3.1.12) inkubiert, wo durch die Zellenmembranen permeabilisieren und ein Lysat aus zytosolischen Proteinen und intakten Zellkernen entsteht. Anschließend wurden die Zellkerne durch den hypertonen Puffer C (Puffertabelle unter 3.1.12) lysiert, wodurch man ein Lysat aus löslichen Kernproteinen erhält.

- Der Zellüberstand von in 10 cm Zellkulturschalen kultivierten Zellen, wurde in 15 ml Greiner-Gefäße überführt. Die Zellen wurden 2 x mit 10 ml DPBS bei RT gewaschen und mit 700 μ l Trypsin abgelöst.

3 Material und Methoden

- Nach 5 min Inkubation bei 37 °C wurde das Trysin durch Zugabe von 10 ml Komplettmedium inaktiviert. Die Zellsuspension wurde daraufhin in ein 15 ml Greiner-Gefäß überführt. Die Zellkulturschalen wurden noch einmal mit 5 ml Komplettmedium nachgegespült und in ein weiteres Greiner-Gefäß gegeben.
- Die Zellsuspension wurde 5 min bei 500*g zentrifugiert (Hereaus Kühlzentrifuge, 4 °C mit Schwingrotor) und 2 x mit 10 ml eiskaltem DPBS gewaschen, danach wurde der Puffer komplett entfernt.
- Das Pellet wurde auf Eis im Kühlschrank in 1 ml PBS + AEBSF und NaF und Na₃VO₄ (Konzentration wie in Puffer A) gelagert.
- Das Zellpellet wurde 1 x in 1 ml Puffer A gewaschen und anschließend in 500 µl Puffer A resuspendiert.
- Die Zellen wurden für 10 min zum Schwellen auf Eis inkubiert.
- Nach der Inkubation wurde der Zellsuspension 1 µl 12,5 % NP-40 je 100 µl Zellsuspension zugesetzt, um die Zellen zu lysieren.
- Das Lysat wurde als nächstes für 10 min bei 4 °C und bei 2000*g zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge).
- Der Überstand wurde abgenommen und in neue Reaktionsgefäße überführt (zytosolische Fraktion). Zum Klären wurde die Zytosolfraktion erneut für 10 min bei 4 °C und 13.000*g zentrifugiert.
- Das Pellet wurde in Puffer A (je 500 µl) gewaschen, um anheftende Cytosolproteine zu entfernen.
- Das Pellet wurde anschließend in je 40 µl Puffer C aufgenommen, resuspendiert und wiederholt kräftig vorgetext. Zur Extraktion der Kernproteine wurden die Ansätze für 30 min (unter permanenten Schütteln oder unter wiederholtem Vortexen) auf Eis inkubiert.
- Die Kernfraktion wurde für 10 min bei 4 °C und 13.000*g zentrifugiert.
- Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben (Kernfraktion).
- Für die zytosolische Fraktion wurden 2 µl des Ansatzes eingesetzt. Die Kernfraktion muss 1:5 in Puffer A vorverdünnt und danach 5 µl zur Proteinbestimmung eingesetzt werden.
- Die Lysate wurden sofort weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert werden.

3.2.8 Isolierung, Aufreinigung und Quantifizierung von DNA

3.2.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmidisolierung mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit basiert auf der Grundlage der alkalischen Lyse. In Gegenwart hoher Salzkonzentrationen bindet DNA an die Silicamembran und wird dort gewaschen, so dass am Ende Plasmid-DNA von der Säule mit einem salzarmen Puffer eluiert werden kann.

Isolierung von Plasmid-DNA mit hoher Kopienzahl

Plasmide mit hoher Kopienzahl, wie bei pcDNA Vektoren wurden mit diesem Protokoll isolieren:

- 5 ml stationäre *E. coli* Zellen wurden durch zentrifugieren für 10 min bei 4.400*g (Hereaus Zentrifuge, Schwingrotor) pelletiert, in 250 μ l P1-Puffer (mit RNase) resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt.
- Anschließend wurden 250 μ l P2-Puffer (Lyse-Puffer) hinzugegeben, das Reaktionsgefäß 7x invertiert sowie für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Das Lysat wurde mit 300 μ l P3-Puffer neutralisiert und für 10 min bei 11.000*g in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert (alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte).
- Der Überstand wurde auf eine QIAprep Spin Miniprep Säule mit 2 ml Sammelgefäß gegeben und 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.
- Die Säule wurde mit 500 ml PB-Puffer gewaschen (nicht notwendig bei DH5 α) und für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.
- Auf die Säule wurde 750 ml PE-Puffer (Wasch-Puffer) gegeben. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde durch 2 min zentrifugieren getrocknet.
- Auf die Membran wurde nun 50 μ l EB-Puffer gegeben. Nach einer Inkubation von 1 min wurde die Säule 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt die isolierte Plasmid-DNA.
- Abschließend wurde mit einem Photometer (Nanodrop ND-2000c) die DNA-Konzentration bestimmt.

Isolierung von Plasmiden mit geringer Kopienzahl

Plasmide mit niedriger Kopienzahl, wie der pDEST14 Vektor und dessen Derivate wurden mit folgendem Protokoll isoliert, um sie für Restriktion und Ligation zu verwenden.

- 4 * 5 ml stationäre *E. coli* Zellen wurden durch zentrifugieren für 10 min bei 4.400*g (Hereaus Zentrifuge, Schwingrotor) pelletiert.

- Jedes Pellet wurde zunächst in 250 μl P1-Puffer (mit RNase) resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt.
- Anschließend wurden 250 μl P2-Puffer (Lyse Puffer) hinzugegeben, jedes Reaktionsgefäß 7x invertiert und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Die Lysate wurden danach mit 300 μl P3-Puffer neutralisiert und für 10 min bei 11.000*g in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert (alle folgenden Zentrifugationsschritte).
- Der Überstand wurde nacheinander auf eine QIAprep Spin Miniprep Säule mit 2 ml Sammelgefäß gegeben. Nach jedem Ladevorgang wird diese für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.
- Die Säule wurde mit 500 ml warmen PB-Puffer (50 °C) gewaschen und für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.
- Auf die Säule wird 600 ml PE-Puffer (Wasch-Puffer) gegeben. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde durch 2 min zentrifugieren getrocknet und anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt.
- Auf die Membran wurde 50 μl EB-Puffer gegeben. Nach einer Inkubation von 1 min wird die Säule 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt die isolierte Plasmid-DNA.
- Abschließend wurde mit einem Photometer (Nanodrop ND-2000c) die DNA-Konzentration bestimmt.

3.2.8.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das Macherey-Nagel NucleoSpin Extract II Kit verwendet. Auch hier erfolgte die Aufreinigung über eine Säule, wobei die PCR-Produkte von Salzen, Detergenzien und Proteinen gereinigt wurden. Des Weiteren war es möglich durch Verdünnen des NT-Puffers kleine DNA-Fragmente aus der Probe zu entfernen (s. Anleitung des Herstellers). Das Protokoll zum Entfernen von 100 bp Fragmenten wie z.B. Primerdimere sah wie folgt aus:

- Ein Volumen der PCR Reaktion wurde mit zwei Volumen NT-Puffer gemischt.
- Die Probe wurde auf einer NucleoSpin Extract II Säule mit 2 ml Sammelgefäß aufgeladen und anschließend bei 11.000*g in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert (wie alle Zentrifugationsschritte). Der Durchfluss wurde verworfen.
- 600 ml NT3-Puffer wurde auf die Säule gegeben und diese zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.
- Die Säule wurde durch 3 min zentrifugieren getrocknet.

- Auf die Membran wurden 50 μl Elutionspuffer gegeben. Nach einer Inkubation von 1 min wurde die Säule 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss enthält die isolierte Plasmid-DNA.
- Abschließend wurde mit einem Photometer (Nanodrop ND-2000c) die DNA-Konzentration bestimmt.

3.2.8.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zum Extrahieren von DNA aus Agarosegelen wurde das QIAEX II Gel Extraction Kit verwendet. Das Prinzip ähnelt dem der Plasmidpräparation. Die aus dem Gel eluierte DNA bindet in Anwesenheit hoher Salzkonzentration an eine Silicagelmatrix, wo sie gewaschen und anschließend mit einem Niedrigsalzpuffer eluiert wird. Das für 1-5 kB optimierte Protokoll sah folgt aus:

- Die DNA-Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten.
- Das Agarosegelstück wurde gewogen und drei Volumen (w/v) QX1 Puffer und 30 μl QIAEX II hinzugegeben.
- Die Suspension wurde bei 50 °C für 10 min erwärmt. Das Reaktionsgefäß regelmäßig vortexen um das QIAEX II in Lösung zu halten.
- Die Probe wurde für 30 s bei 13.000*g in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert (alle Zentrifugations und Waschschritte) und der Überstand verworfen.
- Das Pellet wurde mit 500 μl QX1 Puffer gewaschen und der Überstand verworfen.
- Das Pellet wurde zweimal mit 500 μl PE Puffer gewaschen und der Überstand verworfen.
- Das Pellet wurde bis es weiß wird an der Luft getrocknet.
- Zum Eluieren der DNA wurde das Pellet mit 30 μl 10 mM Tris-HCl pH 8.5 und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Das Pellet wurde runterzentrifuiert und der Überstand mit der eluierten DNA abgezogen
- Die DNA-Konzentration im Überstand wurde mit dem Nanodrop ND-2000c bestimmt.

3.2.8.4 Ethanol/Kaliumacetat-Fällung von DNA

Durch die Ethanol-fällung ist es möglich DNA von Salzen und Proteinen zu reinigen, die z.B. durch eine DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen hinzugeben wurden zu reinigen. Des Weiteren ist es möglich kleine DNA-Fragmente bis 500 bp aus der Probe zu entfernen.

- 1 μl 3 M Kaliumacetatlösung (Tabelle unter 3.1.12) wurde zu 9 μl Ansatzvolumen gegeben.
- Zwei Volumen Ethanol (ausgehend vom Ansatzvolumen) wurden hinzugegeben und 2 Std. bei -20 °C inkubiert.

- Anschließend wurde der Ansatz 20 min bei 4 °C mit maximaler Geschwindigkeit (16.000*g) in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert.
- Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet 1x mit 70 % Ethanol gewaschen.
- Das gewaschene Pellet wurde an der Luft getrocknet und anschließend in 20 μ l 10 mM Tris-HCl pH 8.5 resuspendiert.
- Die DNA-Konzentration wurde mit dem Nanodrop ND-2000c bestimmt.

3.2.8.5 Messung von DNA-Konzentrationen

Die DNA-Konzentration von wässrigen Lösungen wurde photometrisch mit dem Nanodrop ND-2000c bestimmt. Dazu wurde die Absorption der DNA (1 μ l) im UV-Bereich gemessen und durch die Software des Photometers die DNA-Konzentration der Probe in ng/ μ l, sowie deren Reinheit ermittelt. Der Quotient aus der Absorption bei 260 und 280 nm ist bei reiner DNA 1,8.

3.2.9 Gentechnische Methoden

3.2.9.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode um spezifisch einen bestimmten DNA-Abschnitt zu vervielfältigen. Dazu bindet auf beiden DNA-Strängen, je ein spezifischer Oligonukleotidprimer (Tabelle unter 3.1.9), der durch das Enzym DNA-Polymerase, zu einem zum Matrizenstrang komplementären Strang, verlängert wird. Dieser Prozess wird eine bestimmte Anzahl an Zyklen wiederholt, so dass eine Anreicherung der Reaktion mit einem Ziel-PCR-Produkt die Folge ist. Als DNA-Polymerasen (Tabelle unter 3.1.4.1) dienten in dieser Arbeit die Taq-Polymerase, für allgemeine PCR Reaktionen (SAWADY-Taq-Polymerase und die DreamTaq-Polymerase) und die Phusion[®]-Polymerase, mit „Proof-Reading-Aktivität“ für Klonierungen. Die DreamTaq-Polymerase wurde ausschließlich für die PCR mit Zelllysaten (Kolonie-PCR) eingesetzt. Im Folgenden sind die PCR-Ansätze für die jeweiligen DNA-Polymerasen aufgeführt:

Phusion[®]-Polymerase:

<u>Reaktionsansatz:</u>		<u>PCR-Programm:</u>		
5x Phusion Puffer HF	5 μ l	Initiales Schmelzen	8 min	98°C
Phusion [®] HotStart Polymerase (2 U/ μ l)	0,25 μ l			
dNTPs (10 mM)	0,5 μ l	Schmelzen	1 min	98°C
Primergemisch (25 μ M/l)	0,5 μ l	Annealing	20 s	62°C
DMSO	0,75 μ l	Elongation	30 s/kB	72°C
Template DNA (15 ng/Reaktion)	1 μ l	30 Zyklen		
Nukleasefreies H ₂ O	17 μ l	Finale Elongation	10 min	72°C
Gesamtvolumen	25 μ l			

SAWADY-Taq Polymerase:

<u>Reaktionansatz:</u>		<u>PCR-Programm:</u>		
10x PCR-Puffer (für hohe Erträge)	2,5 μ l	Initiales Schmelzen	8 min	94°C
SAWADY Taq DNA-Polymerase (1 U/ μ l)	0,5 μ l			
dNTPs (10 mM)	0,5 μ l	Schmelzen	1 min	94°C
Primergemisch (25 mM)	0,5 μ l	Annealing	20 s	55°C
5x Enhancer-Lösung	5 μ l	Elongation	1 min/kB	72°C
Template DNA (ca. 15 ng/ μ l)	1 μ l	30 Zyklen		
Nukleasefreies H ₂ O	15 μ l	Finale Elongation	10 min	72°C
Gesamtvolumen	25 μ l			

DreamTaq-Polymerase:

<u>Reaktionsansatz:</u>		<u>PCR-Programm:</u>		
10x DreamTaq-Green-Puffer	2,5 μ l	Initiales Schmelzen	3 min	94°C
DreamTaq DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0,1 μ l			
dNTPs (10mM)	0,5 μ l	Schmelzen	1 min	94°C
Primergemisch (25 mM)	0,5 μ l	Annealing	20 s	53°C
Template Lysat	1 μ l	Elongation	1 min/kB	72°C
Nukleasefreies H ₂ O	20,4 μ l	30 Zyklen		
Gesamtvolumen	25 μ l	Finale Elongation	10 min	72°C

Als Thermocycler diente hier der GeneAmp 9600 von Applied Biosystems.

3.2.9.2 Agarosegelelektrophorese

In Agarosegelen lassen sich DNA-Fragmente nach ihrer molekularen Größe auftrennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit von linearen Fragmenten, ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe. Zirkuläre Plasmide wandern entsprechend zu ihrer Dichte, unter-

schiedlich schnell. Die dicht gepackte, kovalent geschlossene ccc-Form, welche häufig als „Super Coil“ vorliegt, wandert schneller als die ringförmige entspannte DNA (Open Circle), die bei einem Einzelstangbruch entsteht. In dieser Arbeit wurden größtenteils 1-2 %ige Agarosegele verwendet. Die DNA-Fragmente im Gel wurden mit Ethidiumbromid angefärbt von dem vermutet wird, dass es sich in die DNA-Doppelhelix einlagert. Ethidiumbromid fluoresziert bei 285 nm im UV Durchlicht, wodurch die DNA-Fragmente im Gel sichtbar werden. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte mit DNA-Längenstandards deren Größen durch den Hersteller definiert sind. Auf Agarosegele wurden üblicherweise je nach Größe der DNA-Fragmente DNA Mengen von 100 ng - 300 ng aufgetragen.

- Für ein 2 % Agarosegel wurden 2 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (Tabelle unter 3.1.12) überführt und erhitzt bis die Agarose sich vollständig gelöst hat.
- War die Agaroselösung auf ca. 60 °C abgekühlt, wurde sie in den Gelträger gegossen.
- Wenn das Gel gelatiniert war, wurde es mit TAE-Puffer überschichtet.
- Die DNA-Proben konnten nun, verdünnt mit DNA-Ladepuffer (Tabelle unter 3.1.12) in die Taschen des Gels pipettiert werden.
- Das Gel lief für 30-40 min bei einer Spannung von 100 V.
- Anschließend wurde das Gel für 10 min im Ethidiumbromidbad (0,1 % (v/v)) gefärbt und danach 10 min gewässert.
- Das Gel wurde auf einem Transilluminator (PEQLAB E-Box) dokumentiert.

3.2.9.3 DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind spezifische DNasen die bestimmte DNA Sequenzen durch Hydrolyse spalten. Restriktionsenzyme werden in 3 Typen unterteilt, wobei für das Klonieren von DNA-Fragmenten die Restriktionsenzyme des Typs II eine übergeordnete Rolle spielen. Die DNA-Hydrolyse wurde wie folgt durchgeführt:

DNA (200 ng/ μ l)	10 μ l
Restriktionsenzym (10 U)	1 μ l
10x Restriktionspuffer	5 μ l
Nukleasefreies H ₂ O	34 μ l
<hr/> Gesamtvolumen	<hr/> 50 μ l

Der jeweilige Restriktionspuffer wurde für das entsprechende Enzym nach der NEB Puffertabelle ausgewählt um die maximale Aktivität zu erhalten. Die Enzyme und Puffer sind in der Tabelle unter 3.1.4.2 aufgeführt. Falls ein Verdau mit zwei verschiedenen Enzymen erforderlich war, wurde ebenfalls der empfohlene Puffer und die entsprechende Enzymmenge des Herstellers benutzt (s. Webseite des Herstellers). Alle Ansätze wurden für 2 Std. bei 37 °C inkubiert

3.2.9.4 DNA-Ligation durch die T4-Ligase

DNA-Fragmente lassen sich durch die T4-Ligase ligieren. Dabei könnten sowohl glatte („Blunt-Ends“) als auch klebrige DNA-Enden („Sticky-Ends“) mit mehreren überhängenden Basen ligiert werden. Um den Vektor und das „Insert“ zu ligieren, werden „Insert“ und Vektor üblicherweise im Verhältnis 3 (Insert) zu 1 (Vektor) zusammengegeben. Anschließend wird der Ligasepuffer und die T4-Ligase (Tabelle unter 3.1.4.3) hinzugegeben. Die T4-Ligase wurde in dieser Arbeit für die Zirkularisierung von linearen DNAs verwendet. Ein solcher Ansatz sah wie folgt aus:

Lineare DNA (50 ng/Ansatz)	2,5 μ l
10x Quick-T4-Ligase Puffer	1 μ l
Quick-T4-Ligase	1 μ l
Nukleasefreies H ₂ O	15,5 μ l
<hr/>	
Gesamtvolumen	20 μ l

Der Ligationsansatz wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für eine Transformation der Zellen wurde je nach Kompetenz der Zellen 2 - 10 μ l verwendet. Diese Form der Ligation wurde hauptsächlich bei der Konstruktion von Plasmiden mit ORF-internen Deletionen angewandt.

3.2.9.5 DNA-Ligation durch direktionales TOPO[®]-Cloning

Das TOPO[®]-Cloning (Life Technologies) ist eine Methode zum Ligieren von DNA-Enden durch das Enzym Topoisomerase I des Vacciniavirus. Die Topoisomerase I wirkt sowohl als Restriktionsenzym als auch Ligase, deren biologische Funktion das Spalten und Ligieren der DNA bei DNA-Replikation ist. Die Topoisomerase erkennt dabei spezifisch die pentamerische 5'-(C/T)CCTT-3' Sequenz und formt eine kovalente Bindung mit der Phosphatgruppe am 3' Thymidin. Es wird der DNA-Strang gespalten wodurch die DNA entwunden wird. Danach religiert das Enzym die DNA-Enden und löst sich von der DNA. Bei der Religation wird beim direktionalen TOPO[®]-Cloning ein linearisierter Vektor mit einem GTGG-Überhang am 5' Ende und einer kovalent mit dem 3' Phosphatende verbundenen Topoisomerase eingesetzt. Dadurch werden z.B. PCR-Produkte mit einer CACC Basensequenz am 5' Ende bevorzugt zum GTGG Überhang des Vektors ligiert. Alle bei Life Technologies gekauften TOPO[®]-Vektoren sind bereits linearisiert und mit der Topoisomerase verbunden (Tabelle unter 3.1.3). Ein typischer Ligationsansatz mit einem Insert von 2-5 Kb wie er in dieser Arbeit verwendet wurde, sah wie folgt aus:

Insert-DNA (12 ng/Ansatz)	0,5 μ l
Salzlösung	1 μ l
Nukleasefreies H ₂ O	3,5 μ l
Vektor-DNA (12 ng/Ansatz)	1 μ l
<hr/>	
Gesamtvolumen	6 μ l

- Der Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Anschließend wurde der Ansatz für die Transformation verwendet.
- Bei kompetenten Zellen die kommerziell hergestellt wurden, sind 2 μl des Ligationsansatzes für die Transformation verwendet worden.

3.2.9.6 DNA-Rekombination durch Gateway[®]-Cloning

Diese Klonierungstechnik (Life Technologies) basiert auf der spezifischen Rekombination des Bakteriophagen λ . Dabei wird durch Rekombination ein bestimmter DNA-Abschnitt der Donor-DNA, gegen einen Abschnitt auf einer Rezipienten-DNA ausgetauscht. Es existieren zwei mögliche Reaktionen die LR und BP Reaktionen. Bei der LR-Rekombination liegt der DNA-Abschnitt auf der Donor-DNA zwischen den zwei „Attachment-Sites“ *attL1* und *attL2*, während dieser auf der Rezipienten-DNA zwischen *attR1* und *attR2* liegt. Die eigentliche Rekombination der Donor- und Rezipienten-DNA erfolgt durch die λ -Proteine Int, Xis und den *E. coli*-Wirtsintegrationsfaktor (IHF), durch die diese Reaktion ermöglicht wird. In dieser Arbeit wurde nur die LR-Rekombination angewandt. Der Ansatz für eine LR-Rekombination sah wie folgt aus:

Donor-DNA (50 ng)	0,5 μl
Rezipienten-DNA (150 ng)	1 μl
TE-Puffer	6,5 μl
LR-Clonase-Mix	2 μl
Gesamtvolumen	10 μl

- Der Ansatz wurde 1 Std. bei 25 °C inkubiert.
- Nach der Reaktion wurde zur Inaktivierung 1 μl Proteinase K hinzugegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert.
- Die rekombinierte Plasmid-DNA wurde anschließend für Transformation verwendet.
- Bei kompetenten Zellen die kommerziell hergestellt wurden, sind 1 μl des Rekombinationsansatzes verwendet worden. Bei selbst hergestellten Zellen wurde der ganze Ansatz verwendet.

3.2.9.7 Sequenzierung von DNA-Abschnitten

Zur Kontrollsequenzierung der in die pENTR-Vektoren klonierten DNAs wurden, 20 μl der Plasmide mit einer Konzentration von 30-100 ng/ μl in EDTA-freier wässriger Lösung an GATC Biotec gesendet. Als Sequenzierprimer dienten der M13-for und der M13-rev aus dem Standardprimersortiment von GATC.

3.2.10 Methoden für den DNA-Transfer

3.2.10.1 Transformation von *E. coli*

E. coli besitzt kein natürliches Transformationsystem. Es ist jedoch möglich durch die Behandlung von *E. coli*-Zellen mit Calciumchlorid und einen anschließenden Hitzeschock, diese zum Aufnehmen freier DNA zu bringen.

Herstellung Calcium-kompetenter *E. coli*-Zellen

- Eine stationäre *E. coli* Kolonie wurde von einer Agarplatte in 10 ml LB-Medium überführt und übernacht im Schüttler bei 37 °C angezogen.
- 1 ml dieser Starterkultur wurde in ein frisches Gefäß mit 10 ml LB-Medium gegeben und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,6 angezogen. Die OD wurde mit Hilfe des Amersham Ultrospec 3100 pro Photometer bestimmt.
- Die Zellen wurden bei 4 °C in einer Kühlzentrifuge (Heraeus, Schwingrotor) mit 4.400*g 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml steriler 100 mM $CaCl_2$ Lösung resuspendiert.
- Die Zellesuspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend nochmal für 10 min bei 4.400*g und 4 °C zentrifugiert.
- Das Pellet wurde mit Hilfe einer abgeschnittenen 200 μ l Spitze in einem Gemisch aus 800 μ l 100 mM $CaCl_2$ Lösung und 200 μ l 87 % Glycerin resuspendiert.
- Die Zellesuspension wurde sofort aliquotiert (100 μ l), in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Transformation Calcium-kompetenter *E. coli*-Zellen

- Die kompetenten Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut.
- Anschließend wurde die DNA in der Menge, wie im Protokoll angegeben zu den kompetenten Zellen hinzugegeben und für 25 min auf Eis inkubiert.
- Nach der Inkubation wurden die Zellen für 1 min einem Hitzeschock (42 °C) unterzogen und danach sofort 1 ml LB-Medium hinzugeben.
- Die transformierten Zellen wurden für 1 Std. bei 37 °C geschüttelt.
- Von den transformierten Zellen wurde neben der unverdünnten Zellsuspension und eine 1 : 10 Verdünnung angelegt.
- Die Zellen wurden auf LB-Festmedium mit dem entsprechendem Antibiotikum für die Plasmidselektion ausplattiert.

Transformation von OneShot *E. coli* Zellen (Life Technologies)

Bei diesen Zellen handelt es sich um kommerziell hergestellte hochkompetente Zellen. Diese wurden nach folgendem Protokoll zur Transformation verwendet.

- Die kompetenten Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut.
- Anschließend wurde die DNA in der Menge, wie im Protokoll zu den kompetenten Zellen hinzugegeben und die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert.
- Nach der Inkubation wurden die Zellen für 30 s einem Hitzeschock (42 °C) unterzogen.
- Danach wurde sofort 250 ml SOC („Super-Optimal-Broth-with-Catabolite-Repression“)-Medium (Life Technologies) hinzugegeben.
- Die transformierten Zellen wurden für 1 Std. bei 37 °C geschüttelt.
- Von den transformierten Zellen wurde eine neben der unverdünnten Zellsuspension und eine 1 : 10 Verdünnung angelegt.
- Die Zellen wurden auf LB-Festmedium mit dem entsprechendem Antibiotikum für die Plasmidselektion ausplattiert.

