

Einzelzell-basierte Analyse der  
endogenen Protein-Protein-Interaktion  
von p65 mit I $\kappa$ B $\alpha$ , DCP1a oder LMO7  
mittels *Proximity Ligation Assay*

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Schlereth, Eva Barbara  
aus Schweinfurt

Gießen, 2018

Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Michael Kracht

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Kracht

2. Gutachter: Prof. Dr. Günter Lochnit

Tag der Disputation: 13.11.2019

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Gicht und hereditäre Fiebersyndrome als Beispiele chronisch entzündlicher Erkrankungen .....	1
1.2 Zytokine - Entstehung, Funktion, Regulation .....	2
1.3 Der Interleukin-1-Signalweg .....	4
1.3.1 Die Rolle der MAP Kinase JNK und der Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie bei zellulären Vorgängen der Entzündung .....	7
1.3.2 mRNA-Stabilisation und posttranslationale Modifikation von Transkriptionsfaktoren durch die p38 MAP Kinase .....	8
1.4 NFκB.....	8
1.4.1 Die Familie der NFκB-Transkriptionsfaktoren - Aufbau und Aufgaben	8
1.4.2 Funktion posttranslationaler Modifikationen an NFκB-Faktoren .....	10
1.5 Aufgabe und Funktion inhibitorischer κB-Proteine .....	11
1.6 Klassische Aktivierung des NFκB-Signalweges .....	12
1.7 Die Wirkung von NFκB im Zellkern am Beispiel des <i>IL-8</i> -Promotors..	13
1.8 Das p65-Interaktom .....	15
1.9 DCP1a als putativer Interaktionspartner von p65 .....	16
1.9.1 Aufbau und Funktion der <i>processing bodies</i> .....	16
1.9.2 Aufgaben der Komponenten der <i>p-bodies</i> .....	17
1.9.3 Abbaumechanismen und Metabolismus von mRNAs in <i>p-bodies</i> ....	19
1.9.4 mRNA-Abbau und <i>p-bodies</i> im klinischen Bezug .....	19
1.9.5 IL-1-abhängige Regulation von DCP1a.....	21
1.10 LMO7 - ein weiterer möglicher Interaktionspartner von p65 .....	21
1.10.1 Die Aufgabe von LMO7 in Zell-Zell-Kontakten .....	22
1.10.2 Die Interaktion von LMO7 mit Emerin und seine Funktion als Transkriptionsfaktor.....	23
1.10.3 LMO7 im klinischen Bezug - Muskelerkrankungen und Tumorgenese .....	24
1.10.4 Untersuchung der Bedeutung der in den Vorarbeiten mittels Ko-Immunopräzipitation und Massenspektrometrie detektierten Interaktion von p65 mit LMO7 .....	25
1.11 Prinzip und Entwicklung der Methode des „ <i>Proximity Ligation Assays</i> “ .....	26
1.12 Ziele der Arbeit und Fragestellung.....	28
<b>2 Material</b> .....	<b>31</b>
2.1 Verbrauchsmaterial.....	31
2.2 Geräte.....	31
2.2.1 Elektrophorese- und Westernblotsysteme .....	31
2.2.2 Mikroskope, Photometer und Software .....	31
2.2.3 Zellkultursysteme .....	31
2.2.4 Zentrifugen .....	31
2.2.5 Andere .....	32
2.3 Chemikalien und Lösungsmittel .....	32
2.4 Puffer und Lösungen .....	33
2.5 Medien.....	36
2.6 Gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien, Kits.....	36
2.7 Standards .....	37
2.8 Plasmide.....	37

2.9 Antikörper .....	37
2.9.1 Primärantikörper.....	37
2.9.2 Sekundärantikörper .....	38
2.10 Zelllinien .....	39
<b>3 Methoden.....</b>	<b>40</b>
3.1 Zellkultur .....	40
3.1.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	40
3.1.2 Kultivieren und Passagieren von Zellen .....	40
3.1.3 Auszählen von Zellen.....	41
3.1.4 Stimulation von Zellen.....	41
3.1.5 Ernten von Zellen .....	41
3.1.6 Transiente Transfektion mit Calciumchlorid .....	41
3.2 Protein-Biochemische Methoden.....	43
3.2.1 Herstellung von Ganzzelllysaten eukaryotischer Zellen .....	43
3.2.1.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten zur Immunodetektion im Westernblot mit Ganzzelllysepuffer .....	43
3.2.1.2 Lysate für die Ko-Immunpräzipitation - Zelllyse nach Bohmann/Weiss .....	43
3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	43
3.2.3 SDS-Page .....	44
3.2.4 Westernblot und Immunodetektion mittels ECL-Reaktion .....	45
3.2.5 Ko-Immunpräzipitation .....	46
3.3 Zellbiologische Techniken .....	47
3.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz.....	47
3.3.2 <i>Proximity Ligation Assay</i> (PLA).....	49
3.4 Computergestützte Analyse der PLA Experimente mittels Duolink®ImageTool .....	51
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
4.0 Validierung der PLA Methode anhand der physiologischen Regulation des p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein-Protein-Komplexes in HeLa-Zellen und einer p65-defizienten Zelllinie.....	57
4.1 Untersuchung der IL-1-abhängigen Interaktion von p65/I $\kappa$ B $\alpha$ durch klassische proteinbiochemische und zellbiologischer Verfahren .....	57
4.1.1 IL-1 $\alpha$ -Zeitreihe in HeLa-Zellen .....	57
4.1.2 Zeitkinetische Analyse der IL-1 $\alpha$ regulierbaren p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Interaktion mittels Ko-Immunpräzipitation.....	60
4.1.3 Indirekte Immunfluoreszenz mit verschiedenen I $\kappa$ B $\alpha$ - und p65-Antikörpern zur Ermittlung der subzellulären Lokalisation der Proteine .....	63
4.2 Rekapitulation der p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Interaktion und deren IL-1-regulierter Dynamik mit Hilfe des <i>Proximity Ligation Assays</i> .....	65
4.2.1 PLAs mit unterschiedlichen p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörperkombinationen .....	65
4.2.2 Erweiterte IL-1 $\alpha$ -Kinetik und Analyse mittels PLA.....	67
4.2.3 Auswirkungen eines RNA Interferenz(RNAi)-vermittelten p65 <i>knock downs</i> auf die, mittels PLA gemessene, p65/I $\kappa$ B $\alpha$ - Wechselwirkung in humanen Zellen .....	70
4.2.4 Auswirkungen eines p65 <i>knock outs</i> auf die, mittels PLA gemessene, p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Wechselwirkung in murinen Zellen .....	73

4.2.5 Pharmakologische Modulation des p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexes durch 5Z-7-Oxozeaenol, einem Hemmstoff gegen die Proteinkinase TAK1 .....	76
4.3 Weitere Validierung des PLA als geeignete Methode für die Messung von Protein-Interaktionen, -Modifikationen und -Lokalisationen auf Einzelzellebene.....	78
4.3.1 Darstellung der Proteinexpression von zellulärem p65, sowie des Anteils an phosphoryliertem p65 im PLA.....	78
4.3.1.1 Untersuchung der Expression von p65 mittels <i>Proximity Ligation Assay</i> .....	78
4.3.1.2 Analyse von HeLa-Zellen auf phosphoryliertes p65 mit Hilfe des PLA.....	81
4.3.2 Untersuchung des NF $\kappa$ B-Heterodimers p65/p50 im PLA .....	82
4.3.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz von p50 .....	82
4.3.2.2 Analyse des p65/p50-Komplexes im PLA.....	84
4.4 Anwendung des <i>Proximity Ligation Assays</i> zur Validierung neuer Interaktionspartner von p65 NF $\kappa$ B .....	85
4.4.1 Identifizierung des <i>decapping factors</i> DCP1a als weiteren Interaktionspartner von p65 .....	85
4.4.1.1 Indirekte Immunfluoreszenz mit DCP1a-Antikörpern .....	85
4.4.1.2 PLA mit p65- und DCP1a-Antikörpern - Austestung verschiedener Antikörperkombinationen .....	87
4.4.1.3 Weitere Analyse der endogenen Interaktion p65/DCP1a mit Hilfe einer erweiterten IL-1 $\alpha$ -Kinetik .....	88
4.4.1.4 Einfluss der RNAi-vermittelten Reduktion von p65 und DCP1a auf den Nachweis von p65/DCP1a-Komplexen im PLA .....	90
4.4.1.5 Nachweis der Expression von DCP1a im PLA und Analyse des Einflusses eines p65 bzw. DCP1a <i>knock downs</i> ...	93
4.4.2 Identifizierung von LIM <i>domain only</i> 7 (LMO7) als weiteren Interaktionspartner von p65 .....	94
4.4.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz mit einem LMO7-Antikörper.....	95
4.4.2.2 Identifizierung eines endogenen p65/LMO7-Komplexes mittels PLA und Testung auf eine mögliche Regulation durch IL-1 $\alpha$ ....	95
4.4.2.3 Auswirkungen eines p65 <i>knock downs</i> auf die Ausbildung von p65/LMO7-Komplexen im PLA.....	97
4.4.2.4 Auswirkung eines TAK1-Inhibitors auf die IL-1-induzierte Reduzierung der Anzahl an p65/LMO7-Komplexen.....	99
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>101</b>
5.1 Detektion der dynamischen IL-1-abhängigen Regulation des p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexes auf Einzelzellebene.....	101
5.2 Der <i>Proximity Ligation Assay</i> als Methode mit hoher Spezifität - Validierung des Assays anhand der bekannten IL-1 $\alpha$ -regulierten Interaktion p65/I $\kappa$ B $\alpha$ .....	102
5.3 Verifizierung der Spezifität des PLAs durch <i>knock down</i> und <i>knock out</i> Experimente, sowie durch pharmakologische Intervention.....	105
5.4 Einsatz des PLA zur Untersuchung der Expression eines Proteins am Beispiel p65 .....	106

5.5 Nutzung des PLAs zur Detektion posttranslationaler Modifikationen .....	108
5.6 Detektion des NFκB-Transkriptionsfaktors p65/p50 im PLA .....	110
5.7 Nachweis der endogenen, IL-1α-unabhängigen Interaktion von p65/DCP1a mittels PLA .....	111
5.8 <i>knock down</i> von p65 bzw. DCP1a und die Auswirkungen auf die PLA Ergebnisse .....	113
5.9 Endogene Interaktion von LMO7 mit p65 in Abhängigkeit von IL-1α .....	115
5.10 Schwachstellen und Vorteile des <i>Proximity Ligation Assays</i> .....	119
5.11 Der PLA in der klinischen Praxis .....	121
<b>6 Summary .....</b>	<b>122</b>
<b>7 Zusammenfassung .....</b>	<b>123</b>
<b>8 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>125</b>
<b>9 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>130</b>
<b>10 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>133</b>
<b>11 Anhang.....</b>	<b>149</b>
11.1 Regulation von Komponenten des NFκB-Signalweges durch IL-1α in HeLa-Zellen .....	149
11.2 <i>Proximity Ligation Assay</i> mit p65- und IκBα-Antikörpern und erweiterter IL-1α-Kinetik.....	150
11.3 PLA mit zwei p65-Antikörpern zum Nachweis der Lokalisation von p65.....	151
11.4 <i>Proximity Ligation Assays</i> mit Sin3a- und Polymerase-II-Antikörpern, sowie IF mit Sin3a-Antikörpern .....	152
<b>12 Publikationen .....</b>	<b>154</b>
<b>13 Erklärung zur Dissertation .....</b>	<b>156</b>
<b>14 Danksagung .....</b>	<b>157</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Gicht und hereditäre Fiebersyndrome als Beispiele chronisch entzündlicher Erkrankungen

In Deutschland weisen rund 20 % der Bevölkerung erhöhte Harnsäurewerte auf und 2,8 % der Männer sowie 0,4 % der Frauen zwischen 30 und 59 Jahren leiden an Gicht (Deutsche Gicht-Liga e.V.). Dabei kann die Hyperurikämie komplett asymptomatisch sein, zum akuten Gichtanfall oder gar zur chronischen Gicht führen. Beim akuten Gichtanfall kommt es meist zu starken Schmerzen in einem Gelenk, am häufigsten dem Großzehengrundgelenk, mit Hautrötung, Schwellung und Überwärmung. Zusätzlich treten oft auch Allgemeinsymptome, wie z.B. Fieber auf. Bei der chronischen Gicht kommt es zur Bildung von Tophi und damit zu Ablagerungen von Harnsäurekristallen in Weichteilen und Knochen, die längerfristig auch zur Gelenkdestruktion führen können. Die schwerwiegendsten Folgen einer chronischen Gicht sind die Uratnephrolithiasis und Uratnephropathie, welche mit der Bildung von Nierensteinen und einer fortschreitenden, chronischen Niereninsuffizienz einhergehen. Pathophysiologisch kommt es bei erhöhten Konzentrationen von Harnsäure (z.B. nach purinreichem Essen, aber auch beim Fasten) bzw. bei einer zu geringen Harnsäuresekretion im Tubulussystem der Niere, oder der Kombination beider Faktoren, zur Ausfällung von Uratkristallen. Grund hierfür ist eine Überschreitung des pH-abhängigen Löslichkeitsproduktes. Man fand heraus, dass diese Uratkristalle zu einer Aktivierung des Inflammasomkomplexes in Makrophagen und Granulozyten führen, was wiederum die Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren zur Folge hat. (Herold und Mitarbeiter 2013), (Ragab et al. 2017) Unter diesen scheint vor allem das Interleukin-1 (IL-1) eine bedeutende Rolle für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion zu spielen (Chen, Shi et al. 2006).

Ebenso steht das IL-1 bei hereditären Fiebersyndromen, wie dem autoinflammatorischen cryopyrinassoziiertem periodischem Syndrom (CAPS), im Mittelpunkt der Immunreaktion. Beim CAPS liegt eine Mutation des *NLRP3*-Gens vor, welches für die Regulation der Interleukin-1 $\beta$  Sekretion mitverantwortlich ist (Hoffman et al. 2001). Das CAPS kommt in drei verschiedenen Formen vor. Die Form mit dem mildesten Krankheitsverlauf wird *familiar cold associated syndrome* (FACS) genannt. Das Muckle-Wells Syndrom (MWS) beschreibt die intermediäre Ausprägung. Die schwerste Verlaufsform wird als *chronic infantile neurologic cutaneous articular* (CINCA)-Syndrom bezeichnet. Die Symptomatik reicht von chronischer Urtikaria, Fieber, Innenohrschwerhörigkeit und Myalgien bis hin zur chronischen

Niereninsuffizienz bei Amyloidose und schweren neurologischen Symptomen (Mamoudjy et al. 2017).

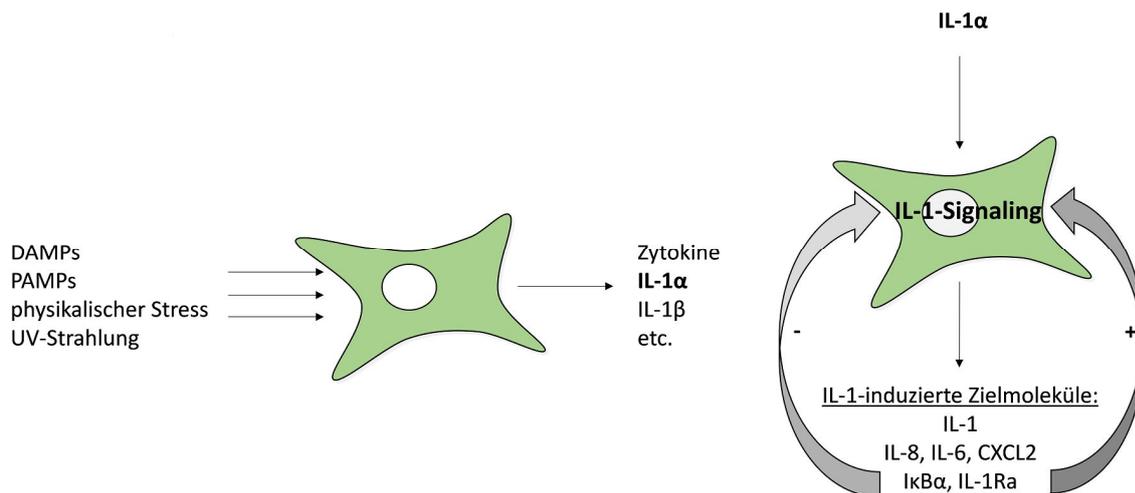
Diese Erkrankungen, wie Gicht und CAPS, stellen nur zwei Beispiele von vielen dar, bei denen Zytokine, wie das IL-1, eine zentrale Rolle in der Vermittlung der Entzündungsreaktion einnehmen.

## 1.2 Zytokine - Entstehung, Funktion, Regulation

Im Organismus werden Zytokine als Reaktion auf zum Beispiel PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) (Takeuchi and Akira 2010) oder DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) synthetisiert und binden anschließend an spezifische Rezeptoren (Schmitz, Weber et al. 2011). PAMPs sind Moleküle, die bei der Infektion mit Mikroorganismen oder anderen Pathogenen freigesetzt werden. DAMPs dagegen kommen bei sterilen Entzündungen vor. Auslöser für die Ausschüttung von DAMPs stellen z.B. physikalischer Stress, UV-Strahlung oder auch Autoimmunreaktionen dar (Chen and Nunez 2010), (Kracht and Saklatvala 2002). Die als Folgeaktion ausgeschütteten Zytokine sind dabei essentiell, um schnell und effektiv gegen eingedrungene Pathogene vorgehen zu können. Diese würden sich ohne die Gegenwehr des Immunsystems exponentiell vermehren und zu einem progressiven Krankheitsverlauf führen. Eine wichtige Wirkungsweise der Zytokine stellt dabei die Aktivierung der Bildung von Chemokinen dar. Durch diese werden wiederum Leukozyten an den Ort des Geschehens rekrutiert. Auch die Induktion verschiedener, die Abwehrfunktion fördernder Enzyme zählt zu den Funktionen der Zytokine. Zu diesen Enzymen gehören z.B. die Cyclooxygenase-2 (COX-2), oder die NO-Synthase, deren Produkte zu einer Erhöhung des lokalen Blutflusses führen (Medzhitov 2010), (Kracht and Saklatvala 2002) und dadurch ebenfalls zur schnelleren Heilung beitragen. Zytokine können von fast allen kernhaltigen Zellen produziert und sezerniert werden, wobei wichtige Produzenten Makrophagen und Monozyten darstellen (Netea et al. 2009). Durch auto- und parakrine Verstärkungskaskaden der pro-inflammatorischen Zytokine (z.B.: IL-1 $\alpha$  und  $\beta$ , *tumor necrosis factor alpha* (TNF $\alpha$ ), IL-6, IL-12, IL-23) kommt es zu einer schnellen und wirksamen Aktivierung der Abwehrmechanismen des Körpers. Dabei wird über die primären Zytokine, wie IL-1 und TNF $\alpha$ , zum einen deren eigene Genexpression gefördert, zum anderen auch die Expression verschiedener weiterer Zielgene induziert. Zu diesen Zielgenen zählen beispielsweise Chemokine wie IL-8 und andere Zytokine, die Einfluss auf das adaptive Immunsystem nehmen (z.B.: IL-2, IL-6 oder IL-12) (Fontes, Rose et al. 2015), (Schmitz, Weber et al. 2011). Letztendlich kann eine Entzündung oder eine

Beschädigung des Gewebes also nur durch das äußerst sensible Zusammenspiel von Zytokinen, Chemokinen, Abwehrzellen, defensiven Enzymen, Bestandteilen des adaptiven Immunsystems (z.B. Antikörper) und der Blutgerinnung effektiv bewältigt werden (Medzhitov 2010).

Genauso wichtig wie die schnelle Rekrutierung der Abwehrmechanismen ist aber auch die kontrollierte und angemessene Inaktivierung der Immunantwort nach dem Ausbleiben pro-inflammatorischer Stimuli. Andernfalls kann es zu einer überschießenden Reaktion oder zu einer chronischen Inflammation kommen. Deswegen existieren Steuerungsmechanismen, welche die Abwehrreaktion wieder eindämmen, sogenannte negative *feedback*-Schleifen. Ein Beispiel hierfür ist die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise IL-1Ra (*IL-1 receptor antagonist*) (Aksentijevich, Masters et al. 2009) oder IL-10 und IL-13 (Schmitz, Weber et al. 2011), (Dinarello 2009).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Prinzipien der Entzündung und des IL-1-signaling

Stressoren (DAMPs, PAMPs, etc.) wirken auf die Zelle ein und führen zur Induktion verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-1α. Diese lösen über komplexe Mechanismen Signalkaskaden innerhalb der Zelle aus, die wiederum zur Induktion weiterer Entzündungsmediatoren führen. Diese können den IL-1-Signalweg durch negative oder positive Rückkopplung verstärken oder hemmen (dicke Pfeile). Modifiziert nach M. Kracht

Weiterhin verfügt der Körper über ein Regulationssystem, welches die basale Expression inflammatorischer Zytokine auf einem sehr niedrigen Level hält. Das heißt, dass in gesunden Zellen die Transkription und Translation pro-inflammatorischer Gene, wie z.B. IL-8, weitestgehend durch verschiedene Mechanismen reprimiert werden (Kracht and Saklatvala 2002), (siehe auch Kapitel 1.7). Treten in diesem äußerst sensiblen System Fehler auf, beispielsweise in Form von genetischen Defekten, können daraus systemische Entzündungen resultieren. So kann es z.B. durch das Fehlen des IL-1Ra, als einem der wichtigsten negativen Regulatoren der Inflammation,

zu lebensbedrohlichen Erkrankungen kommen, die sich vor allem an Haut und Skelett manifestieren (Reddy, Jia et al. 2009), (Aksentijevich, Masters et al. 2009), (Schmitz, Weber et al. 2011). Wie komplex dabei das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren ist, soll nun im Folgenden am Beispiel des IL-1-Signalweges verdeutlicht werden.

