Aus der Universitätsklinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie

der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Modulation der NF-κB-Aktivität durch NEMO und GSK-3β in multivesikulären *bodies*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Lisa-Marie Schleithoff

Oelde

Magdeburg 2018

Bibliographische Beschreibung

Schleithoff, Lisa-Marie

Modulation der NF-κB-Aktivität durch NEMO und GSK-3β in multivesikulären *bodies*, - 2018. - 84 B., 25 Abb., 12 Tab., 1 Anl.

Kurzreferat

ist ein chronisch-entzündlicher Prozess, der die Atherosklerose Grundlage für kardiovaskuläre Erkrankungen bildet. Die nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB)-Aktivität ist bei der Entstehung von Atherosklerose erhöht. Der NF-κB essentielle Modulator (NEMO) reguliert als Baustein des kanonischen NF-kB-Signalwegs die NF-kB-Aktivität. In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass die NF-κB-Aktivität durch die Phosphorylierung von NEMO durch die Glykogensynthasekinase-3β (GSK-3β) beeinflusst werden kann. Dabei stellten sich die Serinreste S8, S17, S31 und S43 von NEMO als Phosphorylierungsstellen der GSK-3β heraus. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass vakuoläre Strukturen wie frühe Endosomen und multivesikuläre bodies (MVB) wichtig für die Interaktion von NEMO und GSK-3β und somit für die NF-κB-Aktivität von Bedeutung sind. Die Arbeit trägt damit zum Verständnis des Entstehungsprozesses der Atherosklerose bei.

Schlüsselwörter: NF-κB, NEMO, GSK-3β, MVB.

Inhaltsverzeichnis

Abkü	rzun	gsverzeichnis	5
1 E	Einfü	hrung	8
1.1	Ath	erosklerose	8
1.2	Ath	erosklerose und NF-κB	10
1.2.	.1	NF-κB-System	11
1.2.	2	NEMO	12
1.3	GS	K-3	14
1.3	.1	GSK-3 Isoformen und die Beeinflussung der NF-kB-Aktivität	
1.3	2	GSK-3 und multivesikuläre bodies (MVB)	15
1.4	Mu	tivesikuläre <i>bodies</i>	16
1.4	.1	Rab	17
1.4.	2	Vps4	
1.5	Zie	setzung	18
2 N	/late	rial und Methoden	20
2.1	Che	emikalien und Verbrauchsmaterialien	20
2.1	.1	Geräte	20
2.1.	2	Chemikalien und Biochemikalien	21
2.1.	3	Lösungen und Puffer	21
2.1.	.4	Kitsysteme	
2.1.	5	Antikörper	24
2.1.	.6	siRNA-Sequenzen	
2.1.	.7	Transfektionsreagenzien	
2.1.	.8	Verbrauchsmaterialien	25
2.2	Sta	tistik und Software	26
2.3	Мо	ekularbiologische Methoden	26
2.3.	.1	Plasmidpräparation kleiner Plasmidmengen (Miniprep)	
2.3.	2	Plasmidpräparation größerer Plasmidmengen (Maxiprep)	
2.3	.3	Agarosegelelektrophorese	
2.4	Zel	biologische Methoden	29
			2

2.4.1	Zelllinien	. 29
2.4.2	Zellkultur und Behandlung	. 29
2.4.3	Bestimmung der Zellzahl	. 29
2.4.4	Einfrieren von Zellen	. 29
2.4.5	Auftauen von Zellen	. 30
2.4.6	Transfektion	. 30
2.4.6.1	Biochemische Transfektion	. 30
2.4.6.2	Physikalische Transfektion Elektroporation	. 32
2.4.7	Stimulierung von Zellen	. 32
2.4.8	Herstellung von Zelllysaten	. 33
2.4.9	Zellkulturvorbereitung für Stimulated Emission Depletion (STED)-Mikroskopie	. 33
2.4.10	Luciferaseaktivitätsmessung	. 33
2.4.11	Bafilomycin	. 34
_		
2.5 Pro	teinchemische Methoden	.34
2.5.1	Bestimmung des Gesamtproteingehalts	. 34
2.5.2	Subzelluläre Fraktionierung	. 35
2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	. 35
2.5.4	Western Blot	. 36
2.5.5	Proteindetektion	. 37
2.5.6	Antikörperentfernung von PVDF-Membranen	. 37
2.5.7	Immunopräzipitation	. 37
2.5.8	In vitro Phosphorylierungsassay	. 38
2.6 Mik	roskopische Methoden	.39
2.6.1	Immunofluoreszenz	. 39
2.6.1.1	Live cell imaging	. 39
2.6.1.2	Visualisierung in Z-Stapeln (Dreidimensionale Mikroskopie)	. 39
2.6.2	STED-Mikroskopie	. 39
2.6.3	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) und fluorescence lifetime imaging	
	microscopy (FLIM)-FRET Analysen	. 39
3 Ergeb	onisse:	41
3.1 GSI	<-3β nimmt über NEMO Einfluss auf die NF-κB-Aktivität	.41
311	GSK-36 phosphoryliert NEMO	41
312	Phosphorylierungsstellen von rhNEMO durch GSK-38	
312	Die von GSK-38-vermittelte Phosphorylierung von NEMO ist für die NE $_{\rm e}$ R- $_{\rm e}$ ktivität	
0.1.0		∕ 1ว
311	Interaction der NEMO-Mutanten mit GSK 28 und anderen Komponenten des NE	. +2
3.1.4		A A
215	TNE a unabhängiga Interaktion und Ca Lakalization von CSK 28 und NEMO	.44 15
3.1.3	THE - unabilitying interaction and co-Lokalisation von GSK-3p and NEMO	. 45 3

3.2	Bafilomycin reduziert die Expression von NEMO und die NF-KB-Aktivität	48	
3.3	LAMP1 als Zeichen für lysosomalen Abbau	49	
3.4	Rab5 interagiert mit NEMO	50	
3.5 3.5. 3.5.2	 Einfluss von Vps4 auf die Expression von NEMO und die NF-κB-Aktivität Auswirkungen des Vps4 <i>knockdown</i>s auf NEMO und die NF-κB-Aktivität Einfluss der Mutante Vps4E233Q auf die Lokalisation und Expression von NEMO und d NF-κB-Aktivität 	51 52 ie 54	
3.6	Interaktion: GSK-3β, NEMO, MVB	57	
4 D	Diskussion	59	
4.1	GSK-3 β kontrolliert die NF- κ B-Aktivität über NEMO	59	
4.2	Interaktion und Co-Lokalisation von GSK-3β und NEMO	62	
4.3 4.3.	 Bedeutung der MVB für NEMO, GSK-3β und die NF-κB-Aktivität Inhibierung der Reifung von vakuolären Strukturen nimmt Einfluss auf die NEMO-GSK- 3β-Interaktion und die NE-κB-Aktivität 	62	
43	2 NEMO ist in frühen Endosomen feststellhar	63	
4.3.4	3 MV/B spielen eine wichtige Rolle für NEMO und die NE-k-B-Aktivität	64	
4.3.4	$GSK-3\beta \text{ beeinflusst die NF-}\kappa B - Aktivität über NEMO und die MVB$	66	
4.4	Ausblick	68	
5 Z	usammenfassung	70	
Literaturverzeichnis			
Veröffentlichungen 80			
Dank	sagungen	80	
Ehrer	nerklärung	81	
Leber	nslauf	82	

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
μm	Mikrometer
μΜ	Mikromolar
NF-κB-RE	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells response
	element
AAA	ATPases associated with different cellular activities
AK	Antikörper
APC	Adenomatous-polyposis-coli
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Ammonium Persulfat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BHK	Baby Hamster Kidney
BSA	Bovines Serum Albumin
bspw.	beispielsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cIAP 1,2	Cellular inhibitor of apoptosis protein
CO ₂	Kohlendioxid
COS-7	CV-1 (simian) in Origin carrying SV40 genetic material
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
DTT	Dithiothreitol
Dvl	Dishevelled
ECL	Enhanced Chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF2B	eukaryotic protein synthesis initiation factor 2B
ESCRT	endosomal sorting complexes required for transport
FBS	Fetal Bovine Serum, fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
FLIM	fluorescence lifetime imaging microscopy

g	Gravitationskonstante
GFP	green fluorescent protein
GSK-3β	Glykogensynthasekinase-3β
GST	Glutathione S-transferase
GTPasen	Guanosin-Triphosphatasen
HBS	HEPES-Buffered Saline
HCI	Chlorwasserstoffsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEK293-Zelenn	human embryonic kidney 293
HeLa	Henrietta Lacks (Epithelzellen eines Zervixkarzinoms)
HRS/Vps27	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate/vacuolar
	protein sorting 27
IB	Immunoblot
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1
IKK	IKB -Kinase
IL-1	Interleukin-1
ILV	intraluminale Vesikel
ΙκΒ	Inhibitor of KB
IP	Immunopräzipitation
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KTL	Kontrolle
LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LRP6	low density lipoprotein receptor-related protein 6
Lys	Lysin
Μ	Molar
MCP	monocyte chemotatic protein
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
min	Minuten
mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mLDL	modifiziertes oxidiertes LDL
MVB	multivesikuläre <i>bodies</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₄ P ₂ O	Natriumpyrophospha
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat

ΝΕΜΟ/ ΙΚΚγ	NF-κB Essential Modulator/ ΙκΒ spezifische Kinase-γ		
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells		
NF-κB-RE	Nuclear Factor κ B Response Element		
ng	Nanogramm		
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
PBS	Phosphate Buffered Saline		
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid		
PP2A	Proteinphosphatase 2A		
Rab5	Ras-related in brain 5		
Rab5 Q79L	Ras-related in brain 5 Q79L (Mutante)		
Rab5-S34N	Ras-related in brain 5 S34N (Mutante)		
rh	Recombinant human		
RHD	Rel-Homology-Domain		
RIP1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1		
RNA	Ribonucleicacid (Ribonukleinsäure)		
Rpm	Rounds Per Minute (Umdrehungen pro Minute)		
S	Serin		
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamid-		
	Gelelektrophorese		
siRNA	Small Interfering RNA		
STED	Stimulated Emission Depletion Microscopy		
	Stimulierte Emissions-Depletions-Mikroskopie		
TAD	transcription activation domain		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
TBS	Tris Buffered Saline		
TBST	Tris Buffered Saline Tween20		
tdEosFP	Tandem dimeric Eos Florescent protein		
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin		
TF	tissue factor		
TLR	Toll-like receptor		
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor</i> -α (Tumornekrosefaktor-α)		
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein		
TRAF 2	TNF receptor-associated factor 2		
Tris	Tris – Hydroxymethyl – Aminomethanhydrochlorid		
UV	Ultraviolett		
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1		
Vgl.	vergleiche		
VPS4	Vacuolar protein sorting-associated protein 4A		
VPSE223Q	Vacuolar protein sorting-associated protein 4-E223Q (Mutante)		
Wnt	Wingless/Int-1		
WT	Wild Type, Wildtyp		

1 Einführung

1.1 Atherosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen zu den weltweit häufigsten Todesursachen (WHO 2015). Verantwortlich dafür sind atherosklerotische Veränderungen der Gefäße (American Heart Association 2014). Atherosklerose ist eine langsam progrediente entzündliche Erkrankung der Arterien und kann im Herzen, im Gehirn oder den Extremitäten zu Ischämien mit Infarkten führen (Ross 1999).

Die Initiation des atherosklerotischen Entstehungsprozesses beginnt mit einer endothelialen Dysfunktion. Mögliche Gründe für endotheliale Dysfunktionen sind Bluthochdruck, Diabetes mellitus, genetische Veränderungen, erhöhte Plasmahomocysteinkonzentrationen, infektiöse Mikroorganismen wie Herpesviren oder *Chlamydia pneumoniae*, ein erhöhtes und modifiziertes *low-density lipoprotein* (LDL), sowie durch Zigarettenrauchen hervorgerufene freie Radikale (Ross 1999). Nach der Initiation der Atherosklerose lässt sich der Prozess der Atherogenese in drei Abschnitte einteilen: 1) *fatty streak* Bildung, 2) Atheromabildung, 3) Bildung von atherosklerotischen Plaques (Rafieian-Kopaei et al. 2014).

Abbildung 1 zeigt schematisch die drei Abschnitte der Atherogenese. Die fatty streak Bildung (1) beginnt mit dem LDL-Cholesterol (LDL-C) trapping. Das bedeutet, dass bei einem erhöhten Plasmalevel von LDL die Endothelzellen die endozytierten LDL-Cholesterylester (LDL-C) nicht mehr verarbeiten können und sich das LDL-C deshalb in der Gefäßwand anreichert. Hinzu kommt, dass es bei diesen Lipoproteineinschlüssen zu einer progressiven Oxidation des LDL durch Lipooxygenasen, reaktive Sauerstoffspezies, Peroxynitrite und Myeloperoxidasen kommt (O'Brien et al. 1994), wodurch das modifizierte oxidierte LDL (mLDL) entsteht. Dieses führt zur Aktivierung der Endothelzellen. Entzündungsmediatoren wie Tumor necrosis factor α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) erhöhen die Bindung von LDL an Endothelzellen und führen zu einer Hochregulierung von Transkriptionsfaktoren wie nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) (Hajjar und Haberland 1997). Dadurch wird die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie Selektine (P-selectin, E-selectin) und der "Andockproteine" intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), sowie vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), verstärkt (Cybulsky et al. 2001; Collins et al. 2000). Dies führt zum vermehrten Eintritt oder Diapedese von Monozyten in den subendothelialen Raum bzw. Intima, wodurch diese zu Makrophagen differenzieren (Leukozytenaktivierung) (Lusis 2000; Glass und Witztum 2001). Als nächstes kommt es zur Schaumzellbildung. Die eingewanderten Monozyten

erhöhen die Expression von *scavenger-R*ezeptoren für die Aufnahme von mLDL. Dadurch wird das mLDL internalisiert und akkumuliert in Cholesterylestern als Tröpfchen im Zytoplasma. Diese lipidbeladenen Makrophagen werden als Schaumzellen bezeichnet (Libby 2002). Das mLDL lockt weitere Monozyten an indem es die Genexpression von M-CSF und *monocyte chemotatic protein* (MCP) in Endothelzellen erhöht, was zur Förderung der entzündlichen Reaktion beiträgt (Ross 1999).

Anschließend erfolgt die Atheromabildung (2). Die Makrophagen produzieren innerhalb der atherosklerotischen Intima Wachstumsfaktoren und Zytokine. Dies führt zum Einwandern von glatten Muskelzellen in die Neointima, die sich dort akkumulieren und zur Bildung von extrazellulärer Matrix führen (Libby 2002).

Am Ende des Prozesses kommt es zur Bildung von atherosklerotischen Plaques (3) (Rafieian-Kopaei et al. 2014). Instabile Plagues sind Wegbereiter für rupturierende Läsionen, die wie Plaqueerosionen zur Koronarthrombose führen (Virmani et al. 2002). Stabile Plaques zeichnen sich durch eine feste fibröse Kappe aus (Davies 1990). Prozesse, die zur Bildung von instabilen (Ruptur-gefährdeten) Plaques beitragen sind solche, die die Synthese der fibrösen Kappe über Fibromyoblast-ähnliche glatte Muskelzellen in der Intima reduzieren und/oder die Degradation der Kollagenkappe unterstützen (Virmani et al. 2002, Moore und Tabas 2011). Ein zweiter Faktor für instabile Plaques ist der nekrotische Kern innerhalb der Plaques, welcher Entzündungen, Thrombosen, proteolytischen Abbau und physikalischen Stress an der fibrösen Kappe beeinflusst (Virmani et al. 2002). Nekrotische Kerne entstehen aus der Kombination von fortgeschrittenen Läsionsmakrophagen und defekter Phagozytose von apoptotischen Makrophagen in fortgeschrittenen Plaques (Virmani et al. 2002, Tabas 2010). Eine Plaqueentzündung kann die Bildung eines nekrotischen Kerns begünstigen. nekrotische Kerne charakterisieren Plaques, Große deren Ruptur ein akutes Koronarsyndrom hervorrufen (Virmani et al. 2002, Tabas 2010; Moore und Tabas 2011).



Abbildung 1. Modifizierte schematische Darstellung der Atherogenese (modifiziert nach Rafieian-Kopaei et al. 2014). 1 *fatty-streak* Bildung: Nach der Initiation (endotheliale Dysfunktion) kommt es zur Formation von oxidiertem LDL, Aktivierung der endothelialen Zellen und Sekretion von Zytokinen: Bei der Migration durch die endotheliale Schicht differenzieren sich die Monozyten zu Makrophagen und beseitigen das oxidierte LDL aus der Gefäßwand, sodass es zur Schaumzellbildung kommt. 2 Atheromabildung: Durch Makrophagen produzierte Zytokine/Wachstumsfaktoren (inflammatorische Antwort) kommt es zur Einwanderung von glatten Muskelzellen und Bildung von extrazellulärer Matrix. 3 Bildung von atherosklerotischen Plaques: Synthese der fibrösen Kappe über Fibromyoblast-ähnliche glatte Muskelzellen in der Neointima. Stabile Plaques haben eine feste fibröse Kappe. Instabile Plaques haben eine reduzierte Synthese der fibrösen Kappe und einen nekrotischen Kern.

1.2 Atherosklerose und NF-κB

Eine erhöhte NF- κ B-Aktivität findet man bei vielen chronisch-inflammatorischen Krankheiten wie rheumatoide Arthritis, chronisch obstruktive pulmonale Erkrankung (COPD), Asthma oder Atherosklerose (Tak und Firestein 2001). Eine Mehrzahl von Faktoren wie oxidierte Lipide (Liao et al. 1993), Zytokine, virale und bakterielle Infektionen (Molestina et al. 2000), die für die Entwicklung der Atherosklerose verantwortlich sind, fördern auch die Aktivierung von NF- κ B (Gareus et al. 2008). Eine erhöhte Expression von NF- κ B-Komponenten findet sich in endothelialen Zellen der Aorta, in denen atherosklerotische Veränderungen gehäuft vorkommen (Leena et al. 2000). Verschiedene Stimuli wie beispielsweise Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), Interleukin 1 (IL-1), Lipoprotein oder Thrombin haben durch NF- κ B einen Einfluss auf Monozyten, Makrophagen, glatte Muskelzellen, endotheliale Zellen und T-Zellen. Dies geschieht über die genregulierende Eigenschaft von NF- κ B auf Zytokine (TNF- α , IL-1), Chemokine (*monocyte chemotatic protein* (MCP-1)), Adhäsionsmoleküle (*vascular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1)) und *tissue*

factor (TF) (Brand et al. 1996). Die Inhibierung von NF- κ B verhindert die Induktion von Adhäsionsmolekülen in endothelialen Zellen und damit die Makrophagenrekrutierung zu den atherosklerotischen Plaques. Dementsprechend initiiert der endotheliale NF- κ B-Signalweg die proinflammatorische Genexpression an der arteriellen Wand und fördert die Pathogenese der Atherosklerose (Gareus et al. 2008).

1.2.1 NF-κB-System

NF-κB bezeichnet eine Familie von Transkriptionsfaktoren, welche aus fünf Mitgliedern besteht: p65 (ReIA), c-ReI, ReIB, NF-κB1 (p50 und seine Vorstufe p105) und NF-κB2 (p52 und seine Vorstufe p100) (Ghosh et al. 1998, de Winther et al. 2005). Alle Mitglieder besitzen eine *ReI-Homology-Domain* (RHD) zur Dimerisierung, für Interaktionen mit inhibitorischen Proteinen und zur DNA-Bindung (Huxford et al. 1999). Jedoch besitzen lediglich p65, c-ReI und ReIB eine Transkriptionsaktivierungsdomäne (*transcription activation domain* (TAD)). Im inaktivierten Status sind die NF-κB-Dimere entweder an einen *Inhibitor of* κ*B* (IκB) -Protein (IκBα (NFKBIA), IκBβ (NFKBIB), IκBε (NFKBIE)) oder an Vorläuferproteine (p100 (NF-κB2) und p105 (NF-κB1)) im Zytoplasma gebunden. (Hayden und Ghosh 2008). Durch diese Bindung wird verhindert, dass sich die NF-κB-Dimere an die DNA binden oder im Nukleus akkumulieren (Hoffmann et al. 2006).

Es gibt zwei wesentliche Signalwege zur Aktivierung von NF-κB: den kanonischen und den nicht-kanonischen (alternativen) Signalweg (Lawrence 2009). Beim kanonischen NF-KB-Signalweg (Abbildung 2) wird die Rezeptoraktivierung (toll-like Rezeptoren (TLRs)) durch Zytokine (TNFa, IL-1), Virusprodukte oder Bakterienbestandteile eingeleitet. Es kommt zur Anlagerung des Adaptors tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein (TRADD) an den Rezeptor. Dieser bildet mit einer E3 Ubiguitin Ligase (cellular inhibitor of apoptosis protein 1,2 (cIAP1,2), dem TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2)) und der Proteinkinase receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIP1) ein Signalosom. RIP1 polyubiquitiniert über Lys63-Verbindungen und verbindet sich mit einer undefinierten Polyubiquitinin-Bindungsstelle von NF- κB essential modulator (NEMO). Dies führt zur Induktion des IkB Kinase (IKK)-Komplexes (Ea et al. 2006). Der IKK-Komplex besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten IKKa (IKK1), IKKB (IKK2) und einer regulatorischen Untereinheit NEMO (IKKy) (Rothwarf et al. 1998). Der aktivierte Komplex phosphoryliert die IκB-Proteine: ΙκBα, ΙκBβ und ΙκBε (Senftleben et al. 2001). Anschließend fungiert die IKK-Phosphoakzeptorstelle von IkB als Erkennungsstruktur für eine Ubiguitinligase, sodass die IkBs ubiguitiniert werden und schließlich in Proteosomen abgebaut werden können (Karin und Ben-Neriah 2000). Dadurch, dass die inhibitorischen Einheiten IkBs proteosomal abgebaut werden, können die freigesetzten NF-kB-Dimere (p50

Einführung

und p65) vom Zytoplasma zum Nukleus translozieren. Dort binden sie sich an ihre Zielgene und regulieren deren Transkription (Karin 1999). NF-κB reguliert so die transkriptionelle Regulation der Immunantwort und beeinflusst die Genexpression. Diese hat Auswirkungen auf Zellüberleben, -differenzierung und -proliferation (Hayden und Ghosh 2008). Die NF-κB-Aktivierung ist streng durch negative Feedbackschleifen reguliert (Van der Heiden et al. 2010). Das bedeutet, dass durch die Produkte der Transkription die Aktivität von NF-κB wiederum gedrosselt wird. Beispielsweise wird durch die NF-κB-Aktivierung die Expression von IκBα-Genen erhöht, welche eine nukleäre Exportsequenz besitzen. Die Exportsequenz vermittelt den Kernexport von NF-κB und steuert so die NF-κB-Aktivität (Ghosh und Karin 2002). Diese Dynamiken sind wichtig, weil damit das Ausmaß und die Ausprägung der Expression der Zielgene beeinflusst werden kann (Van der Heiden et al. 2010).



Abbildung 2. Kanonischer kanonische NF-kB-Signalweg. Der Signalweg wird durch TLR und proinflammatorische Zytokine wie TNFα und IL-1 getriggert. Der Adaptor TRADD lagert sich an den Rezeptor an, welcher ein Signalosom mit E3 Ubiquitin Ligase (cIAP1,2 und TRAF2) und der Proteinkinase RIP1 bildet. RIP1 polyubiquitiniert über Lys63-Verbindungen und verbindet sich mit der Polyubiquitinin-Bindungsstelle von NEMO. Dies führt zum Rekrutieren des IKK-Komplexes (IKKα, IKKβ und NEMO) (Ea et al. 2006). Der Komplex phosphoryliert IκB, wodurch die NF-κB-Dimere p65 und p50 in den Nukleus translozieren können und so die Expression von proinflammatorischen Genen und für das Zellüberleben notwendigen Genen regulieren. Die Einheiten inhibitorischen werden ubiquitiniert und proteosomal abgebaut (Karin und Ben-Neriah 2000).

Der nicht-kanonischen Signalweg ist nicht in Entzündungsprozesse, sondern bei der B-Zellreifung sowie bei der Bildung von sekundären lymphatischen Organen involviert (Senftleben et al. 2001). Die Rezeptoren für den nicht-kanonischen Signalweg werden durch verschiedene Liganden, jedoch nicht durch TNF- α aktiviert (Lawrence 2009). Der Prozess ist unabhängig von IKK β und NEMO (Lawrence 2009).

1.2.2 NEMO

NEMO (IKK γ) ist eine essentielle Komponente des IKK-Komplexes (Rothwarf et al. 1998). Bei Abwesenheit von NEMO sind sowohl der IKK-Komplex als auch NF- κ B nicht aktiv (Yamaoka et al. 1998). NEMO fungiert als Co-Faktor des IKK-Komplexes und stabilisiert IKK α und IKK β (Rothwarf et al. 1998). Die Hauptfunktion von NEMO besteht in der

Vermittlung der IKK-Komplex-Aktivierung durch die vorgeschalteten Stimuli wie TNF-α. Dies zeigt sich bei Verwendung von C-terminal-verkürzten NEMO-Mutanten. Die vorgeschalteten Stimuli können nicht weitergeleitet werden, wodurch die IKK-Aktivität inhibiert wird. Die eigentliche Kinase-Aktivität des IKK-Komplexes wird dabei jedoch nicht beeinflusst (Rothwarf et al. 1998). Die Interaktionen von NEMO werden zum einen durch die Erkennung von ubiquitinierten vorgeschalteten Signalkomponenten oder die Ubiquitinierung von NEMO selbst und zum anderen durch die Phosphorylierung, SUMOlylierung und Proteinmodifikationen beim Falten oder Oligomerisierung von NEMO vermittelt (Shifera 2010). NEMO hat zusätzlich eine IKK-unabhängige Funktion im Nukleus. Die posttranslationellen Modifikationen von NEMO wie SUMOlylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung werden durch DNA-Schäden im Nukleus induziert (McCool und Miyamoto 2012).