3.2.10.2 Transfektion von Säugerzellen durch Lipidreagenzien

Das erste für die Transfektion von HeLa-Zellen verwendete Transfektionssystem, war das Effectene-Reagenz (Qiagen). Hierbei handelt es sich um ein Lipidreagenz, welches in Kombination mit einem „Enhancer“ und einem DNA kondensierendem Puffer (EC-Puffer), bei vielen Zelltypen laut Angabe des Herstellers, hohe Transfektionseffizienzen bewirkt. Unter den gewählten Pufferbedingungen kondensiert dabei die DNA durch Bindung an den „Enhancer“. Zu der kondensierten DNA wird das Effectene-Reagenz gegeben, wodurch sich kondensierte Lipid-DNA Komplexe (Mizellen) bilden. Diese Mizellen werden dann mit Medium auf die Zellen gegeben, wodurch die DNA von den Zellen durch Phagozytose aufgenommen werden kann. Die Transfektion von 5 µg Plasmid DNA in 10 cm Schalen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 0.5 - 2.5*10⁶ der Zellen wurden ausgesäht und über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit angezogen. Die Zellen wiesen immer eine Konfluenz von 60 – 90 % auf.
- Die Plasmide wurden mit sterilem MilliQ-H₂O auf 1 µg/µl DNA vorverdünnt.
- Zum Kondensieren wurde die DNA (5 µg) in 75 µl EC Puffer aufgenommen und 20 µl des „Enhancers“ hinzugegeben.
- Der Ansatz wurde kurz gevortext, danach runterzentrifugiert und für 5 min bei RT inkubiert.
- Danach wurden 25 µl Effectene Reagenz hinzugegeben.

- Der Ansatz wurde kurz gevortext, danach abzentrifugiert und für 10 min bei RT inkubiert, damit sich die Komplexe bilden konnten.
- Die Zellen wurden während des zweiten Inkubationsschritts, 2x mit 5 ml serumreduzierten Medium (0,1 % FCS) gewaschen und in 4,5 ml des Mediums belassen.
- Zu dem Transfektionsansatz wurde 375 μ l serumreduziertes Medium (0.1 % FCS) gegeben.
- Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben.
- Die Zellen wurden für 6 Std. bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.
- Das Medium der Zellen wurde gegen 10 ml Kompletmedium ausgetauscht und die Zellen über Nacht kultiviert.
- Danach waren die Zellen bereit für eine Stimulation bzw. die Ernte.

3.2.10.3 Transfektion von Säugerzellen durch kationische Polymere

Die zweite hier angewandte Transfektionsmethode für HeLa-Zellen ist die JetPrime Transfektionsreagenz von Polyplus. Diese Methode hat bei späteren Versuchen (RelA-Transfektionen), aufgrund der besseren Transfektionseffizienz das Effectene ersetzt. Bei diesem Verfahren bildet die DNA mit Polyethylenimin-Komplexe, die von den Zellen aufgenommen werden. Für die Transfektion von 5 μ g Plasmid-DNA in 10 cm Schalen wurde folgendes Protokoll verwendet:

- $1 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^6$ Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und bis zu einer von Konfluenz von 60 – 80 % angezogen.
- Die Zellen wurden mit 10 ml frischem Kompletmedium versehen.
- Die Plasmid-DNA wurde in 250 μ l JetPrime Puffer aufgenommen.
- Zu dem Ansatz wurde 10 μ l JetPrime Reagenz hinzugegeben, dieser anschließend für 10 s gevortext und für 10 min bei RT inkubiert.
- Der Ansatz wurden tropfenweise auf die Zellen geben und diese für 6 Std. bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubieren.
- Das Mediums wurde gegen 10 ml Kompletmedium ausgetauscht und die Zellen über Nacht inkubiert.
- Danach waren die Zellen bereit für eine Stimulation bzw. die Ernte.

3.2.11 *In vitro* Transkription / Translation

Die klassischen Systeme zur *in vitro* Transkription/Translation basieren üblicherweise auf der Verwendung von Zellysaten bei denen die Verbrauchskomponenten, wie Aminosäuren etc. zur Reaktion hinzugefügt werden. In dieser Arbeit wurde ein zellfreies auf dem *E. coli*-Transkriptions- und Translationsapparat basierendes System (Shimizu et al., 2001) verwendet. Bei diesem System sind alle essentiellen Transkriptions- und Translationskomponenten rekombinant hergestellt und aufgereinigte Ribosomen zugesetzt. Alle übrigen Komponenten werden, wie bei den Lysat basierenden Systemen der Reaktion hinzugegeben. Der Vorteil dieses zellfreien Systems ist, dass man im Gegensatz zu den lysatbasierenden Systemen keine „Blackbox“ aus ungewollten Proteinen wie DNasen, RNasen, Proteasen und anderen störende Faktoren vorliegen hat und die Zusammensetzung des zellfreien *in vitro* Systems weitgehend bekannt ist. Die Reaktionsbedingungen sind zudem so optimiert, dass sie denen einer lebenden Zelle möglichst nah kommen. Ein 25 μ l Ansatz für die *in vitro*-Proteinsynthese sah wie folgt aus:

Lösung A	10 μ l
Lösung B	7,5 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0,5 μ l
Template DNA (100 ng/ μ l)	2,5 μ l
RNase freies H ₂ O	4,5 μ l
Gesamtvolumen	25 μ l

- Nach dem Zusammenpipettieren wurde der Ansatz für 2 Std. bei 37 °C (Heizblock) inkubiert.
- Für einen Western-Blot wurden 1 - 2,5 μ l und für eine Immunpräzipitation 20 - 25 μ l der Reaktion eingesetzt.

3.2.12 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Der Bradfordassay (Bradford, 1976) ist ein kolorimetrischer Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration wässriger Lösungen. Als Farbstoff diente hier Coomassie-Brillant-Blau G-250 das an Proteine, insbesondere an basische Seitenketten von Aminosäuren, bindet. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes verschiebt sich bei Proteinbindung von 470 nm auf 595 nm. Durch eine photometrische Messung bei 595 nm, kann daher die Proteinmenge quantifiziert werden. Durch einen Vergleich mit einer Eichreihe bekannter Konzentration von Rinderserumalbumin (BSA), die parallel zur eigentlichen Messung durch erstellt wird, konnte die absolute Proteinkonzentration der Lösung ermittelt werden.

- Für die Eichgerade wurden Proteinmengen von 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 μ g pro Standard eingesetzt.
- In alle Ansätze und Eichlösungen wurde 1 ml 1:5 verdünnter Bradfordreagenz (Biorad) gegeben.

- Die Ansätze und Eichlösungen wurden für 5 min bei RT inkubiert und in 1 ml Einmal-küvetten überführt.
- Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm mit einem Photometer (Amersham Ultrospec 3100 pro) gemessen.
- Das Photometer errechnete anhand der Eichkurve die Proteinkonzentrationen.

3.2.13 Immunpräzipitation

Bei einer Immunpräzipitation werden Proteinen aus wässrigen Lösungen durch Antikörper präzipitiert. Die Antikörper sind entweder direkt an eine Säulenmatrix aus Agarose oder an Protein-G-Sepharose gebunden. Maus-Antikörper wurden in einem separaten Bindeansatz an das Protein G gebunden, während Kaninchen-Antikörper in das verdünnte Lysat gegeben werden. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend unter denaturierenden Bedingungen mit ihren Interaktionspartnern von der Säule eluiert. Für eine Immunpräzipitation wurde je nach verwendeter Säulenmatrix und verwendetem Antikörpern eine Proteinmenge von 100-1000 μg eingesetzt werden.

Die Versuchsabfolge für die Präzipitation mit einem Kaninchen-Antikörper und Protein-G-Sepharose sah folgendermaßen aus:

- Das Volumen des Proteinextraktes wurde mit dem IP-Puffer (Tabelle unter 3.1.12) auf 800 μl angeglichen. Das Verdünnungsverhältnis des Proteinextraktes betrug dabei mindestens 1:1.
- Zu dem IP-Ansatz wurden 1 μg Antikörper gegeben und der Ansatz anschließend über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator rotiert.
- 40 μl Protein-G-Sepharose „Beads“ wurden durch Zentrifugation (Eppendorf Kühlzentrifuge) für 2 min bei 4 °C und 500*g 4x mit 800 μl IP-Puffer gewaschen.
- Der über Nacht inkubierte IP-Ansatz wurde auf die Protein-G-Sepharose gegeben und für 3 Std. bei 4 °C auf einem Rotator rotiert.
- Der Überstand wurde verworfen und die „Beads“ durch Zentrifugation für 2 min bei 4 °C und 500*g 4x gewaschen.
- Auf die „Beads“ wurden 40 μl 2 x SDS-Page Probenpuffer und 2 μl β -Mercaptoethanol gegeben.
- Der Ansatz wurde für 30 min bei 56 °C in einem Schüttler inkubiert und anschließend für 5 min bei 100 °C gekocht.
- Der gekochte Ansatz wurde für 2 min bei 2000*g zentrifugiert.

3 Material und Methoden

- Der Überstand wurde abgezogen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Das Protokoll für die Präzipitation mit einem Maus-Antikörper und Protein-G-Sepharose sah folgendermaßen aus:

- 40 μl Protein-G-Sepharose „Beads“ wurden durch Zentrifugation (Eppendorf Kühlzentrifuge) für 2 min bei 4 °C und 500*g 4x mit 800 μl IP-Puffer gewaschen.
- Anschließend wurden 500 μl IP-Puffer hinzugegeben.
- Zu den „Beads“ wurden 1 μg Antikörper gegeben und diese für 3 Std. bei 4 °C auf einem Rotator rotiert.
- Die „Beads“ wurden durch Zentrifugation (Eppendorf Kühlzentrifuge) für 2 min bei 4 °C und 500*g 4x mit 800 μl IP-Puffer gewaschen.
- Das Volumen des Proteinextraktes wurde mit IP-Puffer auf 800 μl angeglichen. Das Verdünnungsverhältnis des Proteinextraktes betrug dabei mindestens 1:1.
- Der IP-Ansatz wurde auf die mit dem Antikörper beladene Protein-G-Sepharose gegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator rotiert.
- Alle weiteren Wasch und Elutionsschritte entsprachen denen der IP mit dem Kaninchen-Antikörper.

Das Protokoll für die Präzipitation mit FLAG-Agarose (SIGMA) sah folgendermaßen aus:

- 40 μl der FLAG Agarose wurde durch Zentrifugation (Eppendorf Kühlzentrifuge) für 1 min bei 4 °C und 2000*g 4x mit 1 ml IP-Puffer (abweichend vom Standardpuffer 0,25 % Triton-X100) gewaschen.
- Zwischen jedem Waschschrift wurden die Beads für 10 min mit IP-Puffer inkubiert.
- Das Volumen des Proteinextraktes wurde mit IP-Puffer (0,25 % Triton-X100) auf 1 ml angeglichen. Das Verdünnungsverhältnis des Proteinextraktes betrug dabei mindestens 1:1.
- Der Ansatz wurde auf die gewaschene FLAG-Agarose gegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator rotiert.
- Der Überstand wurde verworfen und die Beads durch Zentrifugation (Eppendorf Kühlzentrifuge) für 1 min bei 4 °C und 2000*g 4x mit 1 ml IP-Puffer (0,25 % Triton-X100) gewaschen.
- Das Eluieren der Proteine von den „Beads“ erfolgte wie bei der Protein-G-Sepharose.

3.2.14 Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode, bei der Proteine im Gel nach Größe aufgetrennt werden. Durch die stark negative Ladung des SDS wird die Eigenladung der Proteine maskiert, so dass die Proteine ausschließlich nach Größe und nicht mehr nach Ladung aufgetrennt werden. Die Methode nach Laemmli (1970) mit Tris-Glycin-SDS als Laufpuffer ist bei Proteinen bis zu einem Molekulargewicht von 5 kDa anwendbar. Kleinere Proteine lassen sich nicht mehr mit entsprechender Effizienz trennen.

Gießen der Gele:

- Als Gelsystem wurde das Protean 3 Mini Gel System und das Criterion-System von Biorad verwendet.
- Für Gradientengele wurden Criterion-Fertiggele verwendet.
- Für die verschiedenen Polyacrylamidkonzentration der Trenngele wurden unter Verwendung der zuvor beschriebenen Puffer (Tabelle unter 3.1.12) und Lösungen folgende Pipettierschema verwendet:

Konzentration [%]	8	10	12	12,5	15	18	20
Tris-HCl (1,5M) pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS (10%)	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
APS (10%)	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Acrylamid (30 %, 29:1)	2,66 ml	3,33 ml	4,0 ml	4,16 ml	4,99 ml	5,98 ml	6,64 ml
Wasser	4,64 ml	3,97 ml	3,29 ml	3,14 ml	2,31 ml	1,32 ml	0,66 ml
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l

- Die hier angegebenen Mengen sind ausreichend für zwei Mini-Gele oder ein Criteriongel.
- Nach dem Mischen wurden die Gellösung in den Gelträger gegossen, mit MilliQ-H₂O überschichtet und für 20 min zum Polymerisieren inkubiert.
- Nach der Polymerisierung wurde das überschüssige H₂O abgegossen.
- Für das 3 % Sammelgel wurde das folgende Pipettierschema verwendet:

Tris-HCl (0,5 M) pH 6,8	2,5 ml
SDS (10 %)	100 μ l
APS (10 %)	100 μ l
Acrylamid (30 %, 29:1)	1 ml
Wasser	6,3 ml
TEMED	10 μ l

- Die angegebenen Mengen sind ausreichend für vier Mini Gele oder zwei Criteriongele.
- Nach dem Vermengen wurde die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen und der Kamm zwischen die Platten des Gelträgers gesetzt.
- Das Gel wurde 30 min zum Polymerisieren inkubiert. Anschließend wurde der Kamm entfernt.

Vorbereitung der Ansätze und PAGE:

- Pro Geltasche wurde eine Proteinmenge von 10 - 20 μ g verwendet.
- Die Probe wurde mit Laemmli-SDS-Probenpuffer (1x Endkonzentration) und β -Mercaptoethanol (10 % Endkonzentration) versetzt und für 5 min bei 100 °C gekocht.
- Die Gele wurden in die Gelapparatur eingesetzt und die Gelkammer mit 1x Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer befüllt. Anschließend wurden die Geltaschen mit Laufpuffer gespült.
- Die Gele wurden mit den gekochten Proben und Proteinmarkern beladen.
- Bei Minigelen wurde eine Spannung von 80 V und an die Criteriongele eine Spannung von 100 V angelegt.
- Nachdem die Proteine das Sammelgel passiert hatten wurde die Spannung bei den Minigelen auf 180 V und bei den Criteriongelen auf 200 V erhöht.
- Die Glasplatten oder die Plastikkassette des Gelträgers wurden nach dem Lauf vorsichtig geöffnet, das Gel entnommen und für einen Western-Blot eingesetzt.

3.2.15 Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Schagger

Im Gegensatz zur Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist die Tris-Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese insbesondere für das Auftrennen von kleineren Proteinen im Molekularbereich von 20 - 1 kDa etabliert (Schagger und v. Jagow, 1987). Dieses wird durch ein bestimmtes Mischungsverhältnis zwischen Acrylamid und Bisacrylamid sowie durch Zugabe von Glycerin oder Ethylenglykol beim Gießen der Gele erreicht. Dadurch wird eine höhere Geldichte

3 Material und Methoden

und Quervernetzung erreicht. Im Gegensatz zur Tris-Glycin-SDS-PAGE verfügen das Sammel- und das Trenngel über den gleichen pH-Wert. Des Weiteren wird ein Tricin- statt glycinhaltiger Gellaufpuffer verwendet.

Gießen der Gele:

	Trenngel 18 %	Sammelgel 3,75 %
Ethylenglykol	3 ml	-
Tris-HCL (3 M) pH 8,45	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid 40 % (19:1)	4,5 ml	-
Acrylamid 30 % (29:1)	-	1,25 ml
MilliQ-H ₂ O	-	6,25 ml
APS	100 μ l	100 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l

- Die angegebenen Trenngelmengen sind für zwei Mini- oder ein Criteriongel und die Sammelgelmengen sind für vier Mini- oder zwei Criteriongele angegeben.
- Bei Gradientengelen wurden 10-20 % Criterion-Tris-Tricin-Fertiggele verwendet.
- Nach dem Vermengen wurde die Trenngellösung in den Gelträger gegossen.
- Die Sammelgellösung wurde direkt auf die Trenngellösung gegossen werden, da sich beide Gellösungen aufgrund des Dichteunterschiedes unter den den gewählten Bedingungen nicht vermischen.
- Anschließend wurde der Kamm sofort zwischen die Platten des Gelträgers eingesetzt.
- Nach 30 min war das Gel polymerisiert und der Kamm konnte gezogen werden.

Vorbereitung der Ansätze und PAGE:

- Pro Geltasche wurde eine Proteinmenge von 20 μ g verwendet.
- Die Probe wurde mit Tris-Tricin-SDS-Probenpuffer (1x Endkonzentration) und β -Mercaptoethanol (10 % Endkonzentration) versetzt und für 5 min bei 100 °C gekocht.
- Die Gele wurden in die Gelapparatur eingesetzt, mit 1x Tris-Tricin-SDS-Laufpuffer befüllt und die Geltaschen anschließend mit Laufpuffer durchspült.
- Die Gele wurden mit den gekochten Ansätzen und Proteinmarkern beladen.

- Bei Minigelen wurde eine Spannung von 80 V und an die Criteriongele eine Spannung von 100 V angelegt.
- Nachdem die Proteine das Sammelgel passiert hatten wurde die Spannung bei den Minigelen auf 180 V und bei den Criteriongelen auf 200 V erhöht.
- Die Glasplatten oder die Plastikkassette des Gelträgers wurden nach dem Lauf vorsichtig geöffnet, das Gel entnommen und für einen Western-Blot eingesetzt.

3.2.16 Western-Blot

Der Western Blot ist ein immunologischer Nachweis zur Detektion spezifischer Proteine, die zuvor durch PAGE aufgetrennt wurden. Dabei werden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran transferiert, wo sie anschließend durch spezifische Bindung von Antikörpern detektiert werden können. In dieser Arbeit wurde die Tank-Blot-Methode angewandt, die von Towbin et al. (1979) entwickelt wurde. Als Blotzelle dienten für Minigele die Biorad Trans-Blot-CellTM und für die Criteriongele der Criterion-BlotterTM. Die eingesetzten primären Antikörper sind in einer Tabelle unter 3.1.10 aufgeführt. Als sekundäre Antikörper wurden Konjugate mit HRP (Meerrettichperoxidase) verwendet (ebenfalls unter 3.1.10). Der Versuchsablauf sah wie folgt aus:

Tank-Protein-Blot:

- Das Whatman-Filterpapier und das Gel wurden in 1x Transferpuffer äquilibriert.
- Die Membran wurde auf 6,5 * 9,5 cm für Mini Gele und 9,5 * 15 cm für Criteriongele zugeschnitten.
- Wurde eine PVDF-Membran verwendet musste diese zunächst in Methanol, danach in MilliQ-H₂O und anschließend in Transferpuffer äquilibriert werden. Bei einer Nitrozellulosemembran wurde nur in MilliQ-H₂O äquilibriert.
- Die Blotapparatur wurde nach folgendem Schema zusammengebaut:

Anode (oben)
Glasfaserpad
4x Whatman-Papier
Membran
Proteingel
4x Whatman-Papier
Glasfaserpad
Kathode (unten)

- Die „Blotsandwiches“ wurden in die Blotzelle und diese wiederum in den Blottank gestellt.
- In den Blottank wurde zur Kühlung ein Eisakku gestellt und der Tank bis zum Rand bzw. Markierung mit Transferpuffer gefüllt.
- Für Proteine von 80 - 30 kDa ist eine Blotzeit von 2 Std. bei 100 V eine gute Durchschnittszeit. Kleinere Proteine wurden kürzer geblottet. 10-20 % Tris-Tricin-Gele wurden immer für 1 Std. bei 100 V geblottet.
- Nach dem Blotvorgang wurde das „Sandwich“ auseinander gebaut und die Membran für die Detektion verwendet.
- Die Waschschrirte unterschieden sich je nachdem ob eine PVDF oder Nitrozellulosemembran verwendet wurde.

3.2.16.1 Immundetektion von Proteinen auf einer PVDF Membranen

- Alle Waschschrirte wurden auf einem Schüttler durchgeführt und wenn nicht anders angegeben bei RT durchgeführt.
- Die Membran wurde für 5 min in MilliQ-H₂O gewaschen.
- Bei Proteinen unter 10 kDa wurde für 20 min mit einer 0,5 % (v/v) Gluteraldehydlösung fixiert. Nach der Fixierung wurde die Membran mit TBS gewaschen bis der Gluteraldehydgeruch verschwunden ist.
- Die Membran wurde mit 5 % Milchpulver in TBS für 1 Std. blockiert.
- Die Membran wurde 3x für 10 min mit TBST gewaschen.
- Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem ersten Antikörper in TBST mit 1,5 % BSA.
- Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde die Membran 3x für 10 min mit TBST mit 2,5 % Milchpulver gewaschen.
- Die Membran wurde für 2 Std. mit dem sekundären Antikörper in TBST mit 2,5 % Milchpulver bei RT inkubiert.
- Nach der Inkubation wurde die Membran 2x für 3 min mit TBS gewaschen.
- Anschließend wurde die Membran 2 mal für 15 min und 1x für 10 min mit TBST gewaschen.
- Zuletzt wurde die Membran 1x mit TBS waschen.
- Der Blot wurde anschließend entwickelt.

3.2.16.2 Immundetektion von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran Membranen

- Alle Schritte wurden auf einem Schüttler und wenn nicht anders angegeben bei RT durchgeführt.
- Die Membran wurde für 5 min in MilliQ-H₂O gewaschen.
- Bei Proteinen unter 10 kDa wurde für 20 min mit einer 0,5 % (v/v) Glutraldehydlösung fixiert. Nach der Fixierung wird die Membran mit TBS gewaschen bis der Glutraldehydgeruch verschwunden ist.
- Die Membran wurde mit 5 % Milchpulver in TBS für 1 Std. blockiert.
- Nach der Blockierung wurde die Membran 3x wenige Sekunden mit MilliQ-H₂O gewaschen.
- Die Membran wurde 3x für 5 min mit TBS gewaschen.
- Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem ersten Antikörper in TBS mit 1,5 % BSA inkubiert.
- Die Membran wurde 3x für 5 min mit TBS mit 2,5 % Milchpulver gewaschen.
- Nach der Inkubation wurde die Membran für 2 Std. mit dem sekundären Antikörper in 2,5 % Milchpulver bei RT inkubiert.
- Die Membran wurde 3x wenige Sekunden mit MilliQ-H₂O gewaschen.
- Anschließend wurde die Membran wird 3x für 5 min mit TBS gewaschen.
- Der Blot wurde anschließend entwickelt.

3.2.16.3 Detektion der Antikörperbindung durch Chemilumineszenz

Die spezifische Bindung des Antikörpers an sein Antigen, kann durch den sekundären Antikörper der über die konjugierte Meerrettichperoxidase verfügt, nachgewiesen werden. Als Substrate dienten hier das Western ECL (Enhanced Chemiluminescence) und bei schwächeren Signalen das Super Signal West Pico Substrat. Das HRP-Konjugat katalysiert hier die Reaktion von Luminol mit Wasserstoffperoxid zu 3-Aminophthalat, welches durch seine Chemilumineszenz nachweisbar ist. Diese Chemilumineszenz kann durch Röntgenfilme oder einen Imager detektiert werden. Für starke Signale wurde der Agfa Cronex 5 Röntgenfilm, für schwächere Signale der Amersham Hyperfilm ECL verwendet. Als Imager diente der Chemostar von INTAS.

- Die beiden Substratlösungen werden 1:1 gemischt.
- Die Membran wurde mit Papiertüchern abgetrocknet und mit der Lösung getränkt.

- Die getränkte Membran wurde zwischen zwei Folien gelegt und deren Chemolumineszenz mit einem Film oder Imager sichtbar gemacht.
- Dabei wurden je nach Film und Stärke des Signals verschiedene Expositionszeiten verwendet.

3.2.16.4 „Strippen“ von PVDF Membranen

Nach der Immundetektion lassen sich von PVDF Membranen Antikörper wieder entfernen, so daß die Membranen erneut für eine Detektion verwenden können. Um dies zu erreichen wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt. Bei der starken „Stripping“-Methode werden die Antikörper durch Reduzieren der Disulfidbrücken mit β -Mercaptoethanol zerstört. Die milde „Stripping“-Methode löst die Antikörper-Antigenbindung in Gegenwart eines niedrigen pH-Wertes. Bei Western-Blots mit geringen Proteinmengen wie IPs und *in vitro* Translationen, wurde das milde „Stripping“ durchgeführt:

starkes „Stripping“:

- Die Membran wurde in der „Stripping“-Lösung für 8 min bei 60 °C inkubiert.
- Nach der Inkubation wurde die Membran mehrmals für 5 min mit TBS gewaschen bis der β -Mercaptoethanolgeruch verschwunden ist.
- Nun wurde die Membran abermals blockiert und für eine weitere Immundetektion verwendet.

mildes „Stripping“:

- Die Membran wurde in der „Stripping“-Lösung für 5 - 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Die Membran wurde nochmals in frischer „Stripping“-Lösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Anschließend wurde die Membran 4 mal für 10 min mit TBS gewaschen.
- Nun wurde die Membran abermals blockiert und für eine weitere Immundetektion verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Konstruktion von Expressionsplasmiden

4.1.1 Klonierung von $I\kappa B\alpha$, RelA (p65) und CSN kodierenden cDNAs in pENTR-Vektoren

Die Interaktionsnachweise zwischen $I\kappa B\alpha$, bzw. RelA und den CSN-Untereinheiten sollten unter anderem durch *in vitro* und ektopisch überexprimierte Varianten dieser Proteine erfolgen. Um dies zu erreichen wurden nach folgendem Schema Expressionsplasmide konstruiert. Die zum offenen Leseraster (ORF) komplementäre DNA (cDNA) für $I\kappa B\alpha$ (*NFKBIA*), RelA (*RELA*) und die CSN-Untereinheiten *COPS1* bis *COPS8* wurde mittels PCR amplifiziert. Als DNA-Matrize dienten hierfür die pcDNA3/pcDNA3.1-Plasmide (*COPS1*, *COPS4*, *COPS5*, *COPS6*, *COPS7A*, *NFKBIA*, *RELA*), die bereits im Labor vorhanden oder freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden (Prof. W. Dubiel, Charité Berlin) bzw. kommerziell (Origene) erworbene pCMV6 Konstrukte (*COPS2*, *COPS3*, *COPS7B*, *COPS8*) (Tabelle unter 3.1.8.3). Zusätzlich wurde den ORFs von *NFKBIA* und *RELA* an das 5' Ende des Primers eine 33 Bp Sequenz angefügt, welche als Markierung („c-Myc-Tag“) zur Aufreinigung diente. Der ORF-Sequenz von *COPS1* bis *COPS8* wurde zum gleichen Zweck um eine 30 Bp kodierende Sequenz („FLAG-Tag“) elongiert. Danach erfolgte eine direktionale „Blunt-End“-Klonierung der PCR-Amplifikate in den pENTRTM-SD/D-TOPO[®]-Vektor (Abb. 4.1) mittels TOPO[®]-Cloning. Die neu konstruierten Plasmide wurden als pENTR-SD-ikba-c-Myc, pENTR-SD-p65-c-Myc und pENTR-SD-CSN1-FLAG bis pENTR-SD-CSN8-FLAG bezeichnet. Neben den für $I\kappa B\alpha$, RelA und CSN1-8 kodierenden ORFs, enthalten die Konstrukte außerdem eine Shine-Dalgarno-Sequenz (SD), sowie eine T7-„Enhancer“-Region (Abb. 4.1). Da den ORFs der jeweiligen Gene „Tag“-codierende Sequenzen hinzugefügt wurden, codieren die Konstrukte für Fusionsproteine mit einer N-Terminale c-Myc- oder FLAG-Markierung. Der DNA-Abschnitt (T7-„Enhancer“-Region, SD, ORF des jeweiligen Gens) ist im pENTRTM-SD Vektor zwischen den zwei „Attachment-Sides“ (*attL1* und *attL2*), die eine Subklonierung dieses Bereichs durch die Gateway[®]-Klonierung ermöglichen, lokalisiert. Des Weiteren ermöglichen die M13-Primer-Bindestellen des pENTRTM-SD Plasmids, eine anschließende Verifizierung der DNA-Sequenz durch Kontrollsequenzierung, eine Methode die neben der DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen stets angewandt wurde.

