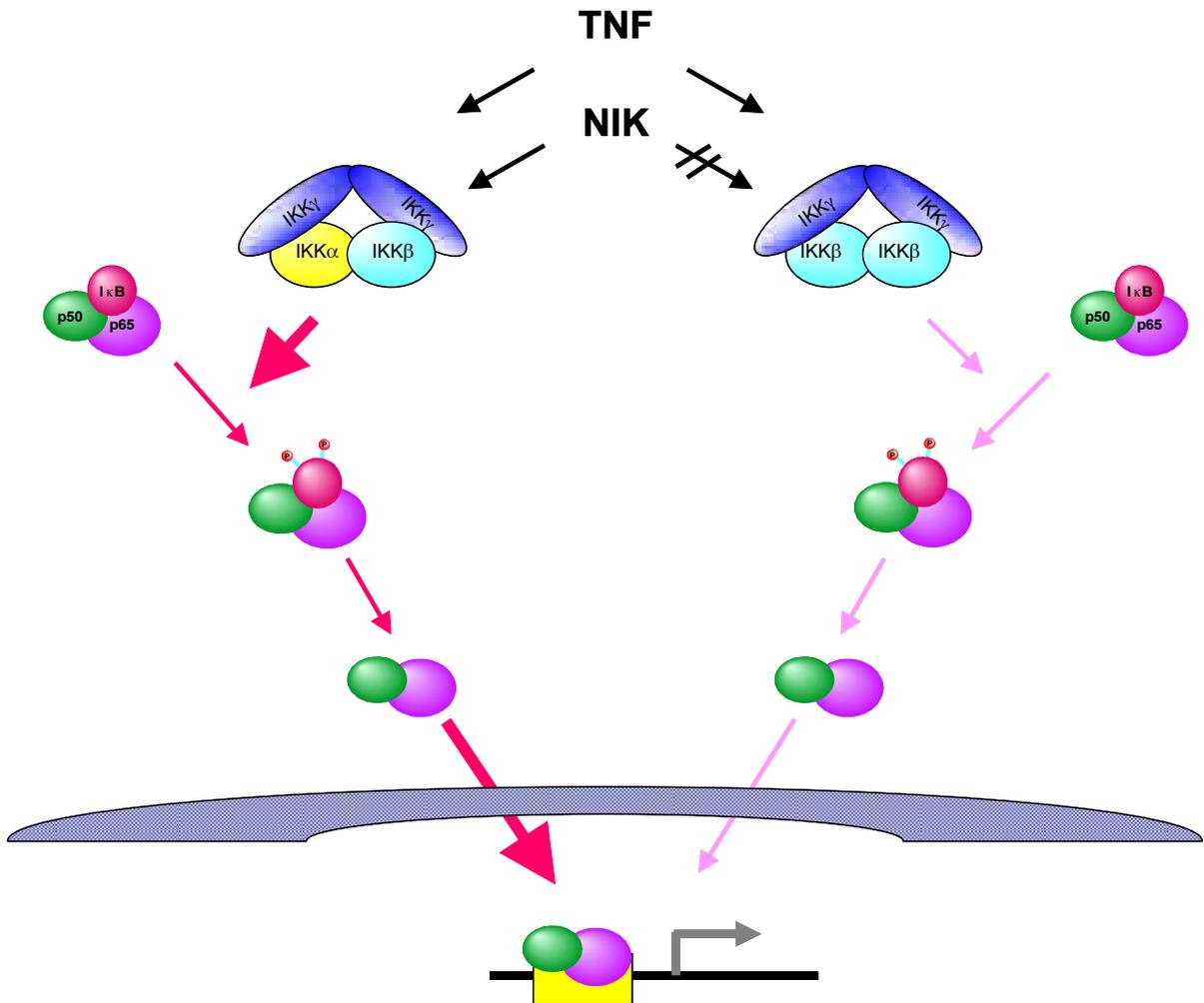

TNF-vermittelte Signalübertragung – Rolle von IKK-Subkomplexen und Charakterisierung der TNF-Toleranz

Martina Quirling



Cuvillier Verlag Göttingen

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Technischen Universität München

**TNF-vermittelte Signalübertragung – Rolle von IKK-Subkomplexen und
Charakterisierung der TNF-Toleranz**

Martina Quirling

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher
2. Univ.-Prof. Dr. K. Brand

Die Dissertation wurde am 22.09.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 11.11.2004 angenommen.