In der Literatur lässt sich ein Zusammenhang zwischen Alterungsprozessen und einer Hyperaktivierung von NF-κB feststellen (Adler et al. 2007). Beispielsweise steht eine fehlerhafte NF-κB-Aktivierung in Zusammenhang mit altersbezogenen Krankheiten wie Neurodegeneration, Osteoporose, Diabetes mellitus Typ 2, Immunschwäche oder Atherosklerose. In Tierexperimenten wurde gezeigt, dass es durch die Akkumulation von Prelamin A – einem Bestandteil der Kernlamina- zu einer vermehrten Aktivierung des NF-κB-Signalwegs über NEMO kommt. Die so von NF-κB induzierte Entzündungsreaktion führt zur Entwicklung von mehreren Merkmalen progeroider Phänotypen. Eine Hemmung des NF-κB-Signalwegs mittels genetischer oder pharmakologischer Strategien *in vivo* konnte diese Veränderungen verhindern (Osorio et al. 2012). Dies zeigt, dass NF-κB induzierte Entzündungsprozesse einen beschleunigten Alterungsprozess und damit altersbezogene Erkrankungen wie Atherosklerose unterstützen.

Embryonen von NEMO-*knockout*-Mäusen sterben durch schwere Leberschäden bei massiver Apoptose. Bei den primären Fibroblasten dieser Mäuseembryonen lässt sich nach der Stimulation durch TNF- α oder IL-1 ein Mangel an detektierbarer DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B feststellen. Dabei kann keine stimulusabhängige I κ B-Kinase-Aktivität detektiert werden, was zusätzlich mit der verminderten Phosphorylierung und verminderten Degradation von I κ B α korreliert (Rudolph et al. 2000).

Beschränkt sich der *knockout* nur auf das endotheliale NEMO, wird dadurch nur die NF-κB-Aktivität in Endothelzellen inhibiert und es kommt so zu einer reduzierten Bildung von atherosklerotischen Plaques. Dies konnte in Experimenten mit Apolipoprotein E-defizienten (ApoE^(-/-))-Mäusen mit *knockout* für endotheliales NEMO gezeigt werden (Gareus et al.

2008). ApoE^(-/-)-Mäuse gelten als anerkanntes Modell für die Atherosklerose, da diese bei Fütterung mit cholesterolreicher Diät schnell Plaques entwickeln (Zhang et al. 1992).

Ebenfalls wird die Expression von NEMO für die Entwicklung von adipositasinduzierter Insulinresistenz benötigt. NEMO-defiziente Mäuse zeigen daher einen Schutz vor adipositasinduzierter Glukoseintoleranz und Insulinresistenz (Wunderlich et al. 2008).

1.3 GSK-3

Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) hat in verschiedenen Signalwegen Einfluss auf die Proteinsynthese, Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Mikrotubuli-Dynamiken und Zellmotilität (Frame und Cohen 2001). Dies geschieht über die Phosphorylierung von Initiierungsfaktoren (Welsh und Proud 1993; Frame und Cohen 2001; Jope und Johnson 2004), von Komponenten des Zellteilungszyklus (Bijur und Jope 2003, Frame und Cohen 2001), sowie von Transkriptionsfaktoren und Proteinen der Mikrotubuli-Funktion und Zelladhäsion (Cho und Johnson 2004, Frame und Cohen 2001, Jope und Johnson 2004). Durch die Inhibierung der Glykogensynthase reguliert die GSK-3 den Insulinsignalweg, was zu einer verminderten Glykogensynthese und zu Insulinsensitivität führt (Embi et al. 1980, Henriksen und Dokken 2006).

GSK-3 ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase mit konstitutiver Aktivität (Embi et al. 1980). Eine Regulierung der Substratphosphorylierung erzielt man zum einen durch die Inaktivierung von GSK-3 mittels zellulärer Signale beispielsweise durch Insulin, zum anderen durch Veränderung der Substratverfügbarkeit oder -erkennung. Die Phosphorylierung von Serinen sowie die Dephosphorylierung von Tyrosin führen zu einer Inaktivierung von GSK-3 (Doble und Woodgett 2003).

1.3.1 GSK-3 Isoformen und die Beeinflussung der NF-_KB-Aktivität

Es gibt zwei hoch homologe Isoformen der GSK-3: GSK-3 α und GSK-3 β (Woodgett 1990). Diese Isoformen sind auf verschiedenen Genen codiert. Die Sequenzen ihrer Kinasedomänen sind fast identisch (Mukai et al. 2002; Jope und Johnson 2004). Die Funktionen der Isoformen unterscheiden sich jedoch. Vorliegend ist nur GSK-3 β von Interesse. Folgende Beobachtungen legen nahe, dass es einen Zusammenhang zwischen GSK-3 β und der TNF- α vermittelten NF- κ B-Aktivierung gibt: Erstens kommt es bei Störung des murinen GSK-3 β Gens in der Mitte der Gestation zur embryonalen Letalität hervorgerufen durch Leberdegeneration aufgrund von extensiver Hepatozytenapoptose (Hoeflich et al. 2000). Zweitens wurden vergleichbare Beobachtungen bei Mäusen mit exzessiver TNF- α -Toxizität gemacht, die durch fehlende NF- κ B-Aktivierung hervorgerufen wurde (Beg et al. 1995; Li et al. 1999). Drittens können GSK-3 β -defiziente Mausembryos durch einen anti-TNF- α -Antikörper überleben. Viertens lässt sich eine Hypersensitivität gegenüber TNF- α und eine reduzierte NF- κ B-Funktion in Fibroblasten von GSK-3 β -defizienten Mausembryonen feststellen (Hoeflich et al. 2000). Ein Zusammenhang zwischen GSK-3 β und der TNF- α vermittelten NF- κ B-Aktivierung kann dies erklären. Diesen Zusammenhang aufzuzeigen ist ein Teil der vorliegenden Arbeit.

1.3.2 GSK-3 und multivesikuläre bodies (MVB)

Der kanonische *wingless/Int-1* (Wnt)-Signalweg spielt eine Rolle in der Entwicklung und Regeneration von Stammzellen und bei der Krebsentstehung. Er benötigt die Inhibierung der Aktivierung von GSK-3. Dies gelingt durch die Sequestration von GSK-3 aus dem Zytosol in MVB, um GSK-3 von ihren zahlreichen zytosolischen Substraten zu trennen. Mittels Cryoimmunoelektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass Wnt mit GSK-3 in MVB co-lokalisiert ist. Es wurde beobachtet, dass nach Wnt-Gabe die endogene GSK-3-Aktivität im Zytosol abnimmt und in den MVB zunimmt, wo sie geschützt vor Proteaseverarbeitungen ist (Taelman et al. 2010).

Durch die Aktivierung des Wnt-Rezeptors wird GSK-3 an die zytoplasmatische Seite des transmembranen Wnt-Rezeptor-Komplexes rekrutiert. Dort phosphoryliert GSK-3 low density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) und andere Substrate wie das Dishevelled (Dvl) Protein, das Adenomatous-polyposis-coli (APC) Protein, Axin und β-Catenin. Anschließend erfolgt die Internalisation des Komplexes (Zeng et al. 2008). Für die Bildung von MVB sind zwei Proteine im Wnt-Signalweg essentiell: hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate/vacuolar protein sorting 27 (HRS/Vps27) und vacuolar protein sorting4 (Vps4). HRS/Vps27 initiiert die Formation des endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT)-0 Komplexes (Taelman et al. 2010). Der ESCRT-0-Komplex ist der erste von vier ESCRT-Komplexen. Bei der Endosomenmorphogenese sind die ESCRTs für die Aufrechterhaltung der strukturellen Grenzen innerhalb der frühen Endosomen und bei der Reifung der Endosomen in MVB von Bedeutung (Woodman 2009). Sie stabilisieren den Vesikelhals, welcher durch die Involutionsreaktion geformt wurde. Die ESCRTs bleiben dabei am Hals lokalisiert und treten nicht in das Innere der geformten Vesikel ein (Babst 2011). ESCRT-0 bindet sich an und verpackt die Ladung für die Übergabe in die MVB (Katzmann et al. 2003; Hurley 2010)

Das zweite für den Wnt-Signalweg essentielle Protein ist Vps4 (Taelman et al. 2010), welches für die Abspaltung des ESCRT-III-Komplexes zuständig ist (Babst et al. 1998; Hurley 2010). Innerhalb des ECRT-Systems hat der ESCRT-III Komplex die Aufgabe der Membranabschnürung (Wollert et al. 2009). Der Proteinkomplex wird auf der zytoplasmatischen Seite des Endosoms aufgebaut, um die Ladung für die MVB zu sortieren und zu sammeln (Babst et al. 2002a).

Der Schlüssel zu der Aktivierung der Transkription im Wnt-Signalweg ist die nukleäre Akkumulation von β -Catenin. Sobald GSK-3 durch MVB sequestriert und im Zytosol nicht mehr vorhanden ist, wird das neu translatierte β -Catenin nicht mehr phosphoryliert. Dadurch wird es stabilisiert und akkumuliert sich im Nukleus (Taelman et al. 2010). Die katalytisch inaktive dominant-negative-GSK-3 β (DN-GSK-3 β) befindet sich nicht in den MVB. Dies lässt vermuten, dass sich GSK-3 in MVB akkumuliert, wenn GSK-3 an ihre üblichen Substrate gebunden ist. Nicht nur β -Catenin, sondern auch andere Proteine, welche GSK-3-Phosphorylierungsstellen besitzen, haben eine verlängerte Halbwertszeit durch die Sequestrierung von GSK-3 (Taelman et al. 2010) (Abbildung 3).



Abbildung 3. Darstellung der Aktivierungsregulierung von GSK-3 im Wnt-Signalweg (Zeng et al. 2008 modifiziert von Taelman et al. 2010). GSK-3 (rot) bindet den sich an Wnt-Rezeptorkomplex (dieser beinhaltet Phospho-LRP6, Phospho-β-Catenin und andere GSK-3-Substrate wie Dvl, Axin und APC) und wird in kleine intraluminale MVB-Vesikel verpackt. Dadurch zytosolische werden β-Catenin Substrate wie (blau) und andere Proteine stabilisiert. Die initialen GSK-3-Moleküle, welche an den Rezeptorkomplex rekrutiert werden, binden sich an Axin. Dies führt dazu, dass die GSK-3-Fraktion, welche an den Destruktionskomplex gebunden ist, als erste abgebaut wird.

1.4 Multivesikuläre bodies

Multivesikuläre *bodies* (MVB) entstehen durch die Einstülpung (Involution) der Außenmembran von frühen Endosomen in das Endosomenlumen. Die daraus resultierenden intraluminalen Vesikel (ILV) befinden sich in den MVB und fungieren entweder als temporäre Lagerkompartimente oder als Übermittler für die Degradation des gesamten Proteininhalts in Lysosomen (Piper und Katzmann 2007). Ist die Ladung innerhalb der ILV zur Degradation bestimmt, ist Ubiquitin das Hauptsortierungssignal, welches kovalent an die Membranproteine gebunden ist. Die Bildung der ILV und das Sortieren ihrer ubiquitinierten Ladung innerhalb der MVB wird durch die ESCRTs und ihre assoziierten Faktoren katalysiert. Die ILV werden durch die Fusion von MVB mit Lysosomen, Hydrolasen ausgesetzt, um deren Inhalt zu degradieren. (Katzmann et al. 2002).

MVB haben diverse Aufgaben innerhalb der Zelle. Hierzu gehören beispielsweise die Herunterregulierung von Oberflächentransportern (Raiborg et al. 2003), wie sie in der Expression des epithelialen Natriumkanals Anpassung der auf physiologische Gegebenheiten stattfindet (Butterworth 2010). MVB dienen auch der Herunterregulierung von Adhäsions- und gap junction Molekülen (Palacios et al. 2005), der Regulierung von Zellkreisläufen (EGF-Rezeptor-Signalweg) und von G-Protein-vermittelten Rezeptor-Signalwegen (Wegner et al. 2011) sowie, im Folgenden besonders bedeutsam, als Zwischenstation bei internen Transportsignalwegen vieler Plasmamembranproteine (Williams und Urbé 2007). Das Sortieren von Proteinen in ILV bedeutet keine zwangsweise Proteindegradation. Stattdessen können durch die Fusion von MVB mit der Plasmamembran ILV sekretiert und so Vorläufer von Exosomen werden. Diese Exosomen werden in Neuronen, Epithelzellen, Mastzellen, Tumorzellen, Melanozyten und Zellen der Hämatopoese produziert (van Niel et al. 2006).

1.4.1 Rab

Ras-related in brain (Rab) Proteine sind regulatorische Guanosin-Triphosphatasen (GTPasen) und gehören zur Ras Superfamilie. Rab5 ist hauptsächlich an sortierenden Endosomen, sowie auf Plasmamembranen und endozytosierten Vesikeln lokalisiert. In seinem GTP-gebundenen Status ist Rab5 membranassoziiert. Im GDP-gebundenen Status ist Rab5 in einem zytosolischen Komplex an einen Rab-Inhibitor gebunden. Rab5 fördert die endosomale Fusion durch das Rekrutieren von zytosolischen Komponenten des Fusionsapparats (Woodman 2000). Wird die Ladung der Endosomen recycelt so wechselt sequentiell die Membrandomäne von Rab5 über Rab4 zu Rab11 (Sonnichsen 2000). Späte Endosomen besitzen separate Domänen (Rab7 und Rab9) (Barbero et al. 2002). Ladung, welche für Degradation bestimmt ist, wird zunächst in frühe Endosomen mit Rab5-Domänen und danach in späte Endosomen mit Rab7 Domänen (Rink et al. 2005). Rab9 positive Endosomen interagieren mit dem *trans*-Golgi-Netzwerk (Carroll et al. 2001, Stenmark 2009). Rab5-positive frühe Endosomen sind ein Hauptindikator für den ersten Schritt in den MVB-Signalweg (Hurley und Odorizzi 2012).

Einführung

Bei Zellen, die mit der Rab5-Mutante Rab5^{Q79L}, welche eine reduzierte GTPase-Aktivität besitzt, transfiziert wurden, kommt es zur Bildung vergrößerter früher endozytotischer Strukturen. Das Protein stimuliert die Endozytose *in vivo* und die endosomale Fusion *in vitro*. Zellen, welche die Mutante Rab5^{S34N} exprimieren, haben eine erhöhte Affinität zu GDP. Es zeigt sich fluoreszenzmikroskopisch ein klein-fleckiges endozytotisches Verteilungsprofil. Rab5^{S34N} blockiert die Fusion zwischen frühen Endosomen *in vitro*, sowie die Endozytose, wodurch es zur Fragmentierung der Endosomen kommt. Es wird vermutet, dass Rab5-GTP die Membranfusion stimuliert und in die Verschmelzung von endozytotischen Vesikeln und frühen Endosomen involviert ist (Stenmark et al. 1994).

1.4.2 Vps4

Mit dem Abspalten des membrangebundenen ESCRT-III-Komplexes wird der ESCRT-Zyklus vervollständigt und der zytosolische Pool von ESCRT-Untereinheiten wieder aufgefüllt (Babst et al. 1998; Hurley 2010). Einmal angereichert wird Energie benötigt, den ESCRT-III-Komplex von der Membran zu dissoziieren. Diese Energie wird durch Vps4 mittels ATP-Hydrolyse bereitgestellt und durch Multimerisation von ESCRT-Untereinheiten gefördert (Babst et al. 1998).

Vps4^{E233Q} ist eine Vps4 Mutante mit defekter ATP-Hydrolyse. Vps4^{E233Q} ist unfähig ESCRT-III abzuspalten und zeigt eine beeinträchtigte Aktivität gegenüber dem Wildtyp Vps4 *in vivo* und *in vitro*. In Immunofluoreszenzuntersuchungen zeigte sich, dass Vps4^{E233Q} in einer großen multilamellären Struktur zur Darstellung kommt (Babst et al. 1998).

In humanen Zellen gibt es zwei in ihren Sequenzen hoch identische (80% Identität) Proteine von Vps4: Vps4-A und Vps4-B (Scheuring et al. 2001). Einzelnes Ausschalten von Vps4A oder Vps4B inhibiert die Zytokinese. Vps4A spielt eine besondere Rolle in der Dissoziation des ESCRT-III-Komplexes (Merrill und Hanson 2010).

1.5 Zielsetzung

Das langfristige Ziel bei der Behandlung der Atherosklerose besteht in der Vermeidung der atherosklerotischen Plaquebildung. Um eine spezifische Therapie zu entwickeln, ist das genaue Verständnis des Entstehungsprozesses der Atherosklerose nötig. Die NF- κ B-Aktivität fördert die Pathogenese der Atherosklerose. Durch NEMO als essentieller Modulator der NF- κ B-Aktivität kann Einfluss auf NF- κ B-Aktivität und somit die Atheroskleroseentstehung genommen werden. Durch frühere Experimente ist ein Zusammenhang zwischen GSK-3 β , NEMO und NF- κ B zu vermuten. Beispielsweise präsentieren sich ähnliche Phänotypen bei GSK-3-*knockout*-Mäusen (Hoeflich et al. 2000), Mäusen mit fehlender NF- κ B-Aktivierung (Beg et al. 1995; Li et al. 1999) und NEMO-

knockout-Mäusen (Rudolph et al. 2000). Eine Regulation des NF- κ B-Systems durch GSK-3 β war bisher nicht bekannt.

Die vorliegende Arbeit wird zeigen, dass die GSK-3 β über die direkte Interaktion mit NEMO Einfluss auf die NF- κ B-Aktivität nehmen kann. Sie wird den Interaktionsort von GSK-3 β und NEMO identifizieren und seine Bedeutung für NEMO und somit für die NF- κ B-Aktivität erläutern. Damit soll ein besseres Verständnis von NEMO und dem NF- κ B-Signalweg erreicht werden, um neue Therapieansätze zur Vermeidung der Atheroskleroseentstehung aufzuzeigen.

Folgende Fragestellungen werden bearbeitet:

- Wird NEMO durch GSK-3β phosphoryliert und wenn ja, an welchen Stellen?
- Welchen Einfluss hat eine Phosphorylierung auf die NF-κB-Aktivität?
- Wo kommt es zur Phosphorylierung/Interaktion von NEMO und GSK-3β?
- Welche Rolle spielt der Interaktionsort für die NF-κB-Aktivität?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Geräte	Name	Hersteller
Absaugsystem	VacuSafe Comfort	IBS Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Autoclav	Laboclav 80	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloß,
		Deutschland
CO ₂ Inkubator	MCO-18AIC(UV)	Sanyo, Moriguchi, Japan
Eisbereiter	AF 80	Scotsman, Vernon Hills, IL, USA
Elektrophorese-	mini-Protean Tetra	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
System	Electrophoresis System	
Elektroporator	Genpulser II Elektroporator	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Feinwaage	Scout Pro 400g	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Gefrierbehälter	Mr. Frosty	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Luminometer	miniLumat LB 9506	EG&G Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Magnetrührer	RH digital Kt/C	IKA Laboratory Equipment, Staufen,
		Deutschland
	Ikamag Reo	IKA Laboratory Equipment, Staufen,
		Deutschland
Mikroplattenlesegerät	Synergy HT	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Mikroskop	Axiovert 40C	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
	Axiovert 200m mit AxioCam	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
	MRm und MRc	
	STED Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Netzgeräte	PowerPac Basic	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
	PowerPac HC	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Pipetten	Reference	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	0,5-10 µl, 10-100 µl, 50-200	
	μl, 100-1.000 μl	
	Research	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl,	
	20-200 µl, 100-1.000 µl, 500-	
Dissettienteilte	5.000 µl, 1-10 ml	
Pipettierniife	Pipetus	Hirschmann-Laborgerate, Eberstadt,
Diatti a rma a biittia r	Delumeur 4040	Deutschland
Plattformschuttler	Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Deinetweeerfilter		ThermoScientific Welthern MA USA
Reinstwasserniter	Beller Mixer SD T6	Stuart Staffordabira LIK
Rommixer	Roller Mixel SK To	Stuart, Staffordabira, LIK
Rolaloi Sobüttlor und	Kompoktoobüttlor KS 15 A	Edmund Rühler Omber Heebingen
Schuttler und	Kompakischuller KS 15 A	Deutechland
IIIKubalioIISIlaube	Inkubationshauba TH 15	Deutschland
Ständer für	MACS Multistand	Miltenvi Riotec, Bergisch Gladhach
Immunonräzinitation		Deutschland
Sterilhank	HeraSafe KS 18	ThermoScientific Waltham MA LISA
Thermomiyer	Thermomixer compact	Enpendorf Hamburg Deutschland
IIV-Transluminator	GenoView	WWR Darmstadt Deutschland
Vortov	MS2 minishakar	IKA Laboratory Equipment Staufon
	WOZ MINISHANEI	Deutschland
		Deutschlichtu

	MS3 basic	IKA Laboratory Equipment, Staufen, Deutschland
Wasserbad	SW22	Julabo, Seelbach, Deutschland
Western Blot- Entwickler	ChemostarImager	INTAS, Göttingen, Deutschland
Western Blot-System	mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Zählkammer	Neubauer	Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifugen	Allegra X-15R Centrifuge Centrifuge 5415C Centrifuge 5417R Micro Centrifuge IR	Beckman Coulter, Brea, CA, USA Eppendorf, Hamburg, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Biochemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100 µg/ml,	GE Health Care, Freiburg, Deutschland
100 Units/ml)	
Ammonium Persulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bafilomycin	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Beta-Mercaptoethanol	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	GE Health Care, Freiburg, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hygromycin B (50µg/ml)	GE Health Care, Freiburg, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Precision Plus Protein Standard Dual Color	Bio-Rad, Hercules, CA, USA.
Marker	
SB216763 (3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione)	
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
TNF-α (10μg/ml)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Trypsin-EDTA (1x)	GE Health Care, Freiburg, Deutschland
Trypanblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 3: Verwendete Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Acrylamid-Lösung	4K-Lösung (30%), Mix 31,5:1 BC	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Agarosegel	- 100 ml 1x TAE-Puffer	
	- Agarose (1 %),	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
	- 5 µl Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA-	3% BSA	GE Health Care, Freiburg, Deutschland
Antikörperlösung	in TBST	
Coomassie-Blau-	Färbelösung:	
Färbung	- 0,1 % Coomassie Brillantblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
	- 20 % Methanol (oder Ethanol)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	- 10 % Essigsäure	Applichem, Darmstadt, Deutschland
	Entfärbelösung:	
	- 20 % Methanol (oder Ethanol)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	- 10 % Essigsäure	Applichem, Darmstadt, Deutschland
DMEM, high glucose,	Gebrauchsfertige Lösung (500	GE Health Care, Freiburg, Deutschland
mit Phenolrot	ml):	
	- 4,5 g/L D-Glukose	
	- 2 mM L-Glutamin	

	- 25 mM HEPES	
Dulbecco's Modified	Gebrauchsfertige Lösung (500	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Eagle Medium	ml):	
(DMEM), high	- 4,5 g/L D-Glukose	
Glucose, ohne	- 2 mM L-Glutamin	
Phenolrot	- 25 mM HEPES	
Einfriermedium	- 20 % FBS	Biochrom (S3113) Berlin, Deutschland
	- 10 % DMSO	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Elektrophoresepuffer	100 ml der gebrauchsfertige	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
(10x)	Lösung:	
	- 0,25 M Tris	
	- 1,92 M Glycin	
	- 1 % (g/v) SDS	
	- destilliertes, deionisiertes H ₂ O	
GSK-3β Kinase	10 μCi [γ-32P] ATP (5000	Hartmann Analytics, Braunschweig,
Assay Puffer	Ci/mmol)	Deutschland
HBS-Puffer (2x)	- 280 mM NaCl	Applichem, Darmstadt, Deutschland
	- 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
	- 50 mM HEPES pH 7,05	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
	- 2,5 M CaCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	- Chloroquin, 25 mM	Applichem, Darmstadt, Deutschland
LB-Agar	- 10 g/l Trypton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	 5 g/l Hefeextrakt 	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	- 10 g/l Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	- 15 g/l Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	- 10 g/l Trypton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	 5 g/l Hefeextrakt 	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	- 10 g/l Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar	Für 20 Platten:	
	7,5 g LB-Agar	
	500 ml LB-Medium	
	\rightarrow autoklavieren und auf 50°C	
	abkühlen lassen	
	\rightarrow 100 µg/l Ampicillin zugeben	
	\rightarrow steril gielsen und bei 4°C	
1	lagern	
Lyseputter	- 30 ml Lysepuffer-Stammlosung	
(Gebrauchslosung)	- 4,2 mg/ml NaF	Applichem, Darmstadt, Deutschland
	- 0,5 mg/ml Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
	-1 Protease-inhibitor Cocktall	Roche, Penzberg, Deutschland
1	1 ablette (1836153001) pro 10 mi	Cirrera Aldrich, Ot Lawis, MO, LICA
Lyseputter	- 1,5% I fiton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
(Stammiosung)	- 50 MM HEPES pH 7,6	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
	- 150 MIVI NACI	Applichem, Darmstadt, Deutschland
		Sigma-Alunch, St. Louis, MO, USA
		Sigma Aldrich St. Louis MO USA
	$= 10 \text{ IIIMI NA}_4 \text{P}_2 \text{O}_7 \text{ X } 10 \text{H}_2 \text{O}$	Sigma-Alunch, St. Louis, MO, USA Righter Rorlin, Doutschland
Medium 3	- 500 mLDMEM high glucose	Life Technologies Carlshad CA LISA
Weddin 5	obne Phenolrot	Life Technologies, Canabad, CA, COA
	-10% (v/v) gestripping EBS	Biochrom Barlin Doutschland
	- 5 ml Antibiotikum	GE Health Care, Freiburg, Deutschland
	- 1 mM Natrium Pvruvat	Biochrom Berlin Deutschland
Medium 4	- 500 ml DMFM bigh glucose	Life Technologies Carlsbad CA USA
	ohne Phenolrot	
	- 5 ml Antibiotikum	GE Health Care Freiburg Deutschland
	- 1 mM Natrium Pyruvat	Biochrom, Berlin, Deutschland
Nährmedium	- 500 ml DMFM high glucose mit	GE Health Care Freiburg Deutschland
	Phenolrot	
	- 10 % (v/v) FBS	Biochrom, Berlin, Deutschland
	- 5 ml Antibiotikum	GE Health Care, Freiburg, Deutschland

Nuclear-Buffer I	 10 mM HEPES pH 7,8 10 mM KCL 2 mM MgCl 0,1 mM EDTA 0,6% Triton x-100 1 mM DTT 0,1 mM PMSF 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette (1836153001) pro 10 ml 	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Applichem, Darmstadt, Deutschland Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Biochrom, Berlin, Deutschland Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Roche, Penzberg, Deutschland
Nuclear-Butter II	 - 50 mM HEPES pH 7,8 - 50 mM KCI - 300 mM NaCI - 0,1 mM EDTA - 10 % Glycerol - 1 mM DTT - 0,1 mM PMSF - 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette (1836153001) pro 10 ml 	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Applichem, Darmstadt, Deutschland Applichem, Darmstadt, Deutschland Applichem, Darmstadt, Deutschland Biochrom, Berlin, Deutschland Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Roche, Penzberg, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	pH 7,4 W/O	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Promega-Lysepuffer	 1 v/v Luciferase Cell Culture Lysis 5x Reagent E1531 4 v/v DNase-freies ddH₂O 4,2 mg/ml Na₃VO₄ 0,5 mg/ml NaF 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette (1836153001) pro 10 ml 	Promega, Madison, WI, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Applichem, Darmstadt, Deutschland Roche, Penzberg, Deutschland
SDS-PAGE- Probenpuffer	 - 150 mM Tris-HCL pH6,8 - 30 % (v/v) Glycerin - 10 %(v/v) SDS - 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 	Applichem, Darmstadt, Deutschland Applichem, Darmstadt, Deutschland Applichem, Darmstadt, Deutschland Applichem, Darmstadt, Deutschland
	- 0.1% (v/v) Bromphenolblau	Applichem Darmstadt Deutschland
SDS-PAGE- Sammelgelpuffer (Upper Tris)	- 0,5 M Tris/HCl pH 6,8	Applichem, Darmstadt, Deutschland
SDS-PAGE- Trenngelpuffer (Lower Tris) (4x)	- 1,5 M Tris/HCl pH 8,8	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Stripping-Puffer	- 62,5 mM Tris pH 6,7 - 2% SDS - 100 mM β-Mercaptoethanol	Applichem, Darmstadt, Deutschland Applichem, Darmstadt, Deutschland Applichem, Darmstadt, Deutschland
TAE-Puffer (10x)	- 0,4M Tris - 0,2M Essigsäure - 10 mM EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Applichem, Darmstadt, Deutschland Applichem, Darmstadt, Deutschland
TAE-Puffer (1x)	- 100 ml TAE-Puffer (10x) - 900ml DNase-freies ddH ₂ O	
TBS-	- 1 x TBST-Puffer	
Antikörperpuffer	- 3 % BSA	GE Health Care, Freiburg, Deutschland
TBS-Puffer (10x)	- 150 mM NaCl - 50 mM Tris pH 8,0	Applichem, Darmstadt, Deutschland Applichem, Darmstadt, Deutschland
TBS-Puffer (1x)	- 100 ml TBS-Puffer (10x) - 900ml DNase-freies ddH ₂ O	
TBST-	- 1 x TBST	
Blockierungspuffer	- 5% (w/v) Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt, Deutschland
TBST-Puffer	0,1% (v/v) Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	in TBS (1x)	
Tris-Glycin-Puffer	- 0,2 M Tris	Applichem, Darmstadt, Deutschland
(10x)	- 1,9 M Glycin	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Western Blot-Puffer	- 100 ml Tris-Glycerin-Puffer	

	 150 ml Methanol 750 ml ddH₂O 	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Elektrophorese- Laufpuffer	 100 ml Elektrophoresepuffer 900 ml ddH₂O 	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Kitsysteme

Tabelle 4: Verwendete Kits

Name	Hersteller
µMACS GFP Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,
	Deutschland
DC™ Protein Assay Kit	Bio-Rad, Hercules, CA, USA.
EndoFree Plasmid Purification Maxi Kit	QIAgen, Venlo, Niederlande
QIAprep Spin miniprep Kit	QIAgen, Venlo, Niederlande
Western Lightning Plus Enhanced Chemiluminescence	Thermofisher, Waltham, MA, USA

2.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete primärer Antikörper. Alle Antikörper werden in 3% BSA in TBST verdünnt.