### 1.3 Der Interleukin-1-Signalweg

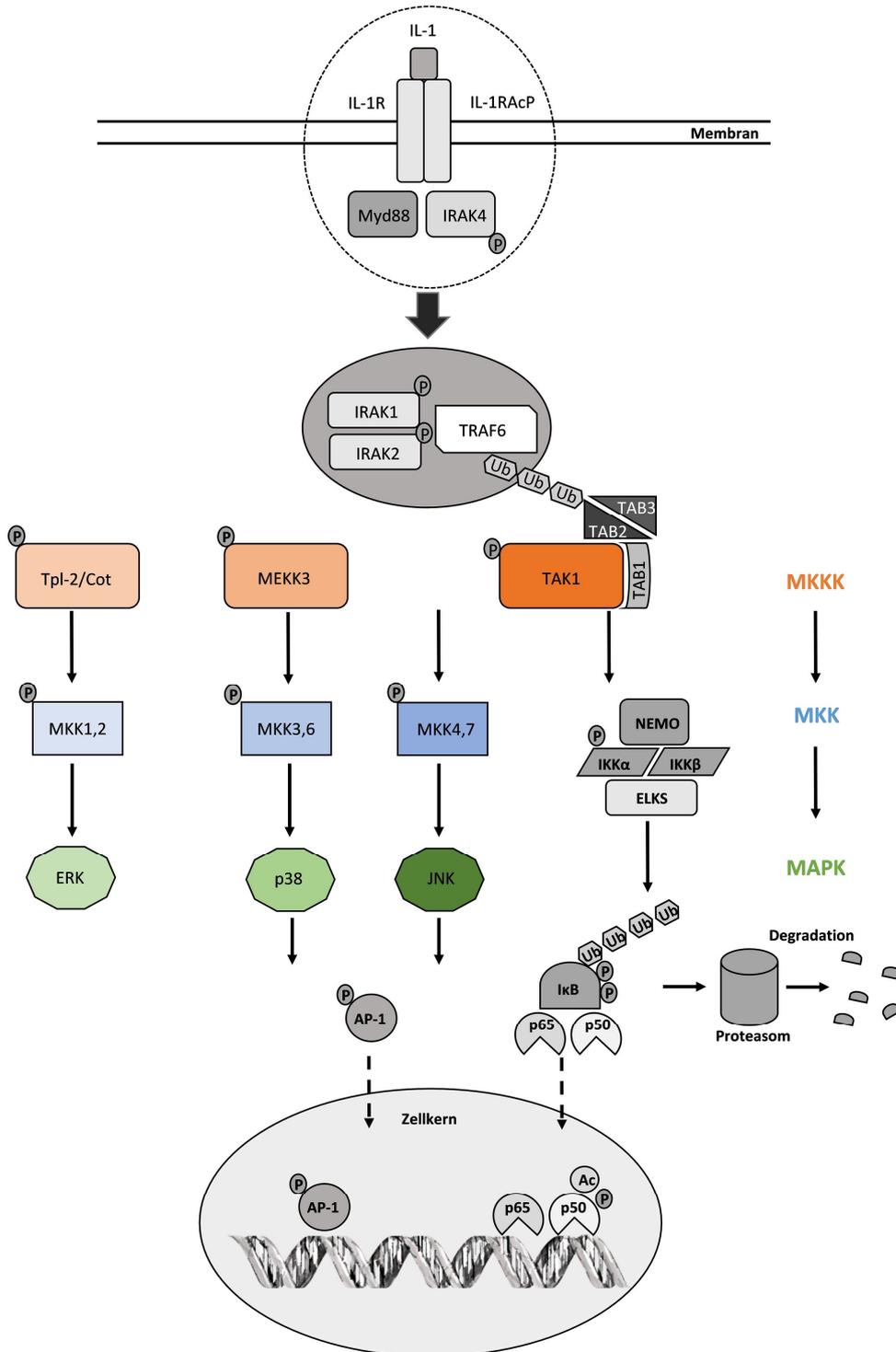
Die Zytokine IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  binden sowohl an den Typ I, als auch den Typ II Interleukin-Rezeptor (IL-1RI bzw. IL-1RII). Dabei wird nur am IL-1RI (Sims et al. 1993) und unter Beisein des *IL-1 receptor accessory protein's* (IL-1RAcP) eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst. Dem IL-1RII fehlen hierfür essentielle zytosolische Domänen (Dinarello 2005). Das IL-1RAcP ist ein Transmembranprotein, das über eine Protein-Kinase-C-Bindestelle und eine GTPase Domäne verfügt (Wesche, Korherr et al. 1997).

Zu Beginn des Signalweges erfolgt eine Konformationsänderung an der extrazellulären Domäne des IL-1RI, die durch die Bindung des Liganden (IL-1 $\alpha$  oder IL-1 $\beta$ ) ausgelöst wird. Außerdem kommt es extrazellulär zur Anlagerung des IL-1RAcP an den IL-1-Rezeptorkomplex, wodurch wiederum intrazellulär die zytoplasmatischen Bereiche von IL-1RI und IL-1RAcP miteinander interagieren können (Wesche, Korherr et al. 1997). Dieser heterotrimere Komplex führt in der Zelle über sogenannte Toll- und IL-1R-like (TIR)-Domänen dazu, dass sich im Zytosol zwei Signalproteine aneinander lagern (Radons et al. 2003). Dies ist zum einen das Myd88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), zum anderen IRAK4 (*Interleukin-1 receptor-activated protein kinase 4*, auch p60 genannt) (Brikos et al. 2007). IRAK4 wird zunächst durch Autophosphorylierung aktiviert und induziert dadurch die Phosphorylierung von IRAK1 und 2 (Kawagoe, Sato et al. 2008). Hierdurch kommt es zur Rekrutierung von TRAF6 (*tumor necrosis factor-associated factor 6*) (Cao et al. 1996). IRAK1, IRAK2 und TRAF6 bilden dann einen Signaltransduktionskomplex, welcher sich schließlich vom ursprünglichen Ligand-Rezeptor-Komplex ablöst und den intrazellulären Teil der Signalkaskade aktiviert. TRAF6 ist dabei, zusammen mit dem Ubiquitin-E2-Ligase-Komplex (zusammengesetzt aus UBC13 (*ubiquitin-conjugating enzyme E2 N*) und UEV1A (*ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1A*)), als Ubiquitin-E3-Ligase aktiv (Deng et al. 2000). Durch deren Wirken kommt es zur K(Lysin)63-verknüpften Polyubiquitinierung verschiedener Proteine, wie z.B. auch IRAK1 (Newton et al. 2008) oder den Adapterproteinen TAB2 und TAB3 (*Transforming growth factor- $\beta$*

(*TGF-β*) *activated protein kinase-binding protein 2* und 3). Im Gegensatz zur K48-Ubiquitinierung, die den proteasomalen Abbau von Proteinen induziert, ermöglicht die K63-Ubiquitinierung die Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen (Wang, Xu et al. 2002). TAB2 und TAB3 binden nach der Polyubiquitinierung TAK1 (*TGF-β-activated protein kinase 1*) und können dieses Protein so mit TRAF6 verlinken (Ishitani et al. 2003). Dabei liegt TAK1 im Komplex mit seinem spezifischen Aktivator TAB1 vor, der mit seiner C-terminalen Domäne an den N-Terminus von TAK1 bindet. TAK1 kann nur in diesem Zustand vollständig aktiviert werden (Sakurai et al. 2000). Auch TAK1 wird ubiquitiniert und kann so direkt mit TRAF6 oder auch MEKK3 (*mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase kinase 3*) assoziieren (Yamazaki et al. 2009).

Ein weiterer wichtiger Schritt ist die Oligomerisation von TRAF6 an seiner C-terminalen TRAF-Domäne. Dadurch können sich die N-terminal gelegenen, variablen Effektor-domänen räumlich annähern und so ihre Aufgabe, die Aktivierung weiterer Kinasen, wahrnehmen (Baud et al. 1999). MEKK3 und TAK1 zählen zu den MAPK Kinase Kinasen (MKKKs), die wiederum MAPK Kinasen (MKKs), wie beispielsweise MKK3, 4, 6 und 7 an Serinen phosphorylieren und dadurch aktivieren können (Yao et al. 2007). Die MKKs aktivieren ihrerseits dann, wie ihr Name suggeriert, spezifisch MAP Kinasen (MAPKs), die durch ihr TxY-Motiv definiert sind und zweifache Phosphorylierung benötigen, um in den aktiven Zustand überzugehen (Kyriakis and Avruch 2001). Zu den MAPKs gehören z.B. ERK 1 und 2 (*extracellular signal regulated kinase 1* und 2), drei verschiedene JNKs (1, 2, 3) (*c-Jun N-terminal kinase*) und die p38 MAPK (Yang, Sharrocks et al. 2003). Die MAPKs spielen z.B. über die posttranslationale Modifikation von Transkriptionsfaktoren, eine wichtige Rolle in der weiteren Signaltransduktion von Stress- und Inflammationsvorgängen in der Zelle (Kyriakis and Avruch 2001). Für eine genauere Beschreibung der Wirkungsweise der MAPKs siehe Kapitel 1.3.1 und 1.3.2.

Die MKKKs aktivieren außerdem den sogenannten I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK), der über die Phosphorylierung und anschließende Degradation von inhibitorischen  $\kappa$ B-Proteinen (I $\kappa$ B) den NF $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*)-Signalweg in Gang setzt (Holtmann, Enninga et al. 2001). Dies stellt einen der bedeutendsten Regulationsschritte dieses pro-inflammatorischen Signalweges dar und wird auch der Fokus der folgenden Arbeit sein. Eine detaillierte Beschreibung folgt ab Kapitel 1.4. Wichtige Regulationsschritte des IL-1-Signalweges zeigt schematisch Abbildung 2.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung wichtiger Komponenten und Regulationschritte des IL-1-Signalweges

Nach Bindung von IL-1 an den IL-1-Rezeptor (IL-1R) kommt es zur Ausbildung eines Rezeptorsignalkomplexes (gestrichelte Ellipse). Dieser führt zur Aktivierung eines zweiten Signaltransduktionskomplexes (dunkelgrauer Kreis), bestehend aus IRAK1, 2 und TRAF6. Dieser dissoziiert vom Rezeptor und aktiviert die Signalkaskade im Zytoplasma. Dies erfolgt über die Phosphorylierung und damit Aktivierung verschiedener MKKKs (orange). Die MKKKs können dann wiederum MKKs (blau) aktivieren, die dann MAPKs (grün) in Gang setzen. Diese können ihre Funktion z.B. über die Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren ausüben, die schließlich an der DNA binden und spezifische Gene induzieren. Der TAK1/TAB1-Komplex bewirkt außerdem eine Aktivierung des NFκB-Signalweges über den IKK-Komplex (bestehend aus NEMO, IKKα und β, ELKS) und die nachfolgende Degradation von IκB (rechte Seite). Phosphorylierungen (P) und Ubiquitinierungen (Ub), sowie Acetylierungen (Ac) regulieren den Signalweg an den unterschiedlichsten Stellen. Modifiziert nach (Kracht and Saklatvala 2002), Lizenznummer: 4717170137691 und (Schmitz, Mattioli et al. 2004), Lizenznummer: 4717161427252.

Im Folgenden werden einige beteiligten Faktoren und deren Funktionen genauer dargestellt. Hierbei wird auf die Transkriptionsfaktoren der NF $\kappa$ B-Familie (v.a. p65) und die inhibitorischen  $\kappa$ B-Proteine (v.a. I $\kappa$ B $\alpha$ ), sowie deren Zusammenwirken, besonderes Augenmerk gelegt. Es schließt sich eine Darstellung des p65-Interaktoms, sowie die Charakterisierung zweier putativer Interaktionspartner von p65, DCP1a und LMO7, an. Im Zusammenhang mit DCP1a wird dabei näher auf die *p-bodies* (*processing bodies*) und den mRNA (*messenger ribonucleic acids*)-Abbau eingegangen. Es folgt dann eine Darstellung der Funktionen von LMO7, sowohl als Mediator in Zell-Zell-Kontakten, als auch als Regulator der Transkription. Für die Verifizierung dieser möglichen Interaktionen mit p65 wurde in dieser Dissertation hauptsächlich mit dem *Proximity Ligation Assay* gearbeitet. Das vorletzte Kapitel der Einleitung beschäftigt sich deshalb mit den Grundprinzipien dieses Verfahrens. Die genaue Durchführung wird dann im Abschnitt Methoden dargestellt.

### **1.3.1 Die Rolle der MAP Kinase JNK und der Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie bei zellulären Vorgängen der Entzündung**

JNK ist eine MAP Kinase, die durch die TAK1/MEKK3-aktivierten MAPK Kinasen MKK 4 und 7 angeschaltet wird (Krause et al. 1998), (Finch et al. 2001). JNK selbst phosphoryliert und aktiviert Mitglieder der AP-1-Transkriptionsfaktorenfamilie, vor allem c-Jun und ATF-2 (*activating transcription factor 2*) (Cirillo et al. 1999). AP-1-Transkriptionsfaktoren sind Heterodimere, welche aus Mitgliedern der JUN-, FOS-, Maf- und ATF-Familie zusammengesetzt sein können (Karin, Liu et al. 1997), (De Bosscher, Vanden Berghe et al. 2003). Sie werden durch verschiedenste Stimuli, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine, zellulären Stress oder bakterielle und virale Infektionen über die im vorangegangenen Kapitel beschriebene Signalkaskade aktiviert (De Bosscher, Vanden Berghe et al. 2003). Die AP-1-Transkriptionsfaktoren sind an multiplen biologischen Prozessen in der Zelle beteiligt, wozu auch die Regulation von Zellproliferation und -differenzierung durch die Initiation der entsprechenden Gene gehört (Shaulian and Karin 2002). Des Weiteren kann das Ausmaß von Entzündungsvorgängen im Körper durch die AP-1-Faktoren über verschiedene Mechanismen moduliert werden (Wagner and Eferl 2005). Hierzu beeinflussen die Faktoren der AP-1-Familie die Transkription von *immediate-early*-Genen, welche zur Induktion einer Entzündungsreaktion beitragen. Dabei wird die Expression dieser Gene zum einen über eine variable Komposition der AP-1-Dimere, zum anderen auch über deren posttranslationale Modifikationen, wie die oben beschriebene Phosphorylierung durch MAPKs, gesteuert (Karin 1995).

### **1.3.2 mRNA-Stabilisation und posttranslationale Modifikation von Transkriptionsfaktoren durch die p38 MAP Kinase**

Die Hauptaufgabe der vorwiegend im Zytoplasma lokalisierten MAP Kinase p38 besteht in der Stabilisierung von mRNAs. Diese müssen, um mit p38 interagieren zu können, AREs (*adenine-uridine-rich elements*) beinhalten. Instabile, durch IL-1-induzierte Transkripte, wie beispielsweise *IL-8* oder *IκBα*, würden ohne p38 schneller abgebaut werden und könnten so nicht mehr zur Immunantwort der Zelle beitragen (Winzen, Kracht et al. 1999), (Holtmann et al. 1999). Dabei wird die mRNA zum einen durch eine Phosphorylierung und damit Inaktivierung des mRNA-destabilisierenden Faktors KSRP (*KH-type splicing regulatory protein*) direkt p38-abhängig stabilisiert (Briata et al. 2005). Zum anderen erfolgt eine indirekte Stabilisation der Transkripte, indem p38 die MK2 (*MAPK-activated protein kinase 2*) aktiviert (Mahtani, Brook et al. 2001) (Winzen, Kracht et al. 1999). Diese induziert die Phosphorylierung von Tristetraprolin (TTP), einem weiteren mRNA-destabilisierenden Faktor und blockiert dadurch dessen Funktion (Mahtani, Brook et al. 2001). Außerdem phosphoryliert p38 auch direkt Transkriptionsfaktoren wie MEF2C (*myocyte-enhancer factor 2C*), welcher wiederum für die Induktion von c-Jun (Mitglied der AP-1-Transkriptionsfaktoren-Familie, s.o.) verantwortlich ist (Han, Jiang et al. 1997). Durch Phosphorylierung und Phosphoacetylierung von Histon H3 kann p38 weiterhin die Rekrutierung von NFκB-Transkriptionsfaktoren an Promotoren und damit die Induktion Stimulus-abhängiger Gene, wie z.B. Zytokinen und Chemokinen, fördern (Saccani, Pantano et al. 2002).

## **1.4 NFκB**

### **1.4.1 Die Familie der NFκB-Transkriptionsfaktoren - Aufbau und Aufgaben**

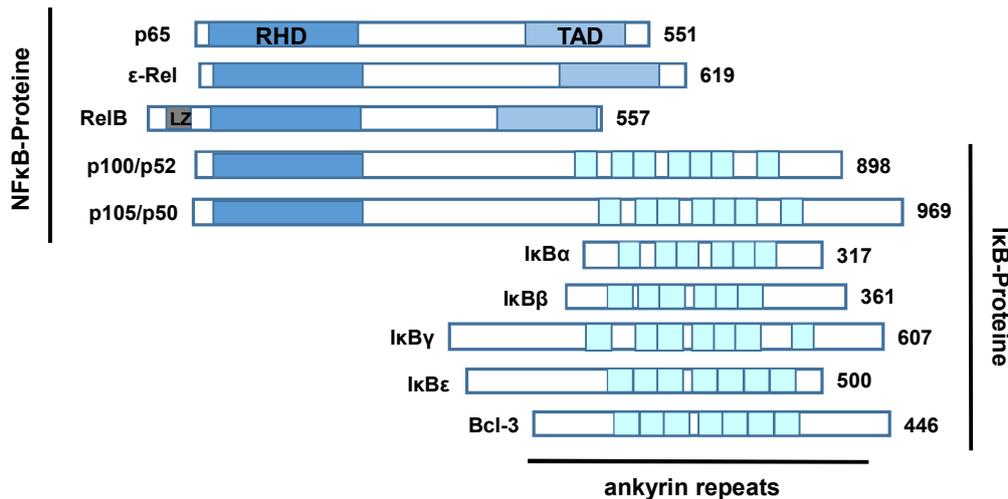
Die NFκB-Familie stellt ein System verschiedener Transkriptionsfaktoren dar, welche grundlegende Funktionen, wie z.B. die Proliferation und Differenzierung einer Zelle, steuern. Die NFκB-Faktoren übernehmen aber auch eine wichtige Rolle in den Bereichen Immunantwort und Tumorentstehung (Schmitz, Weber et al. 2011).

Es existieren fünf verschiedene Untereinheiten, p65 (RelA), c-Rel, RelB, p52 (gebildet aus dem Vorläuferprotein p100) und p50 (gebildet aus dem Vorläuferprotein p105). Wie Abbildung 3 zeigt, stellt die N-terminal lokalisierte *rel homology domain* (RHD) ein gemeinsames Merkmal der NFκB-Faktoren dar. Über diese können z.B. die Dimerisierung der NFκB-Untereinheiten, die Bindung an die DNA oder auch Interaktionen mit weiteren Proteinen vermittelt werden (Ghosh and Karin 2002). Die drei Faktoren p65, RelB und c-Rel verfügen zusätzlich über C-terminal gelegene

Transaktivierungsdomänen (TAD) (Hatada et al. 1993), über welche sie die Transkription verschiedener Zielgene induzieren (vgl. Abbildung 3).

Die Mitglieder der NFκB-Familie kommen als Homo- oder Heterodimere vor und haben je nach Zusammensetzung unterschiedliche Funktionen. Über die p65-Untereinheit wird z.B. die stärkste transkriptionelle Aktivität vermittelt. Hierdurch werden beispielsweise pro-inflammatorische Gene induziert (Schmitz and Baeuerle 1991). Am häufigsten kommt p65 im Komplex mit p50 als Heterodimer vor (Schmitz, Weber et al. 2001). Die Faktoren p50 und p52 sind transkriptionell inaktiv, so dass Homodimere aus diesen Untereinheiten die Transkription nicht fördern bzw. diese sogar reprimieren können (Schmitz and Baeuerle 1991). Des Weiteren ergeben sich durch die Zusammensetzung Abstufungen darin, wie schnell die Dimere die Transkription initiieren. Heterodimere aus p65 und p50 führen zu einer schnellen Aktivierung, während Dimere aus p52 und RelB die Transkription verzögert in Gang setzen (Saccani et al. 2003), (Schmitz, Mattioli et al. 2004).