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2004

Zugl.: München, Techn. Univ., Diss., 2004

ISBN 3-86537-322-4

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2004

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2004

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-322-4

Gewidmet
meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität München in der molekularbiologischen Forschungsgruppe von Herrn Prof. Dr. K. Brand durchgeführt. Dem Direktor des Instituts Herrn Prof. Dr. D. Neumeier sowie Herrn Prof. Dr. Brand möchte ich an dieser Stelle Dank sagen für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. Korbinian Brand möchte ich außerdem ganz besonders herzlich danken für die Bereitstellung dieses interessanten und spannenden Themas, die wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertation, die riesige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit, die durch viele fachliche Diskussionen immer wieder neu geweckte Motivation, für unzählige Besprechungen und für den Spaß den wir trotz aller Arbeit oft hatten.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Dr. A. Bacher, Direktor des Lehrstuhls für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München, der sich bereit erklärt hat, meine Dissertation vor der Fakultät für Chemie naturwissenschaftlich zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. Löms Ziegler-Heitbrock, Institut für Inhalationsbiologie der GSF, München-Gauting bzw. Department of Microbiology and Immunology, University of Leicester, UK danke ich für die Kooperation im Toleranzprojekt.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Brand bedanken. Ganz besonderer Dank gilt dabei Frau Dr. Sharon Page für die tolle Zusammenarbeit bei der Charakterisierung der IKK-Subkomplexe, für ihre Hilfe bei allen Fragen zur englischen Sprache und für viele fachliche und nichtfachliche Diskussionen die stets genauso konstruktiv wie lustig waren.

Ein ganz großes Dankeschön geht außerdem auch an Frau Dr. Marion Wagner für die wunderbare Kooperation im Rahmen der Toleranzstudien, die perfekte Einarbeitung in die Thematik der TNF-Toleranz unter anderem durch unzählige Telefonate zwischen Fulda und München, ihre moralische Unterstützung in allen Höhen und Tiefen und für die vielen ernsthaften und humorvollen Gespräche. Bei Frau Carmen Sydlik und Herrn Andreas Zwergal möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich für die erfolgreiche und produktive Zusammenarbeit vor allem in der späteren Phase des TNF-Toleranzprojekts bedanken.

Bei Frau Tamara Eisele möchte ich mich für die Einarbeitung in die Zellkultur sowie andere gängige Labortechniken und bei Frau Christine Grubmüller und Frau Martina Krautkrämer für die großartige Unterstützung der vorliegenden Arbeit, ihre Geduld bei immer neuen Laborversuchen und das hervorragende Arbeitsklima bedanken.

Darüber hinaus geht ein Dankeschön für das kollegiale Miteinander, das besonders angenehme Arbeitsklima und die vielen fachlichen und aber auch nichtfachlichen Diskussionen – in der Reihenfolge ihres zeitlichen Erscheinens - an Frau Dr. Claudia Fischer, Herrn Nikolaus Jilg, Frau Caroline Nothdurfter, Frau Ursula Schmitz, Herrn Dr. Christian Hafner, Herrn Peter Heiß, Frau Katharina Plenagl, Herrn Bernd Saugel, Herrn Christoph Weber, Frau Dr. Karin Huth, Herrn Michel Jakob, Frau Stephanie Lenzke, Herrn Sebastian Maier, Herrn Daniel Bolz, Herrn Andreas Ertl und Herrn Christian Cappello.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie sowie insbesondere der EDV-Abteilung für ihre Unterstützung.

Ich möchte mich außerdem bei Frau Heike Koch bedanken für den moralischen aber auch den fachlichen Beistand schon seit unserem gemeinsamen Studium und dafür, daß sie sich Zeit für das Korrekturlesen meiner Arbeit genommen hat. Ein großes Dankeschön geht zudem an Herrn Christoph Harsch der sich v.a. in der letzten Phase meiner Dissertation jederzeit um meine unzähligen Computerprobleme gekümmert hat, er war oft meine letzte Rettung, danke auch für das Auffinden so mancher Tippfehler!

Mein größter Dank geht jedoch an meine Familie. Meinen lieben Eltern danke ich für ihre Unterstützung in jeder Hinsicht, sie haben mich immer gefördert und mir so meinen bisherigen Werdegang überhaupt erst ermöglicht. Meinem geliebten Mann Christian Quirling danke ich für seine stete Unterstützung, den Rückhalt den er mir jederzeit bietet und dafür, daß er immer für mich da ist.

Die vorliegenden Studien wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Kommission für Klinische Forschung der TU München und der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie gefördert.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das NF- κ B-System	1
1.1.1	Transkriptionsfaktoren der NF- κ B/Rel Familie	1
1.1.2	I κ B-Inhibitorproteine	1
1.1.3	Die Aktivierung des NF- κ B-Systems	2
1.1.4	Der IKK-Komplex – ein zentraler Schritt der Aktivierung.....	4
1.1.5	IKK-Subkomplexe	8
1.1.5.1	Zusätzliche Bestandteile des IKK-Komplexes.....	8
1.1.5.2	Signalübertragung oberhalb des IKK-Komplexes	8
1.1.5.3	IKK β /IKK γ -Subkomplexe	9
1.1.6	Regulation der NF- κ B-abhängigen Transkription	10
1.1.7	Transkriptionelle Kontrolle von NF- κ B-Zielgenen am Beispiel der IL-8- Genexpression	11
1.2	TNF-Toleranz	12
1.2.1	TNF	12
1.2.2	Toleranz.....	13
1.2.3	TNF-induzierte Toleranz.....	13
1.2.4	TNF-assoziierte Signalübertragung und NF- κ B	14
1.3	Fragestellung	16
1.3.1	Identifizierung und Charakterisierung von IKK-Subkomplexe in monozytären Zellen.....	16
1.3.2	Charakterisierung molekularer Mechanismen der TNF-Toleranz	16
2	Material und Methodik	18
2.1	Material.....	18
2.1.1	Antikörper	18
2.1.2	Reagenzien	19
2.1.3	Plasmide	19
2.2	Methodik.....	20
2.2.1	Zellkultur	20
2.2.2	Endotoxin-Test	20
2.2.3	Zytotoxizitätstest (WST-Test).....	21