Primäre Antikörper	Ursprung	Verdün- nung	Hersteller
DNA-PKcs	Maus monoklonal	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
GFP	Kaninchen polyklonal	1:5.000	Abcam, Cambridge, UK
GSK-3β	Mouse monoklonal	1:1000	BD Biosciences, FranklinLakes, NJ, USA
ΙΚΒα	Maus monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
ΙΚΚα	Kaninchen polyklonal	1:500	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
ΙΚΚβ	Kaninchen polyklonal	1:500	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
anti-phospho- GSK-3β	Maus monoklonal	1:500	BD Biosciences, FranklinLakes, NJ, USA
anti-phospho- NEMO	Kaninchen polyklonal	1:1.000 1:2.000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
anti-phospho- NEMO-S8A	Kaninchen polyklonal	1:1000	Eurogentec, Köln, Deutschland
anti-phospho- NEMO-S17A	Kaninchen polyklonal	1:1000	Eurogentec, Köln, Deutschland
anti-phospho- NEMO-S31A	Kaninchen polyklonal	1:1000	Abcam, Cambride, UK
anti-phospho- NEMO-S43A	Kaninchen polyklonal	1:1000	Abgent, Heidelberg, Deutschland
Tubulin	Maus monoklonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
VPS 4A-110 VPS 4A	Maus monoklonal Kaninchen polyklonal	1:1.000 1:1.000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
β-Aktin	Maus monoklonal	1:10.000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 6: Verwendete sekundäre Antikörper. Alle Antikörper werden in TBS verdünnt.

Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Ziege anti-Kaninchen IgG	1:5.000 für NEMO (1:1.000)	(h+L)-HRPO Dianova, Hamburg,
	1:10.000 für NEMO (1:2.000)	Deutschland
	1:2500 für NEMO Ser8	
	1:2.500 für NEMO Ser17	
	1:5.000 für NEMO Ser31	
	1:5.000 für NEMO Ser43	
Ziege anti-Maus IgG	1:7.000 für β-Aktin	(h+L) -HRPO Dianova, Hamburg,
-	1:2.500 für DNA-PKcs	Deutschland
	1:5.000 für VPS 4A	

2.1.6 siRNA-Sequenzen

Name	Oligoname	Sequenz (5' \rightarrow 3')	Hersteller
VPS4 A	VPS4 A	CCGAGAAGCUGAAGGAUUA	Eurofins, Ebersberg, Deutschland
VPS4 A1	NM_013245si.1	GUACUUCCUCCACGCUAUCTT	Eurofins, Ebersberg, Deutschland
VPS4 A2	NM_013245si.2	ACUGCAAGAACAGCUGAUGTT	Eurofins, Ebersberg, Deutschland
VPS4 A2	VPS4 A2	GCAAAGAGAAACACGGCAA	Eurofins, Ebersberg, Deutschland
VPS4 B1	VPS4B	CCAAAGAAGCACUGAAAGATT	Eurofins, Ebersberg, Deutschland
VPS4 B2	VPS4 B2	GGAUGUCCCUGGAGAUAAA	Eurofins, Ebersberg, Deutschland
GL2	LuciferaseGL2siRNA	CGUACGCGGAAUACUUCGA	Eurofins, Ebersberg, Deutschland
GL3	GL3siRNA	CUUACGCUGAGUACUUCGATT	Eurofins, Ebersberg, Deutschland

Tabelle 7: Verwendete siRNA Sequenzen

2.1.7 Transfektionsreagenzien

Tabelle 8: Verwendete Transfektionsreagenzien

Bezeichnung	Hersteller
FuGENE HD	Promega, Mannheim, Deutschland
JetPei	Polyplus transfection, Illkirch, Frankreich
Lipofectamin 2000 reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
X-treme Gene SiRNA Transfection reagent	Roche, Penzberg, Deutschland

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Liste der Verbrauchsmaterialen und Hersteller

Bezeichnung	Hersteller	
0,5-20 µl Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
1,2 ml Cryoröhrchen Cryovial	Simport Scientific Bernard-Pilon Beloeil, Kanada	
1,5 ml Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
10 cm Kulturschalen	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	
10 ml Einwegpipetten	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	
1-10 ml Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
15 ml Falkon	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland	
2 ml Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
20 ml Einwegpipetten	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	
2-200 µl Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
35 mm Fluorodish Cell Culture Dish	World Precision Instruments	
5 ml Einwegpipetten	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	
50 ml Einwegpipetten	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	
50 ml Falkon	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland	
500-5000 µl Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
50-1000 µl Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	
6-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland	
96-Well Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland	
Luminatorteströhrchen	EG&G Berthold, Bad Wildbad, Deutschland	
Präzipitationssäule (MACS Separation Columns)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	
PVDF Transfermembran, Immobilon-P	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	
Whatman-Papier (RotiLabo 0,36mm)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	

Zellschaber

BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

2.2 Statistik und Software

Tabelle 10: Verwendete Software

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
AxioVision 40 Rel. 4.8	Bildanalyse von	Zeiss, Oberkochen,
	Fluoreszenzmikroskopaufnahmen	Deutschland
Chemostar Professional	Bildanalyse von Western Blot	INTAS, Göttingen, Deutschland
	Membranen	
MS Office 365	Diverse Auswertungen und	Microsoft, Redmond, WA, USA
	Dokumentation der Daten	
ImageJ	Densitometrische Auswertungen	National Institutes of Health
		(NIH)
Gen5 1.06 Data Analysis	Messung von	BioTek, Winooski, VT, USA
	Proteinkonzentration	
Photoshop CS3	Bildbearbeitung von Western Blot	Adobe, San José, CA, USA
	Aufnahmen	

2.3 Molekularbiologische Methoden

Die verwendeten Plasmide wurden mittels DNA-Klonierung in der Arbeitsgruppe "Signaltransduktion in der atherosklerotischen Plaque" unter der Leitung von Prof. Dr. Braun-Dullaeus (im Folgenden ,die Arbeitsgruppe', Kennzeichen: AG) hergestellt. Dazu wurden DNA-Fragmente durch Restriktionsenzyme und DNA-Ligase in dem Klonierungsvektor pGEX4T2 (GE HealthCare) eingefügt und das so entstandene DNA-Molekül zur Plasmidamplifikation in *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 Zellen transformiert.

Tabelle 11: Verwendete Plasmide

Plasmide	Hersteller
DSRed-Rab5-S34N	Abnova, Taipei City, Taiwan
GFP-leer	Addgene, MA, USA
LAMP1-GFP	Thermofisher, Waltham, MA, USA
NEMO-S17A-GFP	AG
NEMO-S31A-GFP	AG
NEMO-S43A-GFP	AG
NEMO-S8A,17,31A-GFP	AG
NEMO-S8A-GFP	AG
NEMO-WT GFP	AG
NEMO-WT- RFP	AG
pCDNA3-EGFP	Addgene, MA, USA
Rab5-Q79L-GFP	Addgene, MA, USA
Rab5-WT-GFP	Addgene, MA, USA
Vps4 ^{E233Q} -GFP	Addgene, MA, USA
Vps4-WT-GFP	Addgene, MA, USA

2.3.1 Plasmidpräparation kleiner Plasmidmengen (Miniprep)

Die Plasmidpräparation kleiner Plasmidmengen bis 25 µg wird mit Hilfe des QIAprep Spin miniprep Kits durchgeführt. Die Plasmid-DNA wird mittels der alkalischen Lyse von Bakterien nach dem Prinzip von Birnboim und Doly präpariert (Birnboim et al. 1979). Danach wird die 26

Plasmid-DNA auf einer Silicamembran in einem salzhaltigen Milieu adsorbiert und anschließend wieder eluiert.

Als Erstes werden 1-5 ml Ampicillin-haltiges Luria Bertani (LB)-Medium (100 µg Ampicillin/ml) mit einer einzelnen Bakterienkolonie einer zuvor ausgestrichenen und bei 37°C inkubierten Kulturplatte (E. coli) beimpft. Die Kolonie wird im Schüttler bei 225 rpm für 12-16 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterien werden durch Zentrifugation bei 6.800 x g und 20°C geerntet. Das Bakterienpellet wird in 250 µl Puffer P1 resuspendiert, mit 250 µl Puffer P2 versetzt und zum Vermischen 4-6-mal invertiert. Danach werden 350 µl Puffer N3 hinzugegeben und abermals 4-6-mal invertiert. Anschließend wird das Gemisch für 10 min mit 17.900 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und in die QIAprep spin column gegeben. Die Plasmide binden sich dabei an die Silicamembran. Es wird erneut für 60 s bei 17.900 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zur Reinigung werden im ersten Schritt 500 µl Puffer PB in die QIAprep spin column hinzugegeben und anschließend für 60 s bei 17.900 x g zentrifugiert. Im zweiten Schritt werden 750 µl Puffer PE hinzugefügt und für 60 s bei 17.900 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird erneut verworfen und um den restlichen Waschpuffer zu entfernen, für weitere 60 s bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Silicamembran wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt für 60 s mit 50 µl Puffer EB (10 mM TrisCl, pH 8,5) oder Wasser inkubiert und die DNA schließlich bei 17.900 x g für 60 s zentrifugiert. (Qiagen 2004). Anschließend wird die Konzentration mittels des Synergy HTs gemessen. Eine erfolgreiche Isolierung der Plasmid-DNA wurde jeweils mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.3.2 Plasmidpräparation größerer Plasmidmengen (Maxiprep)

Um größere Mengen von Plasmid-DNA (bis 0,5 mg) zu isolieren wird das EndoFree Plasmid Purification Maxi Kit verwendet. Dabei bindet sich die Plasmid-DNA an Anion-Austauschharze. RNA, Proteine, Farbstoffe und niedrigmolekulare Verunreinigungen werden durch Waschen mit salzhaltigem Medium entfernt. Die Plasmid-DNA wird in einem hochkonzentrierten Salz-Puffer gelöst und durch Isopropanol präzipitiert. Die so entstandene Endotoxin-freie Plasmid-DNA kann für Transfektionen verwendet werden (Qiagen 2004).

Als erstes wird eine einzelne Kolonie von einer LB-Agarplatte mit 100 µg/ml Ampicillin entnommen. Mit dieser Kolonie werden dann 2-5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin beimpft. Nachdem der Ansatz 8 h bei 37°C geschüttelt wurde, wird die entstandene Vorkultur anschließend im Verhältnis 1:500-1:1.000 in LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verdünnt. Unter erneutem Schütteln bei 37°C für 12-16 h wird der Ansatz inkubiert. Durch Zentrifugation bei 6.000 x g für 15 min bei 4°C werden die Zellen pelletiert. Das Pellet wird mit 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Dann werden 10 ml Puffer P2 hinzugegeben, 4-6-mal

invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes werden 10 ml gekühlter Puffer P3 dem Lysat hinzugefügt und invertiert bis die Lösung klar ist. Das präzipitierte Material enthält genomische DNA, Proteine, Zelldetritus und KDS (Kalium Dodecyl Sulfat). Das Zelllysat wird geschwenkt bis die Lösung klar wird und in die QIAfilter Cartidge gegeben, um anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert zu werden. Es wird ein Stempel in die QIAfilter Cartridge eingesetzt und das Zelllysat in ein 50 ml Reaktionsgefäß gefiltert. 120 µl des gefilterten Lysats werden aufbewahrt und als Probe für die Agarosegelelektrophorese aufgehoben, um zu ermitteln, ob das Wachstum und die Lysekonditionen optimal gewesen sind (Probe 1).

Im nächsten Schritt werden 2.5 ml Puffer ER zu dem gefilterten Lysat gegeben und ca. 10-mal invertiert, während das Lysat für 30 min auf Eis inkubiert. Der QIAGEN-Tip 500 wird durch Zugabe von 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Anschließend wird das gefilterte Lysat auf den QIAGEN-Tip gegeben. Das Lysat läuft nun durch das Anionenaustauschharz, woran sich die Plasmid-DNA binden kann. Es werden 120 µl des gefilterten Lysats für die Agarosegelelektrophorese aufbewahrt, um die DNA-Bindungseffizienz des Anionen-Austauschharzes zu ermitteln (Probe 2). Der QIAGEN-Tip wird 2-mal mit 30 ml Puffer QC gewaschen. Es werden 240 µl der Waschfraktionen für die Agarosegelelektrophorese aufgehoben (Probe 3). Dann wird die DNA mit 15 ml Puffer QN von dem Austauschharz eluiert. Das Eluat wird aufgefangen und 60 µl für eine spätere Agarosegelelektrophorese aufgehoben (Probe 4). Die gelöste DNA wird durch Zugabe von 10,5 ml raumtemperiertem Isopropanol präzipitiert. Die Lösung wird gemischt und sofort bei 4°C mit 15.000 x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgegossen und das DNA-Pellet mit 5 ml raumtemperiertem 70% igen Ethanol gewaschen. Für 10 min wird erneut mit 15.000 x g abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Das Pellet wird für 5-10 min luftgetrocknet und im endotoxinfreien TE Puffer resuspendiert. Die Plasmid-DNA-Konzentration wird mittels des Synergy HTs gemessen und mithilfe einer Agarosegelelektrophorese qualitativ bestimmt (Qiagen 2004).

2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Qualitätsbestimmung der Plasmid-DNA aus Mini- und Maxiprep wird die Agarosegelelektrophorese verwendet. Im Agarosegel werden die Moleküle nach ihrer mittleren Molekülgröße im elektrischen Feld aufgetrennt. Der Agarosegelansatz wird in der Mikrowelle erhitzt und nach Abkühlen auf etwa 50°C in einen Gelschlittenträger mit eingesetztem Kamm für die Geltaschen gegossen. Nach Auspolymerisierung des Gels wird dieses in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Agarosegelelektrophoresekammer gelegt. Die Proben aus den verschiedenen Schritten der Reinigungsprozesse (Lysat, Durchfluss, Waschfraktion, Eluat) werden im Verhältnis 1:5 in einen 6x konzentrierten Ladungspuffer

gegeben und jeweils 2 μ l in die Geltaschen gegeben und bei 100 V aufgetrennt. Mit Hilfe von UV-Translumination werden die DNA-Ethidiumbromidkomplexe bei 312 nm detektiert.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zelllinien

Es wurden drei Zelllinien verwendet. Die *CV-1 in Origin with SV40 genes* (COS-7, Affennierenzellen) und HEK293 (*Human Embryonic Kidney*-Zellen 293)-Zellen wurden jeweils von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Die dritte Zelllinie HEK293-K Σ 2-Zellen wurde mittels Elektroporation (siehe 2.4.6.2) von der Arbeitsgruppe hergestellt.

2.4.2 Zellkultur und Behandlung

Alle drei Zelllinien werden im Nährmedium in 10 cm Schalen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Die Zellen werden alle 3 bis 4 Tage je nach Konfluenz subkultiviert. Hierfür werden nach dem Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS die adhärenten Zellen nach 5-10-minütiger Inkubation mit Trypsin von der Wachstumsoberfläche abgelöst. Danach wird die Zellsuspension in ein mit ca. 10 ml Nährmedium (10% FBS) gefülltes 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend werden die Zellen bei 250 x g für 5 min pelletiert. Der Überstand über dem so entstandenen Pellet wird abgesaugt und in 10 ml Nährmedium resuspendiert. Die Kulturschalen werden mit 7 ml Nährmedium befüllt und anschließend werden die resuspendierten Zellen je nach Zelllinie im Verhältnis 1:10 (COS-7) oder 1:5 (HEK293, HEK293 K Σ 2) ausgesät.

2.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung des Anteils vitaler Zellen wurde eine Trypanblaufärbung durchgeführt. 10 µl der zu analysierenden Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypanblau vermischt und anschließend 10 µl der Mischung in eine Neubauerzählkammer gefüllt. Unter dem Mikroskop werden die Zellen in vier Großquadraten (von insgesamt neun Großquadraten) gezählt. Tote Zellen sind durch die Aufnahme von Trypanblau, aufgrund ihrer perforierten Zellmembran, von vitalen Zellen zu unterscheiden. Nur die lebenden Zellen in vier Großquadraten werden gezählt und die Zellzahl pro ml wie folgt ausgerechnet:

Zellzahl/ml = gezählte Zellen/4 x 10 x 10^4 .

2.4.4 Einfrieren von Zellen

Um die Zellen einzulagern, werden sie zunächst mit Trypsin abgelöst, in frischem Medium mit 10% FBS aufgenommen und bei 250 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird

verworfen und das Pellet mit Einfriermedium resuspendiert. In Cryoröhrchen werden die Proben im Gefrierbehälter bei -80°C eingefroren, sodass es zu einer Abkühlung von 1°C/Minute kommt.

2.4.5 Auftauen von Zellen

Um die eingefrorenen Zellen zu kultivieren, wird der Inhalt des Cryoröhrchens zunächst schnell mit 1 ml auf 37°C angewärmtem Medium aufgetaut und anschließend in 9 ml Medium in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Abzentrifugieren bei 250 x g für 5 min wird das so entstandene Pellet in 10 ml Medium gelöst und in 10 cm Schalen verteilt.

2.4.6 Transfektion

Bei der Transfektion wird DNA bzw. RNA stabil oder transient in eine eukaryotische Zelle eingebracht. Für die folgenden verwendeten Transfektionsmethoden werden allen Zellen in gleicher Weise vorbereitet. Die Zellen werden in Nährmedium in einer Zelldichte von 3x10⁶ HEK293- und HEK293-KΣ2-Zellen bzw. 2*10⁶ COS-7-Zellen pro 10 cm Zellkulturschale und 3x10⁵ HEK293- und HEK293-KΣ2-Zellen bzw. 2x10⁵ COS-7-Zellen pro 6-Well-Platte ausgesät. Vor der Transfektion sollten die Zellen adhärent sein und eine Konfluenz von 70-80 % besitzen. Mindestens 30 min vor der Transfektion wird das Medium je nach Transfektionsmethode durch serumfreies oder -haltiges Medium gewechselt.

2.4.6.1 Biochemische Transfektion

Bei der biochemischen Transfektion wird die DNA in einem stabilen, positiv geladenen Komplex gebunden, welcher an der Membran präzipitiert und mittels Endozytose aufgenommen werden kann.

Transfektion von Plasmid-DNA

a) Calcium-Phosphat-Methode

Mindestens 30 min bis 2 h vor der Transfektion wird das Medium entfernt und durch auf 37°C vorgewärmtes Medium 3 (HEK293 und HEK293-K Σ 2) mit 25 µM Chloroquin ersetzt. Pro 10 cm Zellkulturschale bzw. pro Well einer 6-Well Platte werden im 1. Ansatz 20 µg bzw. 3 µg Plasmid-DNA und 32 µl bzw. 5 µl 2,5 M CaCl₂ gemischt und mit steril filtriertem ddH₂O auf 300 µl bzw. 50 µl aufgefüllt. Der 2. Ansatz besteht aus 300 µl bzw. 50 µl 2 x HBS-Puffer (pH 7,05). Durch mehrmaliges Einlassen von Luft werden in Ansatz 2 Blasen gebildet, wodurch sich die Oberfläche der Lösung erhöht. Bei tropfenweiser Zugabe von Ansatz 1 kann sich so das DNA-CaCl₂-Gemisch feiner verteilen. Bei einer Inkubation von 25-30 min bei Raumtemperatur kommt es zur Bildung feiner Phosphat-DNA-Präzipitate. Den Zellen werden tropfenweise die Präzipitate hinzugegeben und dabei leicht geschwenkt. Bei 37°C

inkubieren die Zellen mit dem Transfektionsgemisch über 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

b) Lipofektion

Die Transfektion per Lipofektion wurde mit dem Transfektionsreagenz TurboFect durchgeführt. Das Protokoll ist angelehnt an die Angaben des Herstellers (Thermo Fisher Scientific Inc. 2013). TurboFect ist eine Lösung eines kationischen Polymers in Wasser. Die Polymere bilden mit der DNA einen kompakten, positiv geladenen Komplex, wodurch diese in eine Zelle eingebracht werden kann. Als erstes wird das Nährmedium mindestens 30 min vor Transfektion durch Medium 4 ersetzt. Pro Well einer 6-Well-Platte werden zwei Ansätze hergestellt.

Ansatz 1 besteht aus 3 μ g Plasmid-DNA, welcher auf 100 μ l mit Medium 4 aufgefüllt wird. Der 2. Ansatz besteht aus 3 μ l Lipofectamine und 97 μ l Medium 4. Die Ansätze werden kurz gevortext. Anschließend wird Ansatz 2 tropfenweise zu Ansatz 1 hinzugegeben und erneut gevortext. Bei Raumtemperatur werden die Ansätze für 30 min inkubiert und tropfenweise pro Well hinzugegeben. Die Zellen werden für 24-48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

c) Nicht-liposomale Transfektion mit FuGENE HD

Die Transfektion mit FuGENE HD ist angelehnt an die Angaben des Herstellers (Promega 2010). Zunächst wird das Nährmedium durch Medium 4 (COS-7) bzw. Medium 3 (HEK293 und HEK293-K Σ 2) ersetzt. Pro Well einer 6-Well Platte bzw. pro Fluoro Dish werden im ersten Ansatz 2 µg DNA mit Medium 4 auf 100 µl aufgefüllt. Der 2. Ansatz besteht aus 6 µl (Verhältnis FuGENE HD Transfektionsreagenz zu DNA 3:1 gemäß Herstellerangaben). Ansatz 2 wird in Ansatz 1 getropft, sofort vermischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird das Gemisch auf die Zellen getröpfelt und für 24-48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Transfektion von siRNA

Zunächst wird das Nährmedium der Zellen durch Medium 4 ersetzt. Es wurden verschiedene Transfektionsreagenzien verwendet. Für eine liposomale Transfektion von siRNA wurde Lipofectamine 2000 und X-treme Gene verwendet. Für die nicht-liposomale Transfektion von siRNA wurde FuGENE HD verwendet. Pro Well einer 6-Well-Platte bzw. pro Fluoro Dish werden für den 1. Ansatz 6 μ l siRNA in 44 μ l Medium 4 pipettiert. Der 2. Ansatz besteht aus 3 μ l Transfektionsreagenz und 47 μ l Medium 4.

Bei der rezeptorvermittelten Transfektion von siRNA wurde das JetPei Transfektionsreagenz verwendet. Mittels des kationischen Polymers Polyethylenimin (PEI) wird die DNA gebunden

und ist so in der Lage sich an einen Rezeptor zu binden, wodurch sie in die Zelle aufgenommen werden kann. Pro Well einer 6-Well-Platte bzw. pro Fluoro Dish werden zwei Ansätze vorbereitet. Im 1. Ansatz werden 6 μ l siRNA mit 400 μ l RNase-freies-ddH₂O gemischt. Der 2. Ansatz besteht aus 6 μ l JetPei und 100 μ l RNase-freies-ddH₂O.

Anschließend wird jeweils Ansatz 2 zu Ansatz 1 tropfenweise hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen werden die Ansätze für 30 min inkubiert und anschließend auf die Zellen getropft. Um eine bessere Transfektionseffizienz zu erreichen, wird die Transfektion zweimal im Abstand von 24 h wiederholt. Die zweite Transfektion erfolgt mit Medium 3.