4 Ergebnisse

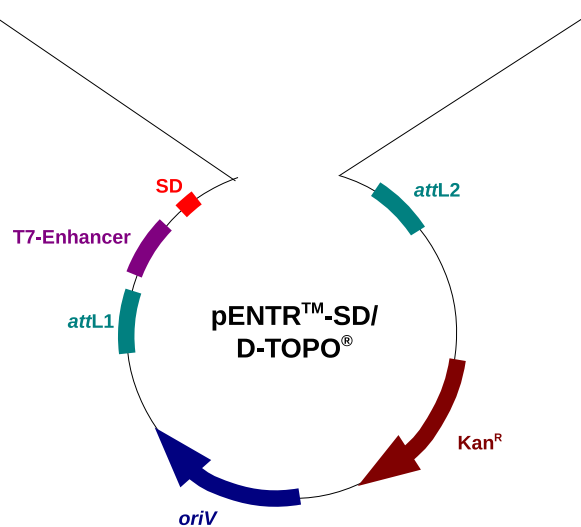
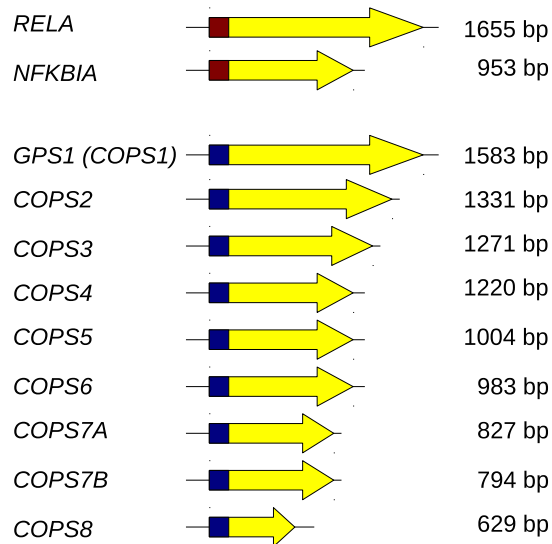


Abb. 4.1: Klonierungsschema von *NFKBIA*, *RELA* und *COPS1* - *COPS8* cDNA-ORFs in den pENTRTM-SD/D-TOPO[®]-Vektor. Die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide tragen zwei „Attachment-Sites“ (*attL1* und *attL2*), zwischen denen sich die T7-„Enhancer“-Region, eine Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) und der um eine c-Myc oder FLAG codierende Sequenz verlängerte cDNA-ORF befindet. Das Plasmidrückgrad enthält eine Kanamycinresistenz (Kan^R) und einen *E. coli* Replikationsursprung (*oriV*).

4.1.2 Subklonierung von $I\kappa B\alpha$, RelA und CSN codierenden cDNAs zur Expression in *E. coli* und *in vitro* Transkription / Translation

Die Ziel-DNA-Abschnitte der Donorvektoren pENTR-SD- $I\kappa B\alpha$ -c-Myc, pENTR-SD-p65-c-Myc und pENTR-SD-CSN1-FLAG bis pENTR-SD-CSN8-FLAG Plasmide wurden durch die Gateway[®]-Klonierung in den Rezipientenvektor pDEST14 kloniert. Durch LR-Rekombination fand dabei ein Austausch der Region zwischen den „Attachment-Sites“ *attL1* und *attL2* auf dem pENTR-Plasmid und der Region zwischen *attR1* und *attR2* auf dem pDEST14-Vektor statt (Abb. 4.2). Der Erfolg der Rekombination wurde jeweils mittels einer DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen verifiziert. Die neu entstandenen pDEST14-Derivate wurden wie folgt bezeichnet: pDEST14- $I\kappa B\alpha$ -c-Myc, pDEST14-p65-c-Myc und pDEST14-CSN1-FLAG bis pDEST14-CSN8-

FLAG (Tabelle unter 3.1.8.1). Neben der Zielsequenz des c-Myc bzw. FLAG-markierten Fusionsproteins, tragen die Plasmide eine für die Expression in *E. coli* notwendigen T7-Promotor, die T7-„Enhancer“-Region und die für die Bindung an prokaryotische Ribosomen erforderliche SD. Die korrekte Expression des markierten Proteins wurde anhand einer Überexpression in *E. coli* mit anschließendem Western-Blot überprüft. Zur Anwendung kamen diese Plasmide in einem *in vitro* Transkriptions- / Translationssystem, welches auf aus *E. coli* aufgereinigten Komponenten basiert und den damit verbundenen Interaktionsstudien.

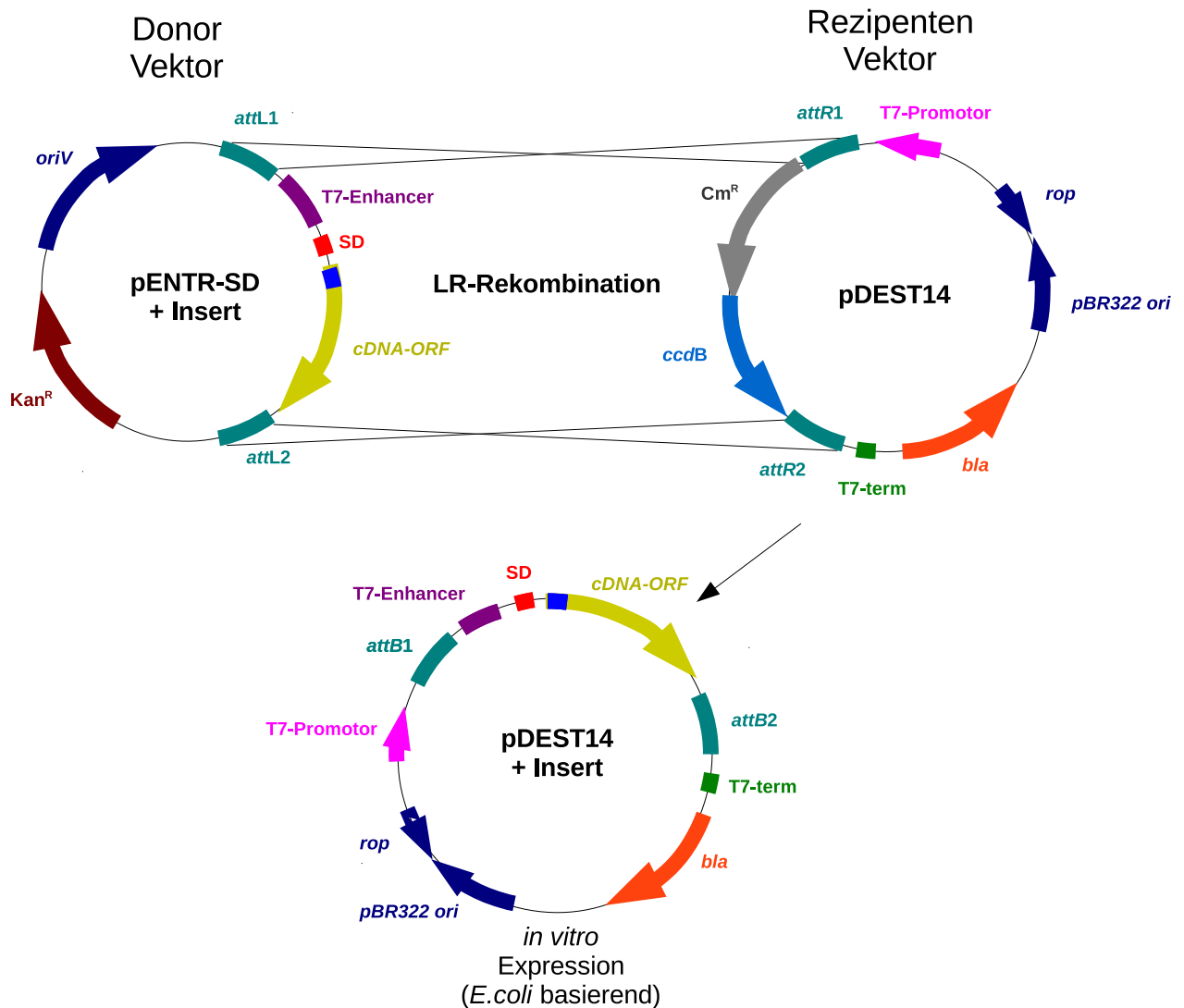


Abb. 4.2: Klonierungsschema für *NFKBIA*, *RELA* und *COPS1 - COPS8* vom pENTR-Donor-Vektor in den pDEST14-Rezipienten-Vektor. Die konstruierten Plasmide tragen jeweils zwei „Attachment-Sites“ (*attB1* und *attB2*) zwischen denen sich die jeweilige Ziel-DNA mit der T7-„Enhancer“-Region, einer Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) und den um die c-Myc- oder FLAG-„Tag“ codierende Sequenz ergänzten cDNA-ORF. Zur Expression in *E. coli* befindet sich vor den „Attachment-Sites“ der T7-Promotor und hinter diesen der T7-Terminator. Auf dem Plasmidrückgrad sind des Weiteren ein β-Lactamasegen (*bla*) für Ampicillinresistenz, sowie für die Replikation in *E. coli*, der *rop* ORF und der pBR322 Replikationsursprung lokalisiert.

4.1.3 Subklonierung von $I\kappa B\alpha$, RelA und CSN codierenden cDNAs zur Expression in HeLa-Zellen

Die Ziel-DNA-Sequenz der Donorplasmide pENTR-SD-ikba-c-Myc, pENTR-SD-p65-c-Myc und pENTR-SD-CSN1-FLAG - pENTR-SD-CSN8-FLAG wurden durch Gateway[®]-Klonierung in den pcDNATM3.2-V5-DEST-Rezipientenvektor kloniert. Durch LR-Rekombination fand dabei ein Austausch der Region zwischen den „Attachment-Sites“ *attL1* und *attL2* des pENTR-Plasmids und zwischen *attR1* und *attR2* des pcDNATM3.2-V5-DEST-Vektors statt. Eine erfolgreiche Rekombination wurde mittels einer DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen verifiziert. Die neu entstandenen pcDNA3.2-Derivate wurden mit den Bezeichnungen pcDNA3.2-ikba-c-Myc, pcDNA3.2-p65-c-Myc und pcDNA3.2-CSN1-FLAG - pcDNA3.2-CSN8-FLAG versehen (Tabelle unter 3.1.8.3). Für die Expression in Säugerzellen tragen die Plasmide den

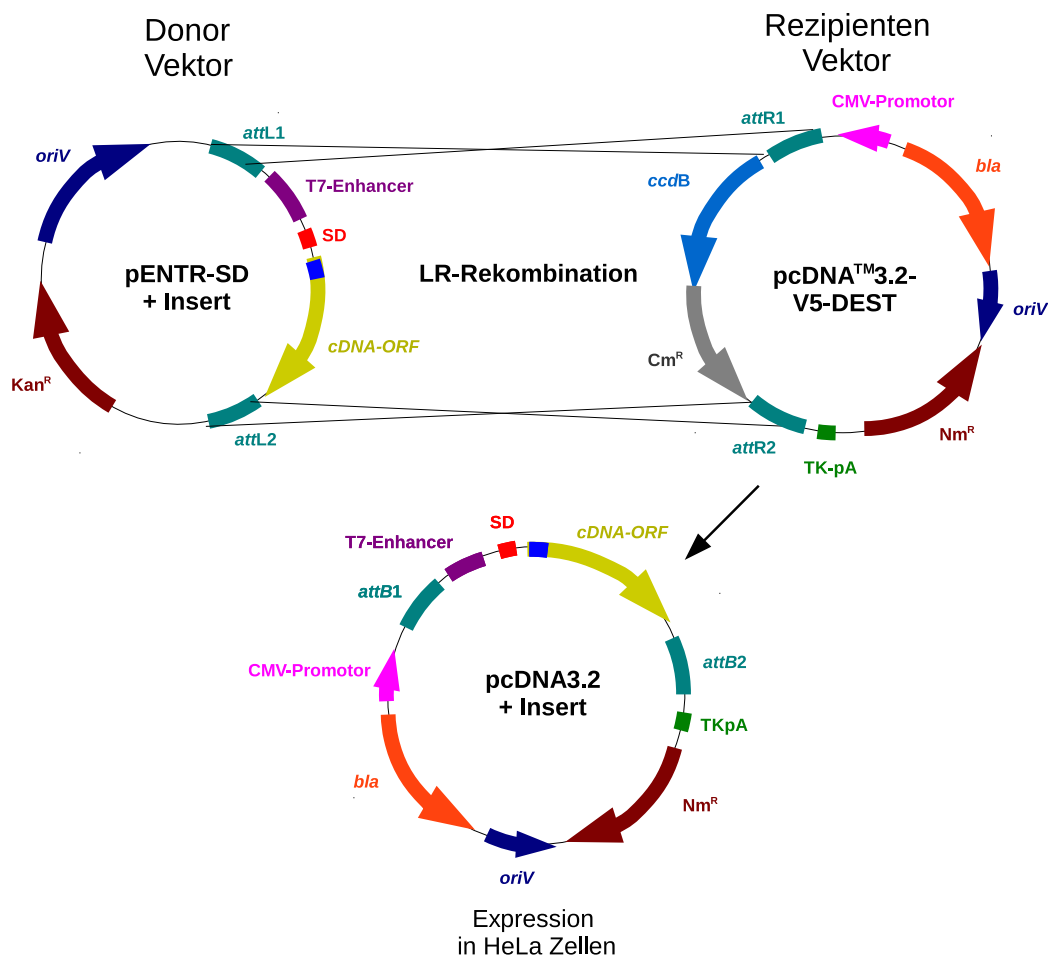


Abb. 4.3: Klonierungsschema für *NFKBIA*, *RELA* und *COPS1* - *COPS8* vom pENTR-Donorvektor in den pcDNATM3.2-V5-DEST-Rezipientenvektor. Die konstruierten Plasmide tragen jeweils zwei „Attachment-Sites“ (*attB1* und *attB2*) zwischen denen die jeweilige Ziel-DNA mit der T7-„Enhancer“-Region und mit der c-Myc- oder FLAG-Sequenz markierten cDNA-ORF liegt. Zur Expression in Säugerzellen befindet sich vor den „Attachment-Sites“ der CMV-Promotor und hinter diesen die TK-pA Region für die Polyadenylierung. Auf dem Plasmid-Rückrad sind des Weiteren ein β -Lactamasegen *bla*, welches Ampicillinresistenz in *E. coli* vermittelt, ein Neomycinresistenzgen mit dem eukaryotischen SV40 Promotor (*Nm^R*) und der pUC *E. coli* Replikationsursprung (*oriV*) lokalisiert.

CMV-Promotor, die T7-„Enhancer“-Region, die jeweilige Ziel-DNA-Sequenz mit c-Myc- bzw. FLAG-Markierung und die TK-pA-Region zur Polyadenylierung. Das 3'-terminal lokalisierte Stop-Codon verhindert die Translation der C-terminalen „V5-Tag“-Sequenz. Die Plasmide sind zur Überexpression in Säugerzelltypen in denen der CMV-Promotor aktiv ist geeignet und kamen in dieser Arbeit bei den Interaktionsstudien in den HeLa-Zellen zum Einsatz. Die Plasmide wurden ebenfalls in HeLa-Zellen auf korrekte Expression des Fusionsproteins getestet.

4.1.4 Klonierung von $I\kappa B\alpha$ -Deletionskonstrukten für *in vitro* Transkription / Translation

Um trunkierte Varianten von $I\kappa B\alpha$ *in vitro* exprimieren zu können, wurden entsprechende Expressionskonstrukte erstellt. Dazu wurden mittels spezifischer PCR von *NFKBIA* trunkierte cDNA-ORFs mit einer 5' c-Myc-Markierung und einem 3' Stop-Codon generiert. Diese wurden anschließend durch TOPO[®]-Cloning in den pENTRTM-SD/D-TOPO[®] kloniert. Danach erfolgte eine Gateway[®]-Klonierung der Region zwischen den „Attachment-Sites“ in den pDEST14 Vektor. Eine erfolgreiche Klonierung wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Es wurden insgesamt sieben Deletionsmutanten von $I\kappa B\alpha$ erstellt (Tabelle unter 3.1.8.2), wobei die erste $I\kappa B\alpha$ Mutante (ΔC -Term) nur den Bereich vom N-Terminus bis zum Ende der sechs Ankyrin-„Repeats“ (1-287 AS) enthält. Die darauf folgenden fünf Mutanten wurden immer jeweils um einen weiteren Ankyrin-Repeat (AS 1-245, AS 1-211, AS 1-172, AS 1-139, AS 1-103) deletiert. Die siebte Mutante, kodiert ausschließlich für den N-Terminus (AS 1-73).

4.1.5 Klonierung von RelA-Deletionsmutanten für die *in vitro* Transkription / Translation mit C-terminaler und interner Deletion

Mittels genspezifischer PCR wurden von *RELA* trunkierte cDNA Amplifikate mit 5' c-Myc-Markierung und 3' Stop-Codon generiert. Die trunkierten cDNA-ORFs wurden anschließend durch TOPO[®]-Cloning in den pENTRTM-SD/D-TOPO[®]-Vektor kloniert. Danach erfolgte eine Gateway[®]-Klonierung der Region zwischen den „Attachment-Sites“ in den pDEST14-Rezipientenvektor.

Für die interne Deletion in der RHD von RelA, wurde das pDEST14-p65-c-Myc Plasmid ohne die für Aminosäuren 38-259 kodierende Region mittels PCR amplifiziert. Durch die anschließende Zirkularisierung des PCR Produktes mittels „Blunt-End“ Ligation, wurde das Expressionsplasmid pDEST14-p65-c-Myc Δ 38-259 generiert (Tabelle unter 3.1.8.2). Eine erfolgreiche Klonierung wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert. Es wurden insgesamt vier Deletionsmutanten von RelA erstellt, wobei die erste RelA-Mutante ($\Delta TA1$) nur um die TA1-Domäne trunkiert wurde, wodurch der Bereich von AS 1-521 erhalten bleibt. Der zweiten RelA-Variante ($\Delta TA1/TA2$) fehlt neben der TA1- auch die TA2-Domäne, so dass nur

noch die Region 1-428 erhalten blieb. Die dritte Mutante (Δ TA1/TA2/link) besteht nur aus der RHD (AS 1-306). Im Fall der vierten Mutante enthält die RHD die bereits beschriebene interne Deletion AS 38-259.

4.1.6 Konstruktion der Plasmide für die *in vitro* Expression von CSN1 und CSN8 Mutanten mit N-terminalen und C-terminalen Deletionen

Die Konstruktion der CSN1 und CSN8 Expressionsplasmide mit C-terminalen Deletionen war methodisch mit den Konstruktionen der $I\kappa B\alpha$ und RelA-Deletionsmutanten vergleichbar. Es wurden mittels einer genspezifischen PCR trunkierte cDNA-Amplifikate von *COPS1_1* und *COPS8* erstellt, die zusätzlich mit einer 5' FLAG-Markierung und einem 3' Stop-Codon versehen wurden. Diese PCR-Amplifikate wurden wiederum durch TOPO[®]-Cloning in den pENTRTM-SD/D-TOPO[®] und im nächsten Schritt, durch die Gateway[®]-Klonierung in den pDEST14-Vektor kloniert.

Von der *COPS8* cDNA wurde zusätzlich ein weiteres Konstrukt erstellt. Der für die CSN8-PCI-Domäne codierende Bereich wurde separat mit einer für eine N-terminale FLAG-Markierung codierenden Sequenz am 5' Ende des Primers in den pENTRTM-SD/D-TOPO[®] und anschließend in den pDEST14-Vektor kloniert. Eine erfolgreiche Klonierung wurde mittels DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen und Sequenzierung verifiziert.

Es wurden zwei CSN1 und drei CSN8 Deletionsvarianten erstellt (Tabelle unter 3.1.8.2). Die erste CSN1-Mutante (AS 1-461) wurde um die C-terminale Region verkürzt, die zweite CSN1-Mutante zusätzlich noch um die PCI-Domäne (AS 1-361). Bei der ersten CSN8-Mutante (AS 1-151) ist nur die C-terminale Region deletiert, während bei der zweiten Mutante (AS 1-67) zusätzlich die PCI-Domäne deletiert wurde. Die dritte Mutante (AS 68-151) besteht nur aus der PCI-Domäne, während alle anderen Bereiche vor und hinter der PCI-Domäne deletiert wurden.

4.2 Interaktion von $I\kappa B\alpha$ mit dem CSN-Komplex

Für diese Versuchsreihe wurden HeLa-Zellen auf 10 cm Schalen kultiviert und 15 Std. unter Serum-reduzierten Bedingungen inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation der Zellen mit dem Proteasominhibitor MG132 und anschließend eine Stimulation mit $TNF\alpha$. Die Zellen wurden lysiert und zytosolische und nukleäre Proteinfraktionen erstellt. Nach einer $I\kappa B\alpha$ -Immunpräzipitation (IP) aus den zytosolischen Fraktionen, erfolgte die Detektion der potentiellen Interaktionspartner mittels CSN3 und CSN5 Western-Blot unter Verwendung von CSN3 und CSN5 spezifischen Antikörpern. Da beide Untereinheiten Bestandteil des CSN sind, sollte der Nachweis dieser Untereinheiten eine Kopräzipitation des gesamten CSN-Komplex indizieren. Als Kontrollen wurden zusätzlich die Lysate beider Fraktionen mittels Western-Blot analysiert (Abb. 4.4). Eingesetzt wurden hier Antikörper gegen CSN3, CSN2, $I\kappa B\alpha$ und ERK1/2, wobei die Detektion von ERK1/2 als Ladekontrolle diente.

4 Ergebnisse

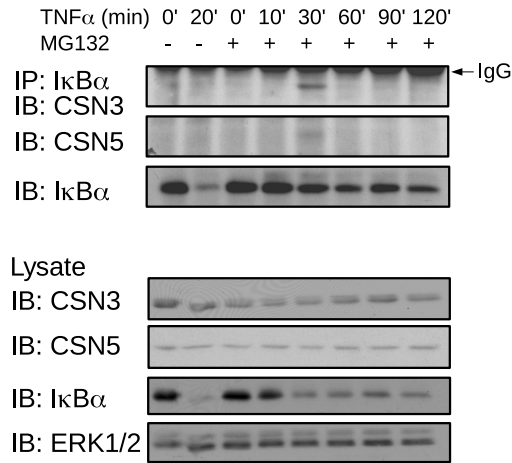


Abb. 4.4: Interaktion von I κ B α mit dem CSN-Komplex. HeLa-Zellen wurden für 1 Std. mit MG132 inkubiert und für die angegebenen Zeiträume mit TNF α stimuliert. Anschließend wurden die zytosolischen und nukleären Proteine extrahiert. Die zytosolischen Fraktionen dienten als Ausgangsmaterial für die I κ B α -Immunpräzipitation (IP), deren Überstände durch Western-Blots (IB) mit den angegebenen Antikörpern analysiert wurden. Als Kontrollen wurden die bei der IP eingesetzten zytosolischen Extrakte durch Western-Blots mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Die Analyse der nukleären Lysate ist nicht dargestellt.

Die Analyse der Immunpräzipitate ergab, dass der CSN-Komplex transient mit I κ B α interagiert. Nach 30 min Stimulation der Zellen mit TNF α , konnte mittels Western-Blots, sowohl mit gegen CSN3, als auch mit gegen CSN5 gerichteten Antikörpern, eine Interaktion des CSN I κ B α mit nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt wäre ohne Verwendung des MG132-Inhibitors, I κ B α vollständig proteasomal degradiert, worauf die *de novo* Synthese von I κ B α beginnen würde. Im dargestellten Experiment hatte die Degradation von I κ B α aufgrund der vorherigen Inkubation mit dem Proteasominhibitor nur in geringem Ausmaß stattgefunden. Bei der Kontrolle ohne Inhibitor war 20 min nach TNF α -Stimulation eine Verminderung der Ausbeute an I κ B α durch proteasomale Degradation zu beobachten („Lane 2“). Allerdings schützt der Proteasominhibitor I κ B α nicht komplett vor der Degradation, denn zu späteren Stimulationszeitpunkten, war eine partielle I κ B α Degradation zu beobachten, die sich auch auf die Menge an präzipitierten I κ B α auswirkte.

Die Ladekontrollen der Lysate zeigten zusätzlich, dass die Menge an CSN3 und CSN5 in den zytosolischen Fraktionen vergleichbar ist und sich durch die Behandlung mit MG132 und Stimulation mit TNF α nicht verändert. Die nahezu vergleichbare Menge an ERK1 und ERK2 in den analysierten Ansätzen lässt auf eine gleichmäßige Beladung des Gels schließen.