Besonderes Augenmerk wurde in dieser Dissertation auf die beiden Faktoren p65 und p50 gelegt. Der 551 Aminosäuren große Transkriptionsfaktor p65 besitzt im C-terminalen Bereich zwei sehr potente Transaktivierungsdomänen, welche diesen zum transkriptionell aktivsten Mitglied der NFκB-Familie machen (Schmitz and Baeuerle 1991). Das transkriptionell inaktive p50 wird im Zytoplasma sowohl konstitutiv, als auch Stimulus getriggert, aus seinem Vorläuferprotein p105 synthetisiert. Dabei gehen p50 und p105 aus dem *NFKB1*-Gen hervor (Ghosh et al. 1990). Der N-terminale Bereich von p105 stellt die prä-mature Form des p50 dar und beinhaltet dessen charakteristische RHD. Dagegen befinden sich im C-terminalen Bereich des p105-Proteins *ankyrin-repeats*, welche typisch für inhibitorische κB-Proteine sind (Rice, MacKichan et al. 1992). p50 wird durch unvollständigen proteasomalen Abbau aus p105 hervorgebracht. Hierbei spielen auch kotranslationale Dimerisierungen im Bereich der sd2-Subdomäne (*second subdomain 2*) in der RHD eine wichtige Rolle (Lin et al. 2000).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Aufbaus von NFκB- und IκB-Proteinen

Die NFκB-Proteine zeichnen sich durch N-terminale *Rel homology domains* (RHD) und C-terminale Transaktivierungsdomänen (TAD) aus. Das Protein RelB besitzt zusätzlich im N-Terminus einen Leuzin-*zipper* (LZ). Die IκB-Proteine tragen alle sechs bis sieben *ankyrin-repeats*. Die Zahlen rechts repräsentieren die Anzahl der Aminosäuren. Modifiziert nach (Schmitz, Mattioli et al. 2004), Lizenznummer: 4717161427252.

#### 1.4.2 Funktion posttranslationaler Modifikationen an NFκB-Faktoren

Neben der variierenden Zusammensetzung der Heterodimere durch die NFκB-Untereinheiten, stellen posttranslationale Modifikationen (PTMs) an den Faktoren eine weitere Möglichkeit zur Regulation des NFκB-Signalweges dar. Die PTMs modulieren die Funktion der Proteine in Bezug auf beispielsweise Interaktionen mit Ko-Aktivatoren oder Ko-Repressoren (Hoberg, Popko et al. 2006), (Dong, Jimi et al. 2008), sowie deren Bindung an Bestandteile der basalen Transkriptionsmaschinerie (Nowak, Tianet et al. 2008). Zu den wichtigsten PTMs im NFκB-Signalweg zählen u.a. Acetylierungen, Ubiquitinierungen und Phosphorylierungen (Wietek and O'Neill 2007).

Acetylierungen an unterschiedlichen Stellen des NFκB p65 können dabei verschiedene Auswirkungen auf dessen Funktion haben. Die am Lysin 310 acetylierte Form des p65 hat z.B. eine höhere Transkriptionsaktivität (Chen, Williams et al. 2005), während Acetylierungen von p65 an anderen Aminosäuren eher eine negative Regulation der Transkriptionsrate bewirken. Die Deacetylierung von p65 an den Lysinen 314 und 315 durch HDAC3 (Histon Deacetylase 3) kann die Transkriptionsaktivität von p65 steigern (Ziesche, Kettner-Buhrow et al. 2013).

Die NFκB-Antwort kann auch durch Ubiquitinierung der p50- und p65-Untereinheiten reguliert und terminiert werden. Hierbei folgt auf eine spezifische Ubiquitinierung eine proteasomale Degradation der an die DNA gebundenen Proteine (Ryo, Suizu et al. 2003), (Saccani, Marazzi et al. 2004). Durch die Bindung von COMMD1 (*copper metabolism gene MURR1 domain-containing Protein 1*) und cullin 2,

welche beide Bestandteile eines Ubiquitin-Ligase-Komplexes sind, kann z.B. das p65 ubiquitiniert und anschließend proteasomal degradiert werden. Die Proteinbindung an COMMD1 bzw. cullin 2, ist wiederum von der Phosphorylierung des p65 an Serin 468 abhängig (Geng, Wittwer et al. 2009). Hier wird deutlich, wie eng das Zusammenspiel der verschiedenen posttranslationalen Modifikationen in der Regulation des NFκB-Signalweges ist.

Die Phosphorylierung von p65 an Serin 536, welches sich im Bereich der Transaktivierungsdomäne 1 am C-terminalen Ende des Proteins befindet, stellt nur eine von vielen weiteren Beispielen an posttranslationalen Modifikationen dar. Die Phosphorylierung von p65 an dieser Stelle erfolgt durch eine Vielzahl an Proteinkinasen. Hierzu zählen zum Beispiel CDK6 (*cyclin-dependent kinase 6*) (Buss, Handschick et al. 2012), IKKα und β (IκB Kinase α und β) oder TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) (Buss, Dorrie et al. 2004), (Sakurai, Chiba et al. 1999). Diese spezifische Phosphorylierung an Serin 536 verstärkt den Import von zytosolischem p65 in den Zellkern (Mattioli, Sebald et al. 2004). Im Zellkern selbst moduliert die Phosphorylierung an Ser536 die Bindung an Ko-Repressoren und Ko-Aktivatoren, wie beispielsweise an Untereinheiten von TFIID (Transkriptionsfaktor IID), worüber eine verstärkte Transaktivierung des *IL-8*-Genes stattfinden kann (Buss, Dorrie et al. 2004).

## 1.5 Aufgabe und Funktion inhibitorischer κB-Proteine

Einer der wichtigsten Regulationsmechanismen im NFκB-Signalweg ist die Inaktivierung der NFκB-Dimere durch inhibitorische κB (IκB)-Proteine (Baeuerle and Baltimore 1996). Diese Proteine gehören zu einer hochkonservierten Genfamilie, die in vielen Organismen zu finden ist. Zu den in Säugetieren gefundenen IκB-Proteinen, gehören IκBα, IκBβ (Baeuerle et al. 1988), IκBε (Whiteside et al. 1997), IκBγ (Inoue et al. 1992), IκBNS (Fiorini et al. 2002), Bcl-3, p100 und p105 (Rice et al. 1992), (Mercurio et al. 1993). Kennzeichnend für diese Proteine sind besondere Protein-Protein-Interaktionsdomänen, die bereits oben erwähnten *ankyrin-repeats* (siehe Abbildung 3) (Hatada, Naumann et al. 1993). Über diese können z.B. NFκB-Untereinheiten gebunden und im Zytoplasma retiniert werden, so dass sie nicht als Transkriptionsfaktoren im Zellkern aktiv werden (Ghosh and Baltimore 1990). Auch hier gibt es zwischen den einzelnen Vertretern der Familie Unterschiede in Funktion und Lokalisation. IκBβ beispielsweise ist ein ausschließlich zytoplasmatisches Protein, welches die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) von p65 und p50 maskieren kann. Das IκBα dagegen, welches eine zentrale Rolle in der vorliegenden Promotion einnimmt, kommt sowohl im Zytoplasma, als auch

im Zellkern vor. Im Komplex mit p65 kann I $\kappa$ B $\alpha$  die NLS von p65 verhüllen und damit die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern blockieren, wodurch dieses in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor inaktiviert wird (Schmitz, Mattioli et al. 2004), (Haskill et al. 1991), (Verma, Stevenson et al. 1995).

Die Proteinbindung zwischen NF $\kappa$ B-Faktoren und den inhibitorischen  $\kappa$ B-Proteinen kann durch unterschiedliche Stimuli, wie z.B. IL-1, und die dadurch induzierten Modifikationen an den I $\kappa$ B-Proteinen, zu großen Teilen aufgehoben werden (Henkel et al. 1993). Anschließend können die nun freien heterodimeren Transkriptionsfaktoren zu ihrer Ziel-DNA-Sequenz in den Zellkern translozieren und die Transkription pro-inflammatorischer Gene herbeiführen. Diese Auflösung der I $\kappa$ B/NF $\kappa$ B-Komplexe wird oft auch als kanonische oder klassische NF $\kappa$ B-Aktivierung bezeichnet (Ben-Neriah and Schmitz 2004). Dabei muss darauf hingewiesen werden, dass es auch im basalen Zustand der Zelle zu einem ständigen Auf- und Abbau von I $\kappa$ B-Proteinen und damit zur Regulation der NF $\kappa$ B-Dimere kommt (Rice and Ernst 1993). Für das I $\kappa$ B $\alpha$  gibt es also im basalen Zustand ohne externe Stimuli einen *steady state* zwischen Degradation und Neusynthese. Kommt dieser *steady state* aus dem Gleichgewicht, z.B. zugunsten der Degradation, während die Syntheserate gleichbleibt, kommt es dazu, dass NF $\kappa$ B frei wird und konstitutiv in den Zellkern translozieren kann, bevor es von neu synthetisiertem I $\kappa$ B $\alpha$  gebunden wird (Miyamoto, Chiao et al. 1994).

## 1.6 Klassische Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges

Der entscheidende Schritt für die Aktivierung der NF $\kappa$ B-Faktoren über die Degradation inhibitorischer  $\kappa$ B-Proteine und damit die Auflösung des Komplexes, besteht darin, dass der aktivierte TAK1/TAB1-Komplex zur Aktivierung des I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes führt (siehe Abbildung 2). Dieser Kinasekomplex besteht aus mehreren Untereinheiten, wobei IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  die katalytischen Untereinheiten darstellen (Hu et al. 1999). Sie besitzen eine N-terminal gelegene katalytisch aktive Domäne, Leuzin-*zipper* und ein C-terminales *helix-loop-helix*-Motiv, über welches die beiden Kinasen direkt miteinander interagieren (Schmitz, Mattioli et al. 2004). Der dritte Bestandteil des IKK ist die regulatorische Untereinheit NEMO (NF $\kappa$ B *essential modifier*), welche an Polyubiquitinketten von einigen Molekülen, wie z.B. IRAK1 (Windheim et al. 2008) oder an TAB2- oder TAB3-gebundenes TAK1, binden kann. Die Literatur beschreibt viele weitere Proteine, die sich an den IKK anlagern. Hierunter scheint z.B. das ELKS-Protein für eine vollständige Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges und auch für die Rekrutierung von I $\kappa$ B $\alpha$  an den IKK essentiell zu sein (Israël 2010).

Der IKK wird IL-1-abhängig über die Kinase TAK1 aktiviert. Diese wiederum wird über TRAF6 und die Adaptorproteine TAB2 oder TAB3 rekrutiert (Kanayama et al. 2004) (siehe auch Abbildung 2). Es spielen vor allem Phosphorylierungen von IKK $\beta$  an zwei Stellen, den sogenannten *activation-loops*, eine entscheidende Rolle für diese Art der Aktivierung des IKK (Delhase, Hayakawa et al. 1999). Weiterhin kann die IKK-Aktivität durch Transautophosphorylierungen oder Phosphorylierungen durch verschiedene *upstream*-Kinasen erhöht werden. In der phosphorylierten Form ist der IKK aktiv und kann dann selbst I $\kappa$ B $\alpha$  an Serin 32 und 36 phosphorylieren (Schmitz, Mattioli et al. 2004). Diese Phosphorylierungen dienen als Initiatoren für eine Ubiquitinierung an K48 woraufhin I $\kappa$ B $\alpha$  nachfolgend im Proteasom degradiert wird. Die NF $\kappa$ B-Untereinheiten werden so aus ihrer Bindung mit den I $\kappa$ B-Proteinen frei gegeben und können nun mit Hilfe ihrer NLS und der Bindung dieser an Importin  $\alpha$ 3 und 4 (Fagerlund, Kinnunen et al. 2005), sowie durch das Mikrotubulussystem (Rosette and Karin 1995) in den Zellkern gelangen (Ghosh and Baltimore 1990), (Schmitz, Mattioli et al. 2004), (Ziesche, Kettner-Buhrow et al. 2013), (Weber, Wasiliew et al. 2010).

Obwohl der Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  nach Stimulation in manchen Zellsystemen nahezu vollständig ist, transloziert nur ein geringer Teil (ca. 10-20 %) der NF $\kappa$ B-Dimere direkt in den Zellkern. Erklären lässt sich dies damit, dass die NF $\kappa$ B-Proteine auch noch an andere inhibitorische Proteine binden. Außerdem könnten weitere Modifikationen, z.B. Phosphorylierungen, nötig sein, damit die Dimere in den Zellkern gelangen können (Miyamoto, Chiao et al. 1994), (Verma, Stevenson et al. 1995).

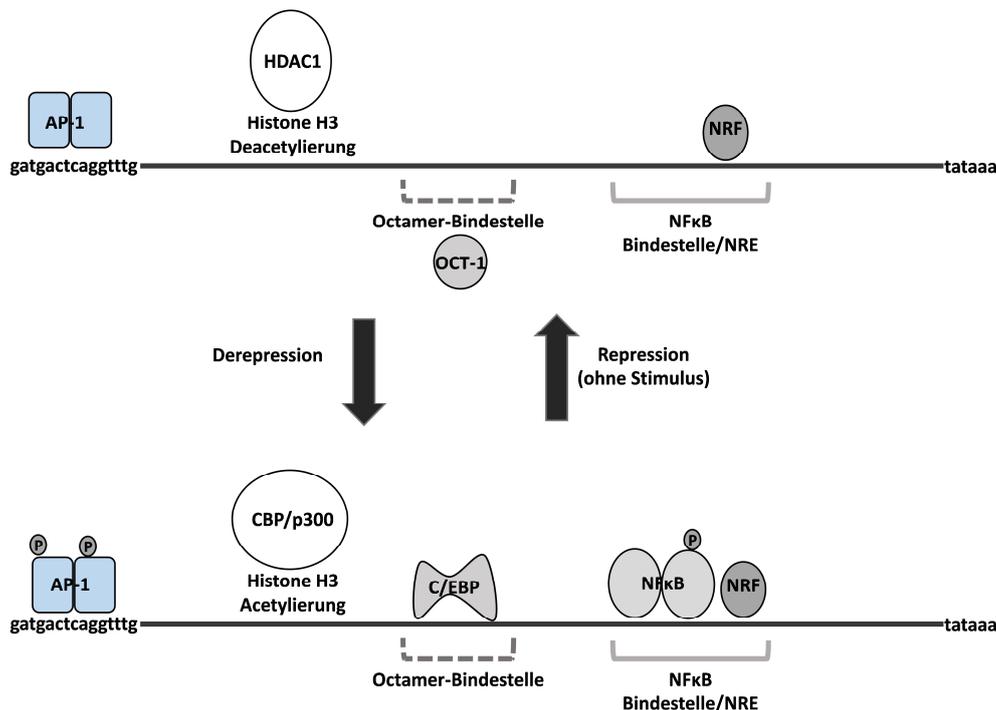
### **1.7 Die Wirkung von NF $\kappa$ B im Zellkern am Beispiel des *IL-8*-Promotors**

Eine der wichtigsten Aufgaben des NF $\kappa$ B-Signalweges ist die Regulation der Transkription verschiedener pro-inflammatorischer Zielgene. Unter diesen gehört das *IL-8* zur Familie der Chemokine. Diese sind eine Gruppe relativ kleiner Proteine (ca. 8-14 kD), die unter anderem auch für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten aus der Blutbahn an den Ort des Entzündungsgeschehens zuständig sind (Zlotnik and Yoshie 2000).

Der *IL-8*-Genlocus besteht aus vier Exons, drei Introns und einer TATA- und CAT-ähnlichen Struktur (Mukaida, Okamoto et al. 1994). Abbildung 4 zeigt einen Ausschnitt der proximalen, regulatorischen Promotorregion des *IL-8*-Gens. Im oberen Abschnitt der Abbildung ist der Promotor im unstimulierten Zustand dargestellt. Ohne Stimuli, wie z.B. IL-1, ist die Transkription von *IL-8* über verschiedene Mechanismen reprimiert. So bindet beispielsweise der NRF (*NF $\kappa$ B-repressing factor*) an das NRE

(*negative response element*), welches teilweise mit der Bindungsstelle von NFκB übereinstimmt (Nourbakhsh, Kaelble et al. 2001). Weiterhin wird durch Bindung von OCT-1 (*Octamer-1*) gegenüber der C/EBP-Bindestelle (*CCAAT/enhancer-binding protein*) (Wu, Lai et al. 1997) und über die H3 Deacetylierung von Histonen durch HDAC1 (Histon Deacetylase 1) (Ashburner, Westerheide et al. 2001) die Transkription von *IL-8* gehemmt.

IL-1-abhängig kommt es zur Translokation von z.B. p65/p50 NFκB-Dimeren in den Nukleus. Diese binden dann an die NFκB-Bindestelle in der Nähe von NRF, was dazu führt, dass nun der *repressing factor* als Ko-Aktivator wirkt (vgl. unterer Teil der Abbildung 4) (Stein and Baldwin 1993). Zusätzlich bindet C/EBP β an der C/EBP-site. Weiterhin führt CBP(*cAMP-responsive element-binding protein-binding protein*)/p300 zur Hyperacetylierung von Histonen und damit zur besseren Zugänglichkeit des Chromatins (Vanden Berghe, De Bosscher et al. 1999). Auch die Phosphorylierung von AP-1-Transkriptionsfaktoren und NFκB-Untereinheiten führt zu einer verstärkten Induktion der Transkription von *IL-8* nach Stimulation mit z.B. IL-1α. IL-1-abhängig wird außerdem die Polymerase-II an den Promotor rekrutiert und somit die Transkription des Genes initiiert (Hoffmann, Dittrich-Breiholz et al. 2002).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des *IL-8*-Promotors und seiner Regulation im basalen und stimulierten Zustand

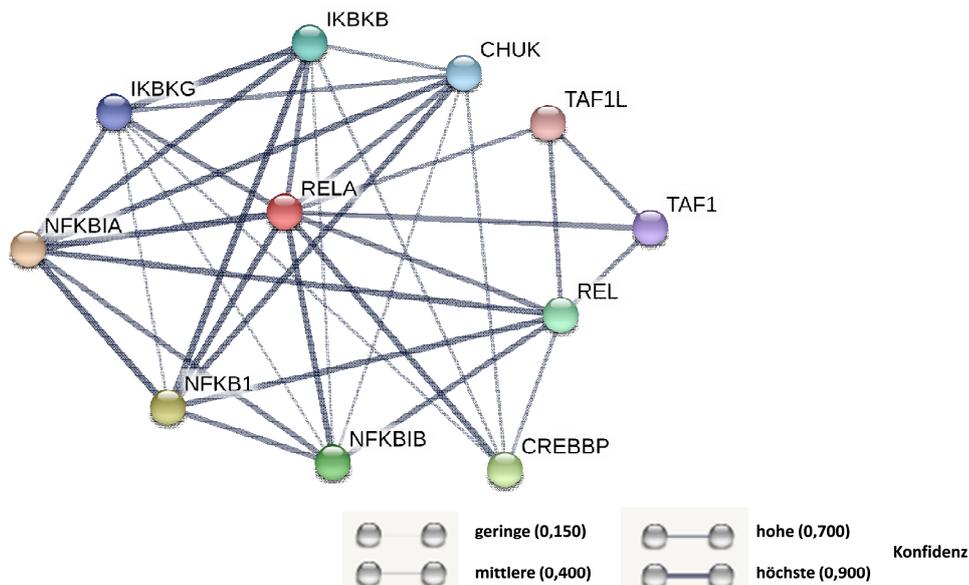
Oberer Abschnitt: Im unstimulierten Zustand der Zelle wird die *IL-8*-Expression durch verschiedene Mechanismen, wie der Bindung von NRF oder OCT-1, sowie der Deacetylierung von H3 Histonen blockiert. AP-1-Faktoren können bereits gebunden sein.

Unterer Abschnitt: Nach Stimulation mit IL-1 kommt es zur Induktion von *IL-8* durch Acetylierung von Histonen, Bindung von C/EBP, sowie NFκB an die entsprechenden Bindestellen. NRF fungiert nun als Ko-Aktivator. Durch Phosphorylierungen (P) der Transkriptionsfaktoren wird ebenfalls die Genexpression gefördert. Modifiziert nach (Hoffmann, Dittrich-Breiholz et al. 2002).

## 1.8 Das p65-Interaktom

Die Wirkungsweise der NFκB-Faktoren wird durch die Rekrutierung von Ko-Faktoren äußerst fein reguliert und kann entsprechend stark variieren.

Für das p65-Protein existieren laut der BioGRID-Datenbank (am 09.12.2018) 319 eindeutige Interaktionspartner (BioGRID 3.4 Database). Dadurch zählt p65 definitiv zu den NFκB-Faktoren, die äußerst viele Wechselbeziehungen mit Ko-Repressoren und Ko-Aktivatoren eingehen. Die im Kapitel 1.5 beschriebene Interaktion mit dem inhibitorischen κB-Protein α (IκBα) ist in der Datenbank mit über 49 Referenzen die am besten beschriebene Interaktion von p65. Auch die Wechselbeziehung mit dem CREBBP (=CBP), einem Faktor, der Aktivatoren der Transkription mit der basalen Transkriptionsmaschinerie verknüpft (Gerritsen, Williams et al. 1997), gehört zu den relativ gut untersuchten p65-Protein-Protein-Interaktionen (24 Referenzen). Viele weitere Proteine, die eine Wechselbeziehung mit p65 eingehen können, wurden bisher nur von einer oder wenigen Arbeitsgruppen untersucht und sollten deshalb vorsichtig interpretiert werden (z.B.: STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) 4 Referenzen; CDK4 (*cyclin-dependent kinase 4*) 1 Referenz) (BioGRID 3.4 Database).