2.4.6.2 Physikalische Transfektion Elektroporation

Bei der Elektroporation kommt es durch kurze elektrische Impulse kurzzeitig zur Porenbildung, sodass DNA in die Zelle eindringen kann. Die Zellen wurden durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der NF- κ B stabil transfizierten HEK293-K Σ 2-Zellen werden zunächst HEK293-Zellen ausgezählt und in einer Zelldichte von 1x10⁶ ausgesät. Die Zellen werden mit 0,8 ml PBS resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Dann werden 10 µg des [pGL4.32[luc2P/NF- κ B-RE/Hygro] Vektors hinzugefügt. Für 5 min werden die Zellen auf Eis inkubiert, danach in eine Elektroporationsküvette überführt und in einem Genpulser II Elektroporator bei 250 V und 975 µF elektroporiert. Anschließend werden die Zellen für ca. 2 min inkubiert, um dann in mit 10 ml Kulturmedium vorbereitete 10 cm Kulturschalen überführt zu werden. Zur Kontrolle wird das Plasmid pCDNA3-EGFP parallel transfiziert, sodass die Transfektionseffizienz bestimmt werden kann. Zur anschließenden Selektion wird dem Kulturmedium Hygromycin B im Verhältnis 1:250 (0,2 µg/ml) hinzugegeben.

2.4.7 Stimulierung von Zellen

Bei der Zellstimulierung in Eppendorfgefäßen werden die adhärenten Zellen im Medium mit dem Zellschaber abgekratzt und in 2 ml Eppendorfgefäße überführt. Nach dem Abzentrifugieren bei 14.000 x g wird der Überstand abgesaugt und mit 2 ml Medium 4 resuspendiert. Die Zellsuspension wird im Anschluss auf zwei 1,5 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt und in den Deckel der zu stimulierenden Probe die entsprechende Menge TNF-α pipettiert. Ein gleichzeitiges Invertieren aller Eppendorfgefäße ermöglicht eine gleichzeitige Stimulation der Proben. Bei 37°C und 300 rpm werden die Proben auf dem Thermomixer für 1 h inkubiert. Es folgt ein 3-minütiges Zentrifugieren bei 14.000 x g und der Überstand wird abgesaugt. Um eventuelle TNF- α Rückstände zu entfernen, werden die Proben mit PBS gewaschen und erneut für 3 min bei 14.000 x g abzentrifugiert. Anschließend können die Proben direkt lysiert (siehe 2.4.8) oder mithilfe von flüssigem Stickstoff zur Lagerung bei -80°C eingefroren werden. Bei der Stimulation in der 10 cm Zellkulturschale bzw. 6-Well-Platte wird eine Lösung aus Medium 4 und der benötigten TNF- α Menge hergestellt. Anschließend tauscht man das Nährmedium durch das mit TNF- α versetzte Medium aus. Nach der gewünschten Stimulationszeit wird das Medium abgesaugt und pro 10 cm Zellkulturschale mit 2-3 ml bzw. pro 6-Well mit 500 µl PBS gewaschen. Dies wird anschließend vorsichtig und gründlich abgesaugt und die Zellen können lysiert werden (siehe 2.4.8).

2.4.8 Herstellung von Zelllysaten

Für die Zelllyse gibt man 150 μ l (pro Well einer 6-Well-Platte) bzw. 250 μ l (pro 10 cm Zellkulturschale) Laborpuffer (COS-7, HEK293) bzw. Promega-Lysepuffer (HEK293-K Σ 2) hinzu. Mit einem Zellschaber werden nun die noch adhärenten Zellen abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und gevortext. Nach 1 h Lyse auf Eis werden die Proben bei 14.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues, gekühltes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und kann entweder direkt analysiert oder bei -80°C gelagert werden.

2.4.9 Zellkulturvorbereitung für *Stimulated Emission Depletion* (STED)-Mikroskopie

HEK293-Zellen. welche auf Fluoro-Dishes adhärent wachsen, werden in 4% Paraformaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend 3-malig mit PBS gewaschen. Um unspezifische Proteinbindestellen zu blocken, werden die Zellen in Blockierungspuffer für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen erneut mit PBS einmalig gewaschen. Die Proben werden sodann mit einem primären Antikörper für ca. 12 h bei 4°C inkubiert. Der primäre Antikörper wird abgenommen und die Zellen 5-malig mit PBS gewaschen. Dann werden die Proben mit einem fluoreszenzmarkierten zweiten Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Zellen erneut 5-malig mit PBS gewaschen und zuletzt in Mowiol (pH 8,4) eingebettet.

2.4.10 Luciferaseaktivitätsmessung

Für die Messung wird das Luciferase Assay System von Promega verwendet. Dabei entsteht Licht durch die Energie, die bei der durch Luciferase vermittelten Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin emittiert wird (Wood 1990).

Für die Luciferaseaktivitätsmessung werden durch Elektroporation hergestellte mit NF- κ B-*Response Elements* (RE)-stabil transfizierte HEK293-KΣ2-Zellen (Herstellung siehe 2.4.6.2) verwendet. Der verwendete [pGL4.32[luc2P/NF- κ B-RE/Hygro] Vektor besteht zum einen aus Luc2P, einer synthetischen Variante des *Phontius pyralos*-Luciferasegens und zum anderen aus einer fünffachen Kopie eines NF- κ B-REs. Durch dieses Verfahren lässt sich die Luciferaseaktivität messen, welche proportional zu der Aktivität des transfizierten Luc2P bzw. in diesem Falle auch zu der NF-κB-Aktivität ist (Promega 2011).

Zunächst werden die Zellen mit Promega-Lysepuffer lysiert. In einem Luminatorteströhrchen werden laut Protokoll des Herstellers 100 µl des Luciferasesubstrats vorgelegt, mit 20 µl des Lysats gemischt und mit dem Luminometer bei 595 nm gemessen. Es erfolgt jeweils eine Dreifachbestimmung.

2.4.11 Bafilomycin

Bafilomycin ist ein spezifischer Inhibitor der vakuolären H (+) -ATPase (V-ATPase) in Zellen und inhibiert die Ansäuerung von Organellen wie Lysosomen und Endosomen, die dieses Enzym enthalten (Klionsky et al. 2008). Um die Bedeutung der Existenz von Endosomen bzw. Lysosomen für NEMO zu zeigen, wird NEMO-WT in HEK293-Zellen transfiziert und anschließend mit 1 µM Bafilomycin in Medium 3 für 12 h inkubiert.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Bestimmung des Gesamtproteingehalts

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgt mittels des DC Protein Assays (BioRad 1995), einem colorimetrischen Assay, dessen Reaktion ähnlich zum Lowry Assay ist (Lowry et al. 1951). Zwei Reaktionen bedingen die Farbentwicklung. Der erste Schritt beruht auf der Biuretreaktion, der Bildung eines blau-violetten, quadratisch-planaren Komplexes zwischen den Peptidbedingungen und den Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung. Beim zweiten Schritt wird Kupfer(II) zu Kupfer(I) reduziert. Die Kupfer(I)-Ionen führen daraufhin eine Reduktion des Folin-Ciocalteu-Reagenzes zu Molybdänblau durch. Die Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration mittels eines Photometers gemessen (Lowry et al. 1951; BioRad 1995).

Vorbereitend wird das Arbeitsreagenz hergestellt, bei dem pro ml Reagenz A 20 µl Reagenz S hinzugegeben wird. Ebenfalls wird bei jeder Messung ein Proteinstandard bestehend aus 7 verschiedenen Konzentrationen (0, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5 und 2,0 mg/ml bovines Serum-Albumin (BSA) zur Erstellung einer Standardkurve gemessen. Auf einer 96-Well-Platte werden in Dreifachbestimmung je Well 5 µl des Proteinstandards oder der Probe pipettiert. Im zweiten Schritt werden 25 µl des Arbeitsreagenzes pro Well hinzugegeben. Zuletzt werden 200 µl Reagenz B in jedes Well gegeben. Die Reagenzien werden für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Mikroplattenlesegerät wird die Extinktion bei 650 nm und 750 nm gemessen. Die Auswertung erfolgt mit der Gen5 Software, wodurch eine Standardkurve erstellt wird und somit die Proteinkonzentrationen berechnet werden können.

Mithilfe von Excel werden anschließend die Konzentrationen der individuellen Probenansätze errechnet.

2.5.2 Subzelluläre Fraktionierung

Um den Proteingehalt getrennt von Nukleus und Zytoplasma zu analysieren wird eine höhere Proteinmenge benötigt. Dazu werden nach erfolgter Transfektion Zellen von mindestens fünf Zellkulturschalen (10 cm) im Medium abgekratzt, in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 250 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet wird mit 1 ml PBS gewaschen, in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 14.000 x g kurz abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1 ml Nuclear-Buffer I gelöst. Überführt in ein Glaspistill mit Mörser wird das Gemisch durch manuelle Homogenisation durch 42-malige Drehbewegungen gestempelt und anschließend im Eppendorfgefäß bei 6.000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es enthält den Zytoplasmaanteil der Probe. Das Pellet wird anschließend jeweils zweimal mit 500 µl Nuclear-Buffer I gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand im Anschluss verworfen, um eventuelle Reste zu entfernen. Nun wird das Pellet mit 250 µl Nuclear-Buffer II resuspendiert und für 1 h auf Eis lysiert. Anschließend wird erneut bei 14.000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand, in dem sich die Nukleusfraktion des Lysats befindet, in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine aus den Zelllysaten werden mittels der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt (Laemmli 1970). Das Gel hat je nach Acrylamidgehalt eine unterschiedlich dichte Netzstruktur, durch welche kleinere Proteine schneller wandern können als größere. Je höher die Acrylamidkonzentration in dem Gel ist, desto kleiner sind die Netzporen und desto besser können kleinere Proteine aufgetrennt werden.
Folgende Zusammensetzungen wurden verwendet:

	Sammelgel	Trenngel		
	4%	7,5%	10%	12%
Acrylamid-Bisacrylamid (30%) [ml]	0,67	3,75	5,0	6,0
1,5 M Tris-HCl pH 8,8 [ml]		3,75	3,75	3,75
0,5 M Tris-HCl pH 6,8 [ml]	1,25			
Aqua dest [ml]	2,97	7,18	5,93	4,93
10% SDS [µl]	50	150	150	150
TEMED [µl]	5	15	15	15
10% APS [µl]	50	150	150	150
Endvolumen für zwei Gele	5 ml	15 ml	15 ml	15 ml

Tabelle 12: Western Blot Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE

Vorbereitend werden die Glasplatten in eine Gelgießvorrichtung eingespannt und die Komponenten für Sammel- und Trenngel bis auf TEMED und APS jeweils im Becherglas vermischt. Im nächsten Schritt wird zum Trenngel TEMED und APS hinzugegeben, der Ansatz gemischt und zügig in die Gelgießvorrichtung gefüllt. Anschließend wird das Gel vor seiner endgültigen Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Aushärten des Trenngels wird der Isopropanol abgegossen und die oberste Schicht des Gels mit destilliertem Wasser gereinigt.

Dann wird dem vorbereiteten Sammelgelansatz TEMED und APS hinzugefügt, der Ansatz gemischt und zügig auf das Trenngel pipettiert. Ein Kamm als Platzhalter für die Probentaschen wird eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels werden die Platten in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, welche dann mit Elektrophoreselaufpuffer befüllt wird. Den Proben wird entsprechend der Proteinbestimmung jeweils dieselbe Proteinmenge entnommen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße gefüllt. Anschließend wird die entsprechende Menge Probenpuffer hinzugefügt, sodass alle Ansätze die gleiche Konzentration besitzen. Die Ansätze werden für 5 min bei 98°C im Thermomixer erhitzt, kurz abzentrifugiert und in die Geltaschen gefüllt. Zum späteren Vergleich der Molekülgrößen werden in die erste Tasche 7 µl und in die letzte Tasche 3 µl Precision Plus Protein Standard Dual Color Marker gegeben. Anschließend werden die Proteine elektrophoretisch bei 80-120 V aufgetrennt.

2.5.4 Western Blot

Beim Western Blot werden die zuvor im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Dabei wird ein elektrisches Feld angelegt. Zunächst wird die PVDF-Membran in Methanol für ca. 30 s aktiviert und anschließend in ein Schälchen mit Transferpuffer gelegt. Die Membran und das Gel werden in einem *Sandwich* von außen mit Schwämmen und Whatman-Filterpapier geschichtet. In einer mit Western

Blot-Puffer gefüllten, auf Eis liegenden Transferkammer werden die Proteine über 2 h mittels einer Spannung von 100 V aus dem Gel auf die PVDF-Membran übertragen.

2.5.5 Proteindetektion

Nach dem Transfer wird die Membran kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und mit TBST-Blockierungspuffer für 30 min blockiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Nach dem Waschen mit TBST wird die Membran in Primärantikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wird die Membran 3-4-mal für jeweils 15 min mit TBST gewaschen und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur mit einem *Horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörper behandelt. Der sekundäre Antikörper wird im 1xTBS-Puffer verdünnt. Dann wird die Membran erneut dreimal mit TBST gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Die Membran wird einem 1:1 Gemisch der Stammlösungen des Western Lightning Plus Enhanced Chemiluminescence Kits für 1 min inkubiert. Die Lumineszenz entsteht durch die Reaktion zwischen dem am Antikörper gekoppelte Enzym (HRP) und dem Luminol im Gemisch als Substrat. Die Bandendetektion erfolgt mit der Chemolumineszenz-Kamera und die Auswertung mittels Chemostarsoftware.

2.5.6 Antikörperentfernung von PVDF-Membranen

Bereits verwendete PVDF-Membranen können durch Antikörperentfernung (*stripping*), erneut benutzt werden, um weitere Proteine zu detektieren. Dazu wird die getrocknete Membran mit Methanol aktiviert, anschließend in TBST einmal gewaschen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 50 ml *stripping*-Puffer gegeben. Das Reaktionsgefäß wird bei 50°C für 30 min erhitzt, danach 10 min bei Raumtemperatur auf dem Rollmischer gedreht, dann viermal á 5 min mit TBST gewaschen. Anschließend wird die Membran erneut mit TBST-Blockierungspuffer geblockt und kann in einer Primärantikörperlösung inkubiert werden.

2.5.7 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation (IP) nutzt die Spezifität der Antikörper, um bestimmte Proteine aus einem Proteingemisch zu isolieren (Kaboord und Perr 2008). Die magnetische Immunopräzipitation wird mit Hilfe des µMACS GFP Isolation Kits durchgeführt. Mittels dieser Methode können GFP-markierte Proteine magnetisch aus einem Zelllysat isoliert werden. Zu dem gesamten Zelllysat werden 50 µl anti-GFP MicroBeads hinzugefügt. Die Ansätze werden anschließend über Nacht bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Währenddessen binden sich die MicroBeads an die GFP-Epitope der zu isolierenden Proteine. In dem µMACS Separator werden µ-Columns mit 200 µl Lysepuffer und anschließend mit dem markierten Zelllysat befüllt. Während das Lysat die Säule passiert, binden sich die magnetisch markierten GFP-Proteine an die Matrix. Im Anschluss wird viermal mit 200 µl Waschpuffer 1 und einmal mit 100 µl Waschpuffer 2 gewaschen. Dann werden 20 µl des auf 95°C vorgeheizten Elutionspuffers auf die Säule gegeben und 5 min inkubiert, sodass die Proteine von den MikroBeads gelöst werden. Das Eluat wird in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgefangen. Nach Zugabe von weiteren 50 µl vorgeheiztem Elutionspuffer wird die Säule 2-3-mal bei 800 x g für 1 min zentrifugiert und das Eluat ebenfalls in dem Eppendorfgefäß aufgefangen. Die entstandene Proteinlösung kann nun für eine Gelelektrophorese verwendet werden (Miltenyi Biotec 2014).

Die Co-Immunopräzipitation ist eine Erweiterung der Immunopräzipitation, welche auf die IP-Reaktionen basiert, um zum einen das gesuchte Zielprotein als auch Makromoleküle, die sich durch verschiedene Interaktionen an das Zielprotein binden, zu detektieren. Je nach Fokus nennt man das Experiment IP (primäres Zielprotein) oder Co-IP (interagierendes Protein) (Thermo Fisher Scientific Inc. 2016a).

2.5.8 In vitro Phosphorylierungsassay

Die *in vitro* Phosphorylierung von rekombinantem humanem NEMO (rhNEMO) bzw. von Glutathione S-transferase (GST)-NEMO-Fusionsproteinen basiert darauf, dass die GSK-3 β radioaktiv markierte γ -Phosphatreste in das vorhandene ATP von NEMO einbaut.

Die GST-NEMO-Fusionsproteine wurden durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe hergestellt. Um diese Fusionsproteine zu erzeugen wurde NEMO-WT bzw. NEMO-S8A, NEMO-S17A, NEMO-S31A, NEMO-S43A, NEMO-S8,43A mit GST ge*tagged*.

RhNEMO oder ein aufgereinigtes GST-NEMO-Fusionsprotein (Wildtyp bzw. Mutanten) wurden mit GSK-3β bei 30°C in einem totalen Volumen von 30 μl von GSK-3β Kinase Assay Puffer inkubiert. Die Phosphoproteinprodukte wurden mittels einer SDS-PAGE (2.5.3), Coomassie-Blau-Färbung bzw. Autoradiographie detektiert.

Bei der Coomassie-Blau-Färbung wird das SDS-Gel über Nacht bei Raumtemperatur mit der Färbelösung gefärbt. Am Folgetag wird das Gel für 3-4 h bei 50-60°C mit der Entfärbelösung entfärbt. Im Anschluss wird das Gel für 15 Min in Wasser gewaschen und unter Vakuum bei 60°C für 2-3 h getrocknet.

2.6 Mikroskopische Methoden

2.6.1 Immunofluoreszenz

In der Fluoreszenzmikroskopie werden bestimmte Stoffe verwendet, welche UV-Licht oder kurzwelliges sichtbares Licht (Wellenlänge λ_1) absorbieren und einen Teil der Energie in Form von langwelliger Strahlung (λ_2) emittieren ($\lambda_2 > \lambda_1$: Stokessche Regel) (Spektrum 1999).

Für die Vorbereitung von *live cell imaging*-Untersuchungen und Studien mittels dreidimensionaler Mikroskopie werden ca. 30.000 Zellen in Fluoro Dishes ausgesät. Durch den Glasboden der Fluoro Dishes, welcher die Dicke eines Deckgläschens besitzt, kann eine bessere Bildqualität für die Mikroskopie erreicht werden (Refraktionsindex=1,525). Die zu untersuchenden Konstrukte werden anschließend mittels der unterschiedlichen Transfektionsmethoden in den HEK293- und COS-7-Zellen transfiziert.

2.6.1.1 *Live cell imaging*

Die Durchführung der *live cell imaging*-Untersuchungen erfolgte nach Vorbereitung der Experimente in Kooperation mit Dr. Werner Zuschratter vom Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg. Dabei werden die transfizierten Zellen über die Zeit beobachtet.

2.6.1.2 Visualisierung in Z-Stapeln (Dreidimensionale Mikroskopie)

Um die Lokalisation einzelner Fluoreszenzsignale innerhalb der Zelle zuzuordnen, kann die Zelle in Z-Stapeln aufgeteilt werden. Dafür wurde das Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop mit einem Neofluar 40x/1.3 Oil Objektiv verwendet. Für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Z-Stapel werden die Fluoreszenzfilter pro Schicht gewechselt. Die Bilder werden im Anschluss mittels der ImageJ-Software zusammengefügt.

2.6.2 STED-Mikroskopie

Für die Co-Lokalisationsexperimente vom endogenen NEMO und GSK-3β werden die Zellen, wie in Kapitel 2.4.9 beschrieben, vorbereitet. Die mikroskopischen Arbeiten mittels 2-Kanal TiSphr-gepulstes STED Mikroskop wurden nach Vorbereitung der Experimente durch Dr. Werner Zuschratter vom Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg durchgeführt.

2.6.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) und *fluorescence lifetime imaging microscopy* (FLIM)-FRET Analysen

Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ist ein distanzabhängiger photophysikalischer Prozess, wo es zu einem Energietransfer zwischen zwei Fluorophoren kommt. Die Energie wird durch die Exzitation des Donormoleküls auf ein Akzeptormolekül übertragen. Für den Energietransfer müssen mehrere Bedingungen erfüllt sein. Erstens müssen sich Donor und Akzeptor in räumlicher Nähe befinden (typischerweise 10-100 Å). Zweitens muss das Adsorptionsspektrum des Akzeptors das Emissionsspektrum des Donors überlappen. Drittens muss das Übergangsdipolmoment von Donor und Akzeptor annährend parallel sein (Thermo Fisher Scientific Inc. 2016b). Durch die Akzeptorbleiche wird die direkte Emission bspw. die Donorintensität verstärkt. Das Prinzip dahinter ist, dass durch die Abwesenheit des Akzeptors kein FRET stattfinden kann. Es wird als Kontrolle genutzt, dass es ohne FRET keinen Anstieg der Donorfluoreszenz gibt. Sie dient der Berechnung der FRET-Effizienz (Karpova et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Paar aus GFP als Donor und RFP als Akzeptor verwendet. Die Nähe der beiden Fluorphore wird durch die räumliche Nähe der Proteine, an die sie gekoppelt sind erstellt. Die Messung des FRETs kann zum einen über die Quantifizierung der sensitized emission des Akzeptors erfolgen. Diese wird durch die Höhe der Akzeptoremission als Resonanz auf Anregungsenergie vom Donor auf den Akzeptor bestimmt. Zum anderen kann der Energietransfer über die "Lebenszeit" des Donors (FLIM-Analyse) oder eine Fluoreszenzanisotropie bestimmt werden (Shrestha et al. 2015). Die FRET und FLIM-FRET Analysen erfolgten nach Vorbereitung des Experiments in Kooperation mit Dr. Werner Zuschratter vom Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg.

3 Ergebnisse:

3.1 GSK-3β nimmt über NEMO Einfluss auf die NFκB-Aktivität

Der Einfluss von GSK-3 β auf die NF- κ B-Aktivität wurde bereits in der Arbeitsgruppe untersucht. In NF- κ B-stabil-transfizierten HEK293-Zellen konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass die NF- κ B-Aktivität nach Inhibierung von GSK-3 β durch Lithium gehemmt wird. Lithium agiert als spezifischer Inhibitor der GSK-3 Proteinfamilie (Stambolic et al. 1996).

3.1.1 GSK-3β phosphoryliert NEMO

Wie bereits in 1.2.2 erwähnt, ist NEMO ein essentieller Regulator des NF- κ B-Signalwegs, dessen Aktivität durch Phosphorylierung reguliert wird (Shifera 2010). Um zu zeigen, dass NEMO durch GSK-3 β phosphoryliert und somit seine Aktivität reguliert wird, wurden *in vitro* Kinaseassays durchgeführt (2.5.8). Der Nachweis der *in vitro* Phosphorylierung des rekombinanten humanen NEMO (rhNEMO) durch GSK-3 β basiert auf der Bindung von radioaktiv markierten γ -Phosphatresten. Anschließend werden die Proben mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt und per Autoradiographie detektiert. Die Coomassie-Färbung dient als Ladekontrolle. Das rhNEMO Protein wurde dosis- und zeitabhängig durch GSK-3 β phosphoryliert (Abbildung 4).





3.1.2 Phosphorylierungsstellen von rhNEMO durch GSK-3β

Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten mit Hilfe von GST *pull-down assay* zeigen, dass der N-Terminus von NEMO mit GSK-3β *in vitro* interagiert. Durch Vergleich der Aminosäuresequenz des N-terminalen Endes von NEMO mit Aminosäuresequenz von bekannten GSK-3β Substraten konnten mögliche Phosphorylierungsstellen ermittelt werden. Auf Grundlage dessen wurden innerhalb der Arbeitsgruppe verschiedene

Phosphorylierungsstellenmutanten von NEMO hergestellt, in welchen die Serinreste S8, S17, S31 und S43 durch Alanin ersetzt wurden (NEMO-S8A, -S17A, -S31A, und -S43A). Sowohl die mutierten NEMO-Varianten als auch NEMO-WT wurden mit einem GST-*Tag* versehen. Mit Hilfe von *in vitro* Kinaseassays (2.5.8) konnte anschließend die Phosphorylierung von NEMO und seiner mutierten Varianten durch GSK-3β mittels Autoradiographie detektiert werden. Die Phosphorylierung von NEMO-S8A durch GSK-3β war größer als die von NEMO-WT. Verglichen zum NEMO-WT war die Phosphorylierung von NEMO-S17A und -S31A geringer, während die Phosphorylierungen von NEMO-S43A oder - S8,43A ähnlich dem NEMO-WT zu detektieren waren (Abbildung 5). In einem *in vitro* Kinaseassay mit einer Mutante, bei der alle vier Serinreste durch Alanin ersetzt waren (NEMO-S8,17,31,43A), zeigte sich gar keine Phosphorylierung durch GSK-3β (Daten nicht gezeigt). Eine Mutation von NEMO an den Phosphorylierungsstellen von GSK-3β an den Serinresten 17 und 31 reduzierte die Phosphorylierung von NEMO.



Abbildung 5. Phosphorylierungsstellen von rhNEMO durch GSK-3β. In vitro Kinaseassay: NEMO-WT und verschiedene GST-NEMO-Fusionsproteine (NEMO-S8A, NEMO-S17A, NEMO-S31A, NEMO-S8,43A, NEMO-S43A) (1 µg) wurden als Substrat für GSK-3ß (0,01 μg) verwendet. Die Aktivität von NEMO und den GST-NEMO-Fusionsproteinen wurde mittels Autoradiographie (vgl. 3.1.1) nachgewiesen.

3.1.3 Die von GSK-3 β -vermittelte Phosphorylierung von NEMO ist für die NF- κ B-Aktivität erforderlich

Mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung von rhNEMO mittels *in vitro* Phosphorylierung untersucht. Für den *in vitro* Phosphorylierung-Kinaseassay (2.5.8) wird rhNEMO als Substrat von GSK-3β verwendet und zu verschiedenen Zeitpunkten von 0-30 Min beobachtet. Die Phosphoproteinprodukte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western Blot mit Antikörpern gegen NEMO und mit den Phosphoantikörpern pNEMO-S8A, pNEMO-S17A, pNEMO-S31A und pNEMO-S43A untersucht. Es zeigte sich, dass GSK-3β signifikant zeitabhängig alle vier Serinreste von rhNEMO phosphorylierte. NEMO diente als Ladekontrolle (Abbildung 6 A).