Da nun die Existenz einer Interaktion zwischen I κ B α und dem CSN-Komplex mit endogenen Proteinen gezeigt wurde, soll diese nun *in vitro* genauer charakterisiert werden. Dazu wurden c-Myc markiertes I κ B α und FLAG markierte CSN-Untereinheiten *in vitro* exprimiert. Als Matrizen-DNA für die *in vitro* Expression dienten die bereits unter 4.1.1. beschriebenen Plasmide pDEST14-CSN1-FLAG - pDEST14-CSN8-FLAG, sowie pDEST14-ikba-c-Myc. Nach der *in vitro* Expression wurde je eine CSN-Untereinheit mit c-Myc-I κ B α kombiniert und für 1 Std.

bei 37 °C zusammen inkubiert. Die Inkubation der beiden Interaktionspartner wurde im *in vitro* Expressionspuffer durchgeführt, einem komplexen Puffer, der zelluläre Bedingungen simulieren soll (Shimizu et al., 2001). Ein Teil des Expressionsansatzes wurde als Expressionkontrolle verwendet. Im Anschluß an die Inkubation folgte die Immunpräzipitation von c-Myc-I κ B α . Die immunpräzipitierten Proteine wurden daraufhin mit einem FLAG-CSN-Western-Blot analysiert. Bei CSN1 und CSN7 sind jeweils beide Isoformen berücksichtigt worden (Abb. 4.5). Der FLAG-CSN-Blot der Immunpräzipitation zeigte starke Interaktion bei CSN1 und CSN3. Bei den anderen Untereinheiten war keine oder nur eine sehr schwache Interaktion festzustellen. Da CSN1 und CSN3 mit I κ B α effizient kopräzipitiert wurden, kann man annehmen dass zwischen I κ B α und beiden CSN-Untereinheiten *in vitro* eine Interaktion stattfindet. In den Kontroll-IPs ohne IP-Antikörper an der Säulenmatrix war keine Kopräzipitation mit den CSN-Untereinheiten nachweisbar, wodurch eine unspezifische Bindung der CSN-Untereinheiten an die Säulenmatrix ausgeschlossen werden kann. Der c-Myc-I κ B α Blot der IPs zeigte, dass die Effizienz des c-Myc-„Pulldowns“ in allen Ansätzen vergleichbar war. Die zur Kontrolle aufgetragenen *in vitro* Translationsansätze ergaben, dass alle CSN-Untereinheiten mit Ausnahme von

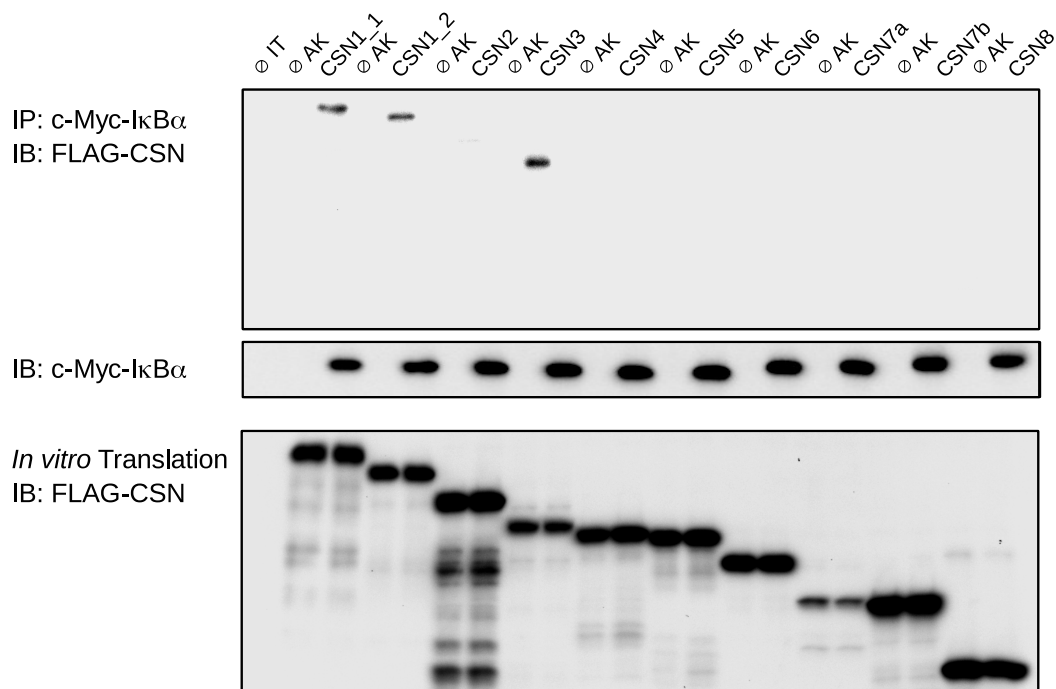


Abb. 4.5: *In vitro* Interaktion von I κ B α mit den Untereinheiten des CSN-Komplexes. c-Myc-I κ B α und die FLAG markierten CSN-Untereinheiten wurden *in vitro* mit den pDEST14-ikba-c-Myc bzw. pDEST14-CSN1 - CSN8-FLAG Konstrukten synthetisiert. Je eine CSN-Untereinheit ist mit c-Myc-I κ B α kombiniert und für 1 Std. bei 37 °C inkubiert worden. Der *in vitro* Translationsansatz, diente als Ausgangsmaterial für die Immunpräzipitation (IP) mit dem c-Myc-Antikörper (Kaninchen), deren Überstände durch Western-Blots (IB) mit FLAG- und c-Myc-Antikörper (Maus) analysiert wurden. Zusätzlich wurde noch ein IP-Ansatz ohne *in vitro* Translation (IT) und ohne Antikörper (AK) an der Säule aufgetragen. Als Kontrollen wurden die bei der IP eingesetzten *in vitro* Translationsansatz mittels Western-Blot mit dem FLAG-Antikörpern analysiert. Die \emptyset AK „Lane“ repräsentiert immer die CSN-Untereinheit der nachfolgenden „Lane“.

CSN7a effizient exprimiert wurden. Der Grund für die geringe Expressionseffizienz von CSN7a dürfte unter anderem an der hohen Zahl an seltenen Codons liegen, die der *COPS7A*-ORF aufweist. Das Verhältnis der verschiedenen Aminoacyl-t-RNAs in diesem *in vitro* Translations-system richtet sich nach dem von *E. coli*, wodurch bestimmte Codons die in Säugerzellen häufig, in *E. coli* jedoch selten verwendet werden nicht so effizient translatiert werden.

Im Anschluss sollte die *in vitro* identifizierten Interaktionen zwischen $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und den CSN-Untereinheiten CSN1 und CSN3 unter zellulären Bedingungen in HeLa-Zellen bestätigt werden. Das sollte durch ektopische Überexpression von T7 markiertem $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und FLAG oder T7 markierten CSN1 bzw. CSN3 erreicht werden. Die HeLa-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80 % mit 5 μg des jeweiligen DNA-Gemisches, in drei verschiedenen Kotransfektionsreihen transfiziert. Für pcDNA3.1-CSN1_1 und pcDNA3-ikba-His/T7 wurden beide Plasmide im Verhältnis 2,5 : 2,5 μg , für pcDNA3-CSN1_2-FLAG und pcDNA3-ikba-His/T7 ebenfalls 2,5 : 2,5 μg und für pCMV6-CSN3-c-Myc/FLAG und pcDNA3-ikba-His/T7 3 : 2 μg transfiziert. Nach anschließender RIPA-Lyse wurde von der CSN1_1-Reihe eine $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und von den CSN1_2 und CSN3 Reihen eine FLAG-Immünpräzipitation durchgeführt. Die jeweils hypothisch interagierende CSN-Untereinheit sollte daraufhin durch Western-Blots nachgewiesen werden.

Die Versuchsreihe mit der längeren CSN1-Isoform (CSN1_1) in Abb. 4.6A zeigte gemäß der T7- und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Blots der IPs, dass eine Interaktion zwischen $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und CSN1_1 auch unter zel-

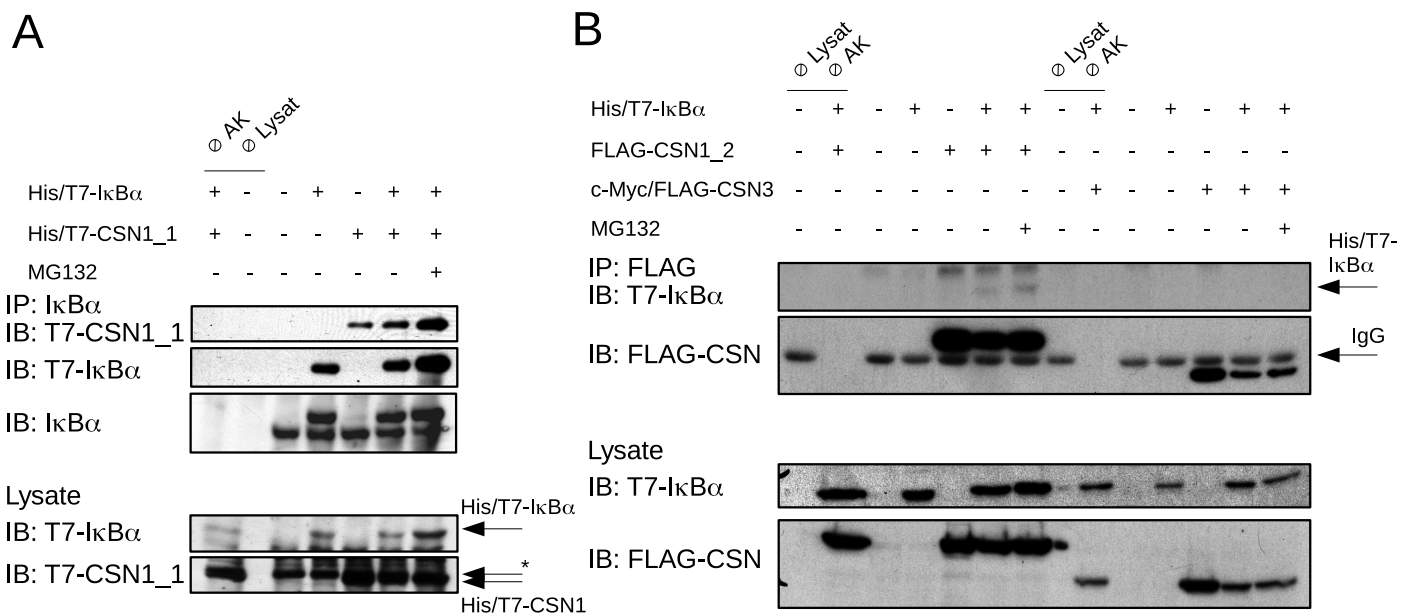


Abb. 4.6: Interaktion von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mit CSN1 und CSN3 in HeLa-Zellen. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ wurde durch transiente Transfektion in HeLa-Zellen zusammen mit CSN1 bzw. CSN3 ektopisch überexprimiert. Transfiziert wurden die Plasmide pcDNA3-ikba-His/T7, pcDNA3.1-CSN1_1, pcDNA3-CSN1_2-FLAG und pCMV6-CSN3-c-Myc/FLAG. Nach der RIPA-Zellyse wurde eine $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Immünpräzipitation (IP) (A) bzw. eine FLAG-CSN1_2 und eine FLAG-CSN3 IP (B) durchgeführt. Die Analyse der Immünpräzipitate und Zelllysate erfolgte durch eine Detektion der hypothetischen Interaktionspartner im Western-Blot (IB) mittels der angegebenen Antikörper (AK). Zusätzlich wurde noch je ein IP-Ansatz ohne Lysat und ohne AK an der Säule und eine mit nichttransfizierten HeLa-Zellen aufgetragen. (*) Unspezifisches Blot-Signal

lulären Bedingungen stattfindet, da in beiden Blots His/T7- $I\kappa B\alpha$ nachgewiesen werden konnte. Zudem ist ersichtlich, dass der Kontrollansatz, ohne ektopisch überexprimiertes $I\kappa B\alpha$ ebenfalls eine Interaktion zeigte, was durch endogenes mit ektopisch überexprimierten CSN1_1 wechselwirkenden $I\kappa B\alpha$ erklärt werden kann. Des Weiteren erhöhte der MG132-Inhibitor die Menge an ektopisch überexprimierten $I\kappa B\alpha$ und CSN1, was natürlich eine höhere IP-Effizienz und dementsprechend eine stärkere Interaktion zur Folge hatte.

Die zweite CSN1-Isoform zeigte eine vergleichbare Situation in Abb. 4.6B. Beim T7- $I\kappa B\alpha$ -Blot der CSN1_2 IPs war ebenfalls eine Interaktion nachzuweisen, was verdeutlicht dass auch die kürzere CSN1-Variante in HeLa-Zellen mit $I\kappa B\alpha$ interagiert. Zudem war bei der Inkubation mit MG132 bei FLAG-CSN1_2 ein vergleichbarer Effekt wie bei His/T7-CSN1_1 zu beobachten. Nach einem CSN3-„Pulldown“ konnte hingegen keine Interaktion mit $I\kappa B\alpha$ nachgewiesen werden. Auch bei verlängerten Expositionszeiten und höherer Antikörperkonzentrationen, konnte keine Interaktion nachgewiesen werden. Auch eine Versuchsreihe mit dem $I\kappa B\alpha$ -Antikörper, der deutlich sensitiver ist als der T7-Antikörper, zeigte ebenfalls keine positive Interaktion (Daten nicht gezeigt). Abschließend sei noch zu erwähnen, dass gemäß der Lysatkontrollen bei allen drei Interaktionsansätzen die ektopische Überexpression erfolgreich war. Ebenso ist auch zu erwähnen, dass bei den Negativkontrollen, speziell bei denen wo kein Antikörper an die Säulenmatrix gebunden war, keine Kopräzipitation nachweisbar waren, wodurch eine unspezifische Wechselwirkung mit der Säulenmatrix ausgeschlossen werden kann.

Nachdem die $I\kappa B\alpha$ /CSN1-Interaktion sowohl *in vitro* als auch unter zellulären Bedingungen nachgewiesen wurde, sollte nun für die Interaktion verantwortliche Bindedomäne bestimmt werden. Zunächst wurden $I\kappa B\alpha$ und trunkierte Varianten von CSN1 *in vitro* exprimiert. Als DNA-Matrize dienten pDEST14- $ikba$ -c-Myc und pDEST14-CSN1_1-FLAG-Plasmide mit den unter 4.1.6 aufgeführten Deletionen. Nach *in vitro* Expression von c-Myc- $I\kappa B\alpha$ und FLAG-CSN1 wurden beide Ansätze miteinander für 1 Std. bei 37 °C im Expressionspuffer inkubiert. Ein Teil des Ansatzes wurde zur Expressionsanalyse aufgehoben. Anschließend erfolgte eine Immunpräzipitation von c-Myc- $I\kappa B\alpha$ durch den c-Myc-Antikörper. Als Negativkontrolle diente ein Interaktionsansatz mit c-Myc- $I\kappa B\alpha$ und FLAG-CSN4 (Abb. 4.7), da sich in den vorherigen Experimenten gezeigt hatte, dass diese nicht miteinander interagieren. Zudem liegt das Molekulargewicht von CSN4 in einer Größenordnung, in der eine Analyse zusammen mit $I\kappa B\alpha$ den CSN1-Deletionen möglich ist. Bei anderen Interaktionspartnern wurden daher andere Kontrollen verwendet. FLAG-CSN1, bzw. bei der Negativkontrolle FLAG-CSN4, wurde anschließend mittels eines Western-Blot der Immunpräzipitate mit dem FLAG-Antikörper detektiert.

Der FLAG-CSN-Western-Blot der Immunpräzipitate zeigte, dass FLAG-CSN1 solange keine Deletionen vorhanden sind, mit c-Myc- $I\kappa B\alpha$ interagiert (Abb. 4.7). Wurden jedoch die 66 C-terminalen Aminosäuren deletiert, war nur noch eine geringe Restinteraktion messbar. Durch eine zusätzliche Deletion der PCI-Domäne, konnte keine weitere Änderung des Interaktionsverhaltens beobachtet werden, so dass sich vermuten lässt, dass die C-terminale Region von CSN1 essentiell für eine effiziente Protein-Protein-Interaktion zwischen CSN1 und $I\kappa B\alpha$ ist. Bei der Negativkontrolle mit CSN4 statt CSN1 konnte keine Interaktion nachgewiesen werden.

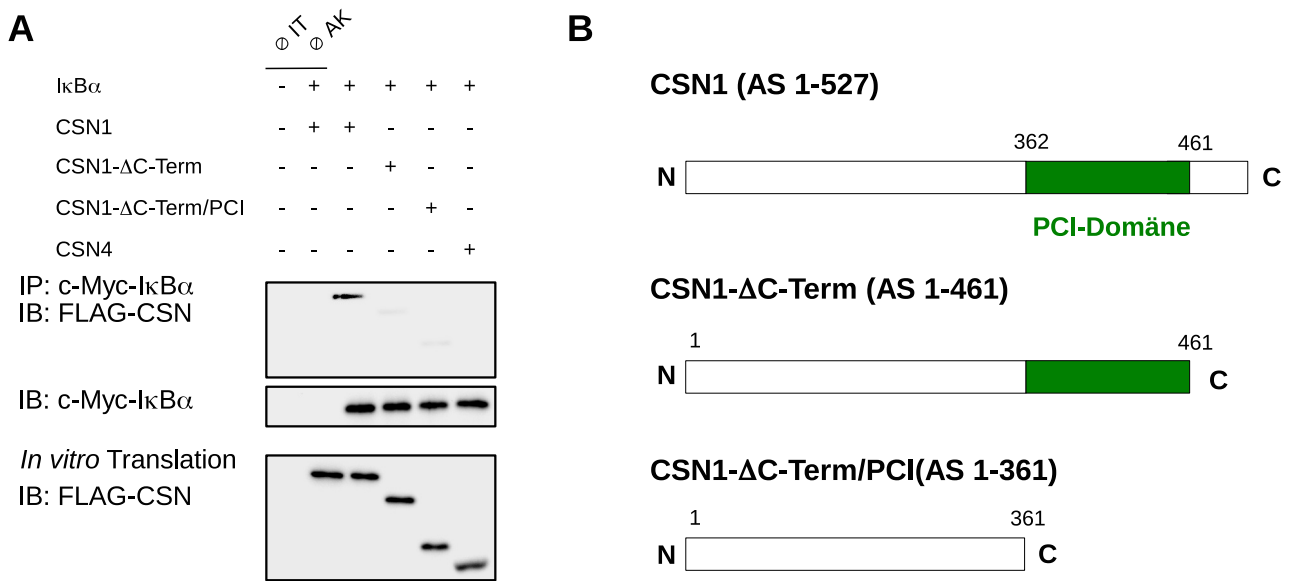


Abb. 4.7: Interaktion von I κ B α mit dem CSN1 C-Terminus. Die Proteine c-Myc-I κ B α und das vollständige FLAG-CSN1, bzw. die FLAG-CSN1-Deletionsmutanten wurden *in vitro* von dem Plasmiden pDEST14-ikba-c-Myc, pDEST14-CSN1-FLAG und den pDEST14-CSN1-FLAG-Deletionsplasmiden exprimiert und anschließend für 1 Std. bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde FLAG-CSN1 durch FLAG-CSN4 ersetzt. **(A)** Von allen Ansätzen wurde eine Immunpräzipitation (IP) mit dem c-Myc-Antikörper (Kaninchen) durchgeführt und deren Immunpräzipitate mit dem FLAG-Antikörper und dem c-Myc-Antikörper (Maus) im Westernblot (IB) analysiert. Als Kontrollen wurden die bei der IP eingesetzten *in vitro* Translationsansätze mittels Western-Blot mit den FLAG-Antikörpern analysiert. Zusätzlich wurde noch ein IP-Ansatz ohne *in vitro* Translation (IT) und ohne Antikörper (AK) an der Säulen aufgetragen. **(B)** Schematische Darstellung der in den Experimenten eingesetzte CSN1-Deletionsmutanten

Der c-Myc-I κ B α -Blot der Immunpräzipitate zeigte, dass die Effizienz der Immunpräzipitation bei allen Ansätzen vergleichbar war. Auch ist die Expressionseffizienz des „Wildtyp“ und der CSN1-Mutanten vergleichbar. Sämtliche Resultate dieses Versuches waren reproduzierbar, insbesondere auch das Verhältnis der spezifischen Interaktion des vollständigen CSN1 und der Restinteraktion der trunkierten CSN1-Mutanten.

Nachdem die Interaktionsdomäne seitens CSN1 identifiziert wurde, sollte im Folgenden die interagierende Domäne von I κ B α ermittelt werden. Dies erfolgte wie schon zuvor, durch *in vitro* Interaktionsstudien. FLAG-CSN1 und trunkierte Varianten von c-Myc-I κ B α wurden *in vitro* exprimiert. Als DNA-Matrize dienten pDEST14-ikba-c-Myc Plasmide unter 4.1.4 aufgeführten Deletionen. Nach der Synthese wurden beide Interaktionspartner für 1 Std. bei 37 °C im Expressionspuffer inkubiert. Ein Teil des *in vitro* Translationsansatzes wurde anschließend als Expressionskontrolle verwendet. Zudem wurde als Negativkontrolle in einer Probe FLAG-CSN1 durch FLAG-CSN7b ersetzt. Aufgrund des geringen Molekulargewichtes der c-Myc-I κ B α -Deletionsmutanten, fiel die Wahl auf CSN7b als Negativkontrolle. Diese Interaktionsansätze wurden durch c-Myc-Immunpräzipitation, und anschließend mittels eines FLAG-CSN-Western-Blot analysiert (Abb. 4.8). Wegen des geringen Molekulargewichtes der c-Myc-I κ B α Mutanten,

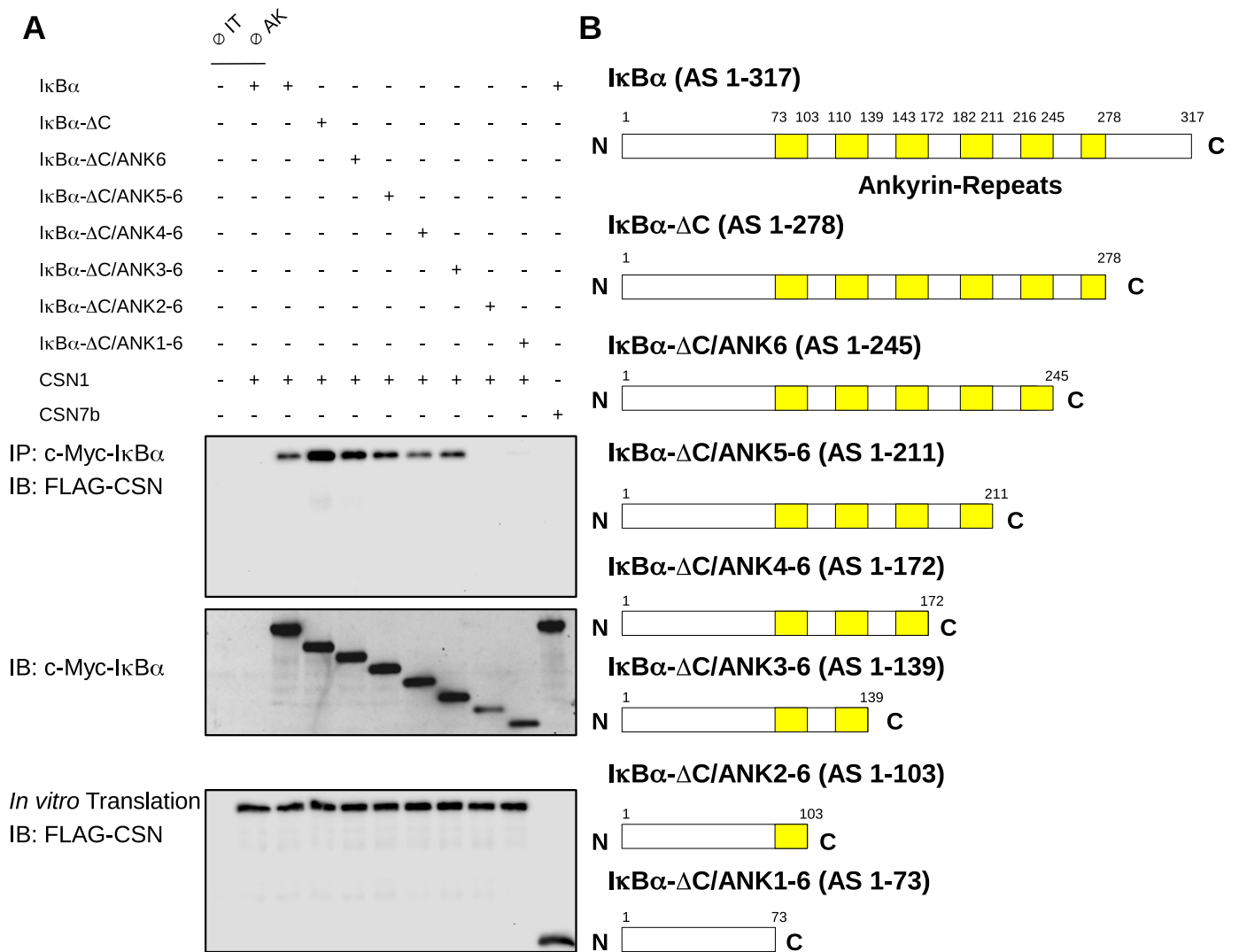


Abb. 4.8: Interaktion von CSN1 mit den I κ B α -Ankyrin-„Repeats“. (A) FLAG-CSN1 und das vollständige c-Myc-I κ B α , bzw. die c-Myc-I κ B α -Deletionsmutanten wurden *in vitro* von den Plasmiden pDEST14-CSN1_1-FLAG, pDEST14-ikba-c-Myc und den pDEST14-ikba-c-Myc-Deletionskonstrukten exprimiert und anschließend für 1 Std. bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde FLAG-CSN1 durch FLAG-CSN7b ersetzt. Von diesen Ansätzen wurde eine Immunpräzipitation (IP) mit dem c-Myc-Antikörper (Kaninchen) durchgeführt und anschließend mit dem FLAG-Antikörper, sowie dem c-Myc-Antikörper (Maus) im Western-Blot (IB) analysiert. Als Kontrollen wurden die bei der IP eingesetzten *in vitro* Translationsansätze mittels Western-Blot mit dem FLAG-Antikörper analysiert. Zusätzlich wurde noch ein IP-Ansatz ohne *in vitro* Translation (IT) und ohne Antikörper (AK) an der Säulen aufgetragen. (B) Schematische Darstellung der in den Experimenten eingesetzten I κ B α -Deletionsmutanten

wurde in allen Experimenten, wo diese detektiert wurden die Tris-Tricin-SDS-PAGE statt der Tris-Glycin-SDS-PAGE angewandt.