**Abbildung 5:** Ausschnitt aus dem p65-Interaktom

Im Zentrum der Abbildung befindet sich **RelA** (= p65) mit gut validierten bekannten Interaktoren. Die Stärke der Verbindungslinien zeigen den *confidence score* an (siehe Legende, je dicker die Linie, desto höher die Konfidenz der Interaktion). Die Grafik zeigt nur Interaktionen die experimentell nachgewiesen werden konnten. **CHUK** (= IKKα; *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha*); **TAF1L** (= TAF1 RNA Polymerase II; *TATA box binding protein (TBP)-associated factor L*); **TAF1** (= RNA Polymerase II, *TATA box binding protein (TBP)-associated factor*); **REL** (= c-Rel); **CREBBP** (= CBP; *CREB binding protein*); **NFKBIB** (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta*); **NFKB1** (= p105/p50; *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1*); **NFKBIA** (= IκBα; *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*); **IKBKG** (*inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma*); **IKKKB** (*inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta*); Erstellt mit: STRING: *functional protein association networks* (Version 10.5 am 20.06.2017). (Szklarczyk et al. 2017)

Abbildung 5 zeigt einen kleinen Ausschnitt des p65-Interaktoms. Mit p65 als gemeinsamen Bindungspartner in der Mitte wird in der Abbildung deutlich, dass die Bindungspartner von p65 auch teilweise untereinander interagieren. Unter Beachtung der Funktion von p65 als Transkriptionsregulator und Signalvermittler in unterschiedlichsten biologischen Situationen, ist davon auszugehen, dass in den nächsten Jahren noch weitere Interaktionspartner von p65 identifiziert werden (STRING Database 10.5).

## 1.9 DCP1a als putativer Interaktionspartner von p65

Für das Protein DCP1a (*decapping mRNA protein 1a*) wurden bis zum 09.12.2018, 62 eindeutige Interaktionspartner beschrieben (BioGRID 3.4 Database). Durch verschiedene Untersuchungen konnte die Arbeitsgruppe Kracht (Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Gießen) zeigen, dass es eine Verknüpfung des IL-1-Signalweges mit Komponenten des *decapping*-Apparates gibt. Ko-Immunpräzipitationen zeigten, dass DCP1a, als Bestandteil dieses *decapping*-Komplexes, IL-1-abhängig mit der endogenen MAP Kinase JNK und mit überexprimiertem p65 direkt interagiert (Rzeczkowski, Beuerlein et al. 2011). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun eine Methode zur Validierung dieser Interaktion auf Einzelzellebene etabliert werden. Da das DCP1a vorwiegend in den sogenannten *p-bodies* (*processing bodies*) gefunden werden kann, soll zunächst auf diese und deren Funktionen näher eingegangen werden.

### 1.9.1 Aufbau und Funktion der *processing bodies*

1997 sprachen Bashkirov et al. zum ersten Mal von sogenannten *p-bodies*, als sie die Exonuclease XRN1 (*chromatin binding exonuclease XRN1*) in kleinen Aggregaten im Zytoplasma von Säugetierzellen lokalisieren konnten (Bashkirov, Scherthan et al. 1997). Die *p-bodies* können z.B. in der indirekten Immunfluoreszenz, durch Markierung essentieller Komponenten, als deutliche Granula im Zytoplasma detektiert werden. Die elektronendichten Körper, sind ca. 244 nm lang, besitzen keine Membran und sind bi-kompartimentell aufgebaut. Das heißt, dass manche Bestandteile eher in der Peripherie (z.B. DDX6 (*DEAD-(asp-glu-ala-asp)box helicase 6*) zu finden sind und als eine Art Anker für Substrate, sowie zur Aufrechterhaltung der Form der *p-bodies* dienen. Andere Komponenten findet man dagegen eher im Zentrum der *p-bodies*, wo möglicherweise die Degradation der mRNAs stattfindet. Häufig sind die *p-bodies* in räumlicher Nähe von Ribosomen und Mitochondrien lokalisiert (Cougot, Cavalier et al. 2012). Prinzipiell stellen sie

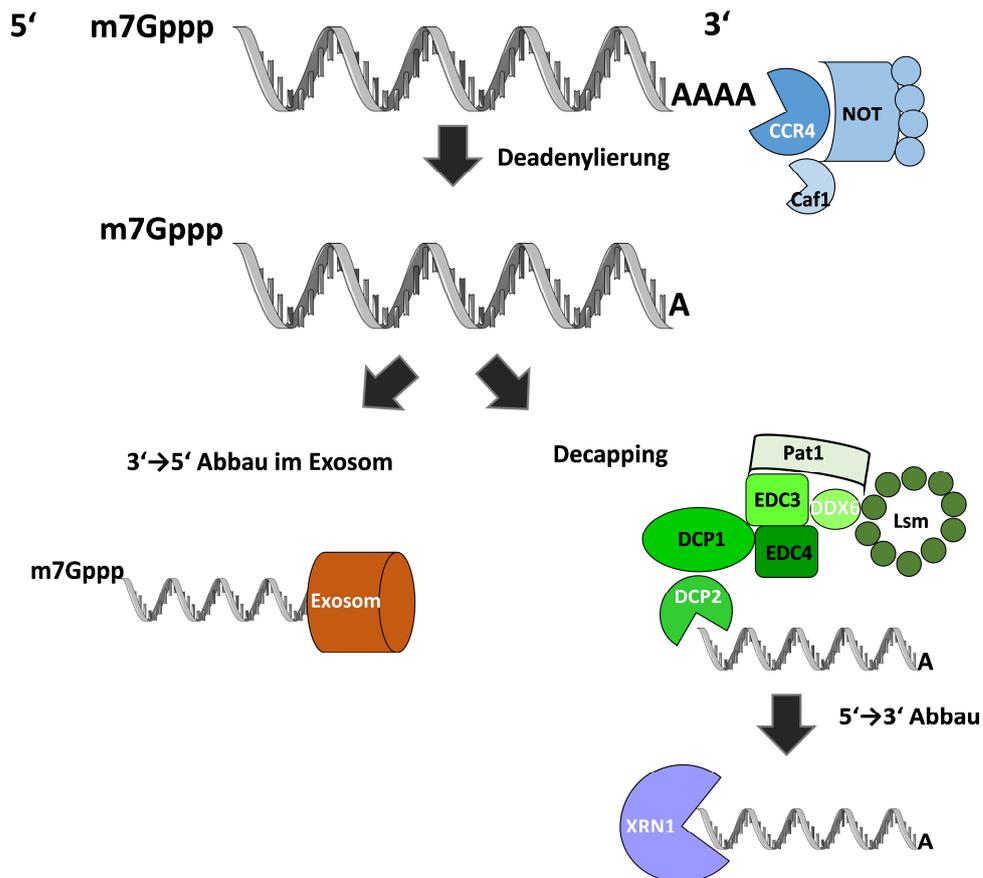
Ribonucleoprotein-Komplexe dar, die viele Faktoren des *decappings* und des 5'→3' Abbaus von mRNAs enthalten (Cougot, Cavalier et al. 2012). Allerdings können mRNAs in den *p-bodies* nicht nur abgebaut sondern auch für eine bestimmte Zeit retiniert bzw. gespeichert werden, um dann gegebenenfalls zu einem späteren Zeitpunkt translatiert zu werden (Brenques et al. 2005). Die Translation von mRNAs in die von ihnen codierten Proteine ist für die Funktionsfähigkeit und den Status einer Zelle maßgeblich. Dadurch stellt dieser Regulationsschritt einen wichtigen Mechanismus dar, um der Zelle die Möglichkeit zu geben auf verschiedenste Stimuli oder Stressoren außer- und innerhalb der Zelle zu reagieren. Diese posttranskriptionelle Regulation unterliegt u.a. den Proteinen und Ko-Faktoren der *p-bodies* (Eulalio, Behm-Ansmant et al. 2007).

### 1.9.2 Aufgaben der Komponenten der *p-bodies*

Für den Abbau von mRNAs stehen im Wesentlichen zwei Systeme in der Zelle zur Verfügung (siehe Abbildung 6). Zum einen findet der Abbau der mRNAs von 3'→5' durch das Exosom statt. Zum anderen erfolgt der Abbau, nach der Entfernung des 7-Methylguanosin *caps* am 5'Ende, dem sogenannten *decapping*, durch die Exonuclease XRN1, in 5'→3' Richtung (Garneau, Wilusz et al. 2007). Beiden Abbauprozessen geht eine Deadenylierung, die Entfernung bzw. Verkürzung des Poly(A)(Adenin)-Schwanzes am 3'Ende der mRNA, durch den Pan2/Pan3 (*poly (A) specific ribonuclease subunit 2* und 3) und CCR4-Caf1-(*CCR4 associated factor 1*)NOT-Komplex, voraus (Tucker, Valencia-Sanchez et al. 2001). Initial dient der Poly(A)-Schwanz der Stabilisierung der mRNA. Dementsprechend ist die Deadenylierung ein wichtiger Schritt für die Einleitung des Abbaus der mRNA und damit das Unterbinden der Translation in die entsprechenden Proteine (Sachs, Sarnow et al. 1997).

Die Enzyme für die Deadenylierung und das *decapping* der mRNAs kommen konzentriert in den *p-bodies* vor, können aber auch im Zytoplasma oder Zellkern diffus verteilt vorliegen. Zu der *decapping*-Maschinerie zählen neben XRN1 (Bashkirov, Scherthan et al. 1997) und dem Lsm1-7-Komplex (*Sm and Sm-like proteins 1-7*), der an deadenylierte mRNAs bindet (Chowdhury, Mukhopadhyay et al. 2007), auch das katalytisch aktive *decapping mRNA protein 2* (DCP2) (van Dijk, Cougot et al. 2002) sowie das oben erwähnte DCP1a. DCP1a besitzt eine C-terminal gelegene Trimerisationsdomäne, welche wichtig für die *decapping*-Aktivität der *p-bodies* ist. Es bindet an die NR(*N-terminal  $\alpha$ -helical regulatory*)-Domäne von DCP2. Dieses wird hierdurch in seine geschlossenen und damit aktive Form überführt

und stabilisiert (She, Decker et al. 2008), (Chang, Bercovich et al. 2014). Außerdem existieren weitere *enhancer* von DCP2, die ebenfalls vermehrt in den *p-bodies* vorkommen. Diese sind z.B. EDC3 (*enhancer of decapping 3*), EDC4 (=Hedls (*human enhancer of decapping large subunit*), Ro52 (Yamochi, Ohnuma et al. 2008), Pat1, Lsm14A, und die RNA Helikase Dhh1/Rck (=DDX6) (Fenger-Gron, Fillman et al. 2005), (Sheth and Parker 2003) (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des mRNA-Abbaus, einschließlich der Deadenylierung und des Abbaus über das Exosom und den *decapping*-Komplex

Dargestellt ist die Deadenylierung der mRNA am 3'Ende mit Hilfe des Pan2/Pan3- und CCR4-Caf1-NOT-Komplexes (blau; (Sen and Blau 2005)). Nach der Deadenylierung kann der weitere Abbau auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen: Entweder findet der 3'→5'-Abbau der mRNA im Exosom (linke Seite), oder das 5'-*decapping* der mRNA durch den *decapping*-Komplex (grün) mit anschließender enzymatischer Degradation von 5'→3' durch die Exonuclease XRN1 (violett), statt. Modifiziert nach (Jain and Parker 2013), Lizenznummer: 4724861260739.

### 1.9.3 Abbaumechanismen und Metabolismus von mRNAs in *p-bodies*

In den *p-bodies* existieren unterschiedliche Mechanismen, über die kurzlebige mRNAs abgebaut werden können. Einer dieser Abbauewege ist der sogenannte *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD). Hierbei führt das Vorhandensein von PTCs (*premature termination codon*) in den mRNAs zur Bindung von NMD-Faktoren wie beispielsweise Upf1 (*up-frameshift 1*) und damit zur transienten Akkumulation dieses Proteins zusammen mit der gebundenen mRNA in den *p-bodies*. NMD-Faktoren führen also ihr Substrat zur Degradation in die *p-bodies* (Sheth and Parker 2006). Enthalten mRNAs in ihren 3'-UTRs (*untranslated regions*) AREs, werden sie über einen weiteren Mechanismus, den AMD (*ARE-mediated mRNA decay*), dem raschen Abbau unterzogen. AREs sind vor allem auch in den mRNAs von Zytokinen und Protoonkogenen, also Proteinen enthalten, die einer schnellen und präzisen Regulation bedürfen (Shaw and Kamen 1986). Hierbei dienen weitere Proteine als Adaptoren zwischen den ARE-enthaltenden mRNAs und dem Exosom bzw. dem *decapping*-Komplex, wobei die wichtigsten zur Tis11-Familie gehören, z.B. TTP, BRF1 (*butyrate response factor 1*) und BRF2. Über Zink-Finger-Domänen in deren Struktur, werden spezifische Interaktion mit der mRNA möglich. Sie lokalisieren ebenfalls in den *p-bodies* (Lai, Kennington et al. 2002), (Stoecklin, Colombi et al. 2002).

Auch das miRNA(microRNA)-induzierte *gene silencing* ist zu großen Teilen mit Proteinen assoziiert, die spezifisch in *p-bodies* lokalisiert sind. Zu diesen Proteinen zählen unter anderem verschiedene Ago (*argonaute*) Proteine (Sen and Blau 2005), GW182 (*glycine(G)-tryptophan(W)-repeats*, 182 kD) (Eystathioy, Jakymiw et al. 2003), TNRC6B (*trinucleotide repeat containing 6B*) (Meister, Landthaler et al. 2005) und TNRC6C (*trinucleotide repeat containing 6C*), sowie die Helikasen Rck (Chu and Rana 2006) und MOV10 (*Mov10 RISC complex RNA helicase*) (Meister, Landthaler et al. 2005). Sie können durch Interaktion mit dem RISC (*RNA-induced silencing complex*) entweder die Translation der mRNAs inhibieren oder deren Abbau induzieren (Kulkarni, Ozgur et al. 2010).

### 1.9.4 mRNA-Abbau und *p-bodies* im klinischen Bezug

Immer häufiger werden neurodegenerative Erkrankungen in Zusammenhang mit fehlerhaftem mRNA-Metabolismus gebracht, der zu großen Teilen in den *p-bodies* stattfindet (Renoux and Todd 2012). Ein Beispiel für eine solche Erkrankung ist die Lafora-Krankheit, bei der es im Krankheitsverlauf zu myoklonalen epileptischen Anfällen, Ataxie und Demenz kommen kann. Histologisch können bei dieser Erkrankung Polyglucosan-Einschlüsse im Gehirngewebe nachgewiesen werden,

welche als Lafora-Körperchen bezeichnet werden (Ganesh, Puri et al. 2006). Die Ursache dieser Krankheit ist ein Gendefekt. Betroffen ist entweder das *EPM2A*-Gen (*Epilepsy, Progressive Myoclonus Type 2A*), welches für eine Laforin-Proteinphosphatase codiert oder das *NHLRC1*-Gen (*NHL repeat containing U3 ubiquitin protein ligase*), dessen Genprodukt die E3 Ubiquitin Ligase Malin ist. Beide Proteine interagieren eng miteinander und beeinflussen gegenseitig ihr Auftreten innerhalb der Zelle. Sowohl der Verlust oder die reduzierte Funktion von Malin, als auch von Laforin, führen jeweils zu einem erhöhten Aufkommen von Polyglucosan-Körperchen (Singh and Ganesh 2009). Normalerweise wird Malin in die *p-bodies* rekrutiert und reguliert seinerseits das DCP1a-Level in den *decapping*-Komplexen, wobei sich die beiden Proteine indirekt proportional zueinander verhalten. Malin führt über den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg zum Abbau von DCP1a. Ist Malin jedoch durch ein defektes Gen inaktiv, wird wiederum in Folge eines erhöhten Levels an DCP1a, die Konzentration des Proteins Dicer erniedrigt. Dicer ist eine RNase III und wichtig für die Reifung von miRNAs (Cuellar et al. 2008). Erniedrigte Konzentrationen an Dicer führen zur Neurodegeneration, sowie zu Hyperphosphorylierungen an Tau-Proteinen, wodurch es zu Ablagerungen in Form der Lafora-Körperchen und schließlich zu den Symptomen der Lafora-Krankheit kommen kann (Singh, Singh et al. 2012).

Auch in der Reifung der mütterlichen Eizelle spielen *p-body*-Komponenten eine entscheidende Rolle. Während der Transformation einer hochdifferenzierten Oozyte zu einer totipotenten Blastomeren, ist die Regulation der Genexpression von essentieller Bedeutung. Dabei müssen im Laufe der Reifung die mütterlichen mRNAs, die in den früheren Entwicklungsstadien äußerst stabil sind und die Versorgung der Eizelle gewährleisten, letztendlich abgebaut werden und den mRNAs, die für andere Proteine codieren, weichen. Dies wird als Verschiebung von mRNA-Stabilität zu mRNA-Instabilität bezeichnet (Brower, Gizang et al. 1981), (Bachvarova, De Leon et al. 1985), (Su, Sugiura et al. 2007). In diesem Prozess stellt die Rekrutierung von mütterlichen *DCP1a*- und *DCP2*-Transkripten und deren anschließende Translation, sowie die Phosphorylierung durch *CDC2A* (*cell division cycle 2 homolog A*), einen entscheidenden Schritt dar. Grund dafür ist, dass durch das Vorhandensein großer Mengen an aktivem DCP1a und DCP2 vermehrt maternale mRNAs abgebaut werden (Ma, Flemr et al. 2013).

### 1.9.5 IL-1-abhängige Regulation von DCP1a

Die zu Beginn von Kapitel 1.9 erwähnte Interaktion von DCP1a mit JNK führt zu einer IL-1-abhängigen Phosphorylierung des DCP1a an Serin 315. Durch diese Phosphorylierung wird die subzelluläre Lokalisation von DCP1a reguliert. Sie führt zu einer Umverteilung des Proteins vom Zytoplasma in die *p-bodies*, wodurch nach IL-1-Stimulation kurzfristig mehr *p-bodies* in den untersuchten Zellen zu finden sind (Rzeczkowski, Beuerlein et al. 2011). Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass DCP1a auch einen Einfluss auf die IL-1-induzierte Genexpression hat. Durch verschiedene Punktmutationen im *DCP1a*-Gen und die sukzessive Änderung der DCP1a Funktion wird beispielsweise die *IL-8*-Expression reduziert (Rzeczkowski, Beuerlein et al. 2011). In Überexpressionsversuchen konnte man p65 und DCP1a ko-immunopräzipitieren. Weiterhin konnte mittels eines GAL4-p65 assays, durch die p65/DCP1a-Interaktion vermittelt, direkt eine verminderte transkriptionelle Aktivität von p65 nachgewiesen werden. Somit geht die Interaktion mit einer reduzierten Induktion IL-1-abhängiger Gene, wie z.B. *IL-8*, einher. Weiterhin könnte der inhibitorische Effekt von DCP1a auf die IL-1-abhängige Genexpression auch durch die Beeinflussung der mRNA Stabilität vermittelt werden (Rzeczkowski, Beuerlein et al. 2011). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Rahmen dieser Arbeit, mit Hilfe des *Proximity Ligation Assays* (PLA) eine Methode etabliert, mit welcher DCP1a als Teil des endogenen p65-Interaktoms dargestellt und untersucht werden sollte, ob es eine IL-1-abhängige Regulation dieser Interaktion gibt.

### 1.10 LMO7 - ein weiterer möglicher Interaktionspartner von p65

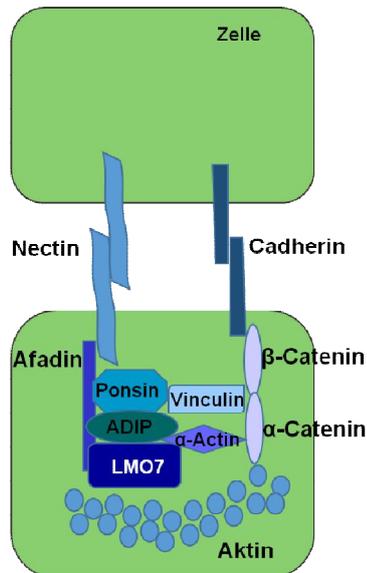
Bei einer massenspektrometrischen Analyse von affinitätsaufgereinigtem TAP-(*tandem-affinity-purification*)-getaggeten p65 im Jahr 2005 ist die Arbeitsgruppe Kracht (Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Gießen), (in mit Calicullin A behandelten Proben) auf ein weiteres, neues Protein gestoßen, das als Interaktor von p65 in Frage kommt, das LMO7 (*Lim-domain only 7*). Daraufhin wurden Überexpressionsversuche durchgeführt, in welchen eine Interaktion zwischen p65 und LMO7 mittels Ko-Immunpräzipitationen detektiert werden konnte (bisher unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Kracht).

In bereits veröffentlichten Studien wurde LMO7 vor allem als Stabilisator in Zell-Zell-Kontakten (Ooshio, Irie et al. 2004), aber auch als eine Art Ko-Faktor bei der Transkription verschiedener Gene beschrieben (Holaska, Rais-Bahrami et al. 2006), (Dedeic, Cetera et al. 2011). LMO7 zeichnet sich dabei durch eine N-terminal gelegene PDZ-Domäne (*post synaptic density protein*; *Drosophila disc large tumor suppressor*;

*Zonula occludens-1 protein*), eine der am weitesten verbreiteten Protein-Protein-Interaktionsdomänen (Sheng and Sala 2001), sowie eine C-terminal befindliche LIM-Domäne (Lin11; Isl-1; Mec-3) aus. Letztere ist ebenfalls für die Bindung von Proteinen zuständig (Bach 2000). Eine weitere Domäne des LMO7 ist die *Calponin homology domain* (*CH domain*). Diese kommt hauptsächlich in Actin-bindenden Proteinen aber auch in Proteinen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, vor (Banuelos, Saraste et al. 1998), (Krcmery, Camarata et al. 2010).