Um den Phosphorylierungszustand der Serinreste zu untersuchen, wurde NEMO in HEK293-Zellen transfiziert. Diese Zellen wurden mit dem GSK-3β-Inhibitor SB216763 behandelt. Zum Vergleich wurde ein Teil der Zellen schließlich für 1 h mit TNF-α (10 ng/ml) stimuliert. Die Zelllysate wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt; im Western Blot wurden NEMO, pNEMO-S8A, pNEMO-S17A, pNEMO-S31A, pNEMO-S43A und β-Aktin detektiert.

42

β-Aktin diente als Ladekontrolle. Bei der Inhibierung von GSK-3β durch den Inhibitor SB216763 konnte eine signifikante Reduktion der Expression von NEMO, sowie von pNEMO-S8A, pNEMO-S17A, pNEMO-S31A und pNEMO-S43A gezeigt werden. Durch die Stimulation mit TNF-α konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 6 B). GSK-3β ist bei der Phosphorylierung an allen untersuchten Serinresten von NEMO beteiligt. Eine weitere Bande von NEMO – als endogenes NEMO bezeichnet – findet sich zwischen 37 und 50 kDa (**x**).

Die Bedeutung der Phosphorylierung von NEMO auf die NF- κ B-Aktivität wurde mittels eines Luciferaseassays mit HEK293-K Σ 2-Zellen, welche mit dem Reporterkonstrukt transfiziert wurden, ermittelt. Während sich bei der Transfektion von NEMO-S31A im Vergleich zum Wildtyp eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität nach 24 h TNF- α Stimulation (1 ng/ml) zeigte, war bei NEMO-S43A kein Unterschied festzustellen. Die Dreifachmutante NEMO-S8A,17,31A wurde von der Arbeitsgruppe hergestellt. Bei der Transfektion dieser Dreifachmutante konnte man im Vergleich zu den anderen Mutanten die größte signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität nach TNF- α Stimulation nachweisen (Abbildung 6 C). Die Luciferaseaktivität als Maß für die NF- κ B-Aktivität konnte durch die Mutation an der Phosphorylierungsstelle S31A von NEMO und kombinant an den Phosphorylierungsstellen S8,17,31A beeinflusst werden.



Abbildung 6. Einfluss der GSK-3β vermittelten Phosphorylierung von NEMO auf die NF-κB- Aktivität. (A) *In vitro* Kinaseassay von GSK-3β (0,01 μg). rhNEMO (1 μg) wird als Substrat verwendet und zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 5, 10, 20, 30 min) untersucht. Anschließend wurden die Zelllysate im Western Blot auf die Expression von pNEMO-S43A, pNEMO-S31A, pNEMO-S17A, pNEMO-S8A und NEMO getestet. NEMO diente als Ladekontrolle. (B) Western Blot von NEMO nach Inkubation mit dem GSK-3β Inhibitor SB216763. HEK293-Zellen wurden mit NEMO-WT-GFP transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 12 h mit dem GSK-3 Inhibitor SB216763 (1μM) inkubiert und schließlich für 1 h mit TNF-α (10 ng/ml) stimuliert. Die Zelllysate wurden im Western Blot auf die Expression von pNEMO-S43A, pNEMO-S31A, pNEMO-S17A, pNEMO-S8A und NEMO untersucht. Als Ladekontrolle diente β-Aktin; x markiert endogenes NEMO. (C) HEK293-KΣ2-Zellen wurden mit NEMO-WT, NEMO-S8A, NEMO-S17A, NEMO-S31A, NEMO-S43A, NEMO-S8,17,31A (jeweils 1 μg Plasmid-DNA) transfiziert und mit TNF-α (1 ng/ml) für 24 h stimuliert. Schließlich wurde die Luciferaseaktivität gemessen. Die Genexpressionsänderung von NF-κB wurde durch Messen der Luciferaseaktivität quantifiziert. Die Ergebnisse werden als vielfache Luciferaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ausgedrückt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von drei Experimenten dar. * bedeutet, dass eine signifikante Reduktion vorliegt.

3.1.4 Interaktion der NEMO-Mutanten mit GSK-3 β und anderen Komponenten des NF- κ B-Signalwegs

Um die Interaktion von NEMO-WT bzw. der NEMO-S8,17,31A mit den Komponenten des NF- κ B-Signalwegs zu veranschaulichen, wurde eine Co-Immunopräzipitation (siehe 2.5.7) durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit NEMO-WT-GFP und NEMO-S8,17,31A-GFP bzw. mit GFP-leer als Kontrolle transfiziert. Zum Vergleich wurde ein Teil der Proben mit TNF- α (10 ng/ml) für 30 Min stimuliert. Die Zelllysate wurden anschließend mit Hilfe des µMACS-GFP Isolationskits magnetisch immunopräzipitiert. Dann wurden die Präzipitate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und schließlich im Western Blot auf NEMO, GSK-3 β , bzw. andere Komponenten des NF- κ B-Signalwegs (IKK β , IKK α) untersucht. Die Coomassie-Färbung für NEMO diente als Ladekontrolle.

Nach der Co-Immunopräzipitation und gelelektrophoretischer Auftrennung ließ sich bei Dreifachmutante NEMO-S8,17,31A im Vergleich zu NEMO-WT signifikant weniger Bindung von GSK-3 β nachweisen. Bei den anderen Komponenten des NF- κ B-Signalwegs zeigte sich keine verminderte Bindung bei der Dreifachmutante NEMO-S8,17,31A im Vergleich zum NEMO-WT. GFP diente als IP Kontrolle. Die Stimulation mit TNF- α hatte keinen Einfluss (Abbildung 7).

Um zu untersuchen, ob die NEMO-Dreifachmutante in Homodimerenformation defekt sei, wurde eine native PAGE-Elektrophorese durchgeführt. Es ließ sich eine reduzierte Bindung in den mit NEMO-S8A,17,31A transfizierten Zellen im Vergleich zu den mit NEMO-WT transfizierten Zellen feststellen (Abbildung 7 obere Bande).



Abbildung 7. Die NEMO-Dreifachmutante und ihr Einfluss auf die NF-kB-Signalweg-Komponenten. HEK293-Zellen wurden mit GFP-leer, NEMO-WT-GFP bzw. NEMO-S8,17,31A-GFP transfiziert und mit TNF-a (10 ng/ml) für 30 min stimuliert. Die Zelllysate wurden mit anti-GFP immunopräzipitiert und anschließend das Eluat im Western Blot aufgetrennt und mittels Antikörpern für NEMO, GSK-3β, IKKβ, IKKα und GFP untersucht. GFP dient als IP-Kontrolle. Die Coomassie-Färbung von NEMO diente als Kontrolle.

3.1.5 TNF- α unabhängige Interaktion und Co-Lokalisation von GSK-3 β und NEMO

Um auszuschließen, dass lediglich Protein-Fehlfaltungen oder intrazelluläre Fehlverteilung des mutierten NEMO für die Abschwächung der TNF-α-induzierten Interaktion mit GSK-3β verantwortlich sind (siehe 3.1.3 Abbildung 6 C), wurde die Dreifachmutante NEMO-S8A,17,31A in lebenden Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert.

HEK293-Zellen wurden mit NEMO-GFP-WT (Abbildung 8 A) und NEMO-S8,17,31A-GFP (Abbildung 8 B) transfiziert. Während NEMO-WT-GFP, wie bereits bekannt, intrazellulär in multiplen zytoplasmatischen *"speckles"* (Flecken) zu beobachten ist (Iha et al. 2003), reduzierte sich die Anzahl der Flecken bei der Transfektion der GFP-getaggten NEMO-S8,17,31A-Mutante signifikant bis hin zu einer dispersen Fluoreszenz (Abbildung 8 B/C). Die fleckenförmige Fluoreszenz von NEMO-WT konnte hingegen durch Co-Transfektion von

GSK-3β-WT erhöht werden (Daten nicht gezeigt). Die Phosphorylierung durch GSK-3β ist für die Lokalisation von NEMO in Flecken essentiell.



NEMO-WT NEMO-S8,17,31A

Die Co-Lokalisation der Interaktionspartner NEMO und GSK-3β in Flecken wurde zusätzlich mittels *Stimulated Emission Depletion* (STED)-Mikroskopie dargestellt. Dafür wurden die Zellen gemäß 2.4.9 vorbereitet. Die primären Antikörper richteten sich gegen NEMO und GSK-3β. Der sekundäre Antikörper war im Fall von NEMO mit RFP ge*tagged*; bei GSK-3β mit GFP versehen. Mittels dieser Methode wurde das fleckenförmige Vorkommen von endogenem NEMO, sowie seine Co-Lokalisation mit endogenem GSK-3β beobachtet. Während NEMO in Flecken innerhalb des Zytoplasmas zu finden ist, lässt sich bei GSK-3β eine zerstreute Verteilung durch das ganze Zytoplasma feststellen (Abbildung 9 A). Dabei kommt es zur Co-Lokalisation zwischen NEMO und GSK-3β im Zytoplasma in Flecken (Abbildung 9 B-D).



Abbildung 9. Co-Lokalisation von endogenem NEMO und GSK-3B. HEK293-Zellen wurden mit einem primären Antikörper gegen NEMO und GSK-3β und fluoreszierenden sekundären Antikörpern behandelt. Anschließend wurde die Verteilung von endogenem NEMO (rot) und GSK-3β (grün) mittels STED-Mikroskopie visualisiert. Die in (A) eingekastelte Region ist in (B-D) vergrößert dargestellt. In (B) ist der GFP-Kanal entsprechend GSK3-B dargestellt. (C) beinhaltet den RFP-Kanal, welcher der

Fluoreszenz von NEMO entspricht. In D finden sich die beiden Kanäle überlagert. Sowohl der 2 µm (A) und der 0,5 µm (B-D) Balken dient als Größenmaßstab. Nach Vorbereitung des Experiments wurden die Bilder von Dr. Werner Zuschratter (Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg) erstellt.

Um die direkte Interaktion von NEMO und GSK-3β zu erfassen, wurden Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)-Analysen und *fluorescence lifetime imaging microscopy* (FLIM)-FRET Analysen durchgeführt (siehe 2.6.3). Hierbei können mittels konfokaler Mikroskopie und spektraler Lasermesstechnik verschiedene Spektren erfasst werden. Bei der hier angewendeten FRET Analyse (Abbildung 10 A), werden Donormoleküle (GSK-3β-WT-GFP) mittels blauem Licht (Wellenlänge 476 nm) angeregt und die Energie wird auf die Akzeptormoleküle (NEMO-WT-RFP) übertragen. In Abbildung 10 A bezeichnen die durchgezogenen Linien das Exzitationsspektrum von GFP (grün) bzw. RFP (rot), die gestrichelten Linien die Emissionen von GFP (grün) bzw. RFP (rot). Die Überlappung der GFP-Emission und der RFP-Exzitation ist in der Abbildung 10 gelb gekennzeichnet. Die blaue Linie zeigt, dass eine Erhöhung der RFP-Emission von etwa 30 % bei Anregung des GFPs zu erwarten ist. Tatsächlich konnte eine Erhöhung der RFP-Intensität um 20% erreicht werden (schwarze Linie). Die gestrichelte schwarze Linie zeigt die RFP-Intensität nach Akzeptorbleiche bei einer Wellenlänge von 561 nm. Sie dient der Berechnung der FRET-Effizienz, welche in diesem Fall ein Maß für die Interaktion von NEMO und GSK-3β darstellt.

In Abbildung 10 B/C ist die FLIM-FRET-Analyse dargestellt. Dort lässt sich zeigen, dass sich durch Anregung der Donorfraktion (GSK-3β) die Fluoreszenzlebensdauer zu Gunsten der Akzeptorfraktion verschiebt. Dabei werden die Pixel gemessen, welche dem zeitlichen Fluoreszenzabfall nach der Anregung entsprechen (Abbildung 10 B/C).



Abbildung 10. Interaktion von NEMO und GSK-3β. (A) FRET-Analyse von HEK293-Zellen, welche mit NEMO-WT-RFP und GSK-3β-WT-GFP co-transfiziert wurden. Die schwarze Linie zeigt die von NEMO-RFP generierte Emission als Antwort auf die Anregung von GSK-3β-GFP durch blaues Licht (476 nm) mittels konfokaler Lasermikroskopie. Die Anregung wird durch gestrichelte Linien und die Emission durch durchgezogene Linien dargestellt. Die grünen Linien zeigen die GFP-Intensität und die roten Linien stellen die RFP-Intensität dar. Die spektrale Überlappung von GFP-Emission und RFP-Exzitation wird durch die gelbe Fläche gezeigt. Die theoretisch erreichte Emission von RFP ist mit der blauen Linie dargestellt. (B) FLIM-FRET-Analyse. In der markierten Region von Interesse wird GSK-3β (Donor) durch blaues Licht angeregt und überträgt die Energie auf NEMO (Akzeptor). (C) Darstellung der Lebenszeit aus der FLIM-FRET-Analyse aufgeteilt in Donor (rot)- und Akzeptorfraktion (grün). Nach Vorbereitung des Experiments wurden die Bilder von Dr. Werner Zuschratter (Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg) erstellt.

3.2 Bafilomycin reduziert die Expression von NEMO und die NF-κB-Aktivität

Um die Bedeutung der Existenz von Endosomen (wie MVB) bzw. von Lysosomen für NEMO zu zeigen, verwendeten wir Bafilomycin, wodurch die vakuoläre H⁺-ATPase inhibiert wird (Klionsky et al. 2008). Gemäß 2.4.11 wurden HEK293-Zellen mit NEMO-WT-GFP transfiziert, anschließend mit Bafilomycin inkubiert und zuletzt mit TNF-α für 1 h stimuliert. Die Zellen wurden gemäß 2.5.2 dann in einen zytosolischen und einen nukleären Teil fraktioniert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western Blot mit Antikörpern gegen NEMO, DNA-PKcs und Tubulin untersucht. Tubulin diente als Ladekontrolle für die Zytoplasmafraktion, DNA-PKcs als Kontrolle für die Nukleusfraktion. In Abbildung 11 A zeigt sich in der Kontrolle, dass die Verteilung von NEMO im Zytoplasma und Nukleus gleichmäßig war. In den Proben, welche mit Bafilomycin behandelt wurden, ließ sich eine verminderte Expression von NEMO im Zytoplasma, vor allem jedoch im Nukleus nachweisen. Sowohl bei der Kontrolle als auch in den mit Bafilomycin behandelten Proben, lässt sich in der Zytoplasmafraktion endogenes NEMO nachweisen (**x**).

Um die Wirkung von Bafilomycin auf die NF- κ B-Aktivität zu untersuchen, wurde die Luciferaseaktivität gemessen. HEK293-K Σ 2-Zellen wurden nach erfolgreicher Reporterkonstrukttransfektion mit NEMO-WT-GFP transfiziert, mit 1 μ M Bafilomycin für 12 h inkubiert und eine Hälfte der Proben mit TNF- α (1 ng/ml) für 24 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, mit dem Luciferasesubstrat versetzt und die Luciferaseaktivität als

Maß für die NF- κ B-Aktivität gemessen. Abbildung 11 B zeigt, dass verglichen zu der Kontrolle, der mit Bafilomycin inhibierten Zellen, die NF- κ B-Aktivität um das Dreifache vermindert war. Durch die Verwendung von Bafilomycin wurde sowohl die Expression von NEMO als auch die NF- κ B-Aktivität negativ beeinflusst.



Abbildung 11. Bafilomycin beeinflusst NEMO und die NF- κ B-Aktivität (A) HEK293-Zellen wurden mit NEMO-WT-GFP transfiziert und mit 1 μ M Bafilomycin für 12 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit TNF- α (50 ng/Well) stimuliert und in den Zytoplasma- und Nukleusanteil fraktioniert. Die Zelllysate wurden im Western Blot untersucht. Tubulin diente als zytoplasmatischer Marker, DNA-PKcs als nukleärer Marker. x markiert endogenes NEMO. (B) HEK293-K Σ 2-Zellen wurden mit Bafilomycin (1 μ M) für 12 h und anschließend mit TNF- α (1 ng/ml) für 24 h inkubiert Die Genexpressionsänderung von NF- κ B wurde durch Messen der Luciferaseaktivität quantifiziert. Die Ergebnisse werden als vielfache Luciferaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ausgedrückt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von drei Experimenten dar. * bedeutet, dass eine signifikante Reduktion vorliegt.

3.3 LAMP1 als Zeichen für lysosomalen Abbau

Durch die Experimente mit Bafilomycin konnte festgestellt werden, dass endosomale bzw. Iysosomale Strukturen für die Expression von NEMO und die NF-κB-Aktivität wichtig sind. Um zu untersuchen, ob es sich dabei um Iysosomale Strukturen handelt, verwendeten wir LAMP1 als Marker für Iysosomalen Abbau. Dafür wurden HEK293-Zellen mit LAMP1-GFP und NEMO-WT-RFP co-transfiziert und unter dem Fluoreszenzmikroskop unter Echtzeitbedingungen beobachtet. Abbildung 12 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer HEK293-Zelle zu einem zufällig ausgewählten Zeitpunkt. Die grünen Signale stammen von GFP-markiertem LAMP1 und die roten Signale von RFP-markiertem NEMO. Betrachtete man die Zelle über die Zeit ließ sich keine Co-Lokalisation der beiden Proteine beobachten. Gleichzeitig waren beide Marker in vesikulären Strukturen lokalisiert, welche sich innerhalb des Zytoplasmas bewegten (siehe "LAMP1 *live cell imaging"* auf beiliegender CD). Der Iysosomale Marker LAMP1 interagierte nicht mit NEMO. Untersuchungen mittels LC3 als Autophagiemarker zeigten ebenfalls keine Co-Lokalisation (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 12. Keine Co-Lokalisation von NEMO und LAMP1. Aufnahme aus einer fluoreszenzmikroskopischen live cell imaging-Sequenz bei 570 Sekunden. HEK293-Zellen wurden mit LAMP1-GFP (grün) und NEMO-WT-RFP (rot) co-transfiziert. Der Beobachtungszeitraum betrug 20 Min. Der 10 µm Balken dient als Größenmaßstab. Nach Vorbereitung des Experiments wurden die Bilder von Dr. Werner Zuschratter (Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg) erstellt.

3.4 Rab5 interagiert mit NEMO

Rab5 ist ein Marker für frühe Endosomen. Um zu untersuchen, ob NEMO mit Rab5 colokalisiert ist, wurden HEK293-Zellen mit NEMO-WT-RFP sowie Rab5-WT-GFP transfiziert und unter dem Fluoreszenzmikroskop unter Echtzeitbedingungen beobachtet. Dabei wurde eine Gruppe durch Rab5-GFP grün leuchtender vakuolärer Strukturen fokussiert. NEMO (rote Darstellung) band sich an diese Strukturen bzw. befand sich innerhalb dieser Strukturen (Abbildung 13) (siehe "Rab5 *live cell imaging"* auf beiliegender CD).



Abbildung 13. Co-Lokalisation von NEMO und Rab5. HEK293-Zellen wurden mit NEMO-WT-RFP (rot) und Rab5-WT-GFP (grün) co-transfiziert und unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Aufnahme aus einer fluoreszenzmikroskopischen Videosequenz (100 Bilder pro 1.500 s) von Rab5-WT-GFP und NEMO-WT-RFP. Der 1 μm Balken dient als Größenmaßstab. Nach Vorbereitung des Experiments wurden die Bilder von Dr. Werner Zuschratter (Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg) erstellt.

Wie bereits in 1.4.1 erwähnt, entstehen bei der Expression der Rab5^{Q79L}-Mutante vergrößerte Endosomen und bei der Expression der Rab5^{S34N}-Mutante ein kleinfleckiges endozytotisches Verteilungsprofil. Um zu zeigen, welchen Einfluss diese Mutationen auf NEMO und dessen Lokalisation innerhalb der frühen Endosomen haben, wurden HEK293-Zellen mit NEMO-WT-RFP und Rab5^{Q79L}-GFP bzw. NEMO-WT-GFP und DSRed-Rab5^{S34N} co-transfiziert. Anschließend wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch in Z-Stapeln und unter Echtzeitbedingungen untersucht. In den durch Rab5^{Q79L} verursachten vergrößerten Endosomen befand sich, im Gegensatz zu Experimenten mit Rab5-WT, kein NEMO

innerhalb der vakuolären Strukturen und es ließ sich keine Interaktion nachweisen. Bei Co-Transfektion von NEMO-WT-GFP und DSRed-Rab5^{S34N} in HEK293-Zellen war im Fluoreszenzmikroskop das durch Rab5^{S34N} entstandene kleinfleckige endozytotische Verteilungsprofil ohne Hinweise auf eine Interaktion mit NEMO-WT erkennbar (Daten nicht gezeigt).

Um den Einfluss der Expression der Rab5-Mutanten auf die NF-κB-Aktivität zu untersuchen, wurden HEK293-KΣ2-Zellen mit NEMO-WT-RFP und Rab5^{Q79L}-GFP bzw. NEMO-WT-GFP und DSRed-Rab5^{S34N} co-transfiziert und anschließend die Luciferaseaktivität der HEK293-KΣ2-Zellen mit und ohne TNF- α Stimulation (1 ng/ml für 24 h) untersucht. In Abbildung 14 ist die Änderung der Luciferaseaktivität der unterschiedlich transfizierten Zellen mit und ohne TNF- α Stimulation dargestellt. Bei der Expression der Rab5-Mutante Rab5^{Q79L} kam es nach TNF- α -Stimulation im Vergleich zur Rab5-WT Kontrolle zu einer signifikant, um 61 % verminderten Luciferaseaktivität. Bei Transfektion der Rab5^{S34N}-Mutante kam es nach TNF- α Stimulation zu einer signifikanten Reduktion der Luciferaseaktivität um 72% im Vergleich zur Rab5-WT Kontrollprobe. Die Luciferaseaktivität nahm bei der Co-Transfektion von HEK293-KΣ2-Zellen mit NEMO-WT und Rab5^{Q79L} bzw. Rab5^{S34N} im Vergleich zur Co-Transfektion mit NEMO-WT und Rab5^{Q79L} bzw. Rab5^{S34N} im Vergleich zur Co-Transfektion mit NEMO-WT und Rab5^{Q79L} bzw. Rab5^{S34N} im Vergleich zur Co-Transfektion mit NEMO-WT ab (Abbildung 14). Da die Luciferaseaktivität ein Maß für die NF- κ B-Aktivität ist, zeigt die mittels der untersuchten Rab5 Mutanten verminderte Luciferaseaktivität der Untersuchten Rab5 Mutanten verminderte



Abbildung 14. Einfluss der Rab5-Mutanten auf die NF-kB-Aktivität. Messung der Luciferaseaktivität als Maß für die NF-ĸB-HEK293-KΣ2-Zellen Aktivität in nach erfolgreicher Reporterkonstrukttransfektion. Die Zellen wurden mit NEMO und Rab5 Mutanten co-transfiziert. Rab5^{Q79L}-GFP, sowie DSRed-Rab5^{S34N} wurden mit NEMO-WT-RFP bzw. NEMO-WT-GFP in HEK293-KΣ2-Zellen co-transfiziert. Als Kontrolle wurden HEK293-KΣ2-Zellen mit NEMO-WT-GFP und Rab5-WT-RFP co-transfiziert. Anschließend wurde die eine Hälfte der Zellen mit TNF- α (1 ng/ml) für 24 h stimuliert. Die Aktivität von NF-ĸB wurde durch Messen der Luciferaseaktivität quantifiziert. Die Ergebnisse werden als Vielfaches der Luciferaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ausgedrückt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von drei Experimenten dar. * bedeutet, dass eine signifikante Reduktion vorliegt.

3.5 Einfluss von Vps4 auf die Expression von NEMO und die NF-κB-Aktivität

Bisher konnte festgestellt werden, dass die Phosphorylierung von NEMO durch GSK-3β an den Serinresten S8, S17, S31 wichtig für die NF-κB-Aktivität ist. Durch die STED-51 Mikroskopie und FLIM-FRET-Analysen fand sich eine Co-Lokalisation und Interaktion von NEMO und GSK-3 β in fleckenförmigen Strukturen. Durch die Inhibierung der vakuolären H⁺-ATPase durch Bafilomycin konnte bestätigt werden, dass vakuoläre Strukturen wichtig sowohl für NEMO als auch für die NF- κ B-Aktivität waren. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion mit dem Iysosomalen Marker LAMP1, sowie dem Autophagiemarker LC3 und NEMO nicht stattfindet. Durch die Untersuchungen mit Rab5-Mutanten als Marker für defekte frühe Endosomen konnte dargestellt werden, dass die Anwendung der Rab5-Mutanten die NF- κ B-Aktivität negativ beeinflusst. Zur Überprüfung, ob eine Interaktion von NEMO und GSK-3 β innerhalb von MVB stattfindet, wurde *Vacuolar protein sorting-associated protein 4* (Vps4) als Bestandteil der MVB-Biogenese näher untersucht.

3.5.1 Auswirkungen des Vps4 knockdowns auf NEMO und die NF-κB-Aktivität

HEK293-Zellen wurden mit NEMO-WT-GFP und verschiedenen siRNA-Varianten von Vps4A co-transfiziert und die Hälfte der Proben mit TNF- α stimuliert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western Blot mit Antikörpern gegen NEMO, Vps4A und β-Aktin als Ladekontrolle untersucht. In Abbildung 15 ist ein Western Blot abgebildet, bei dem eine siRNA-Kontrolle (GL3) und Zelllysate mit von Vps4A-siRNA-Varianten behandelten HEK293-Zellen aufgetragen wurden. Ein signifikanter knockdown von Vps4 konnte mit keiner der beiden untersuchten siRNAs und auch nicht mit der Kombination beider erzielt werden. Tendenziell ließ sich eine verminderte Expression bei Vps4A1 und Vps4A1/A2 erkennen. Eine signifikante Reduktion der Proteinexpression von NEMO konnte jedoch durch den Einsatz der Vps4A1-siRNA und der Vps4A1/A2-siRNA erreicht werden. Die TNF-α-Stimulation hatte keinen Einfluss. Die Anwendung der siRNAs von Vps4A1 und Vps4A1/A2 reduzierte die Expression von NEMO.



Abbildung 15. Einfluss der Vps4AsiRNA-Varianten auf NEMO. In HEK293-Zellen wurden verschiedene Vps4A-siRNA-Varianten bzw. GL3 als siRNA-Kontrollprobe mit NEMO-WTco-transfiziert. Anschließend GFP wurden die Zellen mit TNF- α (5 ng/ml) für 4 h stimuliert. Die Zelllysate SDS-PAGE wurden mittels aufgetrennt und im Western Blot auf NEMO, Vps4A und β-Aktin diente untersucht. β-Aktin als Ladekontrolle.