Der CSN-Western-Blot der Immunpräzipitate wies, wie in den vorherigen Experimenten eine Interaktion von FLAG-CSN1 bei dem c-Myc-I κ B α -Gesamtmolekül auf. Auch die Variante mit deletiertem C-Terminus interagiert mit FLAG-CSN1. Wurden jedoch fünf der sechs Ankyrin-„Repeats“ deletiert, war keine Interaktion mehr nachweisbar. Daher lässt sich vermuten, dass mindestens zwei Ankyrin-„Repeats“ für eine erfolgreiche Interaktion mit CSN1 erforderlich sind.

Im IP-Kontrollansatz bei dem CSN1 durch CSN7b ersetzt wurde, konnte wie in den vorherigen Experimenten keine Kopräzipitation von CSN1 nachgewiesen werden.

Die Effizienz der Immunpräzipitation aus den einzelnen Ansätzen war, mit Ausnahme der $\Delta C/ANK2-6$ Deletion, vergleichbar. In diesem Ansatz ist weniger c-Myc-I κ B α präzipitiert worden als in den anderen Ansätzen. Allerdings ist anzunehmen, dass trotz der geringeren Menge an c-Myc-I κ B α in dieses Ansatzes, eine Interaktion problemlos nachweisbar gewesen wäre, sofern diese existiert hätte. Im FLAG-CSN-Blot wiesen die *in vitro* Translationsansätze vergleichbare Intensitäten auf, wodurch zusätzlich der Nachweis erbracht ist, dass die Menge an *in vitro* synthetisierten CSN1 und CSN7b vergleichbar war und sich so die Negativkontrolle mit den einzelnen Messungen vergleichen lässt.

4.3 Interaktion von RelA (p65) mit dem CSN-Komplex

Nach TNF α -Stimulation interagiert der CSN-Komplex in HeLa-Zellen mit RelA im Zellkern (K. Schweitzer, persönliche Kommunikation). Durch *in vitro* Interaktionsansätze sollte nun die für

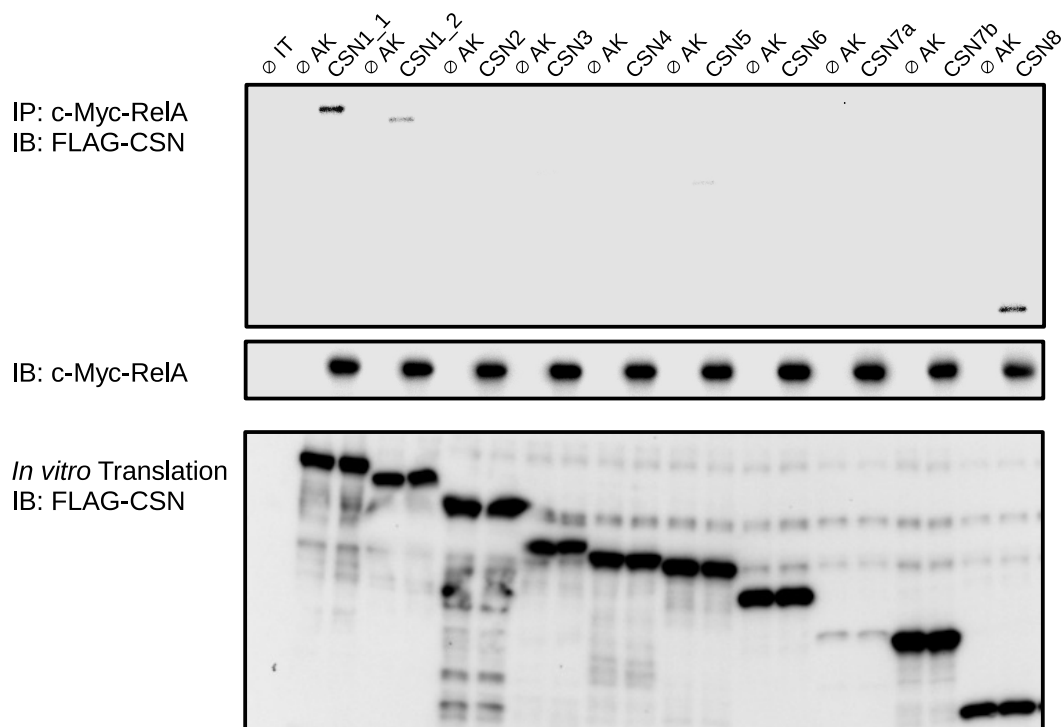


Abb. 4.9: *In vitro* Interaktion von RelA mit den Untereinheiten des CSN-Komplexes. c-Myc-RelA und die FLAG markierten CSN-Untereinheiten wurden *in vitro* mit dem pDEST14-p65-c-Myc und den pDEST14-CSN1-FLAG - pDEST14-CSN8-FLAG Konstrukten synthetisiert. c-Myc-RelA wurde mit je einer CSN-Untereinheit für 1 Std. bei 37 °C inkubiert. Der Interaktionsansatz diente als Ausgangsmaterial für die Immunpräzipitation (IP) mit dem c-Myc-Antikörper (Kaninchen), deren Überstände mittels Western-Blot (IB) mit dem FLAG- und dem c-Myc-Antikörper (Maus) analysiert wurden. Als Kontrollen wurden die *in vitro* Translationsansätze mittels einem Western-Blot mit dem FLAG-Antikörper analysiert. Zusätzlich wurde noch ein IP-Ansatz ohne *in vitro* Translation (IT) und ohne Antikörper (AK) an der Säulenmatrix aufgetragen. Die \emptyset AK „Lane“ repräsentiert immer die CSN-Untereinheit der nachfolgenden „Lane“.

diese Interaktion erforderliche CSN-Untereinheit ermittelt werden. Dazu wurden c-Myc markiertes RelA und die einzelnen FLAG- markierten CSN-Untereinheiten *in vitro* exprimiert. Die bereits erwähnten pDEST14-Konstrukte für c-Myc markiertes RelA und die FLAG markierten CSN-Untereinheiten dienten dafür als DNA-Matrize. Nach der *in vitro* Expression wurde je eine CSN-Untereinheit mit RelA für 1 Std. bei 37 °C zusammen im *in vitro* Expressionspuffer inkubiert. Anschließend wurde durch eine c-Myc-Immunpräzipitation c-Myc-RelA aufgereinigt und ein Teil des Interaktionsansatzes als Expressionskontrolle verwendet. Danach erfolgte die Detektion der CSN-Untereinheiten in den Immunpräzipitaten durch Western-Blot mit Hilfe des den FLAG-Antikörpers (Abb. 4.9).

Der FLAG-CSN-Blot der Immunpräzipitate zeigte, dass FLAG-CSN1 und FLAG-CSN8 *in vitro* mit c-Myc-RelA kopräzipitieren und somit interagieren können. Beide CSN1-Isoformen und CSN8 zeigten eine Interaktion mit RelA, alle weiteren CSN-Untereinheiten hingegen keine oder nur schwache Interaktionen. Anhand des c-Myc-RelA-Blots der Immunpräzipitationen konnte zudem gezeigt werden, dass die Effizienz der IP zwischen den einzelnen Ansätzen vergleichbar war. Auch die Expression der CSN-Untereinheiten, war gemäß des *in vitro* Translations-Blots ähnlich. Lediglich die CSN7a-Untereinheit zeigte, wie schon bereits in den κ B α /CSN-Interaktionsexperimenten, nur eine verhältnismäßig niedrige Expression, wodurch der CSN7a-Ansatz nur eine geringe Aussagekraft hat. Zudem sei zu erwähnen, dass die Kontrollansätze ohne Antikörper keine Interaktion an der Säule zeigten und daher eine unspezifische Bindung der CSN-Untereinheiten an die Säulenmatrix auszuschließen war.

Nachdem CSN1 und CSN8 *in vitro* als RelA-Interaktionspartner identifiziert werden konnten, sollten diese Resultate auch unter zellulären Bedingungen in HeLa-Zellen bestätigt werden. Dazu wurden HeLa-Zellen in 10 cm Schalen mit bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % vermehrt. Diese Zellen wurden je mit pcDNA3.2-p65-c-Myc und pcDNA3.2-CSN1_1-FLAG, pcDNA3.2-p65-c-Myc und pcDNA3.2-CSN1_2-FLAG oder pcDNA3.2-p65-c-Myc und pCMV6-CSN8-c-Myc/FLAG Plasmid-DNA kotransfiziert. Das Transfektionverhältnis zwischen den Expressionsplasmiden für c-Myc-RelA und FLAG-CSN1 betrug unter Berücksichtigung der Expressionseffizienz 5 : 5 μ g und für c-Myc-RelA und c-Myc/FLAG-CSN8 4 : 6 μ g. Diese Zellen wurden am nächsten Tag für 1 Std. mit MG132 inkubiert und anschließend durch RIPA-Lyse aufgeschlossen. Diese Lysate wurden im Anschluss für eine FLAG-Immunpräzipitation mit der Sigma-FLAG-Agarose und zur Expressionskontrolle verwendet. Die Eluate wurden im nächsten Schritt mittels eines c-Myc-Western-Blot analysiert (Abb. 4.10).

Der c-Myc-RelA-Blot der Immunpräzipitationen wies bei allen drei Experimenten eine Interaktion von c-Myc-RelA mit mit der untersuchten CSN-Untereinheit auf, was vermuten lässt, dass beide CSN1-Isoformen und CSN8 nicht nur *in vitro* sondern auch in HeLa-Zellen interagierten. Zudem zeigten die MG132 inhibierten Zellen ein stärkeres Interaktionssignal, obwohl die IP-Effizienz laut dem FLAG-CSN-Blot in der jeweiligen Versuchsreihe vergleichbar war. Dies weist daraufhin, dass in Gegenwart von MG132 durch die Proteasominhibition diese drei Interaktionen stabilisiert werden.

Insgesamt waren die Interaktionssignale der CSN8-Versuchsreihe schwächer, was jedoch auf

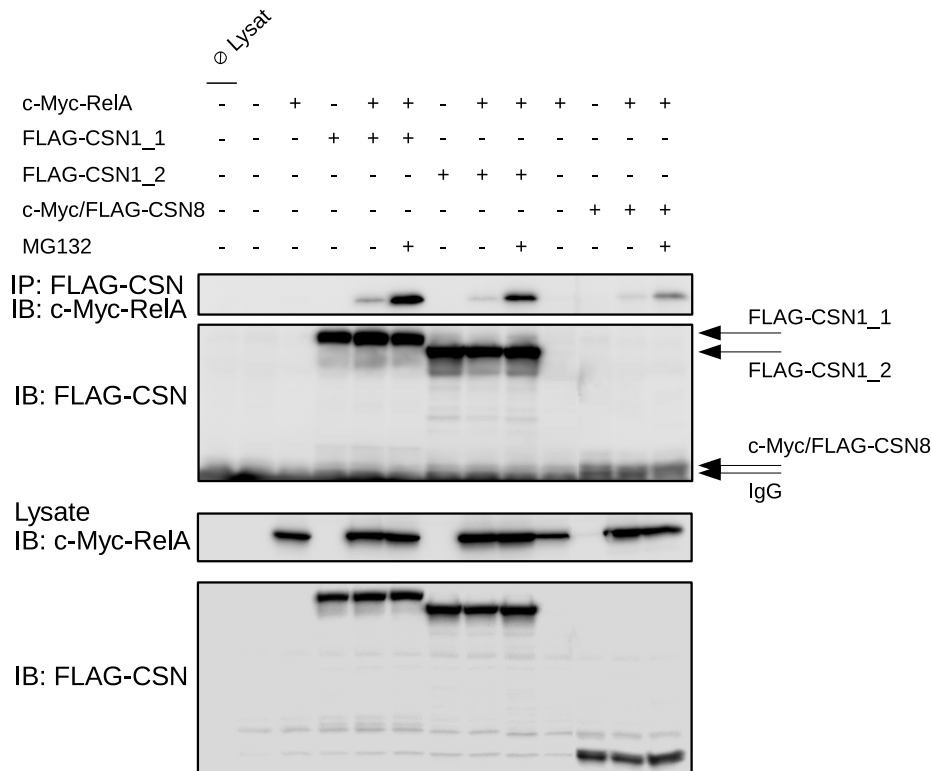


Abb. 4.10: Interaktion von RelA mit CSN1 und CSN8 in HeLa-Zellen. c-Myc-RelA wurde in HeLa-Zellen zusammen mit FLAG-CSN1 bzw. FLAG-CSN8 ektopisch überexprimiert. Für die Transfektion und Expression wurden die Plasmide pcDNA3.2-p65-c-Myc, pcDNA3.2-CSN1_1, pcDNA3.2-CSN1_2 und pCMV6-CSN8-c-Myc/FLAG verwendet. Bei den RelA-Kontrollen wo nur das pcDNA3.2-p65-c-Myc-Plasmid transfiziert wurde sind bei der CSN1-Reihe 5 μg und bei der CSN8-Reihe 4 μg des Plasmids transfiziert worden. Für jede CSN-Untereinheit wurden die HeLa-Zellen in einem Ansatz für 1 Std. mit MG132 inkubiert. Nach der RIPA-Zellyse wurde eine FLAG-CSN1 und FLAG-CSN8 Immunpräzipitation (IP) mit dem FLAG-Agarosekonjugat durchgeführt. Parallel wurde auch eine Leerprobe ohne Lysat verwendet. Anschließend erfolgte die Analyse der Immunpräzipitate und Lysate im Western-Blot (IB) mit dem c-Myc und dem FLAG-Antikörper (AK).

die geringere Expressionsrate von c-Myc-RelA und c-Myc/FLAG-CSN8 in dieser Ansatzreihe zurückzuführen sein könnte. Die Expression von c-Myc/FLAG-CSN8 war trotz des Versuchs die verminderte Expression auszugleichen, niedriger als die von FLAG-CSN1. Die Expression von c-Myc-RelA in der CSN8-Versuchsreihe war wegen der geringeren Menge an transfizierter pcDNA3.2-p65-c-Myc Plasmid-DNA auch etwas niedriger. Die Negativkontrollen ohne FLAG-CSN wiesen keine Interaktionen auf, was ein Hinweis ist, dass hier keine unspezifische Bindung von c-Myc-RelA an die FLAG-Agarose stattgefunden hat.

Nachdem erfolgreich eine Interaktion von RelA mit CSN1, sowie mit CSN8 in HeLa-Zellen gezeigt werden konnte, sollte nun *in vitro* die Interaktionsdomäne seitens RelA bestimmt werden. Hierbei wurde jeweils die Interaktion von CSN1 bzw. CSN8 mit drei C-terminal trunkierten RelA-Mutanten und einer Mutante mit interner Deletion untersucht. Zunächst wurden FLAG-CSN1 und FLAG-CSN8, sowie die drei trunkierten c-Myc-RelA-Mutanten *in vitro* exprimiert. Als Expressionsplasmide wurden pDEST14-CSN1_1-FLAG, pDEST14-CSN8-FLAG und die RelA-Deletionsplasmide unter 4.1.5 eingesetzt. Anschließend wurde je eine RelA-Mutante mit einem CSN1 bzw. einem CSN8 Ansatz für 1 Std. bei 37 °C im *in vitro* Expressionspuffer

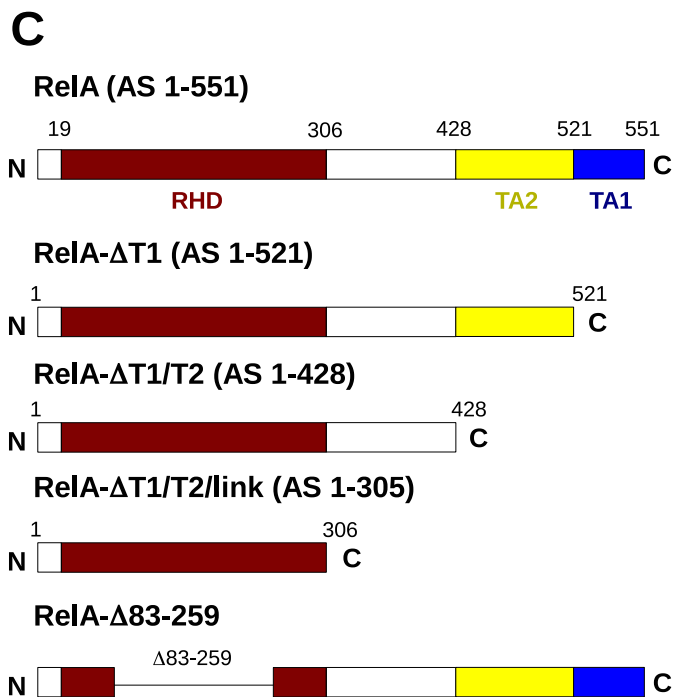
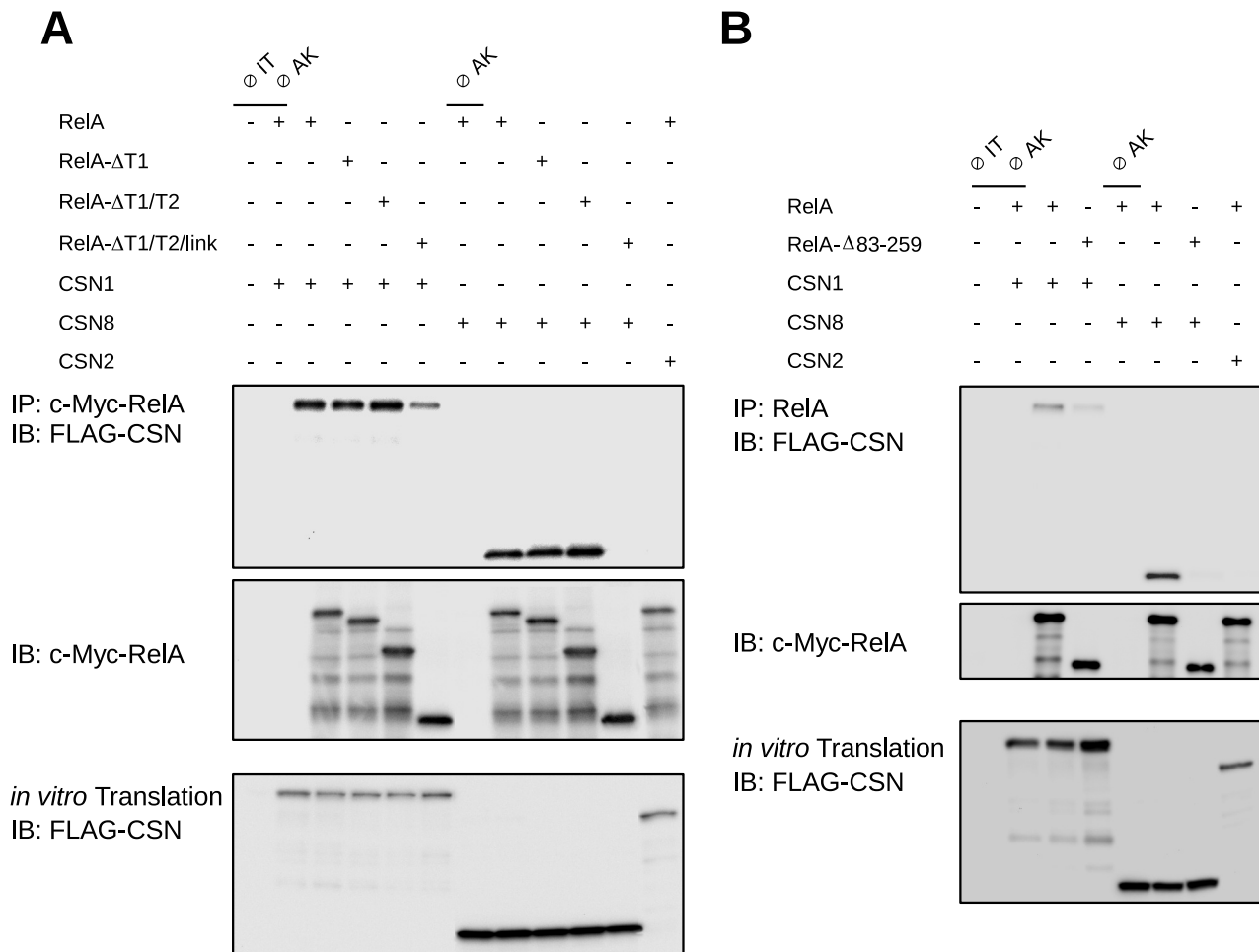


Abb. 4.11: Interaktion von CSN1 mit der RHD und von CSN8 mit der „Linker“-Region und der RHD von RelA. FLAG-CSN1 und FLAG-CSN8, sowie die RelA-Deletionsmutanten (C) wurden *in vitro* mit den pDEST14-CSN1_1-FLAG, pDEST14-CSN8-FLAG und pDEST14-p65-c-Myc-Konstrukten synthetisiert. Beide Interaktionspartner wurden für 1 Std. bei 37 °C inkubiert. (A) Die Interaktionsansätze mit den trunkierten RelA-Mutanten, wurden für die Immunpräzipitation (IP) mit dem c-Myc-Antikörper (Kaninchen) (AK) verwendet. (B) Die c-Myc-RelA-Mutante mit Deletion in der RHD wurde durch eine IP mit dem p65-Antikörper präzipitiert. Die Immunpräzipitate beider IPs wurden durch Western-Blots (IB) mit dem FLAG-Antikörper und dem c-Myc-Antikörper analysiert. Als Kontrollen wurden die *in vitro* Translationsansätze mittels Western-Blot mit dem FLAG-Antikörper analysiert. Zusätzlich wurde ein IP-Ansatz ohne *in vitro* Translation (IT) und ohne IP-Antikörper aufgetragen.

koinkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit FLAG-CSN2, welches nur geringfügig kleiner ist als FLAG-CSN1 und c-Myc-RelA und in den vorherigen Versuchen keine Interaktion zeigte. Die Interaktionsansätze wurden anschließend durch c-Myc-RelA-Immunpräzipitation aufgereinigt.

Zudem wurde ein Teil des *in vitro* Translationsansatzes zur Expressionskontrolle verwendet. Die Immunpräzipitate wurden daraufhin durch einen FLAG-CSN-Western-Blot analysiert (Abb. 4.11A).

Da es nach ersten Analysen Hinweise auf die Involvierung der RelA RHD in beide Interaktionen gab, wurde zusätzlich zu den trunkierten RelA Mutanten eine RelA-Mutante mit einer Deletion innerhalb der RHD verwendet. Analog zum Vorversuch wurden diese *in vitro* exprimiert und je mit FLAG-CSN1 oder FLAG-CSN8 für 1 Std. bei 37 °C inkubiert. Weil eine Immunpräzipitation mit dem c-Myc-Antikörper nicht erfolgreich war, musste diese mit dem C-terminal bindenden anti-p65 Antikörper separat durchgeführt werden. Vermutlich war das c-Myc-Epitop bei der Deletionsmutante im nativen Zustand unzugänglich was dadurch untermauert wird, daß der c-Myc-Antikörper problemlos mit dieser Mutante interagiert, wenn das RelA-Protein zuvor denaturiert wurde. Nach der IP wurden die Immunpräzipitate und die Expressionsansätze mittels FLAG-CSN-Western-Blot analysiert. Neben den Immunpräzipitaten wurden zudem Western-Blots der *in vitro* Expressionsansätze als Expressionskontrolle durchgeführt. Aus dem Western-Blot der Immunpräzipitate beider Experimente ist ersichtlich, dass CSN1 mit der RHD interagiert, denn auch bei Deletion aller weiteren Domänen von RelA ist eine Interaktion messbar (Abb. 4.11A). Wurde ein Teil der RHD deletiert (Abb. 4.11B) war die Interaktionseffizienz massiv vermindert, weshalb die RHD vermutlich relevant für die CSN1/RelA-Interaktion ist. Die Interaktion mit RelA bei kompletter Deletion der RHD konnte nicht untersucht werden, da diese Mutanten *in vitro* nicht effizient exprimierten. Des Weiteren zeigt die Analyse, dass CSN8 mit der „Linker“-Region von RelA und Teilen der RHD interagiert. Wurde RelA vom C-Terminus ausgehend deletiert, war eine Interaktion möglich, sofern die RHD und die Region zwischen dieser und der TA2-Domäne, die „Linker“-Region vorhanden war (Abb. 4.11A). Wurde die „Linker“-Region (122 AS) oder Teile der RHD deletiert, war keine Interaktion nachzuweisen. Bei Negativkontrollen, bei denen FLAG-CSN1 bzw. FLAG-CSN8 durch FLAG-CSN2 ersetzt wurde, war keine Interaktion nachweisbar. Der c-Myc-Blot der IPs zeigte, dass mit zunehmender Trunkierung von c-Myc-RelA die IP-Effizienz im Vergleich zum vollständigen RelA ansteigt (Abb. 4.11A), was dadurch verursacht werden könnte, dass kleinere Proteinen häufig leichter und schneller durch das *in vitro* Expressionsystem synthetisiert werden können. In vorherigen Versuchen erwiesen sich die C-terminalen RelA-Bereiche, als schwerer translatierbar. Dies dürfte auch der Grund für die schwächere Interaktion zwischen FLAG-CSN1 und der c-Myc-RelA- Δ T1/T2/link gewesen sein. Vermutlich war der c-Myc-Antikörper an der Säulenmatrix bei dieser Probe übersättigt, was eine verminderte Kopräzipitation von CSN1 zur Folge hätte. Der FLAG-CSN-Western-Blot der *in vitro* Translationen zeigte, dass die jeweils eingesetzten Mengen innerhalb der FLAG-CSN1 und FLAG-CSN8-Versuchsreihe untereinander vergleichbar waren. Generell war FLAG-CSN8 stärker exprimiert als die FLAG-CSN1, wobei im ersten

Versuchsteil diese Unterschiede deutlicher waren was auf Qualitätsunterschiede bei den eingesetzten Plasmid-DNAs zurückzuführen sein könnte.

Nachdem die RHD von RelA als Bindedomäne für die Interaktion mit CSN1 identifiziert wurde, sollte nun die Bindedomäne seitens CSN1 bestimmt werden. Hierzu wurde zunächst c-Myc-RelA und C-terminal trunkierte FLAG-CSN1-Varianten *in vitro* exprimiert. Als DNA-Matrize für die *in vitro* Expression dienten pDEST14-p65-c-Myc und die unter 4.1.6 aufgeführten pDEST14-CSN1-FLAG Deletionsplasmide. Je eine der FLAG-CSN1-Varianten wurde für 1 Std. bei 37 °C mit c-Myc-RelA im Expressionspuffer inkubiert und anschließend für eine c-Myc-Immunpräzipitation eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde FLAG-CSN1 durch FLAG-CSN2 substituiert. Parallel wurde ein Teil des Ansatzes für die CSN-Expressionsanalyse verwendet. Um FLAG-CSN1 als Kopräzipitat nachzuweisen, wurden die Immunpräzipitate in einem FLAG-CSN-Western-Blot analysiert.