### **1.10.1 Die Aufgabe von LMO7 in Zell-Zell-Kontakten**

Wie bereits erwähnt, stellt die Stabilisation von Zell-Zell-Kontakten einen wichtigen Aufgabenbereich von LMO7 dar. Zell-Zell-Kontakte spielen beispielsweise für die Zelldifferenzierung, Zellproliferation oder die Migration von Zellen, sowie für deren Morphogenese eine wichtige Rolle (Gumbiner 1996), (Perez-Moreno, Jamora et al. 2003). Einen dieser Zell-Zell-Kontakte stellen die sogenannten Adhärenzverbindungen (*adherens junctions*, AJ) dar (siehe Abbildung 7). In diesen sind, neben dem Nectin-Afadin-System, auch E-Cadherine vorhanden. Nectin und Cadherin sind Membranproteine, die letztlich die Verbindung zwischen zwei Zellen an der Zelloberfläche herstellen. Auf der zytoplasmatischen Seite ist Nectin an Afadin gebunden, welches dann entweder direkt oder über Adaptorproteine an das Strukturprotein Aktin bindet. Hierdurch werden die Zellkontakte stabilisiert. Cadherine sind über  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenine mit Aktin verbunden. Über Ponsin und Vinculin treten die beiden Systeme miteinander in Kontakt. So auch über die Bindung von ADIP (*afadin DIL interacting protein*) und  $\alpha$ -Actinin. An  $\alpha$ -Actinin und Afadin bindet dann das LMO7. Es verbindet somit das Nectin-Afadin-System mit dem E-Cadherin-Catenin-System und dient damit wahrscheinlich der weiteren Stabilisation der Zellkontakte (Ooshio, Irie et al. 2004), (Nagafuchi 2001).



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung des Vorkommens von LMO7 in Zell-Zell-Kontakten

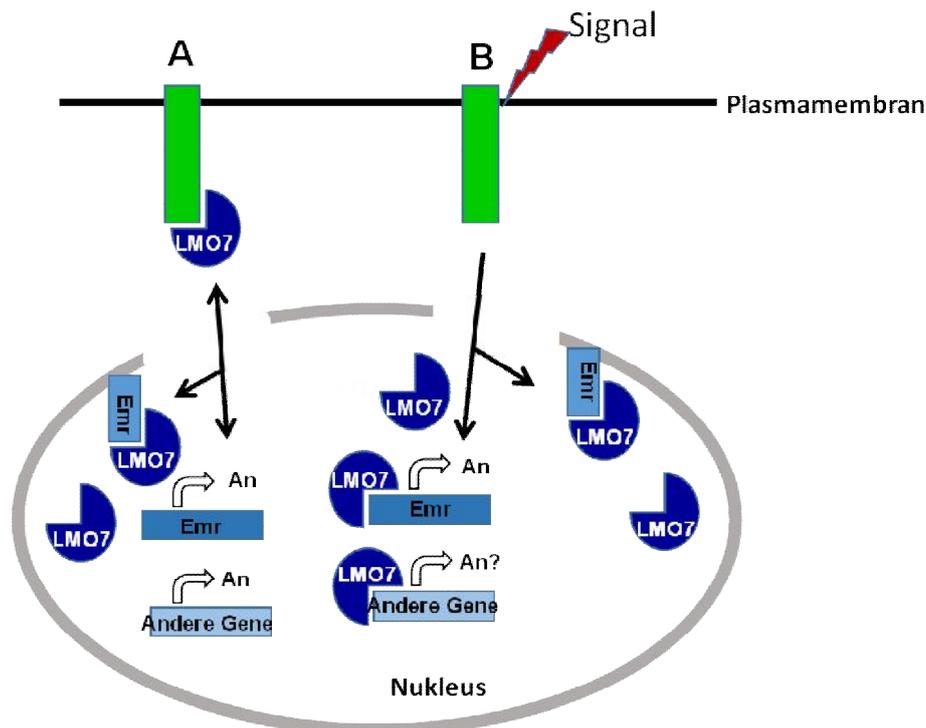
Dargestellt ist eine Adhärenzverbindung zwischen zwei Zellen. Nectin und Cadherin stellen die Membranproteine auf der Zelloberfläche dar. Diese sind an Afadin (links) oder Catenine (rechts) innerhalb der Zelle gebunden. Untereinander sind Nectin-Afadin- und Cadherin-Catenin-System über verschiedene Adaptorproteine verbunden (Ponsin, ADIP, Vinculin,  $\alpha$ -Actinin). Auch LMO7 dient als Adaptor und bindet an Afadin und  $\alpha$ -Actinin. Modifiziert nach (Ooshio, Irie et al. 2004)

### 1.10.2 Die Interaktion von LMO7 mit Emerin und seine Funktion als Transkriptionsfaktor

LMO7 spielt nicht nur in Zell-Zell-Kontakten eine Rolle, sondern kann auch frei im Zytoplasma oder gebunden an Emerin an der inneren Kernmembran (Holaska, Rais-Bahrami et al. 2006) lokalisiert sein. Es kommt in den drei Isoformen LMO7A, LMO7B und LMO7C vor (Lindvall, Blomberg et al. 2005). Von den drei LMO7-Isoformen besitzt nur das LMO7A eine Transaktivierungsdomäne. Diese Isoform wird vor allem in Skelettmuskelzellen exprimiert (Rozenblum, Vahteristo et al. 2002).

Das oben erwähnte Emerin gehört zur Familie der LEM *domain*-Proteine (LAP2; emerin; MAN1), welche an das Chromatin-Protein *Barrier-to-Autointegration* Faktor (BAF) binden (Holaska, Lee et al. 2003), (Nagano, Koga et al. 1996). Dabei ist BAF direkt an der Genregulation und an Veränderungen der Chromatinstruktur beteiligt (Segura-Totten, Kowalski et al. 2002), (Wang, Xu et al. 2002). Außerdem bindet Emerin an Laminin, wodurch es an der inneren Kernmembran verankert wird (Holaska, Wilson et al. 2002). Emerin interagiert weiterhin mit verschiedenen Transkriptionsregulatoren, wie z.B. GCL (*germ cell-less*) (Holaska, Lee et al. 2003) oder  $\beta$ -Catenin (Markiewicz, Tilgner et al. 2006).

LMO7 ist für die Expression von Emerin ein entscheidender Faktor (siehe Abbildung 8). Über verschiedene Mechanismen wird zunächst die Menge an Emerin in der Zelle bzw. im Zellkern überprüft. Wird dabei zu wenig Emerin detektiert oder ist dieses durch andere gebundene Proteine maskiert, wird die Expression von Emerin durch LMO7



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der Funktionsweise von LMO7 als Signaltransduktor und Transkriptionsfaktor

A) Im *steady state* befindet sich LMO7 in Zell-Zell-Kontakten und wandert konstitutiv in und aus dem Zellkern. Im Zellkern bindet es an Emerin (Emr). B) Als Reaktion auf verschiedene Signale (Blitz), transloziert und kumuliert LMO7 im Zellkern. Hierdurch kann zunächst Emerin abegesättigt werden und anschließend können, bei ausreichend hohen Konzentrationen von LMO7 im Kern, verschiedene Gene durch LMO7 induziert werden. Modifiziert nach (Holaska, Rais-Bahrami et al. 2006), Lizenznummer: 4714130540284.

aktiviert. Emerin kann die LMO7-Funktion dementsgegen sowohl positiv als auch negativ regulieren. Zum einen rekrutiert Emerin LMO7 in den Zellkern, damit es dort überhaupt erst seine Funktionen als Transkriptionsfaktor erfüllen kann. Zum anderen schwächt es LMO7 in seiner Genexpressionsaktivität durch die Bindung und Retention des selbigen an der inneren Kernmembran (Holaska, Rais-Bahrami et al. 2006).

Holaska et al. sehen in LMO7 möglicherweise auch einen Vermittler von Signalen aus der Plasmamembran in Richtung Zellkern (Holaska, Rais-Bahrami et al. 2006). Es wäre möglich, dass LMO7 auf verschiedene Stimuli hin, wie z.B. Ligandenbindung oder mechanischen Stress an der Zellmembran, vermehrt in den Zellkern transloziert. Im Zellkern induziert das LMO7 dann, nachdem es das Emerin vollständig gebunden hat, verschiedene Gene (siehe Abbildung 8) (Holaska, Rais-Bahrami et al. 2006).

### 1.10.3 LMO7 im klinischen Bezug - Muskelerkrankungen und Tumorgenese

Sowohl LMO7 als auch Emerin sind wichtig für die Differenzierung von Muskelzellen. Bei Fehlregulationen der Entwicklung kann es zu Muskelerkrankungen kommen. Beide Proteine tragen zur Entstehung der *X-linked* Emery-Dreifuss Muskeldystrophie bei

(Holaska, Rais-Bahrami et al. 2006). Zu den Symptomen dieser Erkrankung zählen der progressive Schwund von Skelettmuskulatur, gefährliche Herz-Rhythmus-Störungen und Kontrakturen der großen Sehnen (Dedeic, Cetera et al. 2011), (Vlcek and Foisner 2007). Dedeic et al. gehen davon aus, dass eine übermäßige Aktivierung von LMO7, welche durch den Verlust von Emerin bedingt ist, zur Muskeldegeneration führt (Dedeic, Cetera et al. 2011). Sie konnten zeigen, dass LMO7 direkt an Promotoren, die für zentrale Proteine der Muskelzellentwicklung codieren, bindet (z.B. an *Pax3*(*paired box 3*)- und *MyoD*(*myogenic differentiation*)-Promotoren) und hierdurch die Expression von Proteinen fördert, welche für die Myoblasten-Proliferation und -Differenzierung entscheidend sind (Goulding, Lumsden et al. 1994), (Tajbakhsh, Rocancourt et al. 1997). Der *Pax3*-Promotor spielt höchstwahrscheinlich auch in der Regeneration adulter Muskelzellen durch Satellitenzellen eine wichtige Rolle (Montarras, Morgan et al. 2005). Kommt es zu einer Dysregulation in diesem System ist die Muskelzellentwicklung und -regeneration gestört.

Neuere Studien zeigen auch einen Zusammenhang von LMO7 mit verschiedenen Tumorerkrankungen. So wurden in einigen Formen von kolorektalen, Brust-, Leber- und Lungentumoren erhöhte Level an LMO7 gefunden (Kang, Xu et al. 2000), (Furuya, Tsuji et al. 2002), (Sasaki, Tsuji et al. 2003). Außerdem entwickeln LMO7-defiziente Mäuse Läsionen am Lungenepithel der terminalen respiratorischen Bronchiolen und in höherem Alter vermehrt Lungen-Adenokarzinome (Tanaka-Okamoto, Hori et al. 2009). Nakamura et al. konnten in einer Studie mit 57 Lungen-Adenokarzinom Patienten zeigen, dass sich in Krebszellen in immunhistochemischen Anfärbungen eine andere Verteilung für LMO7 als in gesunden Zellen ergibt. Weiterhin zeigte die Studie, dass erniedrigte Level an LMO7 mit statistisch signifikant weiter fortgeschrittenen Tumoren und einer deutlich schlechteren Prognose einhergehen (Nakamura, Hori et al. 2011). Insgesamt lässt sich also feststellen, dass die Konzentration an LMO7 allein nicht als Ursache für die Krebsentstehung herangezogen werden kann. Auch hier handelt es sich vermutlich um ein komplexes Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren.

#### **1.10.4 Untersuchung der Bedeutung der in den Vorarbeiten mittels Ko-Immunopräzipitation und Massenspektrometrie detektierten Interaktion von p65 mit LMO7**

Um herauszufinden ob sich auch auf endogenem Level tatsächlich die oben erwähnte p65/LMO7-Interaktion nachweisen lässt, werden in der nachfolgenden Arbeit

PLA Experimente dargestellt, die möglicherweise eine solche Interaktion bestätigen. Des Weiteren galt es herauszufinden ob diese Interaktion IL-1-abhängig reguliert ist und welche Bedeutung diese insgesamt für die Zelle hat.

### **1.11 Prinzip und Entwicklung der Methode des „*Proximity Ligation Assays*“**

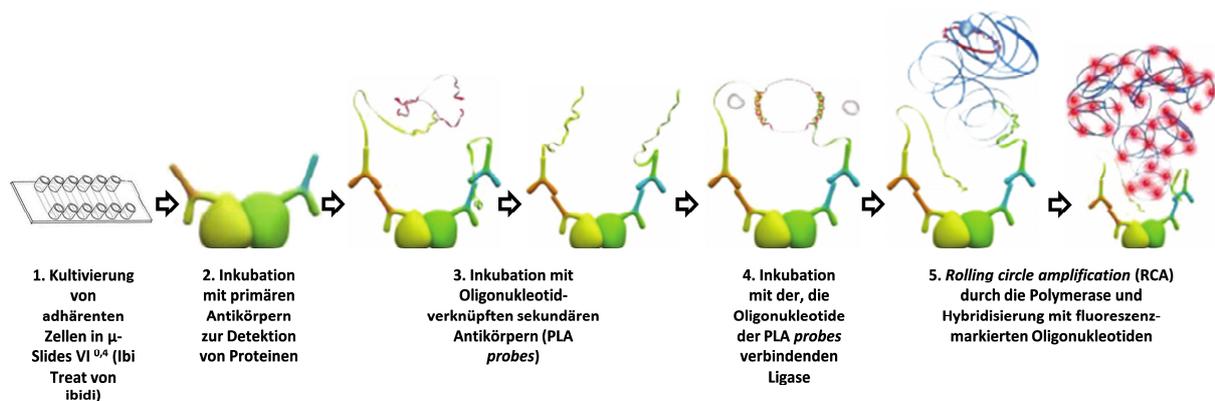
Zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden, die entweder *in vitro*, *in vivo* oder *in silico* durchgeführt werden. Ein Beispiel für eine *in vitro* Methode stellt die Ko-Immunpräzipitation dar. Hierbei werden Proteininteraktionen an Ganzzelllysaten mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die Proteine in ihrer nativen Form im Komplex vorliegen. Allerdings kann es hierbei dazu kommen, dass schwächere Bindungen durch die Prozedur aufgelöst werden und damit der Detektion entgehen. Eine weitere häufig verwendete Methode ist das *TAP-tagging*, das kombiniert mit einer massenspektrometrischen Analyse eine große Vielzahl von Komplexen gleichzeitig nachweisen kann. Bei den affinitätschromatographischen Verfahren können zwar auch schwächere Bindungen nachgewiesen werden, der Nachteil der Methode besteht damit aber in den relativ häufig auftretenden falsch positiven Ergebnissen. Bei der röntgenbasierten Kristallographie handelt es sich um eine sehr hoch auflösende Form der Mikroskopie, bei der direkt die Struktur von Proteinen und deren Interaktionspartner visualisiert werden kann.

Die *Yeast-2-Hybrid* Methode stellt ein Verfahren dar, das *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen letztendlich über die Expression eines Reportergenes nachweisen kann. Hierfür müssen allerdings die interagierenden Proteine im Zellkern lokalisiert sein und es entstehen häufig sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse (Srinivasa, Rao et al. 2014), (Xing et al. 2016).

Anhand der aufgezeigten Methoden ist klar ersichtlich, dass jede Methode Vor- und Nachteile mit sich bringt. Für die zuverlässige Detektion von Protein-Protein-Interaktionen ist die Kombination mehrerer Verfahren sinnvoll, um eine Validierung der Interaktionen zu erhalten. Da die Kenntnis von Protein-Protein-Interaktionen für das Verständnis von biochemischen molekularen Vorgängen enorm wichtig ist, entwickeln Forscher immer wieder neue Methoden zum Nachweis von Interaktionen (Xing et al. 2016).

So wurde auch die Methode des *Proximity Ligation Assays* (PLA) zur spezifischen und sensitiven Detektion von Proteinen und deren Verbindungen entwickelt. Eine Vorstufe zum heutigen PLA wurde bereits in den 1970er Jahren von Besmer et al. generiert. In

diesem Verfahren wurde die DNA-Ligation zur Untersuchung von tRNAs genutzt (Besmer et al. 1972). Dieses Verfahren wurde letztendlich so weiter entwickelt, dass bestimmte Zielproteine mit Hilfe von Adaptorproteinen mit DNA-Strängen verknüpft werden konnten. Befanden sich zwei dieser so markierten Moleküle in räumlicher Nähe wurden die DNA-Stränge über eine Ligase verknüpft. Im *Proximity Ligation Assay* werden Proteine und deren Interaktionspartner also dadurch detektiert, dass zunächst primäre Antikörper an ihre jeweilige Bindungsstelle am Protein binden und anschließend eine Markierung durch einen speziesspezifischen sekundären Antikörper stattfindet, der mit einem spezifischen Nukleinsäurefragment gekoppelt ist. Dabei nutzt man die Amplifikation der Nukleinsäure und deren anschließende Detektion, um sehr sensitive und spezifische Signale zu generieren (Bobrich et al. 2013).

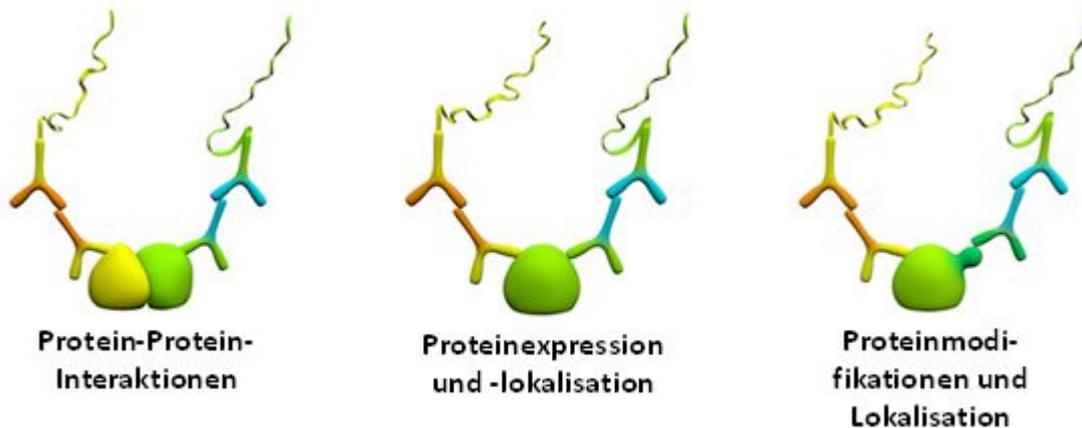


**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der Durchführung und des Prinzips des *Proximity Ligation Assays*

Die Abbildung zeigt die Schritte, die zur Durchführung eines PLA Experimentes notwendig sind. Dabei erfolgt zunächst, die Kultivierung der Zellen in den entsprechenden Analyse-Gefäßen. Anschließend werden die Proben mit den primären und danach mit den sekundären Antikörpern (*PLA probes*) inkubiert. Schließlich erfolgt durch Zugabe einer Ligase die Verknüpfung der beiden, sich in räumlicher Nähe befindlichen, Oligonukleotide der *PLA probes* und deren Vervielfältigung mittels *rolling circle amplification* (RCA). Am so entstehendem Nukleinsäureprodukt hybridisieren komplementäre, fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide und machen so die Proteininteraktion sichtbar. Modifiziert nach (Bobrich et al. 2013).

Gezeigt wird in Abbildung 9 die Durchführung eines PLA, wie sie auch in den Experimenten der vorliegenden Arbeit erfolgte. Hierbei entstehen durch die Bindung von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden an eine, durch RCA (*rolling circle amplification*) generierte DNA-Sequenz, Signale, die unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden können. So können auch Aussagen über die Interaktionen auf Einzelzellebene, wie z.B. deren Lokalisation innerhalb der Zelle, getroffen werden. Die genaue Beschreibung der Durchführung des assays findet sich im Kapitel 3.3.2. Neben der Analyse durch Fluoreszenzmarkierung in einzelnen Zellen können mit Hilfe von Abwandlungen des PLAs sehr kleine Mengen von Proteinen oder Protein-Protein-Interaktionen auch in Zellsuspensionen, wie z.B. Blut, nachgewiesen werden (Gustafsdottir, Schallmeiner et al. 2005). Eine Standardisierung des assays ist allgemein gut durchführbar, wodurch diese Methode weniger anfällig für Prozessfehler

ist. Weiterhin kann der PLA nicht nur für die Detektion von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt werden, sondern bietet auch die Möglichkeit direkt einzelne Proteine, sowie deren Modifikationen (z.B. Phosphorylierungen) *in situ* darzustellen ((Sigma Aldrich) siehe Abbildung 10). Dabei wird die Spezifität, wie auch bei anderen antikörperbasierten Verfahren, von der Qualität und Spezifität der primären Antikörper bestimmt (Gustafsdottir, Schallmeiner et al. 2005), (Greenwood et al. 2015).