Als nächsten Schritt sollte die Bedeutung von Vps4 auf die NF-κB-Aktivität ermittelt werden. Zunächst wurden HEK293-KΣ2-Zellen nach erfolgreicher Reporterkonstrukttransfektion mit NEMO-WT und den siRNAs der Vps4A-Proteine (Vps4A1+Vps4A2) bzw. der Vps4B-Proteine (Vps4B1+B2) und GL2 als siRNA-Kontrolle co-transfiziert. Anschließend wurde die

Ergebnisse

Hälfte der Proben mit TNF- α (1 ng/ml) für 24h stimuliert und die Luciferaseaktivität als Maß für die NF- κ B-Aktivität gemessen. Es ließ sich eine Reduktion der Luciferaseaktivität bei der Transfektion der siRNA-Varianten Vps4A1+A2 um 3% im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Bei der Expression der siRNA-Varianten von Vps4B (Vps4B1+B2) konnte keine Reduktion festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Da jedoch eine – wenn auch nicht signifikante – Verminderung der Luciferaseaktivität bei den siRNA-Varianten Vps4A1+A2 festzustellen war, wurden diese einzeln in HEK293-K Σ 2-Zellen mit NEMO-WT co-transfiziert. Die Hälfte der transfizierten Proben wurden mit TNF- α stimuliert und anschließend die Luciferaseaktivität gemessen. Es zeigte sich nach der TNF- α -Stimulation eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität um 45% bei Transfektion der Zellen mit der Vps4A1-siRNA im Vergleich zur siRNA Kontrolle GL2. Eine Erhöhung gab es hingegen bei der Verwendung der siRNA von Vps4A2 um 18%, welche ebenfalls signifikant war (Abbildung 16).



Abbildung 16. Einfluss der Vps4 siRNA-Varianten auf die NF-kB-Aktivität. HEK293-KΣ2-Zellen wurden mit zwei verschiedenen siRNA-Varianten von Vps4 (Vps4A1 und Vps4A2) zweimal innerhalb von 48 h transfiziert und die eine Hälfte mit TNF- α (1 ng/ml) 24 h stimuliert. Schließlich für wurde die Luciferaseaktivität gemessen. Die Genexpressionsänderung von NFwurde durch Messen der κВ Luciferaseaktivität guantifiziert. Die Ergebnisse werden als vielfache Luciferaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ausgedrückt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von drei Experimenten dar. bedeutet, dass eine signifikante Reduktion vorliegt.

Die mit Vps4A1-siRNA behandelten HEK293-K Σ 2-Zellen zeigten (vgl. Abbildung 16) einen negativen Einfluss auf die Luciferaseaktivität. In Abbildung 17 ist ein Western Blot von HEK293-Zellen zu sehen, welche mit NEMO-WT-GFP und der Vps4A1-siRNA bzw. der GL3-siRNA als Kontrolle co-transfiziert, lysiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Im Western Blot wurden die Proben auf IKK α , IKK β , IkB α , GSK-3 β , NEMO, Vps4A, sowie β -Aktin als Ladekontrolle untersucht. Es konnte ein signifikanter *knockdown* von Vps4A detektiert werden. Ferner konnte wie bereits in Abbildung 15 eine signifikante Reduktion von NEMO bei der Transfektion mit der Vps4A1-siRNA festgestellt werden. Eine signifikante Änderung der Expression der anderen untersuchten Komponenten des NF- κ B-Signalwegs (IKK α , IKK β und I κ B α) oder bei GSK-3 β konnte bei den mit der Vps4A1-siRNA transfizierten HEK293-Zellen nicht detektiert werden. Durch die Stimulation mit TNF- α ließen sich keine

Veränderungen nachweisen (Abbildung 17). Durch den *knockdown* von Vps4A1 wurde die Expression von NEMO, jedoch nicht GSK-3β oder die übrigen Komponenten des NF-κB-Signalwegs reduziert.



Abbildung 17. Einfluss von siRNA Vps4A1 auf NEMO und verschiedene Komponenten des NF- κ B-Signalwegs. HEK293-Zellen wurden mit NEMO-WT-GFP, sowie mit siRNA Vps4A1 (siVps4A1) bzw. mit siRNA GL3 als Kontrolle co-transfiziert. Die Zellen wurden anschließend für 12 h mit TNF- α (1 ng/ml) stimuliert. Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern für IKK α , IKK β , IkB α , GSK-3 β , NEMO, Vps4A und β -Aktin untersucht. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

3.5.2 Einfluss der Mutante Vps4E233Q auf die Lokalisation und Expression von NEMO und die NF-κB-Aktivität

Vps4^{E233Q} ist eine Vps4 Mutante mit defekter ATP-Hydrolyse, bei deren Expression man fluoreszenzmikroskopisch vergrößerte endosomale Strukturen beobachtet (Babst et al. 1998). In den hier gezeigten Versuchen wurde der Einfluss dieser Mutante auf die Lokalisation und Expression von NEMO, sowie die Bedeutung für NF-κB-Aktivität untersucht. In Abbildung 18 A und im Film (30-minütige Sequenz, siehe "Vps4-WT" auf beiliegender CD) sieht man fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer HEK293-Zelle im *live cell imaging*, welche mit NEMO-WT-RFP und Vps4-WT-GFP co-transfiziert wurde. Es ließ sich eine Co-Lokalisation der rot-fluoreszierenden NEMO-WT-Proteine mit den grün-fluoreszierenden Vps4-WT-Proteinen in vakuolären Strukturen nachweisen. Der gleiche Versuch wurde mit NEMO-WT-RFP und Vps4^{E233Q}-GFP durchgeführt. Abbildung 18 B zeigt zum einen die für die Vps4^{E233Q}-Mutante (grün markiertes Protein) typischen vergrößerten endosomalen Strukturen und zum anderen die Lokalisation von NEMO (rot markiertes Protein) vor allem innerhalb der durch die Vps4^{E233Q}-Mutante hervorgerufenen vakuolären Strukturen. Farblich ist die Überlagerung der grünen Fluoreszenz von Vps4^{E233Q} und der roten Fluoreszenz von NEMO gelb dargestellt. Bei der Beobachtung über 24 Min verbleibt NEMO in den vakuolären

Strukturen (siehe "Vps4^{E233Q}" auf beiliegender CD). Dies lässt auf eine Interaktion zwischen NEMO und Vps4 schließen. NEMO verbleibt in den durch Vps4^{E233Q} vergrößerten vakuolären Strukturen.



Abbildung 18. Intrazelluläre Verteilung von NEMO bei Vps4-WT und Vps4^{E233Q}. (A) HEK293-Zellen wurden mit NEMO-RFP-WT und Vps4-WT-GFP co-transfiziert und mittels *live cell imaging* über 30 min beobachtet. (B) HEK293-Zellen wurden mit NEMO-RFP-WT und Vps4^{E233Q}–GFP co-transfiziert und über 24 min mittels *live cell imaging* beobachtet. Die 5 μm (A) und 10 μm (B) Balken dienen als Größenmaßstäbe. Nach Vorbereitung des Experiments wurden die Bilder von Dr. Werner Zuschratter (Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg) erstellt.

Zur weiteren Untersuchung wurden HEK293-Zellen mit NEMO-WT-RFP und Vps4-WT-GFP, Vps4^{E233Q}-GFP bzw. GFP-leer co-transfiziert. Die Hälfte der Proben wurde mit TNF-α stimuliert. Nach der Zelllyse wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die NEMO-Proteinexpression (β-Aktin als Ladekontrolle) im Western Blot untersucht. Es zeigte sich eine erhöhte Expression von NEMO bei der Transfektion mit Vps4^{E233Q} und NEMO-WT im Vergleich zur Kontrolle (GFP-leer). Durch die Stimulation mit TNF-α ließen sich keine Veränderungen nachweisen (Abbildung 19).



Abbildung 19. Einfluss von Vps4^{E233Q} auf NEMO. HEK 293-Zellen wurden mit NEMO-WT-RFP und Vps4 WT-GFP bzw. Vps4^{E233Q}-GFP und GFP-leer (Kontrolle) co-transfiziert und mit TNF- α (2 ng/ml) für 1 h stimuliert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern für NEMO und β -Aktin untersucht. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. **x** markiert endogenes NEMO.

Als nächstes wurde untersucht, welche Auswirkungen Vps4-WT bzw. Vps4^{E233Q} auf den Transport von NEMO vom Zytoplasma in den Nukleus hat. Dazu wurden HEK293-Zellen mit NEMO-WT-RFP und Vps4-WT-GFP bzw. Vps4^{E233Q}-GFP co-transfiziert und die Zelllysate in

eine Zytoplasma- und eine Nukleusfraktion separiert (gemäß 2.5.2). Anschließend wurden die Zelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinexpression in den beiden Zellkompartimenten von NEMO, GSK-3, Vps4, sowie β-Aktin als Ladekontrolle mittels Western Blot untersucht. Durch die Transfektion der Zellen mit der Vps4-Mutante Vps4^{E233Q} kam es zu einer Hochregulation der Proteinexpression von NEMO. Zellen, in denen Vps4-WT exprimiert wurde, wiesen mehr NEMO in der Zytoplasmafraktion als in der Nukleusfraktion auf, während Zellen, in denen Vps4^{E233Q} exprimiert wurde mehr NEMO in der Sytoplasmafraktion als in der Nukleusfraktion als in der Zytoplasmafraktion auf und Zytoplasmafraktion aufwiesen. Die GSK-3β Expression war, sowohl bei Vps4-WT als auch bei Vps4^{E233Q} im Nukleus signifikant höher als im Zytoplasma. Die untersuchten Proteine zeigten nach Stimulation der transfizierten Zellen mit TNF-α keine Unterschiede im Vergleich zu den Proben ohne Stimulation (Abbildung 20).



Abbildung 20. Einfluss von Vps4^{E233Q} auf die subzelluläre Verteilung von NEMO. HEK293-Zellen wurden mit NEMO-WT-RFP, Vps4-WT-GFP Vps4^{E233Q}–GFP bzw. COtransfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48h wurden die Zellen mit TNF-a (20 ng/ml) für 1 h stimuliert und anschließend in einen zytoplasmatischen (C) und einen nukleären (N) Anteil fraktioniert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf die Expression von NEMO, GSK-3β, Vps4 und βuntersucht. Als Aktin Ladekontrolle diente β-Aktin. **x** markiert endogenes NEMO.

Um den Einfluss von Vps4 auf die NF-κB-Aktivität zu untersuchen, wurde die Luciferaseaktivität als Maß der NF-κB-Aktivität gemessen. Hierfür wurden HEK293-KΣ2-Zellen nach erfolgreicher Reporterkonstruktiontransfektion mit NEMO-WT und Vps4-WT bzw. Vps4^{E233Q} co-transfiziert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit TNF-α (5 ng/ml) für 3 h und die Luciferaseaktivitätsmessung. Eine signifikante Steigerung der Luciferaseaktivität zeigte sich bei der Transfektion von Vps4^{E233Q} um 23% im Vergleich zur Transfektion mit Vps4-WT (Abbildung 21). Durch die veränderten strukturellen Eigenschaften von Vps4^{E233Q} kam es zu einer erhöhten NF-κB-Aktivität im Vergleich zum Vps4-WT.



Abbildung 21. Einfluss von Vps4^{E233Q} auf die NF-κB-Aktivität. HEK293-KΣ2-Zellen wurden mit NEMO-WT-RFP und mit Vps4-WT-GFP bzw. Vps4^{E233Q}-GFP cotransfiziert. Anschließend wurden die Proben mit TNF-a (5 ng/ml) für h stimuliert und die 3 Luciferaseaktivität gemessen. Die Genexpressionsänderung von NF- κB wurde durch Messen der Luciferaseaktivität quantifiziert. Die Ergebnisse werden als Vielfache Luciferaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle Die Fehlerbalken ausgedrückt. stellen die Standardabweichung von drei Experimenten dar. bedeutet, dass eine signifikante Erhöhung vorliegt.

3.6 Interaktion: GSK-3β, NEMO, MVB

In 3.1 konnte gezeigt werden, dass NEMO und GSK-3 β in Flecken co-lokalisiert sind, interagieren und so Einfluss auf die NF- κ B-Aktivität nehmen. In 3.2 und 3.3 ließ sich die Bedeutung von vakuolären Strukturen (außer Lysosomen) für NEMO und die NF- κ B-Aktivität feststellen. Um zu zeigen, dass es sich bei diesen Strukturen um MVB handeln könnte, wurde zum einen Rab5 als Marker für frühe Endosomen und das Protein Vps4, welches am letzten Schritt der MVB-Biogenese beteiligt ist, näher untersucht. Vergrößerte endosomale Strukturen hervorgerufen durch Vps4^{E233Q} führten zu einer erhöhten NEMO-Expression und erhöhten NF- κ B-Aktivität. In den folgenden Experimenten soll untersucht werden, wo es zu einer Interaktion von GSK-3 β und NEMO kommt.

HEK293-Zellen wurden mit dem GSK-3β-Inhibitor SB216763 inkubiert und anschließend mit TNF-α stimuliert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-Elektrophorese aufgetrennt und die Proteinexpression von NEMO, GSK-3β, sowie β-Aktin als Ladekontrolle anschließend im Western Blot untersucht (Abbildung 22). Durch die Behandlung mit dem GSK-3β-Inhibitor SB216763 wird die Expression von NEMO bei der Transfektion von Vps4-WT signifikant reduziert. Bei Transfektion von Vps4^{E233Q} konnte bei der Inkubation der Zellen mit dem GSK-3β-Inhibitor Sβ-Inhibitor ebenfalls eine Expressionsreduktion von NEMO, jedoch nicht von GSK-3β festgestellt werden. Die Stimulation mit TNF-α zeigte im Western Blot keinen Einfluss.



Abbildung 22. Einfluss des GSK-3β-Inhibitors SB216763 auf die Proteinexpression von NEMO bei gleichzeitiger Expression von Vps4-WT bzw. Vps4^{E233Q}. HEK293-Zellen wurden mit NEMO-WT-RFP, sowie mit Vps4-WT-GFP bzw. Vps4^{E233Q}-GFP co-transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 48 h mit dem GSK-3 Inhibitor SB216763 (1 µM) inkubiert. Die so behandelten Zellen wurden anschließend für 1 h mit TNF-α (20 ng/ml) Die stimuliert. Zelllysate wurden dann im Western Blot auf NEMO, GSK-3β und β-Aktin untersucht. Als Ladekontrolle diente β-Aktin.

Um die direkte Interaktion des phosphorylierbaren NEMO und Vps4 zu veranschaulichen, wurden Zelllysate von HEK293-Zellen, welche mit NEMO-WT-GFP bzw. der Dreifachmutante NEMO-S8,17,31A-GFP und Vps4-GFP co-transfiziert worden waren, gemäß der Beschreibung in Kapitel 2.5.7 mit Anti-GFP immunopräzipitiert und die Zelllysate proteinchemisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot wurden die Proben mit Antikörpern für NEMO und Vps4 untersucht. Es zeigte sich, dass es bei der Transfektion mit NEMO-S8,17,31A zu keiner Interaktion mit Vps4 kommt. NEMO-WT diente im Western Blot als Kontrolle der erfolgreichen Immunopräzipitation. Die Stimulation mit TNF-α zeigte proteinbiochemisch keine Auswirkungen (Abbildung 23).



Abbildung 23. NEMO-S8,17,31A beeinflusst Vps4. HEK293-Zellen wurden mit NEMO-WT bzw. NEMO-S8,17,31A transfiziert und mit TNF- α (20 ng/ml) für 30 min stimuliert. Die Zelllysate wurden immunopräzipitiert, anschließend das Eluat mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit NEMO und Vps4 Antikörpern untersucht. NEMO diente als Kontrolle der Immunopräzipitation.

4 Diskussion

4.1 GSK-3β kontrolliert die NF-κB-Aktivität über NEMO

Eine Regulation des NF- κ B-Systems durch GSK-3 β war bisher nicht bekannt. Zwar legten verschiedene frühere Studien einen Zusammenhang zwischen GSK-3 β , NEMO und NF- κ B nahe. Beispielsweise präsentieren sich ähnliche Phänotypen bei GSK-3-*knockout*-Mäusen (Hoeflich et al. 2000), Mäusen mit fehlender NF- κ B-Aktivierung (Beg et al. 1995; Li et al. 1999) und NEMO-*knockout*-Mäusen (Rudolph et al. 2000). Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die GSK-3 β über die direkte Interaktion mit NEMO Einfluss auf die NF- κ B-Aktivität nehmen kann.

NEMO als essentielle Komponente des IKK-Komplexes (Rothwarf et al. 1998) wird im NF- κ B-Signalweg über verschiedene Signale bspw. Phosphorylierung beeinflusst (Shifera 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte NEMO zunächst als Substrat der GSK-3 β ermittelt werden, wobei es zu einer dosis- und zeitabhängigen Phosphorylierung kommt (Abbildung 4). Es blieb jedoch festzustellen, an welchen Stellen NEMO durch GSK-3 β phosphoryliert wird.

Bekannt ist, dass viele Substrate der GSK-3β ein "priming phosphate" (Serin/Threoninhaben. welches Aminosäure C-terminal Reste) an der vierten von der Phosphorylierungsstelle (N+4) lokalisiert ist (Frame und Cohen 2001; Doble und Woodgett 2003). Als Substraterkennungssequenz, welche durch die GSK-3β phosphoryliert wird, dient S/T-Xaa-Xaa-Xaa-PS/PT, wobei PS/PT vorphosphorylierte Aminosäuren und Xaa eine beliebige Aminosäure darstellen. Diese Seguenz wurde in mehreren Substraten der GSK-38 gefunden. Die vorphosphorylierten Aminosäuresequenzen sind in vivo permanent phosphoryliert (Frame und Cohen 2001). Weitere Studien zeigten, dass diese vorphosphorylierten Phosphate als Primer nicht benötigt werden, beispielsweise wenn Serinoder Threonin-Aminosäurereste von Prolinresten umgeben sind oder wenn GSK-3ß mit seinen Substraten Komplexe bildet (Jope und Johnson 2004). In der Aminosäuresequenz von NEMO befindet sich an den Serinreste S17, S31 und S43 ein benachbarter Prolinrest (Abbildung 24). Diese Serinreste stellen somit potentielle Phosphorylierungsstellen von GSK-3β dar.



Abbildung 24. Aminosäuresequenz von NEMO mit GSK-3β-Phosphorylierungsstellen. Darstellung der Aminosäuresequenz des N-Terminus von NEMO (AS 1-50). GSK-3 phosphoryliert NEMO an Serin-Aminosäurereste ("S" rot markiert); Prolin-Reste ("P" grün markiert).

Dass es sich bei diesen Serinresten tatsächlich um Phosphorylierungsstellen von GSK-3 β handelt, konnte in der Arbeitsgruppe auf Grundlage von Phosphopeptid-Mapping Experimenten (Carter et al. 2003) sowie mit Hilfe von GST-*pull-down assays* nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den Serinresten S17, S31 und S43 hat sich S8 als Phosphorylierungsstelle der GSK-3 β herausgestellt. Die Phosphorylierung von NEMO an S8 wurde durch die Arbeitsgruppe zum ersten Mal beschrieben und bedarf weiterer Untersuchungen.

Daneben wurden in der Arbeitsgruppe NEMO-Mutanten hergestellt, bei denen die Serinreste durch Alanin ersetzt wurden (NEMO-S8A, -S17A, -S31A, und -S43A). Hierauf aufbauend konnte im Rahmen der vorliegenden Untersuchung mit Hilfe von *in vitro*-Kinaseassays (vgl. Kapitel 3.1.2) gezeigt werden, dass die GSK-3β vermittelten Phosphorylierungen der Mutanten NEMO-S17A und NEMO-S31A im Vergleich zum NEMO-WT reduziert waren. Hingegen war die Phosphorylierung von NEMO-S8A durch GSK-3β stärker als die des NEMO-WTs. NEMO-S43A und die Doppelmutante NEMO-S8,43A wurden ähnlich dem NEMO-WT phosphoryliert (Abbildung 5).

Es lässt sich daraus schließen, dass durch die verhinderte Bindung von GSK-3β die Phosphorylierung von NEMO unterbunden wird. Dabei sind S17 und S31 für die GSK-3βvermittelte Phosphorylierung von NEMO von besonderer Bedeutung. Betrachtet man die Phosphorylierung über die Zeit, so lässt sich im *in vitro*-Kinaseassay feststellen, dass GSK-3β alle vier Serinreste über die Zeit phosphoryliert (vgl. Abbildung 6 A). Wird die GSK-3β-Aktivität durch einen Inhibitor geblockt, ist die Phosphorylierung aller untersuchten Serinreste vermindert oder gänzlich verhindert (vgl. Abbildung 6 B). Zusammenfassend ist die kontinuierliche Phosphorylierung von NEMO durch GSK-3β für dessen Stabilisierung notwendig. Dies deckt sich mit früheren Studien, wonach GSK-3β ihre Substratproteine entweder stabilisiert oder destabilisiert. Beispielsweise führt die Phosphorylierung von *notch* vermittelten Signalwegen durch GSK-3β zu einer Stabilisierung (Foltz et al. 2002), während im Wnt-Signalwegs die Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK-3 β zu einer Degradierung von β -Catenin führt (Taelman et al. 2010).

Den Effekt der Mutation der GSK-3 β -Phosphorylierungsstellen in NEMO auf die NF- κ B-Aktivität wurde durch Luciferaseassays ermittelt (vgl. 3.1.3). Dort fand sich lediglich bei NEMO-S31A und bei der Dreifachmutante NEMO-S8,17,31A eine signifikante Reduktion der NF- κ B-Aktivität. Die Mutation von S43 in NEMO hatte keine Effekte auf die NF- κ B-Aktivität (vgl. Abbildung 6 C). Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass der GSK-3 β -vermittelte Phosphorylierungsstatus von NEMO die NF- κ B-Aktivität bestimmt.

In Abbildung 6 B ist ein Western Blot dargestellt, in welchem bei NEMO eine zusätzliche Bande zwischen 37 und 50 kDa festgestellt werden konnte. Die Bande konnte ebenfalls in anderen Versuchen (vgl. Abbildung 11, Abbildung 19, Abbildung 20, Abbildung 22) gefunden werden und wurde hier exemplarisch herausgegriffen. Dabei handelt es sich um endogenes NEMO.

Bei der Transfektion der Mutante NEMO-S8,17,31A wurde die NF- κ B-Aktivität am meisten reduziert. In Co-Immunopräzipitationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Mutation der GSK-3 β -Phosphorylierungsstellen in NEMO eine Bindung der GSK-3 β an NEMO verhindert. GFP ließ sich lediglich in den Proben nachweisen, in denen GFP-leer transfiziert worden war, was als Maß der erfolgreichen Co-Immunopräzipitation galt (vgl. Abbildung 7). Durch die Mutation der Phosphorylierungsstellen von GSK-3 β können NEMO und GSK-3 β nicht mehr interagieren. IKK α und IKK β werden durch die NEMO-Mutante nicht beeinflusst. Letzteres deckt sich mit früheren Experimenten, dass bei Funktionsverlust von GSK-3 β die frühen Schritte der NF- κ B-Aktivierung nicht beeinflusst werden (Hoeflich et al. 2000). Die Bildung von Homodimeren ist verglichen zum NEMO-WT bei NEMO-S8,17,31A vermindert (vgl. Abbildung 7). Trotz der Mutation der Phosphorylierungsstellen ist NEMO noch in der Lage Dimere zu bilden. Dies schließt die Wahrscheinlichkeit aus, dass eine fehlende Dimerisation durch die Mutante für eine reduzierte NF- κ B-Aktivität verantwortlich ist.

Die NF- κ B-Aktivität wird neben Phosphorylierungen auch durch Dephosphorylierungen und die Balance zwischen Kinasen und Phosphatasen reguliert. Beispielsweise werden durch die Proteinphosphatase 2A (PP2A) Untereinheiten von NF- κ B dephosphoryliert (Yang et al. 2001). Des Weiteren kann PP2A eine inhibierende Phosphorylierung an S68 von NEMO entfernen (Palkowitsch et al. 2008). Weitere Experimente könnten in der Ermittlung einer Phosphatase, welche NEMO an den GSK-3 β -Phosphorylierungsstellen S8, S17, S31 und S43 dephosphoryliert, bestehen. Obwohl mehrere massenspektrometrische Untersuchungen

mit NEMO-WT innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, konnte bisher keine Phosphatase, die NEMO an den entsprechenden Stellen dephosphoryliert, entdeckt werden.

4.2 Interaktion und Co-Lokalisation von GSK-3β und NEMO

Während NEMO-WT-GFP in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen als multiple zytoplasmatische Flecken auftritt (Iha et al. 2003), lässt sich durch die Expression der Mutante NEMO-S8,17,31A feststellen, dass sich die Anzahl der fluoreszierenden Flecken zu einer dispersen über das Zytoplasma verteilte Fluoreszenz reduziert (Abbildung 8). Ferner kann durch eine Co-Transfektion von NEMO-WT mit GSK-3β-WT die fleckenförmige Fluoreszenz von NEMO erhöht werden. Daraus lässt sich schließen, dass GSK-3β für die Anordnung von NEMO in Flecken benötigt wird.

Durch die Analyse mittels STED-Mikroskopie konnte eine Co-lokalisation von endogenem GSK-3β und endogenem NEMO innerhalb der Flecken festgestellt werden (vgl. Abbildung 9). Mittels der FLIM-FRET-Analyse (vgl. Abbildung 10) konnte gezeigt werden, dass es zu einem Energietransfer von GSK-3β auf NEMO kommt. Somit konnte demonstriert werden, dass GSK-3β und NEMO in den Flecken co-lokalisiert sind und miteinander interagieren.

4.3 Bedeutung der MVB für NEMO, GSK-3β und die NF-κB-Aktivität

4.3.1 Inhibierung der Reifung von vakuolären Strukturen nimmt Einfluss auf die NEMO-GSK-3β-Interaktion und die NF-κB-Aktivität

Die STED- und FLIM-FRET-Untersuchungen ergaben, dass NEMO und GSK-3β in Flecken co-lokalisiert sind und dass es in den Flecken zu einer Interaktion zwischen NEMO und GSK-3β kommt. Dass es sich bei den Flecken um vakuoläre Strukturen handelt, wurde mit Hilfe von Bafilomycin geklärt. Durch Bafilomycin wird die vakuoläre H⁺-ATPase inhibiert, was die intraluminale Ansäuerung von Organellen wie Lysosomen, Autophagosomen und Endosomen bewirkt (Yamamoto et al. 1998, Klionsky et al. 2014, Klionsky et al. 2016). Durch die Inhibierung der vakuolären H⁺-ATPase kann ebenfalls Einfluss auf den Ladungstransfer zu den MVB genommen werden (Bayer et al. 1998; Huotari und Helenius 2011).