Der FLAG-Western-Blot der IP zeigte eine Interaktion mit RelA (Abb. 4.12), unabhängig davon, ob der „Wildtyp“, die Δ C-Term oder die Δ C-Term/PCI-Mutante von CSN1 verwendet wurde. Auch bei der Interaktionsstärke waren nur geringe Unterschiede zu beobachten, was vermuten lässt, dass CSN1 über die N-terminalen Region vor der PCI-Domäne mit RelA interagiert. Bei der Kontrolle wo CSN1 durch CSN2 ersetzt wurde, konnte keine Interaktion

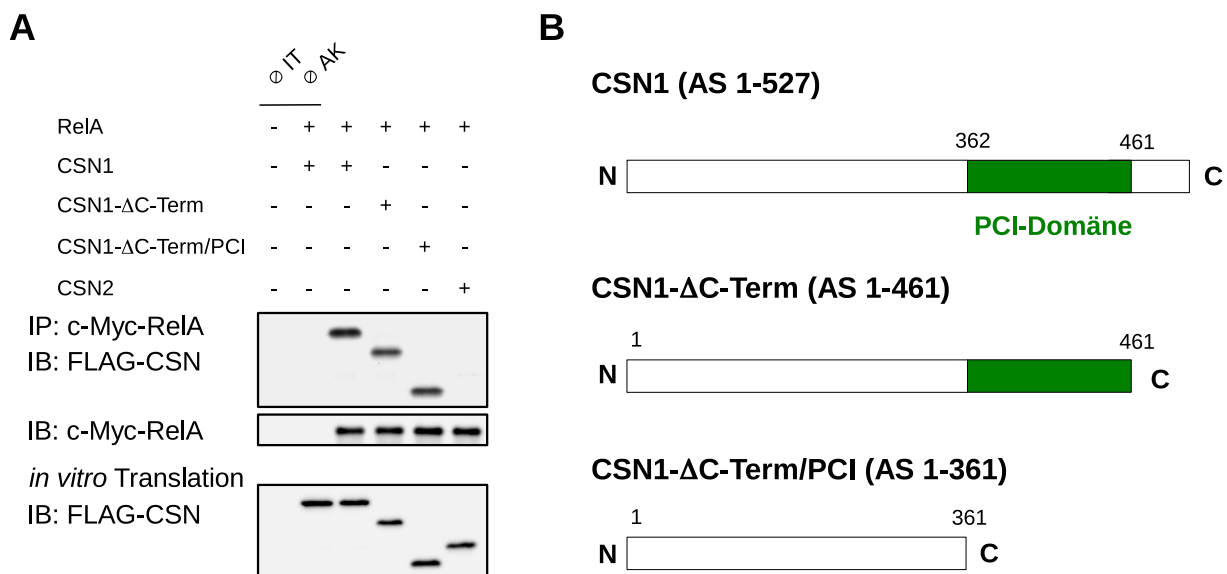


Abb. 4.12: Interaktion von RelA mit dem CSN1 N-Terminus. (A) Die Proteine c-Myc-RelA und das vollständige FLAG-CSN1, bzw. die FLAG-CSN1-Deletionsmutanten wurden *in vitro* von dem Plasmiden pDEST14-p65-c-Myc, pDEST14-CSN1-FLAG und den pDEST14-CSN1-FLAG Deletionsplasmiden exprimiert und anschließend für 1 Std. bei 37 °C inkubiert. In der Negativkontrolle wurde FLAG-CSN1 durch FLAG-CSN2 ersetzt. Von diesen Ansätzen wurde eine Immunpräzipitation (IP) mit dem c-Myc-Antikörper (Kanninchen) durchgeführt und anschließend mit dem FLAG-Antikörper, sowie dem c-Myc-Antikörper (Maus) im Western-Blot (IB) analysiert. Als Kontrollen wurden die bei der IP eingesetzten *in vitro* Translationsansätze mittels Western-Blot mit dem FLAG-Antikörper analysiert. Zusätzlich wurde noch ein IP-Ansatz ohne *in vitro* Translation (IT) und ohne Antikörper (\emptyset AK) an der Säulenmatrix aufgetragen. (B) Schematische Darstellung der hier eingesetzten CSN1-Deletionsmutanten.

nachgewiesen werden. Die „Pulldown“-Effizienz von c-Myc-RelA war laut c-Myc-RelA-Blot der Immunpräzipitate gleichmäßig. Ähnliches gilt auch für die Expressionsrate des vollständigen CSN1 und der beiden Mutanten sowie CSN2. Im FLAG-CSN-Blot der *in vitro* Translationen zeigten diese eine vergleichbare Intensität.

Nach der Bestimmung der RHD und der sogenannten „Linker“-Region als mit CSN8 interagierender Teil seitens RelA, sollte nachfolgend analog auch der in die Interaktion mit RelA involvierte Teil von CSN8 bestimmt werden. Zunächst wurden dafür c-Myc-RelA und C-terminal trunkierte FLAG-CSN8-Mutanten, sowie die FLAG markierte CSN8-PCI-Domäne *in vitro* exprimiert. Als DNA-Matrize dienten neben pDEST14-p65-c-Myc und pDEST14-CSN8-FLAG Plasmiden, auch die in der Tabelle unter 3.1.8.2 aufgeführten pDEST14-CSN8-FLAG Deletionskonstrukte. Danach erfolgte die Inkubation von c-Myc-RelA mit je einer FLAG-CSN8-Mutante bzw. der PCI-Domäne, sowie FLAG-CSN7b als Negativkontrolle für 1 Std. im *in vitro* Expressionspuffer. Im Anschluß wurde c-Myc-RelA durch eine Immunpräzipitation aus dem Ansatz präzipitiert und ein Teil des *in vitro* Translationsansatzes als Expressionskontrolle verwendet. Anschließend erfolgte die Analyse der Immunpräzipitate mittels Western-Blot (Abb. 4.13). We-

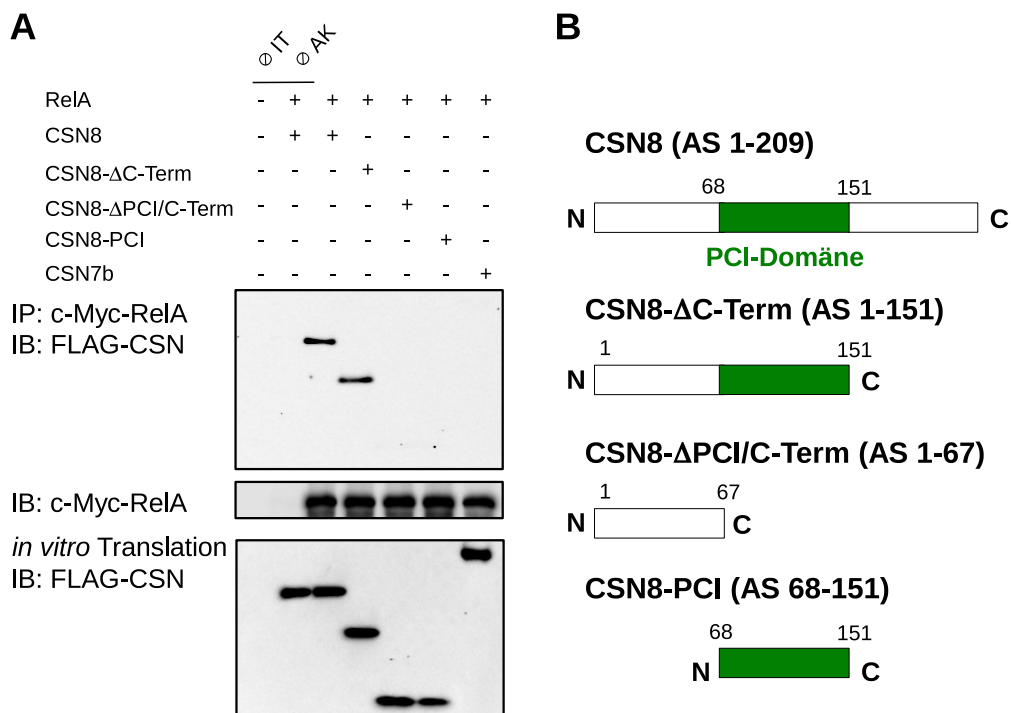


Abb. 4.13: Interaktion von RelA mit der CSN8-PCI-Domäne und Teilen des N-Terminus. (A) c-Myc-RelA, das komplette FLAG-CSN8, bzw. die FLAG-CSN8-Deletionsmutanten wurden *in vitro* von den pDEST14-p65-FLAG, pDEST14-CSN8-FLAG und den pDEST14-CSN8-FLAG Deletionsplasmiden exprimiert. c-Myc-RelA und je eine CSN8 Mutante wurden für 1 Std. bei 37 °C inkubiert und anschließend c-Myc-RelA mit einer Immunpräzipitation mit dem c-Myc-Antikörper (Kaninchen) (AK) durchgeführt. In der Negativkontrolle ist FLAG-CSN8 durch FLAG-CSN7b ersetzt worden. Die Eluate der IP wurden durch Western-Blots mit den FLAG-Antikörper und dem c-Myc-Antikörper (Maus) analysiert. Zusätzlich wurde auch eine IP ohne *in vitro* Translationsansatz (IT) und ohne Antikörper an der Säulenmatrix durchgeführt (B) Schematische Darstellung der im Experiment eingesetzten CSN8-Mutanten und Fragmente.

gen des geringen Molekulargewichtes der CSN8-Fragmente, wurde die Tris-Tricin-SDS-PAGE statt der Tris-Glycin-SDS-PAGE angewandt. Der FLAG-Western-Blot der Immunpräzipitate zeigt, dass c-Myc-RelA mit FLAG-CSN8 interagieren kann, solange die PCI-Domäne und die N-terminale Region vor dieser Domäne erhalten bleibt. Blieb nur eine beider Domänen erhalten, war zwischen CSN8 und RelA keine Interaktion messbar, was darauf hindeutet, dass die RelA-Bindestelle sowohl aus Teilen der PCI-Domäne, als auch aus der N-terminalen Region besteht. Die FLAG-CSN7b Negativkontrolle zeigte keine Interaktion mit RelA.

Der c-Myc-RelA-Blot der Immunpräzipitate zeigte, dass die Effizienz der Immunpräzipitation zwischen den einzelnen Ansätzen vergleichbar war. Auch die Expressionskontrolle durch den FLAG-CSN-Blot der *in vitro* Translationsansätze, wies größtenteils vergleichbare Intensitäten auf. Lediglich die Expression des CSN8-Fragments, welches nur aus der PCI-Domäne besteht war geringfügig abgeschwächt, was allerdings in Anbetracht der zahlreichen Vorversuche und der hohen Reproduzierkeit der Ergebnisse keinen Einfluss auf das Resultat des Versuchs hatte.

5 Diskussion

5.1 Interaktion von $I\kappa B\alpha$ mit dem CSN-Komplex

Das COP9-Signalosom ist ein wichtiger Regulator für das NF- κ B-System, wobei es dieser Funktion vor allem durch Regulieren der Stabilität zentraler Inhibitoren und Transkriptionsfaktoren ausübt. Das erste Ziel dieser Arbeit war die Interaktion des CSN mit $I\kappa B\alpha$ zu charakterisieren. Diese Interaktion ist Teil des Regulationsmechanismus der frühen NF- κ B-Aktivierung. Nach der Stimulation des NF- κ B-Signalwegs mit $TNF\alpha$ wird $I\kappa B\alpha$ proteasomal degradiert und nach Translokation von RelA im Zellkern resynthetisiert (Sun et al., 1993). Nach der *de novo* Synthese von $I\kappa B\alpha$ interagiert dieses mit dem CSN-Komplex und wird durch die CSN-assoziierte Deubiquitylase USP15 deubiquitynyliert (Schweitzer et al., 2007). Bisher ist diese Interaktion nach vorangegangener Überexpression von CSN2 nachgewiesen worden, wodurch sich die absolute Menge des gesamten CSN-Komplexes in der Zelle erhöht (Schweitzer et al., 2007). Allerdings ist die Interaktion mit endogenem CSN bisher nicht gezeigt worden.

In dieser Arbeit konnte die Interaktion zwischen dem CSN-Komplex und $I\kappa B\alpha$ auf endogenem Expressionslevel bestätigt werden. Unter diesen Bedingungen konnte 30 min nach Stimulation mit $TNF\alpha$, eine CSN/ $I\kappa B\alpha$ Interaktion, in mit dem MG132-Proteasominhibitor behandelten HeLa-Zellen gezeigt werden. Zu diesem Zeitpunkt würde unter unbehandelten Bedingungen, nach $TNF\alpha$ induzierter $I\kappa B\alpha$ -Degradation die $I\kappa B\alpha$ *de novo* Synthese beginnen (Sun et al., 1993). Diese Tatsache unterstützt die Annahme, dass der CSN-Komplex bei der *de novo* Synthese von $I\kappa B\alpha$ eine wesentliche Rolle spielt. Dies wird verdeutlicht durch die Arbeit von Schweitzer et al. (2007), da durch einen CSN2 „Knock-Down“ die Zeitspanne für die *de novo* Synthese deutlich verlängert wird.

Der Zeitrahmen für die endogene CSN/ $I\kappa B\alpha$ Interaktion beträgt gemäß den Experimenten einige Minuten, wobei diese Wechselwirkung nur durch vorherige Inkubation HeLa-Zellen mit MG132 nachweisbar war. Die Publikation von Schweitzer et al. (2007) deutet auf eine deutlich größere Zeitspanne hin, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass dort der CSN-Komplex überexprimiert wurde. Diese Erkenntnisse deuten zudem darauf hin, dass die Ergebnisse dieser Dissertation nur den Zeitpunkt der stärksten Interaktion zeigen und diese nicht über eine längere Zeitspanne hinweg stabil existiert. Wenn die gesamte Interaktionszeitspanne bestimmt werden soll, müssten höhere Proteinmengen eingesetzt werden und eine sensitivere Nachweismethode verwendet werden. Diese Ergebnisse liefern jedoch keine detaillierten Informationen über die Interaktion auf molekularer Ebene. Ob es sich in den Beobachtungen um eine direkte Interaktion handelt oder noch weitere Faktoren involviert sind, geht aus den durch-

geführten Untersuchungen zur Interaktion von CSN und $I\kappa B\alpha$ nicht hervor. Nicht selten zeigen Immunpräzipitationen aus Zellysaten nur indirekte Interaktionen, wie z.B die indirekte Interaktion von COMMD1 und $I\kappa B\beta$ (Ganesh et al., 2003). Zudem ist auch nicht erkennbar welche der acht CSN-Untereinheiten mit $I\kappa B\alpha$ interagiert.

Um diese Fragestellung genauer zu bearbeiten, wurden die CSN-Untereinheiten und $I\kappa B\alpha$ *in vitro* exprimiert und die Interaktion zwischen $I\kappa B\alpha$ und jeder einzelnen CSN-Untereinheit analysiert. In diesen Experimenten war eine direkte Interaktion zwischen $I\kappa B\alpha$ und CSN1, sowie zwischen $I\kappa B\alpha$ und CSN3 nachweisbar. Da dieses *in vitro* System auf rekombinant hergestellten und aufgereinigten Faktoren des *E. coli*-Transkriptions- und Translationsapparats basiert und keine eukaryotischen Faktoren enthalten sind, entsteht keine „Blackbox“ aus unbekanntem Proteinen, welche die Interaktion störend beeinflussen könnten. Es muss allerdings angemerkt werden, dass diese *in vitro* synthetisierten Proteine, nicht nachweislich korrekt gefaltet sind, da bestimmte Proteinfaltungen nicht durch Chaperone oder sonstige Faktoren, begünstigt werden. Zudem werden auch keine posttranslationalen Modifikationen erzeugt (Shimizu et al., 2001). Die Vergleichbarkeit der einzelnen Interaktionsansätze der jeweiligen Untereinheiten untereinander ist bei gleichem Expressionsniveau gewährleistet. Nur der $I\kappa B\alpha$ /CSN7a Interaktionsansatz, war aufgrund zu geringer Expressionseffizienz von CSN7a nicht mit den anderen vergleichbar. Experimente die CSN7a-Expression durch Optimierung der eingesetzten DNA-Menge und anderen Reaktionskomponenten zu erhöhen, brachten nicht den gewünschten Erfolg. Obwohl CSN7a zu CSN7b eine hohe Homologie aufweist lässt sich CSN7b *in vitro* viel effizienter exprimieren. Eine Erklärung hierfür wäre, dass der Genlokus *COPS7A* für *E. coli* seltene Codons kodiert, denn der *COPS7A*-ORF enthält deutlich mehr *E. coli*-„untypische“ Codons als der *COPS7B*-ORF, wodurch die Expressionseffizienz in diesem *in vitro*-Expressionssystem deutlich vermindert sein kann (Dessau et al., 2008). Um dieses Problem zu umgehen, würde man CSN7a aus modifizierten *E. coli* Stämmen einsetzen müssen oder könnte alternativ die Codons des *COPS7A*-ORFs für die Expression in *E. coli* anpassen. Da diese Prozedur mit einem hohen zeitlichen und finanziellen Aufwand verbunden ist, wäre eine solche Prozedur nur sinnvoll gewesen, wenn sich im Vorfeld Hinweise auf eine Beteiligung der CSN7a Untereinheit, bei Interaktion des CSN mit $I\kappa B\alpha$ ergeben hätten.

Anhand der übrigen Ergebnisse können Aussagen über die Affinität der einzelnen CSN-Untereinheiten zu $I\kappa B\alpha$ getroffen werden. Für eine exakte Bestimmung der Affinität ist es jedoch erforderlich alle Interaktionspartner aufzureinigen und in gleicher Konzentration einzusetzen und eine sensitivere Quantifizierungsmethode als einen Western-Blot (wie beispielsweise SPR-Spektroskopie) zu verwenden. Da es sich vorhergehend um *in vitro* Interaktionsuntersuchungen handelte, konnte nicht vorausgesetzt werden, dass diese Interaktionen auch *in vivo* zustandekommen. Häufig werden Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* durch Proteinfaltung, PTMs oder andere zelluläre Proteine beeinflusst, so dass teilweise Proteinbindestellen nicht zugänglich sind (Phizicky und Fields, 1995). Um dieses zu überprüfen wurde die $I\kappa B\alpha$ /CSN1-Interaktion in HeLa-Zellen untersucht und konnte unter zellulären Bedingungen bestätigt werden. Ein vergleichbares Modell in einer lebenden Maus müsste für diese Fragestellung erst noch etabliert

werden. Zudem können Schwankungen der CSN-Menge oder ein CSN-„Knock-Out“ in einem lebenden Organismus zu unvorhersehbaren Effekten bis zur Letalität führen (Lykke-Andersen et al., 2003).

In HeLa-Zellen wurden $I\kappa B\alpha$ und CSN1 bzw. CSN3 ektopisch überexprimiert mit dem Ergebnis, dass CSN1 auch unter eukaryotischen *ex vivo* Zellkulturbedingungen mit $I\kappa B\alpha$ interagiert. Ähnlich wie die Ergebnisse mit dem *in vitro* exprimierten $I\kappa B\alpha$ und CSN1, interagieren auch in diesem Fall beide CSN1-Isoformen mit $I\kappa B\alpha$. Der funktionelle Unterschied beider CSN1-Isoformen ist nicht bekannt. Die Interaktion mit dem überexprimierten $I\kappa B\alpha$ und CSN1, ist im Gegensatz zur Interaktion von $I\kappa B\alpha$ und dem gesamten CSN-Komplexes auf endogenen Level, konstitutiv was vermutlich auf die Überexpression beider Interaktionspartner zurückzuführen ist. Auch bei anderen CSN Interaktionspartnern aus dem NF- κ B-System, wie den Komponenten des IKK-Komplexes wurde ein solches Verhalten beobachtet (Orel et al., 2010; Hong et al., 2001).

Eine CSN3/ $I\kappa B\alpha$ -Interaktion auf zellulärer Ebene war nicht nachweisbar. Zudem war das Koexpressionslevel von CSN3/ $I\kappa B\alpha$ in HeLa-Zellen weitaus geringer als bei CSN1/ $I\kappa B\alpha$. Obwohl der Versuchbedingungen entsprechend angepasst wurden konnte keine Interaktion nachgewiesen werden. Vermutlich sind *in vivo* die Interaktionsdomänen von $I\kappa B\alpha$ oder CSN3 durch endogene Kofaktoren belegt, was eine Interaktion mit CSN3 ohne Zugabe von z.B. Stimulationsfaktoren verhindert, was jedoch eine Interaktion von CSN3 und $I\kappa B\alpha$ *in vivo* nicht ausschließt. Generell ist bei der Auswertung dieser Interaktionsexperimente zu beachten, dass durch die Präzipitation der jeweiligen CSN-Untereinheit auch weitere Untereinheiten des Komplexes und zusätzliche Proteine kopräzipitiert werden können, was zu einem falschen positiven oder falschem negativen Ergebnis führen kann (Fang et al., 2012). Daher ist es essentiell, die Ergebnisse aus dem *in vitro* System mit den in HeLa-Zellen exprimierten Interaktionspartnern zu vergleichen. Nur wenn in beiden Fällen eine positive Interaktion nachweisbar ist, kann man von einer direkten Interaktion sprechen, die auch in lebenden Zellen zustande kommen kann. Eine Interaktion die *in vitro* nicht nachweisbar ist, bestätigt sich häufig nur als indirekte Interaktion (Phizicky und Fields, 1995).

Nach dem erfolgten Interaktionsnachweis von $I\kappa B\alpha$ und CSN1 sollten im Folgenden auch die Interaktionsdomänen bestimmt werden. Durch *in vitro* Interaktionsexperimente mit $I\kappa B\alpha$ -Deletionsmutanten konnten die $I\kappa B\alpha$ -Ankyrin-„Repeats“ als Interaktionsdomäne identifiziert werden. Diese zeigten, dass eine Interaktion mit CSN1 möglich ist, sofern mindestens zwei der sechs Ankyrin-„Repeats“ in der $I\kappa B\alpha$ -Deletionsmutante existent sind. Seitens CSN1 ist die C-terminale Region für die Interaktion mit $I\kappa B\alpha$ essentiell. Ob ausschließlich diese 66 Aminosäuren allein für die Interaktion mit $I\kappa B\alpha$ oder ob noch Teile der PCI-Domäne erforderlich sind, müsste noch durch zusätzliche Deletionen überprüft werden. Da sich die CSN1-PCI-Domäne in einem Teil des CSN-Komplex befindet der räumlich verglichen mit anderen Bereichen des Komplexes sehr dicht ist, wäre eine Beteiligung größerer Teile der PCI-Domäne in die CSN1/ $I\kappa B\alpha$ -Interaktion unwahrscheinlich (Enchev et al., 2012). Zudem ist bei trunkierten Proteinen wie sie in diesen Experimenten verwendet wurden, die vollständige korrekte Proteinfaltung nicht

gewährleistet, wodurch die eigentliche Funktion des Proteins verloren gehen kann und die Resultate zusätzlich beeinflusst werden (Kovac et al., 2011). Die vollständige Kristallstruktur von humanem CSN1 wurde bisher nicht ermittelt, jedoch existiert jedoch eine annähernd vollständige kristallographische Analyse der CSN1-Untereinheit des *A. thaliana* CSN (Lee et al., 2013). Die Aminosäuresequenz des *A. thaliana* CSN1 ist zu 45 % identisch mit dem humanem CSN1 (Lee et al., 2013). Jedoch zeigt diese Kristallisation, die für die Interaktion mit $I\kappa B\alpha$ relevante C-terminale Region nicht. Gemäß der Sekundärstrukturvorhersage befindet sich in diesem Bereich eine ca. 20 AS umfassende α -Helix sowie einige ungeordnete Segmente (Lee et al., 2013). Zudem ist dieser Bereich gemäß der Strukturanalyse im CSN und im CSN-SCF-Komplex flexibel, wodurch eine mögliche Bindestelle für $I\kappa B\alpha$ entsteht (Lee et al., 2013; Enchev et al., 2012). Bei der Wechselwirkung des CSN mit SCF binden die N-terminalen Bereiche von CSN1 und CSN3 u.a. an die Substraterkennungstellen von SCF, wodurch diese beiden Untereinheiten nah am SCF-Substrat lokalisiert sind (Enchev et al., 2012), ein weiteres Indiz für eine Beteiligung von CSN1 an der Interaktion mit $I\kappa B\alpha$.

Die Ergebnisse zur Interaktion von $I\kappa B\alpha$ und CSN1 weisen Parallelen zu publizierten Ergebnissen von Li et al. (2007) auf. Das Ankyrin-,Repeat“ und SOCS-Box haltige Protein 4 (Asb-4) interagiert ebenfalls mit CSN1 (Li et al., 2007). Wie $I\kappa B\alpha$ ist Asb-4 ein „Ankyrin“-Repeat-Protein, was vermuten lässt, dass CSN1 ein Ankyrin-,Repeat“-Bindepotein ist. Die Interaktion wurde von Li et al. (2007) durch Yeast-to-Hybrid, *in vitro* und Koimmunpräzipitation aus HEK293-Zellen charakterisiert. Zudem interagiert Asb-4, wie auch $I\kappa B\alpha$ mit der C-terminalen Region von CSN1. Auch sind bei Asb-4 die Ankyrin-,Repeats“ für die Interaktion mit CSN1 essentiell (Li et al., 2007).

Ein weiteres CSN1-Interaktionsprotein ist die Inositoltetrakisphosphat-1-Kinase (ITRPK1) (Sun et al., 2002). Die Kinase phosphoryliert $I\kappa B\alpha$, p53 und c-Jun. Diese Interaktion wurde von Sun et al. (2002) zunächst *in vitro* für den gesamten CSN-Komplex gezeigt und anschließend mit monomerem CSN1 nachgewiesen. Weitere Interaktionen der CSN-Untereinheiten mit ITRK1 konnten hier nicht nachgewiesen werden. Da sich ITRPK1 strukturell und funktionell von $I\kappa B\alpha$ oder Asb-4 unterscheidet, zeigt dass CSN1 hinsichtlich seiner Interaktionspartner nicht auf einen bestimmten Proteintyp beschränkt ist. Über die jeweiligen Interaktionsdomänen wurden von Sun et al. (2002) keine weiteren Aussagen getroffen.