2.2.4	Isolierung zytosolischer und nukleärer Extrakte	21
2.2.5	In vivo-Phosphorylierung.....	22
2.2.6	Transfektion und Überexpression	22
2.2.7	Western blot-Analyse	23
2.2.8	Immunpräzipitation und Assoziationsassay	24
2.2.9	Immunpräzipitation und Kinaseassay	25
2.2.10	Immundepletion	25
2.2.11	Gelretardierungsassay	26
2.2.12	Statistische Auswertung	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Identifizierung von IKK-Subkomplexen in monozytären Zellen und Charakterisierung von assoziierten Signalwegen.....	28
3.1.1	Identifizierung von endogenen IKK β /IKK γ -Subkomplexen in monozytären Zellen.....	28
3.1.2	Kontrolle der Immundepletionsbedingungen.....	30
3.1.2.1	Überprüfung durch IKK α -Fällung.....	30
3.1.2.2	Überprüfung durch IKK β -Fällung	30
3.1.3	Aktivierung von endogenen monozytären IKK β /IKK γ -Subkomplexen durch TNF	33
3.1.4	IKK β -Immundepletion in monozytären THP-1-Zellen	33
3.1.5	NIK kann die IKK β /IKK γ -Subkomplexe nicht aktivieren.....	35
3.1.5.1	Aktivierbarkeit des NF- κ B-Systems durch Überexpression von NIK.....	35
3.1.5.2	Keine Aktivierung der IKK β /IKK γ -Subkomplexe durch NIK	37
3.1.6	Zusammenbau von IKK β /IKK γ -Subkomplexen durch Überexpression.....	38
3.1.7	Exogene IKK β /IKK γ -Subkomplexe enthalten kein IKK α und sind durch TNF stimulierbar.....	40
3.1.8	Verzögerte Proteolyse von I κ B α in Abwesenheit von IKK α	40
3.1.9	Reduzierte IKK-Aktivität in Abwesenheit von IKK α	42
3.1.10	Verminderte Proteolyse von I κ B α in Anwesenheit von überexprimierten IKK β /IKK γ -Subkomplexen	44
3.2	TNF-Toleranz	47
3.2.1	Inhibierung der IL-8-Zytokin-Produktion in THP-1-Zellen unter Toleranzbedingungen	47

3.2.2	Keine Veränderung der DNA-Bindeaktivität von NF- κ B unter TNF-Toleranzbedingungen	47
3.2.3	Hemmung der IL-8-Promotor-abhängigen Transkription unter TNF-Toleranz ..	48
3.2.4	Bedeutung von C/EBP β - und Ap-1-Bindestellen bei der Ausbildung der TNF-Toleranz.....	49
3.2.5	Die κ B-Bindestelle als minimale Voraussetzung für die Ausbildung der TNF-Toleranz.....	52
3.2.6	Inhibierung der p65-Phosphorylierung unter TNF-Toleranz	52
4	Diskussion.....	55
4.1	Identifizierung von IKK-Subkomplexen in monozytären Zellen und Charakterisierung assoziierter Signalwege	55
4.1.1	Detektion von IKK β /IKK γ -Subkomplexen.....	55
4.1.2	Untersuchung der Stimulierbarkeit von IKK β /IKK γ -Subkomplexen.....	55
4.1.3	Selektive Aktivierbarkeit der IKK β /IKK γ -Subkomplexe	57
4.1.4	IKK β /IKK γ -Subkomplex-assoziierte Signalübertragung	57
4.1.5	IKK α - ein „Turbo-Molekül“?	58
4.1.6	Mögliche therapeutische Ansatzpunkte der IKK β /IKK γ -Subkomplexe.....	60
4.2	Molekulare Mechanismen der TNF-Toleranz.....	61
4.2.1	TNF-Toleranz: Inhibierung der IL-8-Produktion auf transkriptioneller Ebene ...	61
4.2.2	Das κ B-Motiv als minimale Voraussetzung für die Ausbildung der TNF-Toleranz.....	62
4.2.3	Bedeutung der p65-Phosphorylierung.....	62
4.2.4	Schlußbemerkung zur TNF-Toleranz.....	64
5	Zusammenfassung	66
6	Literaturverzeichnis	68
7	Anhang.....	86
7.1	Publikationen.....	86
7.2	Kongreßbeiträge	87
7.3	Abkürzungen	88
7.4	Lebenslauf	93