**Abbildung 10:** Anwendungsmöglichkeiten des *Proximity Ligation Assays*

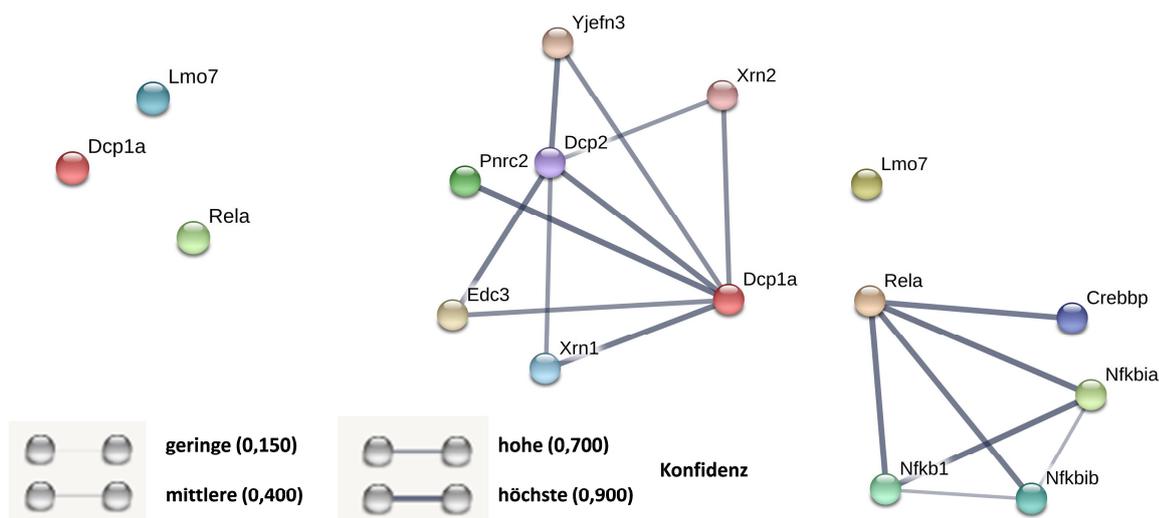
Mit Hilfe des PLA ist es möglich Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Weiterhin können aber auch, durch Verwendung entsprechender primärer Antikörper, die Expression von Einzelproteinen und deren Lokalisation sowie Proteinmodifikationen nachgewiesen werden.  
[www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/optimize-duolink-assay.html](http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/optimize-duolink-assay.html); aufgerufen und modifiziert am 28.06.2017

Klinisch könnte der PLA Bedeutung für die Detektion wichtiger Biomarker und damit deren frühzeitige Entdeckung oder auch zur Erkennung von Zielmolekülen zur Therapie verschiedener Krebsarten erlangen. So nutzten Mereiter et al. den PLA bereits um Veränderungen der Glykosylierung zu zeigen, die eine wichtige Rolle für das unterschiedliche Verhalten von gastrointestinalen Tumoren spielen (Mereiter et al. 2016).

## 1.12 Ziele der Arbeit und Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe der Interaktion zwischen p65 und I $\kappa$ B $\alpha$  die Spezifität der PLA Methode zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen. Da die Interaktion zwischen p65 und I $\kappa$ B $\alpha$  eine der wissenschaftlich am besten untersuchten Interaktionen zwischen Proteinen ist, wurde diese und deren bekannte IL-1-regulierte Dynamik als Grundlage für die Untersuchungen gewählt. Außerdem wurde die Interaktion p65/I $\kappa$ B $\alpha$  und der zeitliche Abbau dieses Komplexes nach IL-1-Behandlung mit Hilfe des *Proximity Ligation Assays* dargestellt, um damit die Ergebnisse des assays zu verifizieren. Durch *knock out* und *knock down* Experimente,

bei denen jeweils einer der beiden Bindungspartner ausgeschaltet bzw. herunterreguliert wird, soll getestet werden ob der PLA die Komplexe aus beiden Proteinen abbildet. Wenn der PLA in der Lage ist den p65/IkBa-Komplex und dessen Regulation spezifisch zu detektieren, könnte die Methode genutzt werden um auch neu gefundene Interaktionspartner von p65, deren Wechselwirkung bisher z.B. nur in Überexpressionsmodellen gezeigt werden konnten, auf endogenem Level zu überprüfen. Die beiden putativen Interaktoren des p65-Proteins, DCP1a und LMO7, wurden bisher zum Beispiel in der STRING Datenbank nicht direkt mit p65 in Verbindung gebracht (siehe Abbildung 11), konnten aber in Überexpressionsversuchen der AG Kracht (Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Gießen) eindeutig mit diesem assoziiert werden. Ob eine direkte Interaktion von p65 mit DCP1a und LMO7 auf endogenem Level vorliegt und diese eventuell sogar IL-1-abhängig reguliert wird, sollte im Rahmen dieser Dissertation mit Hilfe des *Proximity Ligation Assays* untersucht werden.



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung der Interaktionen von p65, DCP1a und LMO7

Oben links: Es werden nur die direkten Interaktionen zwischen den Proteinen RelA (p65), DCP1a und LMO7 mit Hilfe von STRING: functional *protein association networks* angezeigt. Es bestehen keine Verbindungen. Mitte/Rechts: Darstellung weiterer Interaktoren von p65, DCP1a und LMO7. **Lmo7:** LIM domain only 7; **Dcp1a:** DCP1 decapping enzyme homolog 1A; **Yjefn3:** YjeF N-terminal domain containing 3; **Xrn2:** 5'-3' exoribonuclease 2; **DCP2:** DCP2 decapping enzyme homolog 2; **Pnrc2:** Proline-rich nuclear receptor coactivator 2; **Edc3:** Enhancer of mRNA decapping 3 homolog; **Xrn1:** 5'-3' exoribonuclease 1; **RelA** = p65; **CREBBP** = CBP, CREB binding protein; **NFKBIB:** nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta; **NFKB1:** = p105/p50, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1; **NFKBIA:** = IκBα, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha. Erstellt mit: STRING: functional *protein association networks* (Version 10.5 am 20.06.2017), (Szkarczyk et al. 2017)

Zusammenfassend ergeben sich für die Dissertation folgende Fragestellungen:

Kann der PLA die bereits gut untersuchte Interaktion p65/I $\kappa$ B $\alpha$  spezifisch abbilden?

Kann mit Hilfe des PLA auch die IL-1 $\alpha$ -abhängige Regulation dieses Komplexes abgebildet werden?

Zeigt sich im PLA bei *knock out* und *knock down* Versuchen eine erwartete verringerte Signalanzahl?

Können mit dem PLA putative neue Interaktionspartner des p65, wie z.B. DCP1a und LMO7, die bisher nur im Überexpressionsmodell nachgewiesen werden konnten, auf endogenem Level dargestellt werden?

Wie stellen sich die Interaktionen p65/DCP1a und p65/LMO7 im PLA dar und kann eine Regulation durch IL-1 $\alpha$  gezeigt werden?

## **2 Material**

### **2.1 Verbrauchsmaterial**

Alle verwendeten Plastikwaren und Einwegmaterialien wurden von den Firmen Ansell, Brand, Eppendorf, Greiner, IBIDI, Neolab, nerbe plus, Nunc, Omnilab, Roth oder Sarstedt bezogen.

### **2.2 Geräte**

#### **2.2.1 Elektrophorese- und Westernblotsysteme**

- Amersham Pharmacia Biotech, Large semiphor transphor Unit
- Biometra, Power Pack P25
- BIORAD, Elektrophorese Kammer, Mini-Protean II

#### **2.2.2 Mikroskope, Photometer und Software**

- Duolink®ImageTool, Software
- Image J, Software
- Leica, DM IL, Mikroskop
- Leica, DM IRE 2, Mikroskop
- Leica, FW 4000, Mikroskop
- Molecular Devices, Spectramax Plus, Microplate Spectrophotometer
- OLYMPUS, CKX41, Mikroskop
- SigmaPlot 11.0, Software

#### **2.2.3 Zellkultursysteme**

- GFL, Wasserbad
- Heraeus, Thermo Scientific, BBD 6220, Brutschrank
- Heraeus, Hera Safe Typ HS15, Sterilwerkbank

#### **2.2.4 Zentrifugen**

- Beckman Coulter, Optima™ TLX Ultrazentrifuge
- Beckman Coulter, Microfuge 22R Centrifuge, Kühlzentrifuge
- Eppendorf, Tischzentrifuge 5424
- Eppendorf, Kühlzentrifuge 5415 R
- Eppendorf, Kühlzentrifuge, 5427 R
- IKA, MinuteniG, Tischzentrifuge

### 2.2.5 Andere

- AGFA, Curix 60, Filmentwicklermaschine
- Branson, Sonifier 250
- Chyo, Electronic Balance MP-3000, Waage
- DYNATECH, Varishaker-Incubator, Schüttler
- ELMI, Intelli Mixer RM-2L
- Eppendorf, Thermomixer compact
- Fisher Scientific, Absaug-/Filtrierstation
- Heidolph, Vortexer Über-Kopf-Schüttler
- Heidolph, Schüttler Unimax 2010
- HP, HP Scan Jet 4200C, Scanner
- Integra, Pipetboy
- thermo-DUX, Techne Hybridiser HB-1D, Hybridisierungssofen
- Ziegra F, Eismaschine

### 2.3 Chemikalien und Lösungsmittel

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Baker, Biomol, Fluka, Invitrogen, Merck, Pharmacia, Promega, Roche, Roth, Serva und Sigma bezogen (Qualitätsstufe "p.a.", "Für die Molekularbiologie" oder "*cell culture grade*"). Bei den im Folgenden dargestellten Konzentrationen handelt es sich jeweils um finale Konzentrationen.

## 2.4 Puffer und Lösungen

Im Folgenden sind die genauen Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen und Puffer dargestellt.

### Lysepuffer (für IPs verwendet) - nach Bohmann/Weiss (Weiss et al. 2003)

Konzentration	Material
50 mM	HEPES ( <i>pH 7,4 mit KOH einstellen</i> )
50 mM	NaCl
1 % (v/v)	Tween 20
2,5 mM	EGTA
1 mM	EDTA
1 mM	NaF
10 mM	$\beta$ -Glycerolphosphat
0,1 mM	$\text{Na}_3\text{VO}_4$
1 mM	PMSF
1x	Proteaseinhibitormix (Roche)
1 mM	DTT

### Waschpuffer nach Bohmann/Weiss (Weiss et al. 2003)

Konzentration	Material
50 mM	HEPES ( <i>pH 7,4 mit KOH einstellen</i> )
450 mM	NaCl
1 % (v/v)	Tween 20
2,5 mM	EGTA
1 mM	EDTA
1 mM	NaF
10 mM	$\beta$ -Glycerolphosphat
0,1 mM	$\text{Na}_3\text{VO}_4$
1 mM	PMSF
1x	Proteaseinhibormix (Roche)
1 mM	DTT

**2x HEBS (sterilfiltriert)**

Konzentration	Material
280 mM	NaCl
50 mM	HEPES
1,5 mM	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<i>pH 7,12 mit NaOH einstellen</i>	

**10x Laemmli-Laufpuffer**

Konzentration	Material
250 mM	Tris
1,92 M	Glycin
1 % (w/v)	SDS

**PBS**

Konzentration	Material
137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
8 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
1,8 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<i>pH 7,4 mit HCl einstellen</i>	

**Ponceau-Rot-Lösung**

Konzentration	Material
0,1 % (w/v)	Ponceau S
5 % (v/v)	Essigsäure

**Sammelgelpuffer**

Konzentration	Material
1 M	Tris
<i>pH 6,8 mit HCl einstellen</i>	

**1x Semi Dry Blotpuffer**

Konzentration	Material
25 mM	Tris
192 mM	Glycin
20 % (v/v)	Methanol

### **Ganzzellysepuffer mit Proteinase- und Phosphatasehemmstoffen**

Konzentration	Material
30 mM	Natriumpyrophosphat
50 mM	NaCl
1 % (v/v)	Triton X-100
2 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
50 mM	NaF
20 mM	B-Glycerolphosphat
10 mM	Tris
<i>pH 7,05 mit HCl einstellen</i>	
1 µg/ml	Pepstatin
10 µg/ml	Leupeptin
1 mM	PMSF
1 µM	Microcystin

### **TBS-Puffer**

Konzentration	Material
10 mM	Tris
150 mM	NaCl
<i>pH 7,4 mit HCl einstellen</i>	

### **TBS-T-Puffer**

TBS-Puffer mit 0,05 % (v/v) Tween 20

### **Trenngelpuffer**

Konzentration	Material
1 M	Tris
<i>pH 8,8 mit HCl einstellen</i>	

## 2.5 Medien

### DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), PAA Laboratories

mit folgenden Zusätzen für HeLa, MEF Zellen:

10 % (v/v) FKS

100 µg/ml Streptomycin

100 U/ml Penicillin

2 mM L-Glutamin

### Schockmedium für den Glycerolschock

DMEM (++) + 10 % Glycerol

### Selektionsmedium

DMEM (++) + 1 µg/ml Puromycin

## 2.6 Gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien, Kits

Reagenzien und Materialien	Firma
ECL-Filme (Fuji X-ray Film SUPER RX)	Fujifilm
ECL Western blotting detection reagent	GE Healthcare
Hank's BSS	PAA, PAN Biotech
Immobilion Western Chemiluminescent HRP-Substrate	Millipore
PVDF-Membranen	Roth
Roti®-Quant Bradford-Kit	Roth
TrueBlot Anti-Kaninchen Ig, IP Beads	Rockland
Zellkulturmaterial BSA (Bovine Serum Albumin)	Greiner Bio-One

PLA Kits	Firma
Duolink® In Situ Detection Reagents Orange	Sigma-Aldrich
Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Goat PLUS	Sigma-Aldrich
Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Mouse MINUS	Sigma-Aldrich
Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Mouse PLUS	Sigma-Aldrich
Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Rabbit MINUS	Sigma-Aldrich
Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Rabbit PLUS	Sigma-Aldrich
Duolink® In Situ Wash Buffers	Sigma-Aldrich

## 2.7 Standards

### Protein-Standard

PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas

## 2.8 Plasmide

---

Plasmide	
pSUPER.Puro	AG Kracht
pSUPER.Puro-shp65	AG Kracht
shDCP1a	AG Kracht (Poppe 2013)

---

## 2.9 Antikörper

### 2.9.1 Primärantikörper

#### Westernblots und Co-IPs

---

Antikörper	Firma, Nr.	Spezies	Konzentration	Hybridisierungslösung
anti-β-Actin	Santa Cruz, 47778	Maus	1:1 000	TBS-T, 5 % Milch
anti-IgG	Santa Cruz, 2027	Kaninchen	1:1 000	TBS-T
anti-IκBα	Cell Signaling, 9242	Kaninchen	1:1 000	TBS-T
anti-NFκB p65 (C-20)	Santa Cruz, 372	Kaninchen	1:1 000	TBS-T, 5 % Milch
anti-p50	Santa Cruz, 8414	Maus	1:1 000	TBS-T, 5 % Milch
anti-phospho- IκBα S32	Cell Signaling, 9242	Kaninchen	1:1 000	TBS-T, 5 % BSA
anti-phospho- NFκB p65 Ser536	Cell Signaling, 3033	Kaninchen	1:1 000	TBS-T, 5 % BSA

---

anti-Tubulin	Santa Cruz 8035	Maus	1:1 000	TBS-T, 5 % Milch
--------------	--------------------	------	---------	------------------

### IF und PLA

Antikörper	Firma, Nr.	Spezies	Konzentration
anti-DCP1a	Abnova, 186-285	Maus	1:100
anti-DCP1a	Abcam, 47811	Kaninchen	1:100
anti-Ik-B $\alpha$ (E130)	Abcam, 32518	Kaninchen	1:50, 1:100
anti-Ik-B $\alpha$	Cell Signaling, 9242S	Kaninchen	1:25, 1:50, 1:100
anti-LMO7 (C-16)	Santa Cruz, 49826	Ziege	1:100
anti-LMO7 (H300)	Santa Cruz, 98423	Kaninchen	1:100, 1:200
anti-mSin3a (K-20)	Santa Cruz, 994	Kaninchen	1:50, 1:100, 1:200
anti-mSin3a	Cell Signaling, 7691	Kaninchen	1:100
anti-mSin3a	Abcam, 3479	Kaninchen	1:50, 1:100, 1:200
anti-NF $\kappa$ B p105/p50	Abcam, 7971	Kaninchen	1:100, 1:200
anti-NF $\kappa$ B p50 (NLS)	Santa Cruz, 114	Kaninchen	1:100, 1:200
anti-NF $\kappa$ B p50 (C-19)	Santa Cruz, 1190	Kaninchen	1:100, 1:200
anti-NF $\kappa$ B-p65 (A)	Santa Cruz, 109	Kaninchen	1:50
anti-NF $\kappa$ B p65 (C-20)	Santa Cruz, 372	Kaninchen	1:100, 1:200, 1:500
anti-NF $\kappa$ B p65 (F6)	Santa Cruz, 8008	Maus	1:50, 1:100
anti-p50	Santa Cruz, 8414	Maus	1:50, 1:100
anti-phospho-Ik-B $\alpha$ S32	Cell Signaling, 2859S	Kaninchen	1:50, 1:100
anti-phospho-NF $\kappa$ B-p65 Ser536	Cell Signaling, 3036S	Maus	1:50, 1:100, 1:200, 1:500
anti-Polymerase-II	Millipore, 05-623	Maus	1:100, 1:200
normal anti-Maus-IgG	Santa Cruz, 2025	Maus	1:100
normal anti-Kaninchen- IgG	Santa Cruz, 2027	Kaninchen	1:100

### 2.9.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Firma, Nr.	Spezies	Konzentration
anti-Kaninchen-IgG- Cy3	Millipore, AP182C	Esel	1:200
anti-Maus-IgG-Cy3	Millipore, AP192C	Esel	1:200

anti-Kaninchen-Dylight	ImmunoReagents Inc. DkxRb-003-D488NHSX DkxRb-003-D594NHSX	Esel	1:200
anti-Maus-Dylight	ImmunoReagents Inc. DkxMu-003-D488NHSX DkxMu-003-D594NHSX	Esel	1:200
anti-Kaninchen-FITC	Sigma, F0382	Ziege	1:100
anti-Maus-FITC	Sigma, F0257	Ziege	1:100
anti-Kaninchen-IgG HRP TrueBlot	Rockland, 18-8816-33	Maus	1:1 500
anti-Maus-IgG HRP TrueBlot ULTRA	Rockland, 18-8817-33	Ratte	1:1 500
anti-Kaninchen-IgG- POD	Dako, PO448	Esel	1:3 000
anti-Maus-IgG-POD	Dako, PO447	Schaf	1:2 000

## 2.10 Zelllinien

**HeLa (Hui Geng):** humane, epitheloide Zervixkarzinomzellen, übernommen aus der Arbeitsgruppe Prof. Schmitz, Universität Gießen, Deutschland (Geng et al. 2009)

**MEF:** *mouse embryonic fibroblasts*, Wildtyp und p65-defiziente Zellen, übernommen von Dr. Elisabeth Ziesché, AG Kracht, Universität Gießen, Deutschland (Li et al. 2012)

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

#### **3.1.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen**

Die in Stickstoff gelagerten Zellen werden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Zum Entfernen des vorhandenen DMSO werden die Zellen bei 1 300 rpm für fünf Minuten abzentrifugiert und anschließend in DMEM resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt, in der frisches Medium vorgelegt wird.

Vor dem Einfrieren werden die Zellen zweimal mit, im Wasserbad auf 37°C erwärmten, PBS gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung zum Ablösen überschichtet. Die verwendete Trypsin/EDTA-Lösung bewirkt dabei, dass die Bindungen der Zellen aufgelöst werden. Durch Trypsin werden die, für die Zellkontakte notwendigen, Proteine abgebaut, während durch das EDTA das ebenfalls für die Zellverbindungen essenzielle Calcium komplexiert wird. Der Überstand wird sofort wieder abgesaugt, wobei die Zellen aber benetzt bleiben. Anschließend werden die Zellen für ca. vier Minuten im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen komplett abrunden und abgelöst werden können. Die Zellen werden in 3 ml eiskaltem Einfriermedium (DMEM, 40 % FKS, 10 % DMSO) resuspendiert und anschließend auf zwei vorgekühlte Kryoröhrchen verteilt. Die mit Zellen befüllten Kryoröhrchen werden zunächst für zehn Minuten auf Eis und anschließend bei -80 °C gelagert bzw. zur längeren Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **3.1.2 Kultivieren und Passagieren von Zellen**

Die Zellen werden mit dem entsprechenden Medium im Brutschrank bei 37 °C, 96 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgt alle 4-5 Tage. Dafür wird das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen (bei den MEF Zellen nur einmaliges Waschen) und schließlich mit ca. 1 bis 2 ml Trypsin/EDTA (TE) pro 100 mm Schale überschichtet. Die Zellen werden anschließend mit der Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert, bis diese sich nach zwei bis drei Minuten abrunden und ablösen. Die Reaktion wird durch Zugabe von frischem DMEM gestoppt. Die Zellen werden resuspendiert und im, für den jeweiligen Versuchsaufbau definierten, Verhältnis auf eine neue Zellkulturschale mit DMEM-Vollmedium überführt.

### **3.1.3 Auszählen von Zellen**

Zum Auszählen werden ca. 10-15  $\mu\text{l}$  der resuspendierten Zellen in eine Neubauer-Zellkammer pipettiert und anschließend unter dem Mikroskop ausgezählt. (Volumen je Quadrat:  $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \mu\text{l}$ , Formel zur Berechnung der Zellzahl pro ml: Zellzahl pro Quadrat  $\times 10^4$ ).