Auch $I\kappa B\alpha$ verfügt über mehrere Interaktionspartner, wobei diese größtenteils Komponenten des NF- κ B-Systems sind. Die Ankyrin-,Repeats“ von $I\kappa B\alpha$ interagieren neben CSN1 auch mit dem RelA/p50 Heterodimer (Jacobs und Harrison, 1998). Hier wechselwirken die einzelnen $I\kappa B\alpha$ Ankyrin-,Repeats“ mit den C-terminalen Bereichen der RHD von RelA und p50, sowie der p50 Vorstufe p105 (Jacobs und Harrison, 1998; Bouwmeester et al., 2004). Hierdurch zeigt sich, dass die $I\kappa B\alpha$ -Ankyrin-,Repeats“ als typische Protein-Protein-Interaktionsdomäne nicht auf einen bestimmten Domämentyp beschränkt ist und zudem eine Interaktion mit mehreren Proteinen gleichzeitig stattfinden kann (Jacobs und Harrison, 1998; Bouwmeester et al., 2004). Eine Interaktion von $I\kappa B\alpha$ mit mehren CSN-Untereinheiten wie CSN1 und CSN3 ist nicht unwahrscheinlich, jedoch ist $I\kappa B\alpha$ mit einer Größe von ca. 37 kDa ein eher kleines Protein, wo-

durch $I\kappa B\alpha$ schon aus räumlichen Gründen nicht über viele verschiedene Protein-Bindestellen verfügen kann.

Ein weiteres Indiz für den weiten Interaktionsbereich der $I\kappa B\alpha$ Ankyrin-„Repeats“ ist die Interaktion mit dem NF- κ B Regulator COMMD1. Diese wechselwirken hier mit der N-terminalen Region und Teilen der COMM-Domäne von COMMD1 (Ganesh et al., 2003). Dieser Bereich weist mehrere α -Helices auf, die wie bei RelA und p50 eine Voraussetzung für die Interaktion sind (Jacobs und Harrison, 1998; Ganesh et al., 2003). Zudem weist auch CSN1 in der C-terminalen Region *in silico* eine solche Struktur auf (Lee et al., 2013). Innerhalb des NF- κ B-Systems weisen die Ankyrin-„Repeats“ der $I\kappa$ Bs hinsichtlich der Interaktionspartner jedoch eine hohe Spezifität auf. Im Gegensatz zu $I\kappa B\alpha$ bindet $I\kappa B\beta$ nur indirekt an COMMD1, obwohl beide Proteinen über Ankyrin-„Repeats“ verfügen (Ganesh et al., 2003).

5.2 Interaktion von RelA (p65) mit dem CSN-Komplex

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit einer möglichen Interaktion des NF- κ B-Transkriptionsfaktors RelA (p65) mit dem CSN. Vorversuche in unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass nach einer NF- κ B-Aktivierung durch TNF α in HeLa-Zellen, RelA im Zellkern mit dem CSN interagiert (K. Schweitzer, persönliche Kommunikation). Es war bisher nicht bekannt ob es sich hier um eine direkte Interaktion handelt, welche Untereinheiten involviert sind und welche Binde-domänen bei dieser Interaktion eine Rolle spielen. Daher sollte zunächst ermittelt werden, ob eine direkte Interaktion zwischen RelA und dem CSN stattfindet und welche Untereinheiten des CSN-Komplexes dabei mit RelA interagieren können. Dafür wurde die Interaktion von RelA mit den jeweiligen CSN-Untereinheiten *in vitro* überprüft. Dabei wiesen beide Isoformen von CSN1, sowie CSN8 die höchste Affinität zu RelA auf. Die Affinität von RelA zu den anderen Untereinheiten ist vergleichsweise gering, bzw. nicht nachweisbar. Eine exakte Quantifizierung erfordert z.B. eine SPR-Spektroskopie. Da schon die $I\kappa B\alpha$ /CSN3 Interaktion zeigte, dass sich *in vitro* Interaktionen nicht zwangsläufig im Zellkulturmodell bestätigen, wurden zur Verifizierung Interaktionsexperimente in HeLa-Zellen durchgeführt.

In HeLa-Zellen war die Interaktion zwischen ektopisch überexprimiertem CSN1 und RelA konstitutiv nachweisbar. Zusätzlich erhöhte sich nach Zugabe des Proteasominhibitors MG132 die Interaktionseffizienz zwischen beiden Interaktionspartnern deutlich. Auch die Interaktion von überexprimierten RelA mit CSN8 konnte in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Hier bewirkte der MG132 ebenfalls einen Anstieg der Interaktionseffizienz. Dies ist vermutlich durch ektopisch überexprimiertes RelA zu erklären, welches teilweise ubiquitinyliert vorliegt, denn die Ubiquitinylierung wird durch die Proteasominhibition stabilisiert und lässt daher den Rückschluss zu, dass ubiquitinyliertes RelA eine höhere Affinität zum CSN besitzt (Palombella et al., 1994). Dies müsste allerdings erst durch Analyse der Ubiquitinylierung von ektopisch überexprimierten RelA und durch einen *in vitro* Interaktionsansatz mit ubiquitinyliertem RelA und CSN1 oder CSN8 überprüft werden. Es sei außerdem zu erwähnen, dass die Interaktion von endogenem RelA und dem CSN-Komplex, hypothetisch im Zellkern stattfindet (K. Schweitzer, persönliche

Kommunikation). Dies ist jedoch bei ektopisch überexprimierten CSN und RelA nicht mehr gewährleistet, da der überwiegende Teil des RelA und der CSN-Untereinheit gemäß in Vorversuchen gewonnener Erkenntnisse im Zytosol überexprimiert wird. Die durch MG132 induzierte erhöhte Interaktionseffizienz könnte sich deshalb nur auf den zytosolischen Anteil beziehen. Dass zwei Untereinheiten CSN1 und CSN8 mit RelA interagieren ist hier nicht abwegig, da sie im CSN-Komplex räumlich nah beieinander liegen und so ein Kontakt mit beiden Untereinheiten möglich ist (Enchev et al., 2012).

Nach dem erfolgtem Nachweis der RelA/CSN1 und RelA/CSN8-Interaktion im Zellkulturmodell sollten die für die Interaktion erforderlichen Bindedomänen bestimmt werden. Durch die *in vitro* Interaktionsanalyse konnte bei der RelA/CSN1-Interaktion die RHD von RelA, als essentiell identifiziert werden. Auf der Seite von CSN1 wurde der N-terminale Bereich als essentiell identifiziert. In diesem Bereich befindet sich eine Region mit hoher Homologie zur Proteasomuntereinheit Rpn7 in Hefen, Rpn6 in *D. melanogaster* bzw. PSMD6 beim *H. sapiens* (Isono et al., 2004; Lee et al., 2013). Diese Untereinheit des 19 S Regulator „Lid“-Komplexes in den genannten Spezies, entspricht der CSN1-Untereinheit im CSN-Holokomplex (Henke et al., 1999). Strukturell enthält diese Region in *A. thaliana* zwei helikale „Repeat“-Domänen und eine „Linker“-Helix. Diese „Linker“-Helix ist die längste α -Helix im CSN1 (Lee et al., 2013). Diese strukturellen Eigenschaften können in Anbetracht der hohen Homologie zu anderen Spezies auch auf das humane CSN1 übertragen werden. Im CSN-Komplex ist die N-terminale Region nach außen gerichtet, während die PCI-Domäne an der Bildung des Kernelements beteiligt ist (Enchev et al., 2012). Das „Helix-Turn-Helix“-Motiv der N-terminale Region von CSN1 weist strukturelle Ähnlichkeiten zum Tetratricopeptid-Repeat, ein typisches Protein-Protein-Interaktionsmotiv (Lee et al., 2013; Zeytuni und Zarivach, 2012), auf. Daher stellt die N-Terminale Region von CSN1 eine potentielle Protein-Protein-Interaktionsdomäne dar, was die Erkenntnisse, dass RelA mit eben dieser Region interagiert, fundiert. Da beide Isoformen des humanen CSN1 mit RelA interagieren, ist es unwahrscheinlich, dass der variable Bereich, der am Anfang des N-Terminus lokalisiert ist, in die Interaktion mit RelA für die Interaktion von Bedeutung ist. Ein weiterer Interaktionspartner für die N-Terminale Region von CSN1 ist das Spliceosom-assoziierte Protein 130 (SAP130) einer Untereinheit des SF3b-RNA-Splice Komplexes und des STAGA-Transkriptionskomplexes (Menon et al., 2008; Martinez et al., 2001). Wie RelA ist SAP130 ein nukleinsäurebindendes Protein, welches auch im Zellkern lokalisiert ist (Menon et al., 2008). Bisher wurden jedoch für SAP130 keine funktionellen Domänen beschrieben.

Mit der N-terminalen Region von CSN1 interagiert auch das Calcium-Bindeprotein TSA1 in *A. thaliana* (Li et al., 2011). Da sich die beiden N-terminalen CSN1-Bindeproteine TSA und RelA sowohl strukturell als auch funktionell unterscheiden, deutet dies auf eine Vielzahl verschiedener CSN1 Interaktionspartner hin. In *Drosophila melanogaster* wurden durch Yeast-to-Hybrid Screening weitere Interaktionspartner von CSN1 identifiziert. Davon sind viele DNA-Bindeproteine und Transkriptionsfaktoren wie RelA. Einige enthalten auch Ankyrin-„Repeats“ (Giot et al., 2003) was darauf hinweist, dass neben der bereits bei der CSN1/I κ B α Interaktion beschriebenen Bindung von Ankyrin-„Repeat“-Proteinen auch DNA-Bindeproteine bevorzugte

Interaktionspartner sind. Bei der CSN1/RelA Interaktion hatte sich gezeigt, dass unter anderem die RelA-RHD, die ein DNA-Bindemotiv enthält, für die Interaktion essentiell ist.

Als weiterer Interaktionspartner von RelA wurde CSN8 charakterisiert. CSN8 ist die kleinste Untereinheit des CSN-Komplexes und weist die geringste Homologie zwischen den verschiedenen Spezies auf (Liu et al., 2013). In einigen Spezies wie *C. elegans* ist CSN8 nicht existent (Luke-Glaser et al., 2007). Durch die Interaktionsexperimente mit den Deletionsmutanten von RelA und CSN8 konnten bei RelA Teile der RHD und die Region zwischen der TA2 und der RHD als essentiell identifiziert werden. Seitens CSN8 wurde die N-terminale Region und PCI-Domäne als interagierende Region bestimmt. CSN8 ist im CSN-Komplex im Randbereich lokalisiert, wodurch die CSN8-PCI-Domäne im Gegensatz zur CSN1-PCI-Domäne gut für zugänglich für RelA ist und somit als Interaktionsdomäne zur Verfügung steht (Enchev et al., 2012). Dass mehrere CSN-Untereinheiten mit einem Interaktionspartner interagieren ist beim CSN nicht ungewöhnlich, denn bei der Interaktion von CSN/IKK β wechselwirken die Untereinheiten CSN3, CSN4 und CSN5 (Orel et al., 2010). Bei einem weiteren CSN Interaktionspartner, dem Rezeptor Nod1, interagieren CSN1, CSN3, CSN5, CSN6, CSN7 und CSN8 mit der Nod1 CARD Domäne, jedoch mit unterschiedliche Affinität (da Silva Correia et al., 2007). Ein CSN Interaktionspartner der ausschließlich mit CSN8 interagiert, wurde bisher nicht beschrieben, wodurch CSN8 bei CSN/RelA Interaktion nur eine unterstützende Funktion aufweisen könnte und CSN1 die primäre interagierende Untereinheit darstellt. Physiologisch nimmt CSN8 z.B. eine wichtige Funktion bei der Zellzyklusregulation ein. MEF-Zellen die über ein niedriges endogenes CSN8-Expressionslevel verfügen oder HeLa-Zellen bei denen CSN8 durch einen siRNA-, „Knock-Down“ herunter reguliert wurde, wachsen deutlich langsamer (Liu et al., 2013). In Maus-Hepatozyten führt ein CSN8 „Knock-Out“ zur Apoptose (Lei et al., 2013).

Die mit CSN1 und CSN8 interagierende RelA-RHD verfügt neben der DNA-Bindefunktion, über zahlreiche weitere Interaktionspartner. Diese Protein-Protein-Interaktionsdomäne bindet neben p50 und I κ B α an I κ B β , CARM1, Calmodulin 1, c-Fos und c-Jun (Suyang et al., 1996; Covic et al., 2005; Antonsson et al., 2003; Stein et al., 1993). Calmodulin 1 weist in den mit RelA interagierenden Bereichen Strukturen aus mehreren α -Helices auf (Antonsson et al., 2003). Auch CARM1 weist im Interaktionsbereich derartige Sekundärstrukturen auf (Troffer-Charlier et al., 2007). Solche Strukturen findet man auch im N-terminalen Bereich von CSN1, wodurch die Vermutung aufkommt, dass diese Strukturen eine Interaktion mit der RelA-RHD begünstigen (Lee et al., 2013). Auch CSN8 enthält innerhalb der „atypischen“ PCI-Domäne spezielle α -Helices. Eine Interaktion mit den „typischen“ PCI-Domänen von CSN1, CSN2, CSN3, CSN4 und CSN7 kommt vermutlich nicht zustande, weil sich diese stark von der „atypischen“ CSN8-PCI-Domäne unterscheiden (Pick et al., 2009). Es existieren auch andere Protein-Strukturen die ebenfalls mit der RHD wechselwirken. Im Fall von c-Fos und c-Jun interagiert ein mini-Leucin-Zipper bzw. die schon beschriebenen Ankyrin-, „Repeats“ von I κ Bs mit der RelA-RHD, was bedingt durch die Größe und strukturelle Heterogenität dieser Domäne denkbar ist (Covic et al., 2005; Jacobs und Harrison, 1998).

Nach Berücksichtigung der gewonnenen Erkenntnisse und vorliegender Publikationen können

ein neue Hypothesen erstellt werden. Vermutlich übernimmt die RelA/CSN Interaktion bei der Inaktivierung von NF- κ B nach TNF α -Stimulation eine essentielle Rolle. Nach Translokation von RelA in den Zellkern, wo RelA zusammen mit p50 als Transkriptionsfaktor wirkt, wird ein Teil des RelA durch die ECS^{SOCs1}-E3-Ligase unter Mitwirkung von COMMD1 und GCN5 ubiquitinyliert und anschließend durch das Proteasom degradiert. Durch die Degradation wird RelA vom Chromatin entfernt (Maine et al., 2007; Mao et al., 2009; Li et al., 2012). Ein spezielles Beispiel wäre die durch TNF α -Stimulation induzierte K48-Ubiquitinylierung die eine Degradation von RelA am *ICAM1*-Promotor (Li et al., 2012) vermittelt. Der Rest des „Gesamtpool“ an nukleärem RelA, muss vor der Degradation geschützt werden, um so für die Transkription anderer Gene, des Rücktransports ins Zytoplasma oder andere nukleäre Prozesse verfügbar zu sein. An diesem Prozess ist das CSN nach den hier gewonnenen Erkenntnissen entscheidend beteiligt. Das CSN vermittelt hier offenbar die Deubiquitinylierung und die Stabilisierung von RelA, so dass dieses teilweise vor der Degradation geschützt wird. Nicht degradiertes RelA kann unter dem Einfluss von I κ B α in das Zytoplasma exportiert werden oder für andere Funktionen, wie der Aktivierung der Transkription späterer Gene bereit stehen (Arenzana-Seisdedos et al., 1997). Die Deubiquitinylierung von RelA wird dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit durch eine CSN assoziierte DUB ermöglicht, da das CSN selbst nicht über eigene Deubiquitinylaseaktivität verfügt (Zhou et al., 2003).

Der nicht degradierte Anteil von RelA kann sowohl K63-ubiquitinyliert, als auch durch die Histonacetyltransferase p300 acetyliert werden. Die Ubiquitinylierung ist dabei generell an jedem Lysin möglich, wobei K195 unter *in vivo* Bedingungen die bevorzugte Ubiquitinylierungsstelle bei RelA ist (Fan et al., 2009; Li et al., 2012). Der Anteil an ubiquitinyliertem und acetyliertem RelA unterliegt einer gegenseitigen Regulation dessen physiologische Funktion dieses Phänomens ist bisher unbekannt (Li et al., 2012). Jedoch sind PTMs, wie Phosphorylierungen, Acetylierungen, Ubiquitinylierungen und Methylierungen wichtige Regulationsfaktoren für die Aktivität eines Transkriptionsfaktors wie RelA (Perkins, 2012). Durch spezifische Acetylierung von RelA durch p300 und CBP wird z.B die Bindung von RelA an bestimmte „Enhancer“-Regionen ermöglicht, während durch Deacetylierung die transkriptionelle Aktivität inhibiert wird (Chen et al., 2005).

Anzunehmen ist, dass das CSN außerdem in andere Regulationsmechanismen des NF- κ B-Systems eingreift. Interessante Kandidaten für eine weiterführende Interaktionsstudie wären z.B I κ B β , I κ B ϵ , sowie p105 und p100. Es war zudem geplant mittels „Tandem-Affinity-Purification“ (TAP) des CSN-Komplexes mit anschließender Massenspektrometrie, neue Interaktionspartner des CSN zu identifizieren. In einer kürzlich veröffentlichten Publikation, in der eine ähnliche Methode angewandt wurde, konnten unter nicht NF- κ B aktivierenden Bedingungen, keine direkten Interaktionspartner aus dem NF- κ B-System identifiziert werden, wohl aber eine hohe Zahl an Zellzyklus involvierten Proteinen (Fang et al., 2012). Um NF- κ B-Interaktionspartner zu identifizieren ist es möglicherweise notwendig, die Zellen mit NF- κ B aktivierenden Stimulationsfaktoren, wie TNF α , IL1, *Helicobacter pylori* usw. zu behandeln was jedoch aus Zeitmangel nicht mehr durchgeführt werden konnte.

5.3 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen dem COP9-Signalosom und den NF- κ B-Komponenten I κ B α und RelA charakterisiert. Dabei wurden die CSN interagierenden Untereinheiten und die involvierten Bindedomänen identifiziert. Im Zuge dessen konnte zum Verständnis und zur Entwicklung eines Modells zur Stabilisierung von I κ B α und RelA durch das CSN unter NF- κ B aktivierten Bedingungen beigetragen werden. Die hier analysierten Interaktionen umfassen allerdings nur einen Teil des NF- κ B-Systems. Das NF- κ B-System ist für zahlreiche zelluläre Prozesse wie z.B. Entzündungen, Krebs und Autoimmunerkrankungen ein wichtiger Signalweg und daher Gegenstand vieler Forschungsprojekte (Gilmore et al., 2002; Ben-Neriah und Karin, 2011; Hayashi und Faustman, 2000). Die Untersuchungen zur Rolle des COP9-Signalosoms im NF- κ B-Signalweg stehen jedoch nach wie vor am Anfang. Allein das komplette Funktionspektrum von RelA im Zellkern ist bisher nicht beschrieben. Es existieren aller Voraussicht nach noch weitere Stellen im NF- κ B-System, wo denen das CSN involviert ist. Dazu zählen nicht nur Proteine der I κ B-Proteinfamilie. Jedes durch Ubiquitylierung regulierte Protein kann eine weitere Möglichkeit bieten NF- κ B durch das CSN zu regulieren. Die bereits erwähnte „Tandem-Affinity-Purification“ wäre ein Ansatz, um auf verschiedene Weise NF- κ B aktivierten Zellen CSN-Interaktionspartner zu ermitteln. So könnten neue Interaktionspartner aus kanonischen und alternativen NF- κ B aktivierenden Signalwegen erforscht werden. In nicht stimulierten Zellen waren NF- κ B-Interaktionen mit dem CSN-Komplex gemäß den Arbeiten von Fang et al. (2012) nicht nachweisbar. Zahlreiche Komponenten der NF- κ B-Signalwege unterliegen der Regulation durch E3-Ubiquitinligasen, unter denen zumindest die CRLs durch das CSN reguliert werden. Dazu existiert aller Voraussicht nach noch eine hohe Zahl an Regulatoren und Komponenten, die bisher nicht charakterisiert wurden. Nach vollständiger Charakterisierung aller Komponenten würde ein komplexes Netzwerk entstehen in dem das CSN eine essentielle Rolle spielt.

Die Interaktion zwischen dem CSN und I κ B α und RelA sollte weiterhin genauer charakterisiert werden. Man würde z.B. die genaue Interaktionssequenz der Interaktionspartner ermitteln oder die räumliche Struktur von beiden Interaktionen durch Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse aufklären. Weiterhin besteht die Möglichkeit die Wechselwirkung mit Hilfe einer Kinetik quantifizieren. Diese Erkenntnisse könnten zudem sehr hilfreich für das Entwickeln neuer Therapiestrategien bei Krankheiten deren Ursache ein gestörter NF- κ B-Signalweg ist. In einigen Tumorzellen sind NF- κ B-Signalwege abnormal aktiviert (Perkins, 2012). Inhibitoren für eine Interaktion zwischen dem CSN und Komponenten des NF- κ B-Signalwegs wie z.B. RelA könnten als neue Medikamente zur Behandlung von Entzündungen und bestimmten Krebserkrankungen infrage kommen, da NF- κ B potentiell in der Lage ist das Überleben und die Bösartigkeit von Tumorzellen zu Regulieren (Perkins, 2012).

6 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
%	Prozent
*g	Faktor Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
AK	Antikörper
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cm	Zentimeter
DD	Death-Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Deoxyribonuklease
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötale-Kälber-Serum
g	Gramm
HRP	Meerrettichperoxidase
IB	Western-Blot
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IT	<i>in vitro</i> -Translation
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
l	Liter
LZ	Leucin-Zipper
min	Minute
ml	Milliliter
M	Molar

6 Abkürzungen

mm	Millimeter
mM	Millimolar
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
μg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
NLS	Nuclear Localisation Signal
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PS	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RH	Rel-Homologie
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RIPA	Radioimmunpräzipitationsansatz
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std.	Stunde
TA	Transaktivierung
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBS	Tris-Buffered Saline
U	Units (Einheiten)
z.A.	zur Analyse
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
∅	ohne

Literaturverzeichnis

- Alkalay, I., Yaron, A., Hatzubai, A., Orian, A., Ciechanover, A., und Y, B.-N. (1995). Stimulationdependent I κ B alpha phosphorylation marks the NF- κ B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:10599–10603.
- Antonsson, A., Hughes, K., Edin, S., und Grundström, T. (2003). Regulation of c-Rel nuclear localization by binding of ca^{2+} /calmodulin. *Mol Cell Biol*, 23:1418–1427.
- Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R., Virelizier, J., und Dargemont, C. (1997). Nuclear localization of I κ B α promotes active transport of NF- κ B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci*, 110:369–378.
- Beinke, S., Belich, M. P., und C, L. S. (2002). The death domain of NF- κ B1 p105 is essential for signal-induced p105 proteolysis. *J Biol Chem*, 227:24162–24168.
- Ben-Neriah, Y. und Karin, M. (2011). Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nature Immunol*, 12:715–723.
- Bertrand, M. J., Milutinovic, S., Dickson, K. M., Ho, W. C., Boudreault, A., Durkin, J., Gillard, J. W., Jaquith J B, Morris, S. J., und Barker, P. A. (2008). cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell*, 30:689–700.
- Bianchi, K. und Meier, P. (2009). A tangled web of ubiquitin chains: breaking news in TNF-R1 signaling. *Mol Cell*, 36:736–742.
- Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S., Hopf, C., Huhse, B., Mangano, R., Michon, A., Schirle, M., Schlegl, J., Schwab, M., Stein, M., Bauer, A., Casari, G., Drewes, G., Gavin, A., Jackson, D., Joberty, G., Neubauer, G., Rick, J., Kuster, B., und Superti-Furga, G. (2004). A physical and functional map of the human TNF- α /NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol*, 6:97–105.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254.
- Chen, L., Williams, S., Mu, Y., Nakano, H., Duerr, J., Buckbinder, L., und Greene, W. (2005). NF- κ B RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Mol Cell Biol*, 25:7966–7975.
- Chen, Z. J., Parent, L., und Maniatis, T. (1996). Site-specific phosphorylation of I κ B α by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell*, 84:853–862.
- Cohen, S., Orian, A., und 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*, 276:26769–26776.

- Cope, G. A., Suh, G. S., Aravind, L., Schwarz, S. E., Zipursky, S. L., Koonin, E. V., and Deshaies, R. J. (2002). Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of nedd8 from cul1. *Science*, 298:608–611.
- Covic, M., Hassa, P., Saccani, S., Buerki, C., Meier, N., Lombardi, C., Imhof, R., Bedford, M., Natoli, G., and Hottiger, M. (2005). Arginine methyltransferase CARM1 is a promoter-specific regulator of NF- κ B-dependent gene expression. *EMBO J*, 24:85–96.
- da Silva Correia, J., Miranda, Y., Leonard, N., and Ulevitch, R. (2007). The subunit CSN6 of the COP9 signalosome is cleaved during apoptosis. *J Biol Chem*, 282:12557–12565.
- Dechend, R., Hirano, F., Lehmann, K., Heissmeyer, V., Ansieau, S., Wulczyn, F., Scheidereit, C., and Leutz, A. (1999). The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF- κ B/Rel and nuclear co-regulators. *Oncogene*, 18:3316–3323.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., and Karin, M. (1999). Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science*, 284:309–313.
- Dessau, M., Halimi, Y., Erez, T., Chomsky-Hecht, O., Chamovitz, D., and Hirsch, J. (2008). The *Arabidopsis* COP9 Signalosome Subunit 7 Is a Model PCI Domain Protein with Subdomains Involved in COP9 Signalosome Assembly. *Plant Cell*, 20:2815–1834.
- Dornan, D., Wertz, I., Shimizu, H., Arnott, D., Frantz, G. D., Dowd, P O'Rourke, K., Koeppen, H., and Dixit, V. M. (2004). The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature*, 429:86–92.
- Enchev, R., Scott, D., da Fonseca, P., Schreiber, A., Monda, J., Schulman, B., Peter, M., and Morris, E. (2012). Structural basis for a reciprocal regulation between SCF and CSN. *Cell Rep*, 2:616–627.
- Fan, Y., Mao, R., Zhao, Y., Yu, Y., Sun, W., Song, P., Shi, Z., Zhang, D., Yvon, E., Zhang, H., Fu, S., and Yang, J. (2009). Tumor necrosis factor- α induces RelA degradation via ubiquitination at lysine 195 to prevent excessive nuclear factor- κ b activation. *J Biol Chem*, 284:29290–29297.
- Fang, L., Kaake, R., Patel, V., Yang, Y., Baldi, P., and Huang, L. (2012). Mapping the protein interaction network of the human COP9 signalosome complex using a label-free QTAX strategy. *Mol Cell Proteomics*, 11:138–147.
- Fiorini, E., Schmitz, I., Marissen, W., Osborn, S., Touma, M., Sasada, T., Reche, P., Tibaldi, E., Hussey, R. E., Kruisbeek, A., Reinherz, E., and Clayton, L. (2002). Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF- κ B inhibitor. *Mol Cell*, 9:637–648.
- Freilich, S., Oron, E., Kapp, Y., Nevo-Caspi, Y., Orgad, S., Segal, D., and Chamovitz, D. A. (1999). The COP9 signalosome is essential for development of *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol*, 9:1187–1190.
- Ganchi, P. A., Sun, S., Greene, W., and Ballard, D. W. (1992). I κ B/MAD-3 masks the nuclear localization signal of NF- κ B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF- κ B p65 DNA binding. *Mol Biol Cell*, 3:1339–1352.
- Ganesh, L., Burstein, E., Guha-Niyogi, A., Louder, M., Mascola, J., Klomp, L., Wijmenga, C., Duckett, C., Nabel, and GJ (2003). The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4+ lymphocytes. *Nature*, 426:853–857.