Nach Behandlung der Zellen mit Bafilomycin zeigte sich, dass weniger NEMO, sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus festzustellen war. Die reduzierte NF-κB-Aktivität bei Anwendung von Bafilomycin ist mutmaßlich durch die verminderte Menge an NEMO zu

erklären (Abbildung 11). Daraus lässt sich schließen, dass vakuoläre Strukturen wie Endosomen, Lysosomen oder Autophagosomen wichtig sowohl für das zytoplasmatische als auch das nukleäre NEMO und somit für die NF-κB-Aktivität sind.

4.3.2 NEMO ist in frühen Endosomen feststellbar

Die Flecken, in denen NEMO feststellbar ist, haben sich als Endosomen, nicht aber als Lysosomen oder Autophagosomen herausgestellt. Um zu prüfen, ob es sich bei den Flecken um Lysosomen handelt, wurde der lysosomale Marker LAMP1 verwendet. Fluoreszenzmikroskopisch ließ sich keine Co-Lokalisation von NEMO und LAMP1 feststellen (Abbildung 12). Eine Lokalisation von NEMO in Autophagosomen, wie beispielsweise durch das virale M45 Protein vermittelt (Fliss et al. 2012), konnte in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit NEMO und dem Autophagiemarker LC3 ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei den vakuolären Strukturen, in denen NEMO in Flecken lokalisiert ist, handelt es sich demnach weder um Lysosomen noch um Autophagosomen.

Für die Untersuchung, ob es sich um Endosomen handelt, wurde zunächst Rab5 als Marker für frühe Endosomen (Woodman 2000) verwendet. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten eine Co-Lokalisation von NEMO und Rab5 (Abbildung 13). Dies deutet darauf hin, dass die frühen Endosomen bzw. die endosomale Fusion für NEMO wichtig sind.

Die durch die Rab5-Mutationen hervorgerufenen strukturellen Veränderungen konnten in fluoreszenzmikroskopischen Versuchen in HEK293-Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt frühere Untersuchungen. So wurde bereits in Baby Hamster *Kidney* (BHK)- und Henrietta Lacks (HeLa)-Zellen, welche mit mutiertem Rab5^{Q79L} transfiziert worden waren, eine Bildung von vergrößerten frühen endozytotischen Strukturen nachgewiesen, während sich bei der Transfektion mit mutiertem Rab5^{S34N} ein klein-fleckiges endozytotisches Verteilungsprofil zeigt (Stenmark et al. 1994). Durch die strukturellen Veränderungen können keine weiteren endosomalen Fusionen durchgeführt werden (Stenmark et al. 1994). Die NF-κB-Aktivität wird durch die Transfektion mit den Rab5-Mutanten vermindert (Abbildung 14). Daraus lässt sich schließen, dass eine strukturelle und damit funktionelle Veränderung der frühen Endosomen einen Einfluss auf die NF-kB-Aktivität hat. Es liegt die Vermutung nahe, dass es durch fehlende Interaktion von NEMO – als essentieller Modulator der NF-κB-Aktivität – mit den frühen Endosomen zu einer Reduktion der NF-κB-Aktivität kommt. Als weiterführende Experimente könnten neben den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen proteinbiochemische Untersuchungen angeschlossen werden. Dadurch könnte gezeigt werden, dass bei einer Co-Transfektion mit NEMO-WT und den Rab5-Mutanten weniger NEMO in den Zellen zu finden ist.

63

Neben Rab5 als Marker für frühe Endosomen gibt es Domänen für späte Endosomen wie Rab7 und Rab9 (Barbero et al. 2002). Während Rab7-positive späte Endosomen für die Degradation bestimmt sind (Rink et al. 2005), interagieren Rab9-positive späte Endosomen mit dem *trans*-Golgi-Netzwerk (Stenmark 2009). Weitere Experimente mit NEMO und bspw. Rab7 und Rab9 könnten Aufschlüsse über den intrazellulären Transport von NEMO geben.

4.3.3 MVB spielen eine wichtige Rolle für NEMO und die NF-κB-Aktivität

Hinweise, dass es sich bei den Flecken, in denen GSK-3 β und NEMO co-lokalisiert sind und dort interagieren, um MVB handelt, ergaben sich durch die Untersuchungen in 3.2 und 3.4. Durch die Inkubation mit Bafilomycin konnten eine verminderte NEMO-Expression und eine verminderte NF- κ B-Aktivität festgestellt werden. Neben dem Vorhandensein auf eine vakuoläre Struktur ist dies ebenfalls hinweisgebend auf die Existenz von MVB, da durch Bafilomycin ebenfalls die Reifung der frühen Endosomen zu späten Endosomen (wie MVB) blockiert wird (Baravalle et al. 2005; Huotari und Helenius 2011). In den Untersuchungen von Rab5 und NEMO konnte deren Co-Lokalisation und die Beeinflussung der NF- κ B-Aktivität durch strukturelle Veränderung der frühen Endosomen aufgezeigt werden. Rab5-positive frühe Endosomen gelten als Zugang in den MVB-Signalweg (Hurley und Odorizzi 2012), da durch Rab5 die endosomale Fusion gefördert wird (Woodman 2000). Des Weiteren ist von GSK-3 β bekannt, dass GSK-3 β bspw. im Wnt-Signalweg an die jeweiligen Substrate gebunden in MVB akkumuliert (Taelman et al. 2010).

Um den Einfluss von MVB auf die Interaktion von NEMO und GSK-3β, sowie die NF-κB-Aktivität zu überprüfen, wurde Vps4 näher untersucht. Vps4 liefert im letzten Schritt der MVB-Biogenese durch ATP-Hydrolyse die nötige Energie zum Abspalten des membrangebundenen ESCRT-III-Komplexes. Der ESCRT-Zyklus wird mit diesem Schritt vervollständigt (Hurley 2010). In der zu Abbildung 18 A gehörigen Videosequenz wird gezeigt, dass NEMO mit Vps4-WT rege interagiert. Um zu untersuchen, ob das Fehlen von Vps4 und demnach das Fehlen von MVB eine Auswirkung auf NEMO und die NF-kB-Aktivität hat, wurden knockdown Experimente mit siVps4 durchgeführt. Von Vps4 ist bekannt, dass in humanen Zellen zwei Varianten des Proteins exprimiert werden: Vps4-A und Vps4-B (Scheuring et al. 2001). Insbesondere Vps4A ist für die Dissoziation des ESCRT-III-Komplexes wichtig (Merrill und Hanson 2010). Die Transfektion mit den unterschiedlichen, gepoolten siRNA-Sequenzen von Vps4A zeigte, dass bei Transfektion mit siRNA Vps4A1 die Proteinexpression von NEMO (Abbildung 15) und die NF-kB-Aktivität (Abbildung 16) am stärksten vermindert wurden. Die Versuche mit Vps4B-siRNAs zeigten keine signifikanten Einflüsse auf NEMO oder die NF-κB-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Dass beim knockdown von Vps4A weniger NEMO zu finden ist, konnte in Abbildung 17 gezeigt werden. Andere Komponenten des NF- κ B-Signalwegs (IKK α , IKK β und I κ B α) sowie die GSK-3 β blieben vom Vps4A-*knockdown* unbeeinflusst. Die Interaktion von NEMO mit den MVB sind für NEMOs Stabilität und für die NF- κ B-Aktivität demnach wichtig. Dass die anderen Komponenten des NF- κ B-Signalwegs nicht durch den *knockdown* beeinflusst werden, zeugt davon, dass sich NEMO in den MVB nicht im IKK-Komplex befindet.

Vps4^{E233Q} ist eine Vps4 Mutante mit defekter ATP-Hydrolyse. Der ESCRT-III-Komplex kann nicht von der Membran des Vesikels abgespaltet werden, sodass intrazellulär große endosomale Strukturen gebildet werden und die Bildung von MVB verhindert wird. Bei der Expression von Vps4^{E233Q} entstehen vergrößerte endosomale Strukturen, in denen sich bestimmte Proteine vermehrt akkumulieren (Babst et al. 1998). In dieser Arbeit konnte mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen gezeigt werden, dass sich in diesen vergrößerten endosomalen Strukturen NEMO akkumuliert (vgl. Abbildung 18). Diese Akkumulation konnte im Western Blot durch eine erhöhte Expression von NEMO gezeigt werden (Abbildung 19).

In der subzellulären Fraktionierung von mit Vps4-WT und Vps4^{E233Q} transfizierten Zellen konnte festgestellt werden, dass sich in den mit Vps4^{E233Q} transfizierten Zellen sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma mehr NEMO befand als in den Zellen, welche mit Vps4-WT transfiziert worden waren (vgl. Abbildung 20). Dadurch, dass mehr NEMO im Zytoplasma zur Verfügung stand, zeigte sich nach TNF-α-Stimulation eine gesteigerte NF-κB-Aktivität in den mit Vps4^{E233Q} transfizierten Zellen (Abbildung 21). Dies ist damit zu erklären, dass durch die Akkumulation von NEMO in den durch Vps4^{E233Q} hervorgerufenen, vergrößerten endosomalen Strukturen mehr NEMO für den NF-kB-Signalweg zur Verfügung steht. In Abbildung 20 zeigt sich ebenfalls, dass sich bei Vps4-WT und Vps4^{E233Q} transfizierten Zellen mehr GSK-3β im Nukleus als im Zytoplasma befand. Von GSK-3β ist bekannt, dass sie vor allem im Zytoplasma jedoch auch im Nukleus und in Mitochondrien vorhanden ist (Bijur und Jope 2003). Die Translokation und spezifische zelluläre Lokalisation von GSK-3ß wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst: durch die Beteiligung von GSK-3ß an verschiedenen Signalwegen, durch die Interaktion von GSK-3β mit unterschiedlichen Substraten, durch die Teilnahme an der Bildung von Proteinkomplexen und durch die Beeinflussung der Transkription und Translation (Jope und Johnson 2004). Daraus lässt sich schließen, dass GSK-3β in beiden Ansätzen (Vps4-WT und Vps4^{E233Q}) gleichartig beeinflusst wird, sodass es zu einer Verlagerung vom Zytoplasma zum Nukleus kommt. Betrachtet man die Ansätze separat, so kann man feststellen, dass sich in den Vps4-WT transfizierten Zellen mehr NEMO im Zytoplasma als im Nukleus befand, während bei den Vps4^{E233Q} transfizierten Zellen mehr NEMO im Nukleus als im Zytoplasma vorkam. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass durch die Akkumulation von NEMO in den durch Vps4^{E233Q} entstandenen,

vergrößerten endosomalen Strukturen, weniger NEMO in den zytoplasmatischen Pool zurückbefördert werden konnte. Die MVB – als Signalplattform bzw. Zwischenstation (Williams und Urbé 2007, Hanson und Cashikar 2012) – standen nicht einwandfrei zur Verfügung. Betrachtet man die subzelluläre Verteilung von NEMO in den mit Bafilomycin behandelten Zellen, so lässt sich feststellen, dass dort insbesondere im Nukleus weniger NEMO vorhanden war (Abbildung 11). Durch die Abwesenheit der MVB fehlt deren Vermittlerrolle für den intrazellulären Transport von NEMO vom Zytoplasma zum Nukleus.

MVB spielen für den intrazellulären Transport von NEMO eine wichtige Rolle. Um den Transport von NEMO innerhalb der Zelle besser zu verstehen, wurden Versuche mit TandemEos-getagged-NEMO-Proteinen durchgeführt. Durch die Farbwechselfähigkeiten des photoaktivierbaren Fluoreszenzproteins TandemEos von Grün auf Rot (Photokonversion) nach Aktivierung mittels eines fokussierten UV-Lichtstrahls bei 390 nm (Wiedenmann und Nienhaus 2006) konnte der Transport von NEMO über einen Zeitraum von 20 min beobachtet werden. Mittels der Photokonversion ließ sich durch die Umverteilung der farblich umgeschalteten NEMO-Proteine eine rasante Dynamik des Proteinaustausches im Zytoplasma und Nukleus veranschaulichen (Daten nicht gezeigt). Zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit ist es noch nicht möglich, wie in McKinney et al. (2009), durch konfokale Mikroskopie einen fokussierten Strahl auf ein einzelnes NEMO-Molekül oder einen MVB zu beschränken. Mit dieser Technik wäre es möglich, den Transport von NEMO durch die Zelle besser nachzuvollziehen.

Ferner wären elektronenmikroskopische Aufnahmen von NEMO in den MVB zur Untermauerung von NEMOs Lokalisation wichtig. Entsprechende Experimente wurden in der Arbeitsgruppe bereits begonnen.

4.3.4 GSK-3β beeinflusst die NF-κB -Aktivität über NEMO und die MVB

In Kapitel 3.1. wurde der Einfluss von GSK-3β auf NEMO und die NF-κB-Aktivität untersucht. Ähnliche Resultate wie durch die Hemmung der GSK-3 durch Lithium in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten durch die Verwendung des GSK-3-Inhibitors SB216763 gezeigt werden. Die Blockierung der GSK-3β führte zu einer verminderten Expression von NEMO in Vps4-WT und Vps4^{E233Q} transfizierten Zellen. Die Expression von GSK-3β war nicht vermindert (Abbildung 22). Durch die Blockade von GSK-3β durch den Inhibitor SB216763 konnte NEMO sich nicht wie in den Experimenten in Kapitel 3.5.2. durch die Transfektion von Vps4^{E233Q} in den zytoplasmatischen Flecken akkumulieren. Ein Erklärungsansatz bietet Taelman et al. (2010), nach denen GSK-3β durch SB216763 inhibiert wird, kommt es nicht zur Bindung von GSK-3β und NEMO. Somit ist die Akkumulation in den MVB vermindert (Abbildung 22). Zur Bestätigung dieser Hypothese könnte man fluoreszenzmikroskopisch die Verteilung von NEMO in mit NEMO-WT und Vps4-WT bzw. Vps4^{E233Q} co-transfizierten Zellen, welche mit SB216763 behandelt wurden, untersuchen. Zu erwarten wäre, dass weniger NEMO innerhalb der MVB zu finden sein wird.

Einen Einfluss auf die Expression von GSK-3β und den *knockdown* von Vps4A konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 17). MVB sind demnach nicht für die GSK-3β essentiell, jedoch ist die Phosphorylierung von NEMO durch GSK-3β wichtig für die MVB-Bildung. Dies konnte mittels Immunopräzipitation gezeigt werden (vgl. Abbildung 23). Die Expression von NEMO-S8,17,31A präsentierte eine Verminderung der Bindung an Vps4A. Es besteht somit ein Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von NEMO durch GSK-3β und Vps4A und somit der MVB-Reifung. Fluoreszenzmikroskopisch ist dies in Abbildung 8 veranschaulicht, wo durch Transfektion von NEMO-S8,17,31A eine verminderte Intensität von NEMO in den Flecken innerhalb des Zytoplasmas zu sehen ist.

Aufgrund der Erkenntnisse, dass NEMO in frühen Endosomen und MVB lokalisiert ist, stellt sich die Frage, wie NEMO dort hineintransportiert wird. Festgestellt werden konnte, dass zwischen der Phosphorylierung von NEMO durch GSK-3β und Vps4A und somit der MVB-Reifung ein Zusammenhang besteht. Ein Erklärungsansatz (Abbildung 25) wäre ein vergleichbarer Mechanismus wie im Wnt-Signalweg, wo GSK-3 an die zytoplasmatische Seite des Wnt-Rezeptorkomplexes rekrutiert wird und dadurch LRP6 und andere Substrate wie DvI, APC, Axin und β-Catenin phosphoryliert werden und GSK-3 in MVB internalisiert wird (Taelman et al. 2010). In dem in dieser Arbeit dargestellten Fall wäre ebenfalls eine Rekrutierung von GSK-3β an einen Signalosomenkomplex denkbar. NEMO würde sich an GSK-36 binden und phosphoryliert werden, dann würde eine Internalisierung in MVB stattfinden. Dieser Vorgang wäre ähnlich zu der T-cell-receptor (TCR)-vermittelten NF-κB-Aktivierung. Dort bindet sich NEMO an der immunologischen Synapse an einen TCR-Signalosom-Komplex (Weil et al. 2003). Unklar bei einem Signalosomen-Modell ist das Signal, aufgrund dessen GSK-3 β an einen Signalosomenkomplex rekrutiert wird und sich anschließend NEMO daran bindet. TNF- α kommt dabei als Signal nicht in Frage, da bereits festgestellt werden konnte, dass die Interaktion von GSK-3ß und NEMO in den Flecken TNF- α unabhängig ist (siehe Kapitel 3.1.5).

Wie bereits in Kapitel 1.1 beschrieben, ist die Endothelaktivierung wichtig für die Entzündungsinitiation und –progression bei der Atherosklerose. Die Wege der endothelialen Aktivierung der akuten Entzündungsreaktion können auf zweierlei Weise beschrieben werden: Typ I (nicht-transkriptionelle Aktivierung) über Ligand-Rezeptor-Interaktion durch Wnt5a und Typ II (transkriptionelle Aktivierung) für die inflammatorische Genexpression (TNF- α , IL-1 β) (Pober und Sessa 2007; Kim et al. 2010). Es konnte festgestellt werden, dass

67

Wnt5a und TNF- α überlappend eine Reihe von nachgeschalteten Genen regulieren. Es scheint ein duales System zwischen dem β -Catenin-unabhängigen Wnt-Signalweg und dem TNF- α /IL-1 β -Signalweg für die endotheliale Aktivierung zu geben (Kim et al. 2010). Aufgrund dieses Zusammenhangs zwischen Wnt5a und TNF- α wäre Wnt5a als mögliches Signal zur Co-Lokalisation von GSK-3 β und NEMO in MVB denkbar. Dies bedarf weiterer Prüfung. Die genannten Zusammenhänge können folgendermaßen graphisch dargestellt werden:



Abbildung 25. Erklärungsmodell: Interaktion von NEMO und GSK-3 β in den MVB im NF- κ B-Signalweg. Modifiziert von Ea et al. 2006.

4.4 Ausblick

Um den endothelialen NF-κB-Signalweg, der die proinflammatorische Genexpression an der arteriellen Wand und somit die Pathogenese der Atherosklerose fördert, zu beeinflussen, wurde NEMO als wichtiger Einflussfaktor gefunden. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass es bei ApoE^(-/-)-Mäusen mit *knockout* für endotheliales NEMO trotz cholesterinreicher Diät aufgrund der Endothel-beschränkten Hemmung der NF-κB-Aktivität zu einer reduzierten Bildung atherosklerotischen Plaques kommt (Gareus et al. 2008). Für die spätere praktische Anwendung wäre daher eine Beeinflussung des endothelialen NEMOs von außen interessant, um so die Endothel-beschränkte Hemmung der NF-κB-Aktivität zu erreichen. Dazu wären Untersuchungen und Beeinflussung beispielsweise durch GSK-3β und Vps4 von NEMO in Endothelzellen nötig.

Für die Bewertung der kurativen Anwendung wäre wichtig, dass man weitere Untersuchungen *in vivo* durchführt. Interessant wäre die Relevanz der Hemmung der MVB-Biogenese für die NF-κB-Aktivität im lebenden Organismus, um den Prozess der

Atherosklerose zu beobachten. Weitere Experimente könnten beispielsweise anhand einer Vps4-*knockout*-Maus durchgeführt werden. Mittels dieses Modells könnte man herausfinden, ob es durch den Verlust von Vps4 zu einer verminderten Bildung von atherosklerotischen Plaques kommt. Des Weiteren könnte man andere Nebeneffekte untersuchen, welche durch das Ausschalten von Vps4 entstehen könnten.

Schließlich ist nicht auszuschließen, dass die Ergebnisse dieser Untersuchung Bedeutung für die Erforschung von Melanosomen beispielsweise bei der *Incontinentia pigmenti* haben könnten, da die Bildung von MVB eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Melanosomen spielt (Katzmann 2006). Die *Incontinentia pigmenti* ist durch Alopezie, Zahnschäden, Hautschäden und Veränderungen der Hautpigmentierung gekennzeichnet. Sie ist eine X-chromosomal dominant vererbte Genodermatose, welche durch eine Mutation von NEMO hervorgerufen wird (Courtois und Israël 2000). Es wäre denkbar, dass durch die Mutation von NEMO die Interaktion zwischen NEMO und Vps4 verhindert wird und es dadurch zu einer Fehlfunktion der MVB bzw. Melanosomen kommt. Durch diese Beeinflussung der MVB und somit der Melanosomen könnte es zur Veränderung der Hautpigmentierung bei Patienten mit *Incontinentia pigmenti* kommen.

5 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den weltweit häufigsten Todesursachen. Ihnen liegen atherosklerotische Gefäßveränderungen zu Grunde, bei denen sich eine erhöhte NFκB-Aktivität feststellen lässt. NEMO ist ein wichtiger Bestandteil des kanonischen NF-κB-Signalwegs. Durch die Beeinflussung von NEMO kann die NF-kB-Aktivität moduliert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte GSK-3ß als Interaktionspartner von NEMO identifiziert werden. Über die direkte Interaktion mit NEMO kann die GSK-3ß Einfluss auf die NF-κB-Aktivität nehmen. NEMO wird dabei durch die GSK-3β an den Serinresten S8, S17, S31 und S43 phosphoryliert. Die Phosphorylierung an S17 und S31 hat sich als essentiell herausgestellt, da eine Mutation dieser Serinreste zu nicht-phosphorylierbaren Alaninen die Phosphorylierung von NEMO durch GSK- 3ß verhindert. Ebenso wurde der Interaktionsort von NEMO und GSK-3ß herausgefunden. Die bereits aus fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen bekannte fleckenförmigen Anordnung von NEMO wird durch die Phosphorylierung von NEMO durch GSK-3β beeinflusst. Mittels STED-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass es in diesen subzellulären Strukturen zu einer Co-Lokalisation von NEMO und GSK-3β kommt. Weiter konnte mittels FLIM-FRET-Analysen eine Interaktion von NEMO und GSK-3β in den fleckenförmigen Strukturen nachgewiesen werden. Untersuchungen mit Bafilomycin, einem Inhibitor der vakuolären ATPase, zeigte, dass es sich bei den fleckenförmigen Strukturen um vakuoläre Strukturen handelt. Zur genaueren Spezifizierung folgten Untersuchungen mit Rab5 - als Marker für frühe Endosomen - und deren Mutanten (Rab5^{S34N}, Rab^{Q79L}). Es ließ sich bestätigen, dass frühe Endosomen für die NEMO-abhängige NF-κB-Aktivität eine Rolle spielen. Da Rab5-positive frühe Endosomen als Zugang in den MVB-Signalweg gelten, wurde untersucht, ob auch MVB über NEMO und GSK-3β einen Einfluss auf die NF-κB-Aktivität nehmen. Ein knockdown von Vps4, welches für den letzten Schritt der MVB-Bildung verantwortlich ist, zeigte, dass sich weniger NEMO in der Zelle befindet und somit die NF-κB-Aktivität vermindert. Andere Interaktionspartner des NF-κB-Signalwegs wie IKKβ, IKKα, IκBα wurden nicht durch den knockdown von Vps4 beeinflusst. Die Phosphorylierung von NEMO durch GSK-3ß findet somit vor der IKK-Komplex-Bildung statt. Vergrößerte Strukturen, hervorgerufen durch Vps4^{E233Q}, erhöhen durch Akkumulation von NEMO die NF-KB Aktivität. Ein Erklärungsmodell für die Frage wie NEMO in die MVB gelangt, wäre, dass NEMO, wie andere Substrate der GSK-3β, über deren substratbindende Eigenschaft in MVB internalisiert wird. Durch die Manipulation der MVB-Bildung auf endothelialer Ebene könnte in Zukunft NEMO und somit die NF-κB-Aktivität moduliert werden, um die Bildung von atherosklerotischen Plaques zu beeinflussen.

Literaturverzeichnis

- 1. Adler, A. S.; Sinha, S.; Kawahara, T. L. A.; Zhang, J. Y.; Segal, E.; Chang, H. Y. (2007): Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity. In: *Genes Dev* 21 (24), S. 3244–3257.
- 2. American Heart Association (2014): Atherosclerosis. Online verfügbar unter http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/Cholesterol/WhyCholesterolMatters/At herosclerosis_UCM_305564_Article.jsp, zuletzt geprüft am 05.08.2015.
- 3. Babst, M. (2011): MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. In: *Current opinion in cell biology* 23 (4), S. 452–457.
- 4. Babst, M.; Katzmann, D. J.; Estepa-Sabal, E. J.; Meerloo, T.; Emr, S. D. (2002a Aug): Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. In: *Dev Cell.* (3(2)), S. 271–282.
- 5. Babst, M.; Katzmann, D. J.; Snyder, W.B.; Wendland, B.; Emr, S. D. (2002b Aug): Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. In: *Dev Cell*. (3(2)), S. 283–289.
- 6. Babst, M.; Wendland, B.; Estepa, E. J.; Emr, S. D. (1998): The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. In: *The EMBO journal* 17 (11), S. 2982–2993.
- 7. Baravalle, G.; Schober, D.; Huber, M.; Bayer, N.; Murphy, R. F.; Fuchs, R. (2005): Transferrin recycling and dextran transport to lysosomes is differentially affected by bafilomycin, nocodazole, and low temperature. In: *Cell and tissue research* 320 (1), S. 99–113.
- 8. Barbero, P.; Bittova, L.; Pfeffer, S. R. (2002): Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. In: *The Journal of cell biology* 156 (3), S. 511–518.
- 9. Bayer, N.; Schober, D.; Prchla, E.; Murphy, R. F.; Blaas, D.; Fuchs, R. (1998): Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. In: *Journal of virology* 72 (12), S. 9645–9655.
- Beg, A. A.; Sha, W. C.; Bronson, R. T.; Ghosh, S.; Baltimore, D. (1995): Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. In: *Nature* 376 (6536), S. 167–170.
- 11. Bijur, G. N.; Jope, R. S. (2003): Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. In: *Neuroreport* 14 (18), S. 2415–2419.
- 12. BioRad (1995): DC Protein Assay Instruction Manual. Online verfügbar unter http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9005.pdf, zuletzt geprüft am 08.12.2015.
- 13. Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic Acids Research* (7(6)), S. 1513–1523.
- 14. Brand, K.; Page, S.; Rogler, G.; Bartsch, A.; Brandl, R.; Knuechel, R. (1996): Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. In: *The Journal of clinical investigation* 97 (7), S. 1715–1722.
- 15. Butterworth, M. B. (2010): Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by membrane trafficking. In: *Biochimica et biophysica acta* 1802 (12), S. 1166–1177.
- 16. Carroll, K. S.; Hanna, J.; Simon, I.; Krise, J.; Barbero, P.; Pfeffer, S. R. (2001): Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. In: *Science (New York, N.Y.)* 292 (5520), S. 1373–1376.
- Carter, R. S.; Pennington, K. N.; Ungurait, B. J.; Ballard, D. W. (2003): In vivo identification of inducible phosphoacceptors in the IKKgamma/NEMO subunit of human IkappaB kinase. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (22), S. 19642– 19648.
- Cho, J.-H.; Johnson, G. V. W. (2004): Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. In: *Journal of Neurochemistry* 88 (2), S. 349–358.
- Collins, R. G.; Velji, R.; Guevara, N. V.; Hicks, M. J.; Chan, L.; Beaudet, A. L. (2000): P-Selectin or Intercellular Adhesion Molecule (Icam)-1 Deficiency Substantially Protects against Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. In: *Journal of Experimental Medicine* 191 (1), S. 189–194.
- 20. Courtois, G.; Israël, A. (2000): NF-kappa B defects in humans: the NEMO/incontinentia pigmenti connection. In: *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* 2000 (58), S. pe1.
- 21. Cybulsky, M. I.; Iiyama, K.; Li, H.; Zhu, S.; Chen, M.; Iiyama, M. (2001): A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. In: *The Journal of clinical investigation* 107 (10), S. 1255–1262.
- 22. Davies, M. J. (1990): A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. In: *Circulation* 82 (3 Suppl), S. II38-46.
- 23. de Winther, M. P J; Kanters, E.; Kraal, G.; Hofker, M. H. (2005): Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25 (5), S. 904–914.
- 24. Doble, B.; Woodgett, J. R. (2003): GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. In: *J Cell Sci* 116 (Pt 7), S. 1175–1186.
- 25. Ea, C.-K.; Deng, L.; Xia, Z.-P.; Pineda, G.; Chen, Z. J. (2006): Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. In: *Molecular cell* 22 (2), S. 245–257.
- Embi, N.; Rylatt, D. B.; Cohen, P. (1980): Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. In: *Eur J Biochem* 107 (2), S. 519–527.
- Fliss, P. M.; Jowers, T. P.; Brinkmann, M. M.; Holstermann, B.; Mack, C.; Dickinson, P. (2012): Viral mediated redirection of NEMO/IKKγ to autophagosomes curtails the inflammatory cascade. In: *PLoS pathogens* 8 (2), S. e1002517.