### **3.1.4 Stimulation von Zellen**

Vor der Stimulation wird unter dem Mikroskop geprüft, ob die Zellen ausreichend bzw. übermäßig dicht für die Stimulation gewachsen sind (Optimal: ca. 80 % dicht). Außerdem wird das Medium in der Zellkulturschale reduziert. Die Stimulation der Zellen erfolgt mit IL-1 $\alpha$  (f.c. 10 ng/ml, Stock 10  $\mu\text{g/ml}$  von Jeremy Saklatvala, London) oder TNF $\alpha$  (f.c. 20 ng/ml; Stock 10  $\mu\text{g/ml}$  von R&D Systems oder Hoelzel) für die im Ergebnisteil angegebenen Zeiten. Dabei wurden die Zytokine direkt und in der entsprechenden finalen Konzentration zum Vollmedium auf die Zellen gegeben, bzw. bei der Stimulation in den  $\mu$ -Slides VI<sup>0,4</sup> (Ibi Treat von ibidi) eine Vorverdünnung des IL-1 $\alpha$  von 1:100 in Medium vorgenommen und diese anschließend für die finale Konzentration von 10 ng/ml mit dem Gesamtvolumen 1:10 weiter verdünnt.

### **3.1.5 Ernten von Zellen**

Um während der Prozedur eine mögliche Degradierung von Proteinen durch Proteasen zu verhindern, wird auf Eis bei 4 °C gearbeitet. Die Zellen werden zum Ernten zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in PBS mit dem Scraper geerntet, anschließend bei 3 000 rpm für fünf Minuten (4 °C) in der Zentrifuge pelletiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die Zellen werden direkt lysiert oder bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

### **3.1.6 Transiente Transfektion mit Calciumchlorid**

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von DNA in Zellen. Bei der transienten Transfektion wird diese DNA nur vorübergehend in die Zellen aufgenommen und geht nach dem Passagieren der Zellen wieder verloren. Zusammen mit dem gewünschten DNA-Abschnitt wird auf dem Plasmid eine Resistenz gegen, beispielsweise Puromycin, übertragen, um anschließend die Zellen selektieren zu können, bei denen die Integration erfolgreich war. In dieser Dissertation wird mit Calciumchlorid gearbeitet. Dieses fällt beim pipettieren in den Puffer als Kristall aus. An diese Kristalle kann dann

die zu übertragende DNA binden und per Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. (Sun, Bernard et al. 2013)

In dieser Arbeit wird zum einen der Leervektor, der ausschließlich eine Puromycin-Resistenz trägt, sowie ein Vektor für eine shRNA (*short hairpin*) eingebracht, die zu einer *RNA-interference* (RNAi) von p65 bzw. DCP1a und damit zu deren *knock down* führt. Beide Vektoren gehören dabei zum pSUPER System, welches die Bildung von *short interfering RNA's* (siRNA), basierend auf H1 RNA-pol-III-Promotoren, hervorbringt (Brummelkamp et al. 2002).

Bei der RNAi können Gene sequenz-spezifisch posttranskriptionell abgeschaltet werden. Dabei wird mit den Plasmiden ein DNA Abschnitt in die Zellen eingebracht, der für eine shRNA codiert. Diese nimmt die Form einer Haarnadel (*hairpin*) mit Stiel und Schleife an und kann mit Hilfe von *Dicer*, einem Enzym das zu den RNAsen III gezählt wird, in kleine siRNAs gespalten werden. Diese siRNAs wiederum können, eingebettet in einen Multiprotein-Komplex, den sogenannten *RNA-inducing silencing complex* (RISC), zur Degradation der Ziel mRNA (*messenger RNA*), hier dementsprechend der p65- bzw DCP1a-mRNA, führen (Dykxhoorn et al. 2003).

Am Vortag der Transfektion werden  $1,2 \times 10^5$  HeLa-Zellen auf je eine 100 mm Schale ausgesät, sodass am folgenden Tag ein relativ dichter (etwa 70-80 % dicht) Zellrasen vorliegt. Für die Transfektion werden dann 1 359  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O und 1 510  $\mu$ l 2x HEBS, sowie 30  $\mu$ g Plasmid-DNA in ein Falcon-Röhrchen pipettiert. Der Ansatz wird gevortext und anschließend 190,26  $\mu$ l kaltes Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) tropfenweise hinzu gegeben. Es folgt eine Inkubation für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Ansatz zu den Zellen gegeben, wobei darauf geachtet wird, dass sich durch leichtes Schwenken der Schale und geeignetes Pipettieren, der Transfektionsansatz gleichmäßig auf alle Zellen verteilt. Es folgt eine Inkubationszeit von fünf Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 96 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Danach wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 3 ml Schockmedium überschichtet. Dieses wird nach drei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wieder abgenommen und die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen. Danach wird wieder DMEM (12 ml) auf die Zellen gegeben und nach 24 Stunden mit der Selektion begonnen. Hierfür werden die Zellen zweimal mit PBS + EDTA (0,4 g/l) gewaschen, da die transfizierten Zellen aufgrund der Präzipitate besonders stark an den Schalen adherent sind. Anschließend werden die Zellen mit TE überschichtet und nach kurzem Einwirken im Brutschrank, mit Selektionsmedium von den Schalen abgelöst und in Suspension gebracht. Danach werden die Zellen in definierten Verhältnissen auf 6 cm Schalen (in 4 ml Selektionsmedium), sowie in  $\mu$ -Slides VI<sup>0,4</sup> (Ibi Treat von ibidi) ausgesät (pSUPER.Puro und pSUPER.Puro-shp65-transfizierte Zellen:

200 000 Zellen, Ibis: 240 000 Zellen/ml; untransfizierte Zellen: 120 000 Zellen, Ibis: 120 000 Zellen/ml). Hierbei werden in die Slots der  $\mu$ -Slides VI<sup>0.4</sup> jeweils 30  $\mu$ l, der auf die gewünschte Zellzahl eingestellten Suspensionen, pipettiert. Nach drei Tagen Selektion im, mit 1  $\mu$ g/ml Puromycin versetztem Selektionsmedium werden die Zellen dann mit IL-1 $\alpha$  (10 ng/ml), für die im Ergebnisteil angegebenen Zeiten, stimuliert bzw. unbehandelt belassen und mittels *Proximity Ligation Assay* oder für den Westernblot weiter verarbeitet. Dabei wird immer eine untransfizierte Kontrolle mituntersucht.

## **3.2 Protein-Biochemische Methoden**

### **3.2.1 Herstellung von Ganzzelllysaten eukaryotischer Zellen**

Alle Arbeitsschritte der Zelllyse werden auf Eis bei 4 °C durchgeführt, um einer Degradation der zellulären Proteine entgegenzuwirken. Je nach Verwendungszweck wird das Zellmaterial mit unterschiedlichen Lysepuffern und nach verschiedenen Protokollen behandelt.

#### **3.2.1.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten zur Immunodetektion im Westernblot mit Ganzzellysepuffer**

Die zuvor bei -80 °C eingefrorenen Zellpellets werden auf Eis abgetaut und je nach Pelletgröße mit 60-80  $\mu$ l Ganzzellysepuffer resuspendiert. Anschließend wird diese Suspension gevortext und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach werden die Proben bei 10 600 rpm bei 4 °C für ebenfalls 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert und in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt.

#### **3.2.1.2 Lysate für die Ko-Immunpräzipitation - Zelllyse nach Bohmann/Weiss**

Die Zellpellets werden auf 4 °C aufgetaut und mit Lysepuffer nach Bohmann/Weiss (Weiss et al 2003) resuspendiert. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis und gelegentlichem Vortexen, werden die Proben, zum Optimieren des Zellaufschlusses, dreimal 20 Sekunden lang mit dem Branson Sonifier 250 auf Stufe 1 sonifiziert. Danach werden die Proben bei 4 °C und 41 000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird dann wieder in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt.

### **3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration durch die Bradford-Methode beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung an Proteine bindet.

Hierdurch kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm und damit zu einem Farbumschlag, der mit Hilfe eines Spektrophotometers quantifiziert werden kann (Bradford 1976).

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung werden zunächst die Proben mit PBS verdünnt und hiervon jeweils dreimal 100 µl in einer 96-Well-Platte vorgelegt. Ebenso werden je dreimal 100 µl einer BSA(*bovine serum albumin*)-Standardreihe (0-35 µg/ml Proteingehalt) pipettiert. Zu den Proben sowie der Standardreihe werden nun je 100 µl der Farbstofflösung, die sich aus Roti Quant 40 % (v/v) und ddH<sub>2</sub>O 60 % (v/v) zusammensetzt, gegeben. Nach ca. fünf Minuten und kurzem Schütteln der Platte, wird die Extinktion bei 595 nm im Microplate Spectrophotometer gemessen. Es wird darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen in den Vertiefungen befinden. Durch Vergleich mit der Standardreihe wird dann die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

### 3.2.3 SDS-Page

Mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend mittels Westernblot detektiert werden. Damit alle Proteine die gleiche Ladung aufweisen und sich somit nur durch ihr spezifisches Molekulargewicht unterscheiden, wird für die Anfertigung einer SDS-Page Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet. Dieses führt zu einer Denaturierung der Proteine, indem es an die hydrophoben Bereiche der Proteine bindet. Dadurch erhalten diese eine negative Ladung und migrieren im elektrischen Feld in Richtung der Anode (Laemmli 1970).

Der Größe der zu detektierenden Proteine angepasst, werden 9 %-ige Trenn- und 5 %-ige Sammelgele angefertigt:

<b>Lösungen (Lämmli)</b>	<b>9 %-Trenngel (18 ml)</b>	<b>5 %-Sammelgel (7,5 ml)</b>
ddH <sub>2</sub> O	3,09	4,21
50 % Glycerol	1,62	0,68
Trenngelpuffer (pH 8,8)	6,90	-
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	-	0,95
30 % Bisacrylamid	5,40	1,26
2 % SDS	0,90	0,38
40 % APS	0,054	0,023
TEMED	0,036	0,015

Zunächst wird das Trenngel gegossen, das mit Isopropanol überschichtet wird, um einen ebenen Abschluss zu erhalten. Nach der Polymerisierung wird das Isopropanol abgegossen und die Fläche über dem Gel vorsichtig mit ddH<sub>2</sub>O gesäubert und schließlich getrocknet. Anschließend wird das Sammelgel inklusive Geltaschen, durch Einbringen eines Gelkammes, gegossen. Dieser wird nach Aushärten des Sammelgels wieder vorsichtig entfernt. Die polymerisierten Gele werden in die Gellaufkammern eingebracht und mit Lämmli-Laufpuffer (1x) übergossen. Die Proben werden im Verhältnis 4:1 mit RotiLoad-Auftragspuffer (Roth) versetzt, zehn Minuten bei 95 °C denaturiert, abzentrifugiert und aufgetragen. Zusätzlich wird ein Marker in die Taschen pipettiert. Pro Minikammer wird eine Stromstärke von 36 mA angeschlossen (hier: 2 Minigele = 72 mA). Anschließend werden die Gele für den Westernblot weiter verwendet.

### **3.2.4 Westernblot und Immunodetektion mittels ECL-Reaktion**

Beim Westernblot werden Proteine von einem Proteingel durch Migration in einem elektrischen Feld auf eine Membran übertragen, auf der die Proteine dann z.B. durch Bindung von primären Antikörpern und anschließender Detektion mit HRP(*horse radish peroxidase*)-gekoppelten sekundären Antikörpern und einem Detektionsreagenz nachgewiesen werden können (Shaw and Zheng 1998).

Der Transfer der Proteine erfolgt in einem *semi-dry*-Verfahren in einer speziellen Bloteinrichtung. Es werden PVDF(Polyvinylidenfluorid)-Membranen verwendet. Die Gele werden, frei von Luftblasen, auf eine zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-Membran transferiert und von oben und unten mit je zwei Lagen Filterpapier (Dicke 1,2 mm) eingelegt. Die Filterpapiere werden zuvor in Westernblotpuffer (1x *Semi Dry* Blotpuffer) getränkt. Beim Aufbau des Blots wird darauf geachtet, dass die Membran näher zur Anode liegt, da die negativ geladenen Proteine aus dem Gel in Richtung des positiven Pols auf die Membran transferiert werden. Der Transfer erfolgt bei 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> für zwei Stunden. Im Anschluss wird der erfolgreiche Transfer mit Hilfe einer Gesamtproteinfärbung mit einer 0,1 %-igen Ponceau S-Lösung überprüft. Der Hintergrund wird vor der Dokumentation, der nun gefärbten Proteinbanden, durch Schwenken in aqua bidest entfärbt. Anschließend werden die Membranen wieder mit TBS-T vollständig entfärbt.

Für den Nachweis von spezifischen Proteinen werden anschließend zunächst unspezifische Bindungsstellen auf den Membranen durch Schwenken in Absättigungslösung (5 % Milch-TBS-T) für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur, blockiert. Um dann die gewünschten Proteine detektieren zu können,

werden die Membranen entweder über Nacht bei 4 °C oder für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit den primären Antikörpern, unter Schwenken, inkubiert. Dabei werden die Antikörper in 5 % Magermilch, in TBS-T oder 5 % BSA in TBS-T, in unterschiedlichen Konzentrationen angesetzt (1:500-1:10 000 je nach Antikörper, siehe Kapitel 2.9). Anschließend werden die Membranen zweimal kurz und dann fünfmal für je fünf Minuten mit TBS-T gewaschen, um überschüssige und nicht-gebundene Antikörper zu entfernen. Danach werden die Membranen bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde unter Schwenken mit dem passenden (anti-Kaninchen oder anti-Maus) HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert, welcher das Fc-Fragment des primären Antikörpers erkennt. Die Sekundärantikörper werden in 5 % Magermilch in TBS-T in verschiedenen Konzentrationen angesetzt (siehe Kapitel 2.9). Nicht-gebundene Antikörper werden dann erneut durch Waschen mit TBS-T (wie oben) entfernt. Die Detektion erfolgt, soweit nicht anders vermerkt, mittels der Enzym-Substrat-Reaktion der HRP mit dem ECL(*enhanced chemiluminescence*)-Reagenz von GE Healthcare. Die bei dieser Reaktion frei werdende Energie kann genutzt werden, um die Proteine, nach Schwärzung eines Röntgenfilms (Fujifilm) nachzuweisen.

Zur Detektion weiterer spezifischer Proteinbanden mit anderen Antikörpern auf derselben Membran, werden die Membranen kurz in Methanol geschwenkt (zur Inaktivierung des noch gebundenen Sekundärantikörpers), in TBS-T äquilibriert und erneut in 5 % Magermilch in TBS-T für eine Stunde zum Blockieren der unspezifischen Bindungstellen, abgesättigt. Die weiteren Arbeitsschritte folgen dann wie oben beschrieben.

### **3.2.5 Ko-Immünpräzipitation**

Um Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen, werden Ko-Immünpräzipitationen mit dem TrueBlot-System durchgeführt. Hierbei werden mit Hilfe eines Antikörpers und den TrueBlot-Beads einzelne Proteine aus den Lysaten (hier: Lysate nach Bohmann/Weiss) isoliert und unter günstigen Bedingungen gleichzeitig deren Bindungspartner präzipitiert. Diese können dann mittels SDS-Page und Westernblot detektiert werden.

Zunächst werden die TrueBlot-Beads (anti-Kaninchen) vorbereitet. Hierfür werden pro Ansatz 15 µl TrueBlot-Beads entnommen, diese mit 500 µl Lysepuffer nach Bohmann/Weiss versetzt und bei 4 °C und 4 700 rpm eine Minute lang zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und dieser Vorgang noch zweimal mit 800 µl Lysepuffer nach Bohmann/Weiss wiederholt. Zuletzt werden die Beads auf 600 µl mit Lysepuffer aufgefüllt und auf drei 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Anschließend werden die

entsprechenden Antikörper zu den Beads pipettiert. Es werden unterschiedliche Konzentrationen verwendet:

- Anti-IgG, Kaninchen, Santa Cruz 2027 und anti-p65 (C-20), Kaninchen, Santa Cruz 372, jeweils 1 µg pro Ansatz
- Anti-Iκ-Bα, Kaninchen, 9242S Cell Signaling je 0,085 µg pro Ansatz

Nach zwei Stunden Inkubation bei 4 °C auf dem Über-Kopf-Schüttler werden die immobilisierten Beads für eine Minute bei 4 °C und 4 700 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt, mit 500 µl Lysepuffer erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert, wieder der Überstand abgesaugt und die Proben schließlich auf 600 µl aufgefüllt. 100 µl dieser Antikörper-Beads-Suspension werden dann zu den Lysaten gegeben, die einen Proteingehalt von 0,9-1 mg aufweisen (aufgefüllt mit Lysepuffer auf 400 µl). Dieser Ansatz wird erneut zwei Stunden auf dem Über-Kopf-Schüttler bei 4 °C rotiert. Das Protein-Antikörper-Beads-Gemisch wird abzentrifugiert und anschließend viermal mit 500 µl Waschpuffer nach Bohmann/Weiss gewaschen. Die Elution der immobilisierten Proteine erfolgt durch Aufkochen der Beads in 60 µl 2xRoti-Load für zehn Minuten bei 95 °C. Die Eluate werden dann mittels SDS-Page untersucht. Lämmli-Gelelektrophorese und Westernblot laufen, wie bereits in Kapitel 3.2.3 und 3.2.4 beschrieben ab. Als Sekundärantikörper werden allerdings spezielle HRP-markierte TrueBlot-Antikörper der Firma Rockland verwendet (anti-Kaninchen und anti-Maus jeweils 1:1 500 in 5 % Magermilch in TBS-T). Diese sekundären Antikörper vermindern den Nachweis der zum Teil in der Detektion der Proteine der Ko-IP störenden schweren und leichten Kette der Immunglobuline. Dies kommt dadurch zu Stande, dass TrueBlot vor allem die nicht-reduzierte Form der IgG's detektiert, somit also hauptsächlich an die, nach SDS-Page und Westernblot auf die Membranen gegebenen, primären Antikörper bindet. Die IgG's, die für die Ko-IP verwendet werden, werden durch die Behandlung mit SDS denaturiert und damit reduziert und deshalb nur noch in geringem Maße von den sekundären TrueBlot-Antikörpern detektiert (siehe eBioscience, Catalog Number: 18-8816).

### **3.3 Zellbiologische Techniken**

#### **3.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz**

In der indirekten Immunfluoreszenz (IF) werden Proteine mittels primärem Antikörper markiert und können anschließend mit Hilfe eines Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpers, unter dem Fluoreszenzmikroskop, detektiert werden. So lassen sich die markierten Proteine und deren Lokalisation in der Zelle sichtbar machen.

Zunächst werden für die indirekte Immunfluoreszenz, die in diesem Fall nur mit HeLa-Zellen durchgeführt wird, Zellen in  $\mu$ -Slides VI<sup>0,4</sup> (Ibidi Treat von ibidi) ausgesät. Hierfür wird eine Zellsuspension auf 300 000 Zellen pro ml eingestellt und hiervon je 30  $\mu$ l pro Slot verwendet. Die Zellen werden für ca. eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und unter dem Mikroskop geprüft, ob die Zellen schon adherent sind. Anschließend werden die Kanäle mit 100  $\mu$ l Medium aufgefüllt. Am nachfolgenden Tag wird dann die indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Je nach Versuchsaufbau werden die Zellen zunächst stimuliert oder unbehandelt belassen. Alle folgenden Arbeitsschritte und Inkubationen finden bei Raumtemperatur statt. Zuerst wird das restliche Medium abpipettiert, die Zellen zweimal mit 150  $\mu$ l Hank's BSS Puffer gewaschen und mit 100  $\mu$ l 4 %-igem Paraformaldehyd in HBSS für fünf Minuten fixiert. Danach werden die Zellen erneut zweimal fünf Minuten mit je 150  $\mu$ l Hanks Puffer gewaschen. Es folgt die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit 100  $\mu$ l 10 % Serum (aus Esel, verdünnt in Hanks Puffer mit 0,1 % Saponin). Anschließend werden die Zellen mit den primären Antikörpern für zwei Stunden inkubiert. Hierbei werden die Antikörper in Konzentrationen zwischen 1:25-1:500 (siehe Kapitel 2.9), in Hank's BSS + 0,1 % Saponin verdünnt, eingesetzt. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen dreimal zehn Minuten mit 150  $\mu$ l HBSS + 0,1 % Saponin gewaschen und anschließend für zwei Stunden mit den sekundären Antikörpern inkubiert. Dies findet im Dunkeln statt, da die Antikörper lichtempfindliche Fluoreszenzen enthalten. Auch die Sekundärantikörper werden in HBSS + 0,1 % Saponin verdünnt (Cy3-gekoppelte Antikörper 1:200, FITC-gekoppelte Antikörper 1:100, Dylight-gekoppelte Antikörper 1:200). Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen mit 150  $\mu$ l Hanks Puffer dreimal für zehn Minuten gewaschen. Es folgt die Kernfärbung mit 100  $\mu$ l einer 1  $\mu$ M Hoechst-Lösung (Bis-Benzimid, gelöst in HBSS) für fünf Minuten in Dunkelheit. Hoechst 33342 (Invitrogen) interkaliert mit doppelsträngiger DNA und emittiert eine blaue Fluoreszenz, sodass auf diese Weise die Zellkerne angefärbt werden können. Die Zellen werden zweimal innerhalb von fünf Minuten mit jeweils 150  $\mu$ l HBSS gewaschen und zuletzt mit 50-100  $\mu$ l einer 30 %-igen Glycerollösung (in HBSS verdünnt) überschichtet, um die Proben auch längerfristig lagern und untersuchen zu können. Als Kontrollen werden jeweils nur einer der sekundären ohne die primären Antikörper in einen Slot gegeben, sowie ein Slot ohne jegliche Antikörper belassen, der nur die Behandlung durch die Wasch- und Lösungsmittel erfahren hat. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgt am DM IRE 2 Mikroskop von Leica. Mit Hilfe der Leica FW4000-Software werden die Bilder aufgenommen und weiter bearbeitet.