- Geng, H., Wittwer, T., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., und Schmitz, M. L. (2009). Phosphorylation of NF- κ B p65 at Ser468 controls its COMMD1-dependent ubiquitination and target gene-specific proteasomal elimination. *EMBO Rep*, 10:381–386.
- Gerlach, B., Cordier, S., Schmukle, A., Emmerich, C., Rieser, E., Haas, T., Webb, A., Rickard, J., Anderton, H., Wong, W., Nachbur, U., Gangoda, L., Warnken, U., Purcell, A., Silke, J., und Walczak, H. (2011). Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature*, 471:591–596.
- Gerondakis, S. und Siebenlist, U. (2010). Roles of the NF- κ B pathway in lymphocyte development and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2:a000182.
- Gilmore, T. (2006). Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25:6680–6684.
- Gilmore, T., Gapuzan, M., Kalaitzidis, D., und Starczynowski, D. (2002). Rel/NF- κ B/I κ B signal transduction in the generation and treatment of human cancer. *Cancer Lett*, 181:1–8.
- Giot, L., Bader, J., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y., Ooi, C., Godwin, B., Vitols, E., Vijayadamodar, G., Pochart, P., Machineni, H., Welsh, M., Kong, Y., Zerhusen, B., Malcolm, R., Varrone, Z., Collis, A., Minto, M., Burgess, S., McDaniel, L., Stimpson, E., Spriggs, F., Williams, J., Neurath, K., Ioime, N., Agee, M., Voss, E., Furtak, K., Renzulli, R., Aanensen, N., Carrola, S., Bickelhaupt, E., Lazovatsky, Y., DaSilva, A., Zhong, J., Stanyon, C., Finley, R., White, K., Braverman, M., Jarvie, T., Gold, S., Leach, M., Knight, J., Shimkets, R., McKenna, M., Chant, J., und Rothberg, J. (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 302:1727–1736.
- Goldenberg, S., Cascio, T., Shumway, S., Garbutt, K., Liu, J., Xiong, Y., und Zheng, N. (2004). Structure of the Cand1-Cull1-Roc1 complex reveals regulatory mechanisms for the assembly of the multisubunit cullin-dependent ubiquitin ligases. *Cell*, 119:517–528.
- Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A., Tanaka, K., und Nakatani, Y. (2003). The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell*, 113:357–367.
- Haas, T. L., Emmerich, C. H., Gerlach, B., Schmukle, A. C., Cordier, S. M., Rieser, E., Feltham, R., Vince, J., Warnken, U., Wenger, T., Koschny, R., Komander, D., Silke, J., und Walczak, H. (2009). Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol Cell*, 36:831–844.
- Hailfinger, S., Nogai, H., Pelzer, C., Jaworski, M., Cabalzar, K., Charton, J., Guzzardi, M., Décaillot, C., Grau, M., Dörken, B., Lenz, P., Lenz, G., und Thome, M. (2011). Malt1-dependent RelB cleavage promotes canonical NF- κ B activation in lymphocytes and lymphoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108:14596–14601.
- Hatada, E. N., Nieters, A., Wulczyn, F. G., Naumann, M., Meyer, R., Nucifora, G., McKeithan, T. W., und C., S. (1992). The ankyrin repeat domains of the NF- κ B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF- κ B dna binding. *proc. natl. acad. sci.* 89: 2489-2493. *Proc Natl Acad*, 89:2489–2493.
- Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N., und Nakayama, K. (2001). U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem*, 276:33111–33120.

- Hayashi, T. und Faustman, D. (2000). Defective function of the proteasome in autoimmunity: involvement of impaired NF- κ B activation. *Diabetes Technol Ther*, 2:415–28.
- Heissmeyer, V., Krappmann, D., Hatada, E. N., und Scheidereit, C. (2001). Shared pathways of I κ B kinase-induced SCF β^{TrCP} -mediated ubiquitination and degradation for the NF- κ B precursor p105 and I κ B α . *Mol Cell Biol*, 21:1024–1035.
- Henke, W., Ferrell, K., Bech-Otschir, D., Seeger, M., Schade, R., Jungblut, P., Naumann, M., und Dubiel, W. (1999). Comparison of human COP9 signalosome and 26S proteasome 'lid'. *Mol Biol Rep*, 26:29–34.
- Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Krönke, M., Ben-Neriah, Y., und Baeuerle, P. A. (1993). Rapid proteolysis of I κ B α is necessary for activation of transcription factor NF- κ B. *Nature*, 365:182–185.
- Hetfeld, B., Helfrich, A., Kapelari, B., Scheel, H., Hofmann, K., Guterman, A., Glickman, M., Schade, R., Kloetzel, P., und Dubiel, W. (2005). The zinc finger of the csn-associated deubiquitinating enzyme usp15 is essential to rescue the e3 ligase rbx1. *Curr Biol*, 15:1217–1221.
- Hirotsu, T., Lee, P., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S., und Takeda, K. (2005). The nuclear I κ B protein I κ BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J Immunol*, 174:3650–3657.
- Hofmann, K. und Bucher, P. (1998). The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. *Trends Biochem Sci*, 23:204–205.
- Hong, X., Xu, L., Li, X., Zhai, Z., und Shu, H. (2001). CSN3 interacts with IKK γ and inhibits TNF- but not IL-1-induced NF- κ B activation. *FEBS Lett*, 499:133–136.
- Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G., und Goeddel, D. V. (1996). TRADD–TRAF2 and TRADD–FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, 84:299–308.
- Huang, L., Kinnucan, E., Wang, G., Beaudenon, S., Howley, P., Huibregtse, J., und NP, P. (1999). Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science*, 286:1321–1326.
- Huang, X., Hetfeld, B., Seifert, U., Kähne, T., Kloetzel, P. M., Naumann, M., Bech-Otschir, D., und Dubiel, W. (2005). Consequences of COP9 signalosome and 26S proteasome interaction. *The FEBS J*, 272:3909–3917.
- Huang, X., Ordemann, J., Müller, J., und Dubiel, W. (2012). The COP9 signalosome, cullin 3 and Keap1 supercomplex regulates CHOP stability and adipogenesis. *Biol Open*, 1:705–710.
- Huibregtse, J., Scheffner, M., Beaudenon, S., und Howley, P. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:2563–2567.
- Ikeda, F., Deribe, Y. L., Skånland, S. S., Stieglitz, B., Grabbe, C., Franz-Wachtel, M., van Wijk, S., Goswami, P., Nagy, V., Terzic, J., Tokunaga, F., Androulidaki, A., Nakagawa, T., Pasparakis, M., Iwai, K., Sundberg, J., Schaefer, L., Rittinger, K., Macek, B., und Dikic, I. (2011). SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF- κ B activity and apoptosis. *Nature*, 471:637–641.

- Isono, E., Saeki, Y., Yokosawa, H., und Toh-e, A. (2004). Rpn7 Is required for the structural integrity of the 26 S proteasome of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 279:27168–27176.
- Israël, A. (2009). The IKK Complex, a Central Regulator of NF- κ B Activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2:a000158.
- Jacobs, M. D. und Harrison, S. C. (1998). Structure of an I κ B α /NF- κ B complex. *Cell*, 95:749–758.
- Jaffray, E., Wood, K. M., und Hay, R. T. (1995). Domain organization of I κ B α and sites of interaction with NF- κ B p65. *Mol Cell Biol*, 15:2166–2172.
- Kanayama, A., Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K., Hong, M., Shaito, A., Chiu, Y. H., Deng, L., und Chen, Z. J. (2004). TAB2 and TAB3 activate the NF- κ B pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell*, 15:Mol. Cell 15, 535–548 (2004).
- Kannan, Y., Yu, J., Raices, R., Seshadri, S., Wei, M., Caligiuri, M., und Wewers, M. (2011). I κ B ζ augments IL-12- and IL-18-mediated IFN- γ production in human NK cells. *Blood*, 117:2855–2863.
- Kato, J. und Yoneda-Kato, N. (2009). Mammalian COP9 signalosome. *Genes to Cells*, 300:1209–1225.
- Kovac, A., Zilka, N., Kazmerova, Z., Cente, M., Zilkova, M., und Novak, M. (2011). Misfolded truncated protein τ induces innate immune response via MAPK pathway. *J Immunol*, 187:2732–2739.
- Krappmann, D. und Scheidereit, C. (1997). Regulation of NF- κ B activity by I κ B α and I κ B β stability. *Immunobiology*, 198:3–13.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227:680–685.
- Lawrence, T., Bebien, M., Liu, G., Nizet, V., und Karin, M. (2005). IKK α limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature*, 434:1138–1143.
- Lee, J., Yi, L., Li, J., Schweitzer, K., Borgmann, M., Naumann, M., und Wu, H. (2013). Crystal structure and versatile functional roles of the COP9 signalosome subunit 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110:11845–11850.
- Lei, D., Li, F., Su, H., Liu, J., Wei, N., und Wang, X. (2013). Hepatic Deficiency of COP9 Signalosome Subunit 8 Induces Ubiquitin-Proteasome System Impairment and Bim-Mediated Apoptosis in Murine Livers. *PLoS One*, 8:10.1371/journal.pone.0067793.
- Li, H., Wittwer, T., Weber, A., Schneider, H., Moreno, R., Maine, G. N., Kracht, M., Schmitz, M. L., und Burstein, E. (2012). Regulation of NF- κ B activity by competition between RelA acetylation and ubiquitination. *Oncogene*, 31:611–623.
- Li, J., Chai, B., Zhang, W., Liu, Y., Ammori, J., und Mulholland, M. (2007). Ankyrin repeat and SOCS box containing protein 4 (Asb-4) interacts with GPS1 (CSN1) and inhibits c-Jun nh₂-terminal kinase activity. *Cell Signal*, 19:1185–1192.
- Li, W., Zang, B., Liu, C., Lu, L., Wei, N., Cao, K., Deng, X., und Wang, X. (2011). TSA1 interacts with CSN1/CSN and may be functionally involved in Arabidopsis seedling development in darkness. *J Genet Genomics*, 38:539–546.

- Liu, C., Guo, L., Menon, S., Jin, D., Pick, E., Wang, X., Deng, X., und Wei, N. (2013). COP9 Signalosome Subunit Csn8 Is Involved in Maintaining Proper Duration of the G1 Phase. *J Biol Chem*, 288:20443–20452.
- Luke-Glaser, S., Roy, M., Larsen, B., Le Bihan, T., Metalnikov, P., Tyers, M., Peter, M., und Pintard, L. (2007). CIF-1, a shared subunit of the COP9 signalosome and eukaryotic initiation factor 3 complexes, regulates MEL-26 levels in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Mol Cell Biol*, 27:4526–4540.
- Lyapina, S., Cope, G., Shevchenko, A., Serino, G., Tsuge, T., Zhou, C., Wolf, D., Wei, N., Shevchenko, A., und Deshaies, R. (2001). Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science*, 292:1382–1385.
- Lykke-Andersen, K., Schaefer, L., Menon, S., Deng, X. W., Miller, J. B., und Wei, N. (2003). Disruption of the COP9 signalosome Csn2 subunit in mice causes deficient cell proliferation, accumulation of p53 and cyclin E, and early embryonic death. *Mol Cell Biol*, 23:6790–6797.
- Maine, G. N., Mao, X., Komarck, C., und Burstein, E. (2007). COMMD1 promotes the ubiquitination of NF- κ B subunits through a Cullin-containing ubiquitin ligase. *EMBO J*, 26:436–447.
- Mao, X., Gluck, N., Li, D., Maine, G., Li, H., Zaidi, I., Repaka, A., Mayo, M., und Burstein, E. (2009). GCN5 is a required cofactor for a ubiquitin ligase that targets NF- κ B/RelA. *Genes Dev*, 23:849–861.
- Marine, J. (2012). Spotlight on the role of COP1 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 12:455–464.
- Martinez, E., Palhan, V., Tjernberg, A., Lyman, E., Gamper, A., Kundu, T., Chait, B., und Roeder, R. (2001). Human staga complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mrna splicing and dna damage-binding factors in vivo. *Mol Cell Biol*, 21:6782–6795.
- Maytal-Kivity, V., Pick, E., Hofmann, K., und Glickman, M. H. (2003). The COP9 signalosome-like complex in *S. cerevisiae* and links to other PCI complexes. *Int J Biochem Cell Biol*, 4:706–715.
- Menon, S., Tsuge, T., Dohmae, N., Takio, K., und Wei, N. (2008). Association of sap130/sf3b-3 with cullin-ring ubiquitin ligase complexes and its regulation by the cop9 signalosome. *BMC Biochem*, 9:1471–2091–9–1.
- Michel, F., Soler-Lopez, M., Petosa, C., Cramer, P., Siebenlist, U., und W, M. C. (2001). Crystal structure of the ankyrin repeat domain of Bcl-3: a unique member of the I κ B protein family. *EMBO J*, 20:6180–6190.
- Müller, J. R. und Siebenlist, U. (2003). Lymphotoxin β receptor induces sequential activation of distinct NF- κ B factors via separate signaling pathways. *J Biol Chem*, 278:12006–12012.
- Nalepa, G., Rolfe, M., und Harper, J. (2006). Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Drug Discov*, 5:596–613.
- Naumann, M., Bech-Otschir, D., Huang, X., Ferrell, K., und Dubiel, W. (1999). COP9 signalosome-directed c-Jun activation/stabilization is independent of JNK. *J Biol Chem*, 274:35297–35300.
- Naumann, M., Wulczyn, F., und Scheidereit, C. (1993). The NF- κ B precursor p105 and the proto-oncogene product Bcl-3 are I κ B molecules and control nuclear translocation of NF- κ B. *EMBO J*, 12:213–222.

- Neumann, M. und Naumann, M. (2007). Beyond I κ Bs: alternative regulation of NF- κ B activity. *FASEB J*, 21:2642–2654.
- Ohh, M., Kim, W. Y., Moslehi, J. J., Chen, Y., Chau, V., Read, M. A., und Kaelin, W. G. J. (2002). An intact nedd8 pathway is required for cullin-dependent ubiquitylation in mammalian cells. *EMBO Rep*, 3:177–182.
- Olma, M., Roy, M., Le Bihan, T., Sumara, I., Maerki, S., Larsen, B., Quadroni, M., Peter, M., Tyers, M., und Pintard, L. (2009). An interaction network of the mammalian COP9 signalosome identifies Dda1 as a core subunit of multiple Cul4-based E3 ligases. *J Cell Sci*, 122:1035–1044.
- Orel, L., Neumeier, H., Hochrainer, K., Binder, B. R., und Schmid, J. A. (2010). Crosstalk between the NF- κ B activating IKK-complex and the CSN signalosome. *J Cell Mol Med*, 14:1555–1568.
- Orian, A., Schwartz, A. L., Israel, A., Whiteside, S., Kahana, C., und Ciechanover, A. (1999). Structural motifs involved in ubiquitin-mediated processing of the NF- κ B precursor p105: roles of the glycine-rich region and a downstream ubiquitination domain. *Mol Cell Biol*, 19:3664–3673.
- O’Shea, J. M. und Perkins, N. D. (2008). Regulation of the RelA (p65) transactivation domain. *Biochem Soc Trans*, 36:603–608.
- Palombella, V., Rando, O., Goldberg, A., und Maniatis, T. (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the nf- κ b1 precursor protein and the activation of nf- κ b. *Cell*, 78:773–785.
- Perkins, N. D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:49–62.
- Perkins, N. D. (2012). The diverse and complex role of NF- κ B subunits in cancer. *Nat Rev Cancer*, 12:121–132.
- Petroski, M. D. und Deshaies, R. J. (2005). Function and regulation of cullin-ring ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6:9–20.
- Phizicky, E. und Fields, S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev*, 59:94–123.
- Pick, E., Golan, A., Zimble, J. Z., Guo, L., Sharaby, Y., Tsuge, T., Hofmann, K., und Wei, N. (2012). The minimal deneddylase core of the COP9 signalosome excludes the Csn6 MPN-domain. *PLoS One*, 7:e43980.
- Pick, E., Hofmann, K., und Glickman, M. H. (2009). PCI Complexes: Beyond the Proteasome, CSN, and eIF3 Troika. *Mol Cell*, 35:260–264.
- Rahighi, S., Ikeda, F., Kawasaki, M., Akutsu, M., Suzuki, N., Kato, R., Kensche, T., Uejima, T., Bloor, S., Komander, D., Randow, F., Wakatsuki, S., und Dikic, I. (2009). Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF- κ B activation. *Cell*, 136:1098–1109.
- Rao, P., Hayden, M., Long, M., Scott, M. L., West, A., Zhang, D., Oeckinghaus, A., Lynch, C., Hoffmann, A., Baltimore, D., und Ghosh, S. (2010). I κ B β acts to inhibit and activate gene expression during the inflammatory response. *Nature*, 466:1115–1119.

- Rape, M. und Jentsch, S. (2002). Taking a bite: proteasomal protein processing. *Nat. Cell Biol.*, 4:113–116.
- Scheel, H. und Hofmann, K. (2005). Prediction of a common structural scaffold for proteasome lid, COP9-signalosome and eIF3 complexes. *BMC Bioinformatics*, 6:71.
- Schwechheimer, C. und Deng, X. W. (2001). COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. *Trends Cell Biol*, 11:420–426.
- Schweitzer, K., Bozko, P. M., Dubiel, W., und Naumann, M. (2007). CSN controls NF- κ B by deubiquitinylation of I κ B α . *EMBO J*, 26:1532–1541.
- Schägger, H. und v. Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166:368–379.
- Schütze, S., Tchikov, V., und Schneider-Brachert, W. (2008). Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:655–662.
- Seeger, M., Kraft, R., Ferrell, K., Bech-Otschir, D., Dumdey, R., Schade, R., Gordon, C., Naumann, M., und Dubiel, W. (1998). A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *FASEB J*, 12:469–478.
- Sen, R. und Baltimore, D. (1986). Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 47:921–928.
- Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., und Ueda, T. (2001). Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol*, 8:751–755.
- Sil, A. K., Maeda, S., Sano, Y., Roop, D. R., und Karin, M. (2004). I κ B kinase- α acts in the epidermis to control skeletal and craniofacial morphogenesis. *Nature*, 428:660–664.
- Silverman, N. und Maniatis, T. (2001). Review NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev*, 15:2321–2342.
- Skaar, J., Pagan, J., und Pagano, M. (2013). Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14:369–381.
- Spain, B., Bowdish, K., Pacal, A., Staub, S., Koo, D., Chang, C., Xie, W., und Colicelli, J. (1996). Two human cDNAs, including a homolog of Arabidopsis FUS6 (COP11), suppress G-protein- and mitogen-activated protein kinase-mediated signal transduction in yeast and mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 16:6698–6706.
- Spratt, D., Walden, H., und GS, S. (2014). RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions. *Biochem J*, 458:421–437.
- Stein, B., Baldwin, A., Ballard, D., Greene, W., Angel, P., und Herrlich, P. (1993). Cross-coupling of the NF- κ B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. *EMBO J*, 12:3879–3891.
- Sun, S., Ganchi, P., Ballard, D., und Greene, W. (1993). NF- κ B controls expression of inhibitor I κ B α : evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*, 259:1912–1915.
- Sun, Y., Wilson, M., und Majerus, P. (2002). Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase associates with the cop9 signalosome by binding to csn1. *J Biol Chem*, 277:45759–45764.

- Suyang, H., Phillips, R., Douglas, I., und Ghosh, S. (1996). Role of unphosphorylated, newly synthesized $I\kappa B\beta$ in persistent activation of NF- κ B. *Mol Cell Biol*, 16:5444–9.
- Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T., und Poellinger, L. (2000). Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J*, 19:4298–4309.
- Thome, M., Charton, J., Pelzer, C., und Hailfinger, S. (2010). Antigen receptor signaling to NF-kappaB via CARMA1, BCL10, and MALT1. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2:a003004.
- Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S., Tanaka, K., Nakano, H., und Iwai, K. (2011). SHARPIN is a component of the NF- κ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature*, 471:633–636.
- Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., Yamamoto, M., Akira, S., Takao, T., Tanaka, K., und Iwai, K. (2009). Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- κ B activation. *Nat Cell Biol*, 11:123–132.
- Totzke, G., Essmann, F., Pohlmann, S., Lindenblatt, C., Jänicke, R. U., und Schulze-Osthoff, K. (2006). A novel member of the $I\kappa b$ family, human $I\kappa b\zeta$, inhibits transactivation of p65 and its DNA binding. *J Biol Chem*, 281:12645–12654.
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76:4350–4354.
- Tran, K., Merika, M., und Thanos, D. (1997). Distinct functional properties of $I\kappa b\alpha$ and $I\kappa B\beta$. *Mol Cell Biol*, 17:5386–5399.
- Troffer-Charlier, N., Cura, V., Hassenboehler, P., Moras, D., und Cavarelli, J. (2007). Functional insights from structures of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 domains. *EMBO J*, 26:4391–4401.
- Tsuge, T., Matsui, M., und Wei, N. (2001). The subunit 1 of the COP9 signalosome suppresses gene expression through its N-terminal domain and incorporates into the complex through the PCI domain. *J Mol Biol*, 305:1–9.
- Vallabhapurapu, S. und Karin, M. (2009). Regulation and function of NF- κ b transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 27:693–733.
- Wei, N. und Deng, X. (1992). COP9: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in arabidopsis. *Plant Cell*, 4:507–518.
- Wei, N., Serino, G., und Deng, X. (2008). The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends Biochem Sci*, 33:592–600.
- Wei, Z., Zhang, P., Zhou, Z., Cheng, Z., Wan, M., und Gong, W. (2004). Crystal structure of human eIF3k, the first structure of eIF3 subunits. *J Biochem*, 279:34983–34990.
- Weil, R., Laurent-Winter, C., und Israël, A. (1997). Regulation of $I\kappa B\beta$ degradation. Similarities to and differences from $I\kappa B\alpha$. *J Biol Chem*, 272:9942–9949.
- Welteke, V., Eitelhuber, A., Düwel, M., Schweitzer, K., Naumann, M., und D, K. (2009). COP9 signalosome controls the Carma1-Bcl10-Malt1 complex upon T-cell stimulation. *EMBO Rep*, 10:642–648.

- Wen-Ming, C. (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer Letters*, 328:222–225.
- Whiteside, S. T., Epinat, J. C., Rice, R. N., und Israel, A. (1997). $I\kappa B\epsilon$, a novel member of the $I\kappa B$ family, controls RelA and c-Rel NF- κB activity. *EMBO J*, 16:1413–1426.
- Wratten, M., Brendolan, A., Ronco, C., La Greca, G., und Tetta, C. (2001). Should we target signal pathways instead of single mediators in the treatment of sepsis? *Contrib Nephrol*, 1:400–414.
- Wulczyn, F. G., Naumann, M., und Scheidereit, C. (1992). Candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF- κB . *Nature*, 358:597–599.
- Xiao, G., Harhaj, E. W., und Sun, S. C. (2001). NF- κB -inducing kinase regulates the processing of NF- $\kappa B2$ p100. *Mol Cell*, 7:401–409.
- Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeuchi, O., Takeshige, K., Saitoh, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Yamamoto, S., Muta, T., Takeda, K., und Akira, S. (2004). Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein $I\kappa B\zeta$. *Nature*, 430:218–222.
- Yamauchi, S., Ito, H., und Miyajima, A. (2010). $I\kappa b\eta$, a nuclear $I\kappa B$ protein, positively regulates the NF- κB -mediated expression of proinflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107:11924–11929.
- Yamazaki, S., Muta, T., und Takeshige, K. (2001). A novel $I\kappa B$ protein, $I\kappa b-\zeta$, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor- κB in the nuclei. *J Biol Chem*, 276:27657–27662.
- Zeytuni, N. und Zarivach, R. (2012). Structural and functional discussion of the tetra-trico-peptide repeat, a protein interaction module. *Structure*, 20:397–405.
- Zhou, C., Wee, S., Rhee, E., Naumann, M., Dubiel, W., und Wolf, D. (2003). Fission yeast COP9/signalosome suppresses cullin activity through recruitment of the deubiquitylating enzyme Ubp12p. *Mol Cell*, 11:927–938.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Michael Naumann für die engagierte Betreuung der Arbeit und des Forschungsprojektes.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Katrin Schweitzer für die Einarbeitung in das Thema, die Unterstützung bei meiner Arbeit, sowie das Korrekturlesen und das entgegengebrachte Vertrauen.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Claus Scheidereit für die Begutachtung der Arbeit als Zweitgutachter und Prof. Dr. Thomas Fischer für die Mitbetreuung meines Themas im GRK1167.

Mein Dank gilt auch der Koordinatorin des GRK1167 Dr. Ann-Christin Schmädicke für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ein Dank auch an Ute Thiel, Astrid Giese und Christine Wolf für die Bereitstellung von Zellen, Plasmiden und das Erledigen von Bestellungen.

Ich danke auch allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Innere Medizin für die gute Arbeitsatmosphäre.

Ein weiterer Dank gilt der DFG für die Förderung meines Projektes.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die mentale Unterstützung.

Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema:

Molekulare Charakterisierung der Interaktion des COP9-Signalosoms mit NF- κ B/RelA und I κ B α

selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, 13.11.2014