- Foltz, D. R.; Santiago, M. C.; Berechid, B. E.; Nye, J. S. (2002): Glycogen synthase kinase-3beta modulates notch signaling and stability. In: *Current biology CB* 12 (12), S. 1006–1011.
- 29. Frame, S.; Cohen, P. (2001): GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. In: *The Biochemical journal* 359 (Pt 1), S. 1–16.
- Gareus, R.; Kotsaki, E.; Xanthoulea, S.; van der Made, I.; Gijbels, M. J. J.; Kardakaris, R. (2008): Endothelial cell-specific NF-kappaB inhibition protects mice from atherosclerosis. In: *Cell metabolism* 8 (5), S. 372–383.
- 31. Ghosh, S.; Karin, M. (2002): Missing Pieces in the NF-κB Puzzle. In: *Cell* 109 (2), S. S81–S96.
- 32. Ghosh, S.; May, M. J.; Kopp, E. B. (1998): NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. In: *Annual review of immunology* 16, S. 225–260.
- Gill, D. J.; Teo, H.; Sun, J; Perisic, O.; Veprintsev, D. B.; Emr, S. D.; Williams, R. L. (2007): Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. In: *The EMBO journal* 26 (2), S. 600–612.
- Glass, C. K.; Witztum, J. L. (2001): Atherosclerosis. the road ahead. In: *Cell* 104 (4), S. 503–516.
- 35. Gruenberg, J.; Stenmark, H. (2004): The biogenesis of multivesicular endosomes. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (4), S. 317–323.
- 36. Hajjar, D. P.; Haberland, M. E. (1997): Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan horses and cellular saboteurs. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (37), S. 22975–22978.
- Hajra, L.; Evans, A. I.; Chen, M.; Hyduk, S. J.; Collins, T.; Cybulsky, M. I. (2000): The NF-κB signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. In: *Cell Biology* (97(16)), S. 9052–9057
- 38. Hanson, P. I.; Cashikar, A. (2012): Multivesicular body morphogenesis. In: *Annual review of cell and developmental biology* 28, S. 337–362.
- 39. Hayden, Matthew S.; Ghosh, Sankar (2008): Shared principles in NF-kappaB signaling. In: *Cell* 132 (3), S. 344–362. DOI: 10.1016/j.cell.2008.01.020.
- 40. Henriksen, Erik J.; Dokken, Betsy B. (2006): Role of glycogen synthase kinase-3 in insulin resistance and type 2 diabetes. In: *Curr Drug Targets* 7 (11), S. 1435–1441.
- 41. Hoeflich, K. P.; Luo, J.; Rubie, E. A.; Tsao, M. S.; Jin, O.; Woodgett, J. R. (2000): Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. In: *Nature* 406 (6791), S. 86–90.
- 42. Hoffmann, A.; Natoli, G.; Ghosh, G. (2006): Transcriptional regulation via the NFkappaB signaling module. In: *Oncogene* 25 (51), S. 6706–6716.
- 43. Huotari, J.; Helenius, A. (2011): Endosome maturation. In: *The EMBO journal* 30 (17), S. 3481–3500.

- 44. Hurley, J. H. (2010): The ESCRT complexes. In: *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 45 (6), S. 463–487.
- 45. Hurley, J. H.; Odorizzi, Greg (2012): Get on the exosome bus with ALIX. In: *Nature cell biology* 14 (7), S. 654–655.
- 46. Huxford, T.; Malek, S.; Ghosh, G. (1999): Structure and mechanism in NF-kappa B/I kappa B signaling. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 64, S. 533–540.
- Iha, H.; Kibler, K. V.; Yedavalli, V. R. K; Peloponese, J.-M.; Haller, K.; Miyazato, A. (2003): Segregation of NF-kappaB activation through NEMO/IKKgamma by Tax and TNFalpha: implications for stimulus-specific interruption of oncogenic signaling. In: *Oncogene* 22 (55), S. 8912–8923.
- 48. Jope, R. S.; Johnson, G. V. W. (2004): The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. In: *Trends in biochemical sciences* 29 (2), S. 95–102.
- 49. Kaboord, B.; Perr, M. (2008): Isolation of Proteins and Protein Complexes by Immunoprecipitation. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 424, S. 349–364.
- 50. Karin, M. (1999): How NF-κB is activated: the role of the IkB kinase (IKK) complex. In: *Oncogene* (18), S. 6867 ± 6874.
- 51. Karin, M.; Ben-Neriah, Y. (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. In: *Annual review of immunology* 18, S. 621–663.
- Karpova, T. S.; Baumann, C. T.; He, L.; Wu, X.; Grammer, A.; Lipsky, P. (2003): Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. In: *Journal of microscopy* 209 (Pt 1), S. 56–70.
- 53. Katzmann, D. J. (2006): No ESCRT to the melanosome: MVB sorting without ubiquitin. In: *Developmental cell* 10 (3), S. 278–280.
- Katzmann, D. J.; Babst, M.; Emr, S. D. (2001): Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. In: *Cell* 106 (2), S. 145–155.
- Katzmann, D. J.; Odorizzi, G.; Emr, S. D. (2002): Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 3 (12), S. 893–905.
- Katzmann, D. J.; Stefan, C. J.; Babst, M.; Emr, Scott D. (2003): Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. In: *The Journal of cell biology* 162 (3), S. 413–423.
- 57. Kim, J.; Kim, J.; Kim, D. W.; Ha, Y.; Ihm, M. H.; Kim, H. (2010): Wnt5a induces endothelial inflammation via beta-catenin-independent signaling. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (2), S. 1274–1282.
- Klionsky, D. J.; Abdelmohsen, K.; Abe, A.; Abedin, M. J.; Abeliovich, H.; Acevedo Arozena, A. (2016): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). In: *Autophagy* 12 (1), S. 1–222.

- 59. Klionsky, D. J.; Elazar, Z.; Seglen, P. O.; Rubinsztein, D. C. (2008): Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? In: *Autophagy* 4 (7), S. 849–850.
- Komander, D.; Clague, M. J.; Urbé, S. (2009): Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (8), S. 550–563.
- 61. Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680-685.
- 62. Lawrence, T. (2009): The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1 (6), S. a001651.
- Li, Q.; van Antwerp, D.; Mercurio, F.; Lee, K. F.; Verma, I. M. (1999): Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. In: *Science (New York, N.Y.)* 284 (5412), S. 321–325.
- 64. Liao, F.; Andalibi, A.; deBeer, F. C.; Fogelman, A. M.; Lusis, A. J. (1993): Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 91 (6), S. 2572–2579.
- 65. Libby, P. (2002): Inflammation in atherosclerosis. In: *Nature* 420 (6917), S. 868-874.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *The Journal of biological chemistry* 193 (1), S. 265–275.
- 67. Lusis, A. J. (2000): Atherosclerosis. In: Nature 407 (6801), S. 233-241.
- 68. MacDonald, B. T.; Tamai, K.; He, X. (2009): Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. In: *Developmental cell* 17 (1), S. 9–26.
- McCool, K. W.; Miyamoto, S. (2012): DNA damage-dependent NF-κB activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. In: *Immunological reviews* 246 (1), S. 311– 326.
- McKinney, S. A.; Murphy, C. S.; Hazelwood, K. L.; Davidson, M. W.; Looger, L. L. (2009): A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. In: *Nature methods* 6 (2), S. 131–133.
- 71. Merrill, S. A.; Hanson, P. I. (2010): Activation of human VPS4A by ESCRT-III proteins reveals ability of substrates to relieve enzyme autoinhibition. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (46), S. 35428–35438.
- 72. Miltenyibiotec (2014): Fast magnetic immunoprecipitation with the µMACS[™] GFP Isolation Kit. Online verfügbar unter http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macsmolecular/molecular-plant-science/immunoprecipitation.aspx, zuletzt aktualisiert 2015, zuletzt geprüft am 08.12.2015.
- 73. Molestina, R. E.; Miller, R. D.; Lentsch, A. B.; Ramirez, J. A.; Summersgill, J. T. (2000): Requirement for NF-kappaB in transcriptional activation of monocyte chemotactic protein 1 by Chlamydia pneumoniae in human endothelial cells. In: *Infection and immunity* 68 (7), S. 4282–4288.

- 74. Moore, K. J.; Tabas, I. (2011): Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. In: *Cell* 145 (3), S. 341–355.
- Mukai, F.; Ishiguro, K.; Sano, Y.; Fujita, S. C. (2002): Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. In: *Journal of Neurochemistry* 81 (5), S. 1073–1083.
- O'Brien, E. R.; Garvin, M. R.; Dev, R.; Stewart, D. K.; Hinohara, T.; Simpson, J. B.; Schwartz, S. M. (1994): Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. In: *The American journal of pathology* 145 (4), S. 883–894.
- 77. Osorio, F. G.; Bárcena, C.; Soria-Valles, C.; Ramsay, A. J.; de Carlos, F.; Cobo, J. (2012): Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF-κB activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. In: *Genes Dev* 26 (20), S. 2311–2324.
- 78. Palacios, F.; Tushir, J. S.; Fujita, Y.; D'Souza-Schorey, C. (2005): Lysosomal targeting of E-cadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell adhesion during epithelial to mesenchymal transitions. In: *Molecular and cellular biology* 25 (1), S. 389–402.
- 79. Palkowitsch, L.; Leidner, J.; Ghosh, S.; Marienfeld, R. B. (2008): Phosphorylation of serine 68 in the IkappaB kinase (IKK)-binding domain of NEMO interferes with the structure of the IKK complex and tumor necrosis factor-alpha-induced NF-kappaB activity. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (1), S. 76–86.
- 80. Piper, R. C.; Katzmann, D. J. (2007): Biogenesis and function of multivesicular bodies. In: *Annual review of cell and developmental biology* 23, S. 519–547.
- 81. Pober, J. S.; Sessa, W. C. (2007): Evolving functions of endothelial cells in inflammation. In: *Nature reviews. Immunology* 7 (10), S. 803–815.
- 82. Promega (2010): FuGENE ® HD Transfection Reagent. Online verfügbar unter https://www.promega.de/~/media/files/resources/protocols/technical%20manuals/10 1/fugene%20hd%20transfection%20reagent.pdf, zuletzt aktualisiert am 09/2013, zuletzt geprüft am 08.12.2015.
- 83. Promega (2011): Luciferase Assay System. Online verfügbar unter https://www.promega.de/~/media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/l uciferase%20assay%20system%20protocol.pdf, zuletzt aktualisiert am 08/2015, zuletzt geprüft am 08.12.2015.
- 84. Qiagen (2004): QIAprep ® Miniprep Handbook. Online verfügbar unter http://public.wsu.edu/~kahn_sci/Flow/E2-QIAprep_Miniprep_Handbook.pdf; zuletzt akutalisiert 04/2004, zuletzt geprüft am 08.12.2015
- 85. Rafieian-Kopaei, M.; Setorki, M.; Doudi, M.; Baradaran, A.; Nasri, H. (2014): Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes. In: *International Journal of Preventive Medicine* 5 (8), S. 927–946.
- 86. Raiborg, C.; Rusten, T. E.; Stenmark, H. (2003): Protein sorting into multivesicular endosomes. In: *Current opinion in cell biology* 15 (4), S. 446–455.
- Rink, J.; Ghigo, E.; Kalaidzidis, Y.; Zerial, M. (2005): Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. In: *Cell* 122 (5), S. 735– 749.

- 88. Ross, R. (1999): Atherosclerosis- an inflammatory disease. In: *The New England journal of medicine* 340 (2), S. 115–126.
- Rothwarf, D. M.; Zandi, E.; Natoli, G.; Karin, M. (1998): IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. In: *Nature* 395 (6699), S. 297– 300.
- Rudolph, D.; Yeh, W.-C.; Wakeham, A.; Rudolph, B.; Nallainathan, D.; Potter, J. (2000): Severe liver degeneration and lack of NF-κB activation in NEMO/IKKγdeficient mice. In: *Genes Dev* 14 (7), S. 854–862.
- Scheuring, S.; Röhricht, R. A.; Schöning-Burkhardt, B.; Beyer, A.; Müller, S.; Abts, H. F.; Köhrer, K. (2001): Mammalian cells express two VPS4 proteins both of which are involved in intracellular protein trafficking. In: *Journal of molecular biology* 312 (3), S. 469–480.
- Senftleben, U.; Cao, Y.; Xiao, G.; Greten, F. R.; Krähn, G.; Bonizzi, G. et al. (2001): Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. In: *Science (New York, N.Y.)* 293 (5534), S. 1495–1499.
- 93. Shifera, A. S. (2010): Protein-protein interactions involving IKKgamma (NEMO) that promote the activation of NF-kappaB. In: *Journal of cellular physiology* 223 (3), S. 558–561.
- 94. Shrestha, D.; Jenei, A.; Nagy, P.; Vereb, G.; Szöllősi, J. (2015): Understanding FRET as a research tool for cellular studies. In: *International journal of molecular sciences* 16 (4), S. 6718–6756.
- 95. Sonnichsen, B. (2000): Distinct Membrane Domains on Endosomes in the Recycling Pathway Visualized by Multicolor Imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. In: *The Journal of cell biology* 149 (4), S. 901–914.
- 96. Spektrum (1999): Floureszenzmikroskopie. Online verfügbar unter http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/fluoreszenzmikroskopie/25361, zuletzt geprüft am 09.12.2015.
- Stambolic, V.; Ruel, L.; Woodgett, J. R. (1996): Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. In: *Current biology: CB* 6 (12), S. 1664–1668.
- Steinbrecher, K. A.; Wilson, W. 3rd; Cogswell, P. C.; Baldwin, A. S. (2005): Glycogen synthase kinase 3beta functions to specify gene-specific, NF-kappaBdependent transcription. In: *Molecular and cellular biology* 25 (19), S. 8444–8455.
- 99. Stenmark, H. (2009): Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (8), S. 513–525.
- Stenmark, H.; Parton, R. G.; Steele-Mortimer, O.; Lütcke, A.; Gruenberg, J.; Zerial, M. (1994): Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. In: *The EMBO journal* 13 (6), S. 1287–1296.
- 101. Tabas, I. (2010): Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. In: *Nature reviews. Immunology* 10 (1), S. 36–46.

- 102. Taelman, V. F.; Dobrowolski, R.; Plouhinec, J.-L.; Fuentealba, L. C.; Vorwald, P. P.; Gumper, I. (2010): Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. In: *Cell* 143 (7), S. 1136–1148.
- 103. Tak, P. P.; Firestein, G. S. (2001): NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. In: *The Journal of clinical investigation* 107 (1), S. 7–11.
- 104. Thermo Fisher Scientific Inc. (2013): Thermo Scientific TurboFect Transfection Reagent. Online verfügbar unter https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ MAN0013119_TurboFect_Transfection_Reagent_Considerations_UG.pdf. zuletzt aktualisiert im 2013, zuletzt geprüft am 08.12.2015.
- 105. Thermo Fisher Scientific Inc. (2016a): Co-immunoprecipitation (Co-IP). Online verfügbar unter https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/co-immunoprecipitation-co-ip.html, zuletzt aktualisiert am 2016, zuletzt geprüft am 01.11.2017.
- 106. Thermo Fisher Scientific Inc. (2016b): Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). Online verfügbar unter https://www.thermofisher.com/ch/en/home/references/molecular-probes-thehandbook/technical-notes-and-product-highlights/fluorescence-resonance-energytransfer-fret.html, zuletzt aktualisiert am 2016, zuletzt geprüft am 01.11.2017.
- 107. Van der Heiden, K.; Cuhlmann, S.; Le Luong, A.; Zakkar, M.; Evans, P. C. (2010): Role of nuclear factor kappaB in cardiovascular health and disease. In: *Clinical science (London, England: 1979)* 118 (10), S. 593–605.
- 108. van Niel, G.; Porto-Carreiro, I.; Simoes, S.; Raposo, G. (2006): Exosomes: a common pathway for a specialized function. In: *J Biochem* 140 (1), S. 13–21.
- 109. Virmani, R.; Burke, A. P.; Kolodgie, F. D.; Farb, A. (2002): Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. In: *Journal of interventional cardiology* 15 (6), S. 439–446.
- 110. Wegner, C. S.; Rodahl, L. M W; Stenmark, H. (2011): ESCRT proteins and cell signalling. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 12 (10), S. 1291–1297.
- 111. Weil, R.; Schwamborn, K.; Alcover, A.; Bessia, C.; Di Bartolo, V.; Israël, A. (2003): Induction of the NF-kappaB cascade by recruitment of the scaffold molecule NEMO to the T cell receptor. In: *Immunity* 18 (1), S. 13–26.
- 112. Welsh, G. I.; Proud, C. G. (1993): Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. In: *The Biochemical journal* 294 (Pt 3), S. 625–629.
- 113. WHO (2015): Cardiovascular diseases (CVDs). WHO. Online verfügbar unter http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/, zuletzt geprüft am 05.05.2015.
- 114. Wiedenmann, J.; Nienhaus, G. U. (2006): Live-cell imaging with EosFP and other photoactivatable marker proteins of the GFP family. In: *Expert review of proteomics* 3 (3), S. 361–374.
- 115. Williams, R. L.; Urbé, S. (2007): The emerging shape of the ESCRT machinery. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (5), S. 355–368.

- 116. Wollert, T.; Wunder, C.; Lippincott-Schwartz, J.; Hurley, J. H. (2009): Membrane scission by the ESCRT-III complex. In: *Nature* 458 (7235), S. 172–177.
- 117. Wood, K. V. (1990): Luc genes: introduction of colour into bioluminescence assays. In: *Journal of bioluminescence and chemiluminescence* 5 (2), S. 107–114.
- 118. Woodgett, J. R. (1990): Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. In: *The EMBO journal* 9 (8), S. 2431–2438.
- 119. Woodman, P. (2009): ESCRT proteins, endosome organization and mitogenic receptor down-regulation. In: *Biochemical Society transactions* 37 (Pt 1), S. 146–150.
- 120. Woodman, P. G. (2000): Biogenesis of the sorting endosome: the role of Rab5. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 1 (9), S. 695–701.
- 121. Woodman, P. G.; Futter, C. E. (2008): Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. In: *Current opinion in cell biology* 20 (4), S. 408–414.
- 122. Wunderlich, F. T.; Luedde, T.; Singer, S.; Schmidt-Supprian, M.; Baumgartl, J.; Schirmacher, P. (2008): Hepatic NF-kappa B essential modulator deficiency prevents obesity-induced insulin resistance but synergizes with high-fat feeding in tumorigenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (4), S. 1297–1302.
- 123. Yamamoto, A.; Tagawa, Y.; Yoshimori, T.; Moriyama, Y.; Masaki, R.; Tashiro, Y. (1998): Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. In: *Cell structure and function* 23 (1), S. 33–42.
- 124. Yamaoka, S.; Courtois, G.; Bessia, C.; St. Whiteside; Weil, R.; Agou, F. et al. (1998 Jun 26): Complementation Cloning of NEMO, a Component of the IκB Kinase Complex Essential for NF-κB Activation. In: *Cell* (93(7)), S. 1231–1240.
- 125. Yang, J.; Fan, G. H.; Wadzinski, B. E.; Sakurai, H.; Richmond, A. (2001): Protein phosphatase 2A interacts with and directly dephosphorylates RelA. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (51), S. 47828–47833.
- 126. Zeng, X.; Huang, H.; Tamai, K.; Zhang, X.; Harada, Y.; Yokota, C. (2008): Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. In: *Development* 135 (2), S. 367–375.
- 127. Zhang, S. H.; Reddick, R. L.; Piedrahita, J. A.; Maeda, N. (1992): Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. In: *Science (New York, N.Y.)* 258 (5081), S. 468–471.

Veröffentlichungen

Medunjanin, Senad; Schleithoff, Lisa; Fiegehenn, Christian; Weinert, Soenke; Zuschratter, Werner; Braun-Dullaeus, Ruediger C. (2016): GSK-3β controls NF-kappaB activity via IKKγ/NEMO. In: *Scientific reports* 6, S. 38553. DOI: 10.1038/srep38553.

Danksagungen

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei all jenen bedanken, die zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Prof. Dr. Braun-Dullaeus f
 ür die Bereitschaft der Betreuung dieser Dissertation und die spannenden Diskussionen.
- Dr. Werner Zuschratter für die Mikroskopie.
- o Claudia Zufelde für ihre Hilfe und Anleitung bei den experimentellen Arbeiten.
- Der medizinischen Fakultät der Universität Magdeburg Referat Forschung für die Unterstützung durch ein Promotionsstipendium im Förderungszeitraum vom 01.12.2014 bis 31.03.2015.
- Meinen Eltern und meinem Bruder Sebastian f
 ür ihre Unterst
 ützung und den Glauben an mich.
- Meiner Schwester Carolin f
 ür ihre wertvollen R
 ückmeldungen und Impulse, ohne die diese Arbeit nicht das geworden w
 äre, was sie letztendlich ist.
- Meinem Freund Clemens Wackernagel für seine Unterstützung und Geduld.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel "Modulation der NF-κB-Aktivität durch NEMO und GSK-3β in multivesikulären *bodies*" in der Universitätsklinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. Rüdiger Braun-Dullaeus und Dr. Senad Medunjanin ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Kreuzlingen, den 29.10.2018

Lisa-Marie Schleithoff

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Lisa-Marie Schleithoff
Geburtstag:	23.06.1987
Geburtsort:	Oelde
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
<u>Schulausbildung</u>	
1994-1998	Karl Wagenfeld Grundschule, Stromberg
1998-2007	Gymnasium Johanneum, Wadersloh
09/2004-02/2005	Elliott School, London
06/2007	Allgemeine Hochschulreife
<u>Studium</u>	
WS 2007/08	Chemiestudium (Bachelor of Science) an der Ruhr-Universität
	Bochum – Absolvierung des Praktikums der Chemie und der
	Physik für Mediziner
SS 2008-WS 2008/09	Altkatholische Theologie (kirchliches Examen) an der
	Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn – Praktikum der
	Biologie für Mediziner
	2. Hörerschaft an der Ruhr-Universität Bochum; SS2008:
	Praktikum der Berufsfelderkundung
SS 2009	Humanmedizin (Staatsexamen) vorklinische Teilzulassung an der
	Johannes Gutenberg-Universität Mainz
WS 2009/10-WS 2014/2015	Humanmedizin (Staatsexamen) Vollzulassung an der Otto-von-
	Guericke-Universität Magdeburg
15.09.2010	1. Staatsexamen (Physikum)
17.11.2014	2. Staatsexamen

Berufliche

Laufbahn/Praktika	
2007-2009	Insgesamt 90 Tage Pflegepraktikum in dem Fachbereich Innere
(vorlesungsfreie Zeit)	Medizin
WS2010/11-SS2013	Insgesamt 120 Tage Famulatur in den Fachbereichen Innere
(vorlesungsfreie Zeit)	Medizin, Pädiatrie, Allgemeinchirurgie, Anästhesie, Zentrale
	Notaufnahme und Allgemeinmedizin
WS 2010/11-SS2011	Studentische Hilfskraft im Präparierkurs (Institut für Anatomie,
	Magdeburg)
SS2013	Studentische Hilfskraft in der Klinik für Hämatologie und
	Onkologie, Universität Magdeburg
	Praktisches Jahr:
19.08.2013-08.12.2013	1.Tertial: Chirurgie: Vietnam Military Medical University Hanoi
09.12.2013-30.03.2014	2.Tertial: Innere Medizin: Kantonsspital Frauenfeld, Schweiz
31.03.2014-20.07.2014	3. Tertial: Urologie: Universitätsklinikum Magdeburg
WS 2014/15	Promotionsstudentin, Universität Magdeburg, Förderung durch
	Referat für Nachwuchs und Forschung
04/2015-06/2015	Diplomkurs Tropenmedizin am Bernhard-Nocht-Institut Hamburg
08/2015-07/2016	Assistenzärztin für Chirurgie, Kantonsspital Frauenfeld, Schweiz
Seit 08/2016	Assistenzärztin für allgemeine Innere Medizin, Kantonsspital
	Frauenfeld, Schweiz

Kreuzlingen, den 29.10.2018

Lisa-Marie Schleithoff