### 3.3.2 Proximity Ligation Assay (PLA)

Der *Proximity Ligation Assay* ist eine äußerst sensitive Methode um zum Beispiel Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen (Soderberg et al. 2008). Hierfür werden zunächst die Ziel-Proteine mit primären Antikörpern markiert. Dabei müssen die primären Antikörper in unterschiedlichen Spezies generiert worden sein (zum Beispiel: Antikörper 1: anti-Maus, Antikörper 2: anti-Kaninchen). So genannte PLA *probes*, die immer in der PLUS- und MINUS-Form zusammen eingesetzt werden (also z.B.: anti-Maus-MINUS und anti-Kaninchen-PLUS), stellen die sekundären Antikörper dar, die an ihren Fc-Bereichen spezifische Oligonukleotide gebunden haben. Diese Oligonukleotide können, nach Hybridisierung mit komplementären Oligos, vorliegend in der Ligase-Lösung (Duolink®, Sigma-Aldrich), bei einem maximalen Abstand von 40 nm, einen DNA-Ring bilden (Duolink® using PLA® Handbuch, Sigma-Aldrich). Dieser wird dann mit Hilfe der Ligase verschlossen. Einer der beiden Oligonukleotide dient mit seinem 3'-Ende als Primer für die *Rolling Circle Amplification* durch die DNA-Polymerase phi29. Hierdurch erfolgt eine ca. 100-fache Amplifikation des DNA-Rings. Das Oligonukleotid an dem anderen sekundären Antikörper, trägt an seinem 3'-Ende drei fehlgepaarte Exonuclease-resistente 2'O-methyl-RNA Nukleotide, damit dieser Strang nicht als Vorlage für die RCA dienen kann (Soderberg, Gullberg et al. 2006). Im Verlauf der RCA hybridisieren die, in der Amplifikation-Solution (Duolink®, Sigma-Aldrich) vorhandenen, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide an mehreren Bereichen des sich wiederholenden RCA-Produkts, wodurch es zu einer massiven Signalverstärkung kommt. Diese Signale können anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Insgesamt ist nach der abgelaufenen Reaktion für jede Protein-Protein-Interaktion ein Spot zu sehen. Weiterhin können mit dem PLA Experiment nicht nur Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen und quantifiziert werden, sondern auch die Proteinexpression sowie die Lokalisation von Proteinen in der Zelle. Hierfür werden zwei Antikörper verwendet, die an unterschiedliche Epitope des gleichen Proteins binden. Auch Protein-Modifikationen können mit Hilfe der Methode auf diese Weise beobachtet werden.

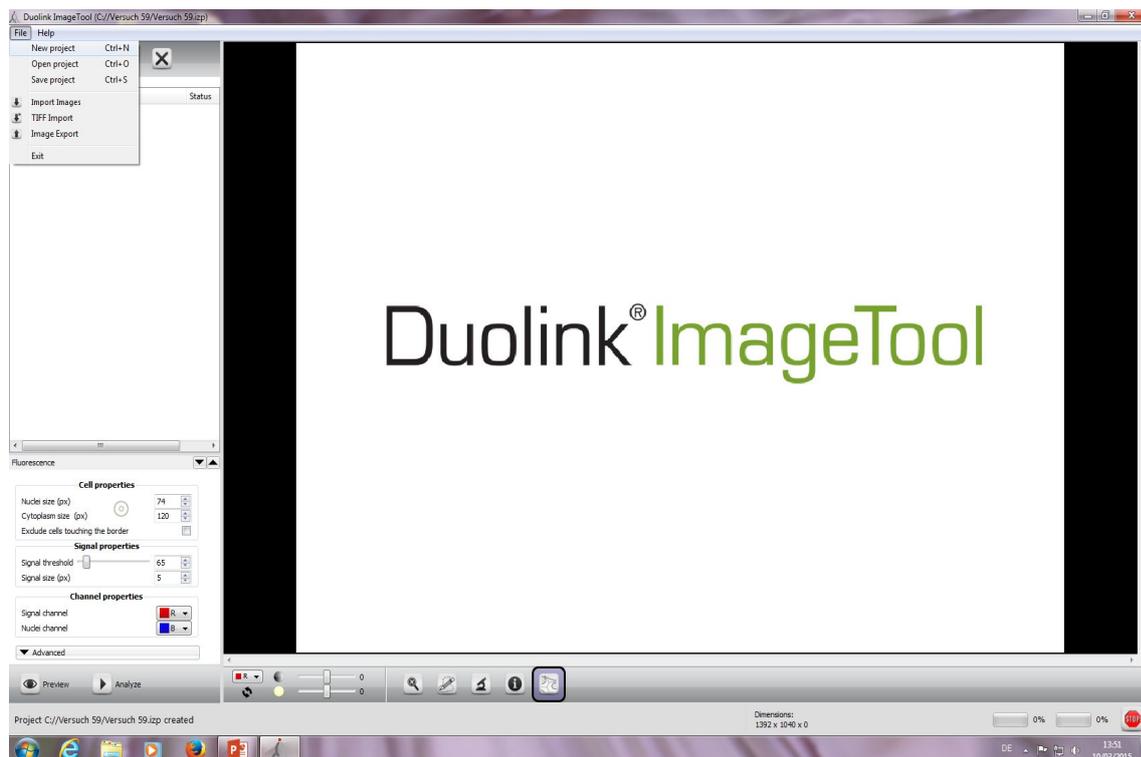
Zur Durchführung eines PLAs werden am Vortag 30 µl einer definierten Zelldichte (HeLa-Zellen: 300 000/ml, MEF-Zellen: 150 000 bzw. 200 000/ml) in die einzelnen Slots der µ-Slides VI<sup>0,4</sup> (Ibidi Treat von ibidi) ausgesät. Nach ca. einer Stunde Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 96 % Luftfeuchtigkeit, werden die Slots mit 100 µl Medium aufgefüllt. Je nach Experiment werden auch hier am Folgetag einzelne Slots mit IL-1α stimuliert oder unbehandelt belassen. Nach Ablauf der Stimulationszeit wird das Medium aus den µ-Slides VI<sup>0,4</sup> (Ibidi Treat von ibidi) entfernt und die Zellen zweimal mit 150 µl Hank's BSS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgt mit

100 µl 4 %-igem Paraformaldehyd (in HBSS) für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend werden die Zellen mit 150 µl HBSS + 0,1 % Saponin zweimal für jeweils fünf Minuten behandelt, um die Membranpermeabilität der Zellen zu verbessern. Danach werden die Zellen mit 100 µl *Blocking Solution* aus dem PLA Kit (Duolink®, Sigma-Aldrich) für 30 Minuten bei 37 °C im Hybridisierungssofen inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Anschließend werden die beiden primären Antikörper (verschiedene Konzentrationen; 1:50-1:200, siehe Kapitel 2.9) im *Antibody-Diluent* (Duolink®, Sigma-Aldrich) verdünnt und hiervon je 50 µl in die Slots pipettiert. Diese können dann für eine Stunde bei 37 °C im Hybridisierungssofen an ihre spezifischen Antigene binden. Die Zellen werden danach dreimal für je fünf Minuten mit 150 µl Waschpuffer A (aus dem PLA Kit, Duolink®, Sigma-Aldrich) gewaschen und anschließend mit den 50 µl-PLA *Probes*-Lösung (Duolink®, Sigma-Aldrich) für eine weitere Stunde im Hybridisierungssofen inkubiert. Die PLA *probes* werden 1:5 im *Antibody-Diluent* verdünnt. Essentiell für die anschließende RCA-Reaktion ist das Verwenden von sowohl PLUS- als auch MINUS-*probes*. Danach werden die Zellen erneut dreimal für fünf Minuten mit 150 µl Waschpuffer A gespült, worauf die Inkubation mit 50 µl der Ligase-Lösung für eine halbe Stunde bei 37 °C im Hybridisierungssofen erfolgt. Die Ligase wird 1:60 in HNPC-Wasser mit der *Ligation-Solution* (1:5) verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit 150 µl Waschpuffer A für jeweils zwei Minuten, erfolgt die Amplifikation. Hierfür wird die Polymerase 1:80 bzw. 1:100 in HNPC-Wasser mit der *Amplification-Lösung* (1:5) verdünnt und 50 µl in die Slots gegeben. Die Inkubation erfolgt auch hier wieder im Hybridisierungssofen bei 37 °C für 100 Minuten. Ab diesem Arbeitsschritt wird darauf geachtet, dass die Proben und Reagenzien nicht mehr direkt dem Licht ausgesetzt werden, um eine mögliche Schädigung der Fluorophore zu verhindern. Die Zellen werden nach der RCA dreimal fünf Minuten mit 150 µl Buffer B (ebenfalls aus dem PLA Kit, Duolink®, Sigma-Aldrich) gewaschen. Es folgt ein weiterer Waschschrift für zweimal eine Minute mit 150 µl HBSS. Die weiteren Schritte (Kernfärbung, Waschen und Einbetten) erfolgen wie bei der indirekten Immunfluoreszenz. Zur Kontrolle der unspezifischen Signale des Assays wird in einem Slot kein primärer Antikörper verwendet und in zwei weiteren jeweils nur einer der beiden primären Antikörper vorgelegt. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgt am DM IRE 2 Mikroskop von Leica mit Hilfe der Leica Software FW4000. Die Rohdaten werden dann mittels dieser Software weiter bearbeitet. Außerdem erfolgt eine standardisierte Analyse der Anzahl der Spots mit Hilfe der Duolink®ImageTool Software, die dann mit SigmaPlot 11.0 graphisch dargestellt werden.

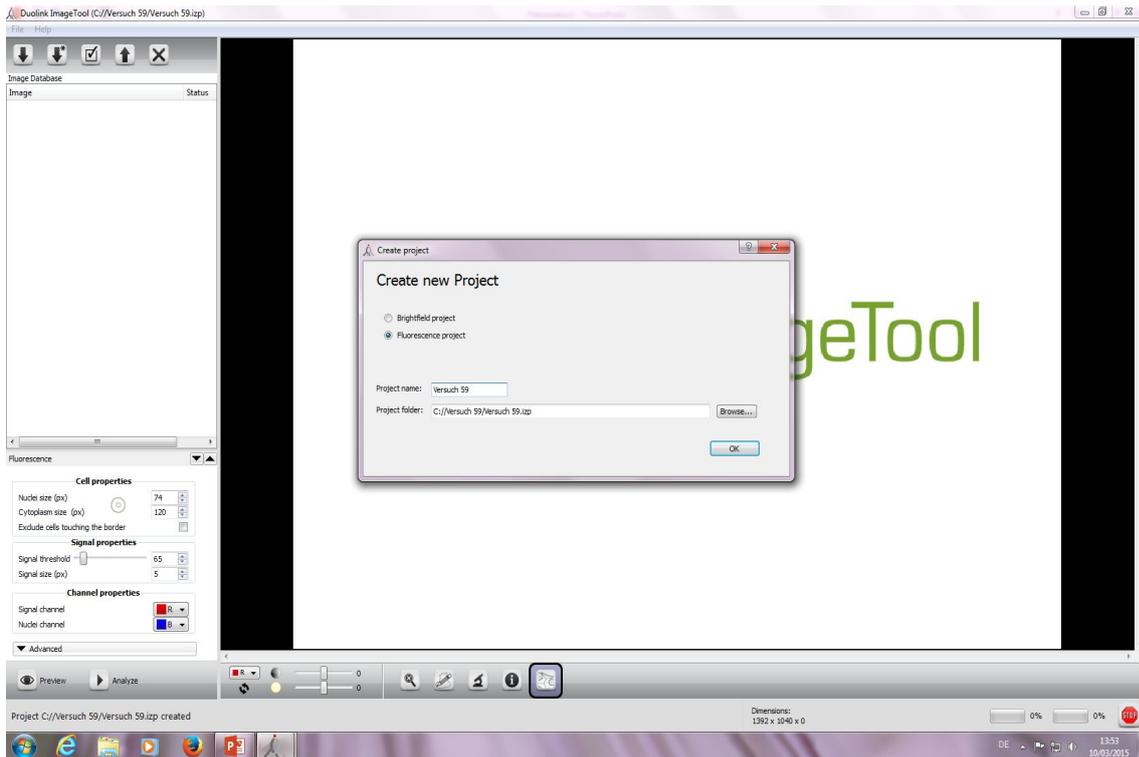
### 3.4 Computergestützte Analyse der PLA Experimente mittels Duolink®ImageTool

Um eine standardisierte Analyse der auftretenden PLA Signale zu ermöglichen werden die mit dem Mikroskop aufgenommenen Bilder mittels Duolink®ImageTool analysiert und so die Signale pro Zelle genau ausgezählt. In Abbildung 12 wird Schritt für Schritt die Vorgehensweise dargestellt.

**Abbildung 12:** Durchführung der standardisierten, computergestützten Analyse der PLA Experimente mittels Duolink®Image Tool



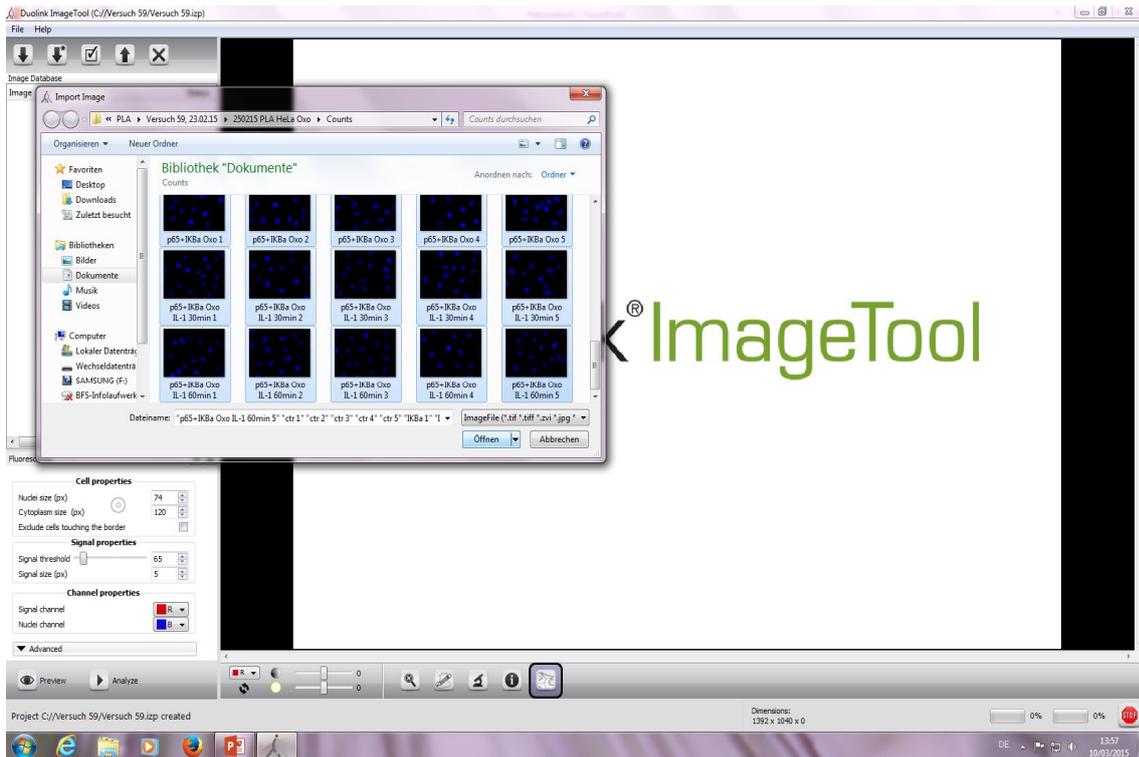
Anlegen eines neuen Projektes: "File" > "New project"



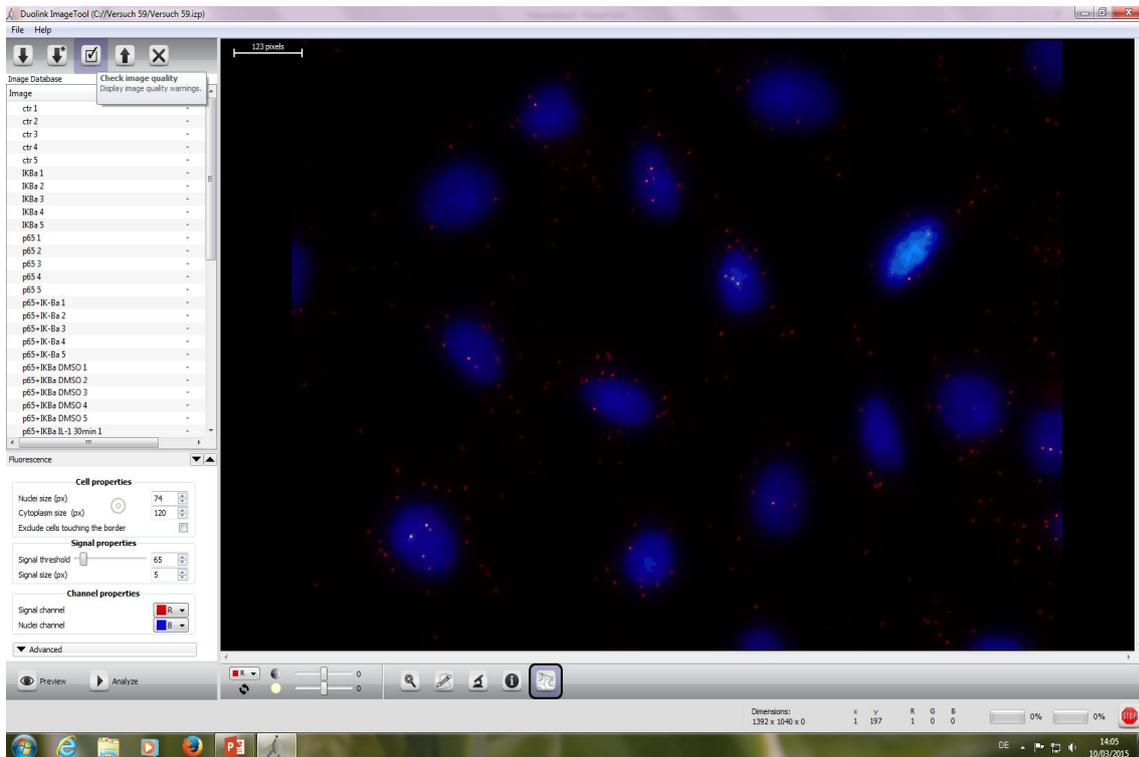
Benennen des Projektes (hier Versuch 59) > "OK"



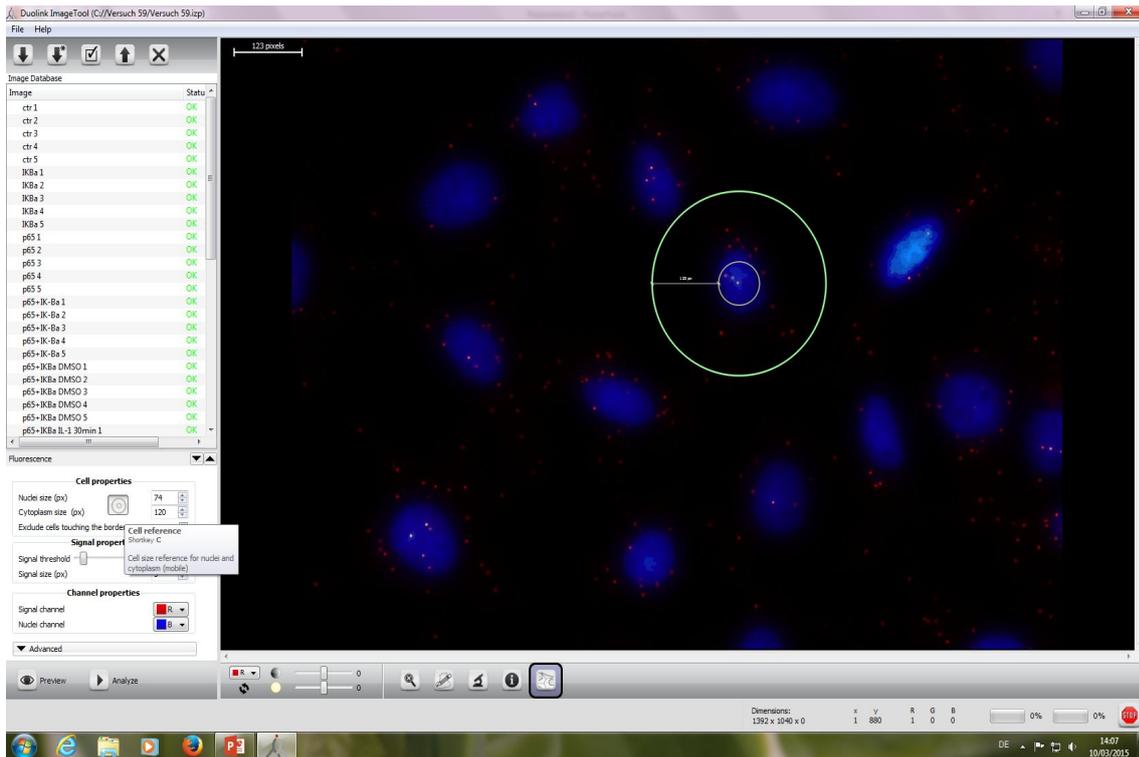
Importieren der Bilder ("Image Import", ↓). Dabei wurden die Bilder verwendet, die das PLA Signal und die Kernfärbung beinhalten (Merge 1), ohne Phasenkontrast.



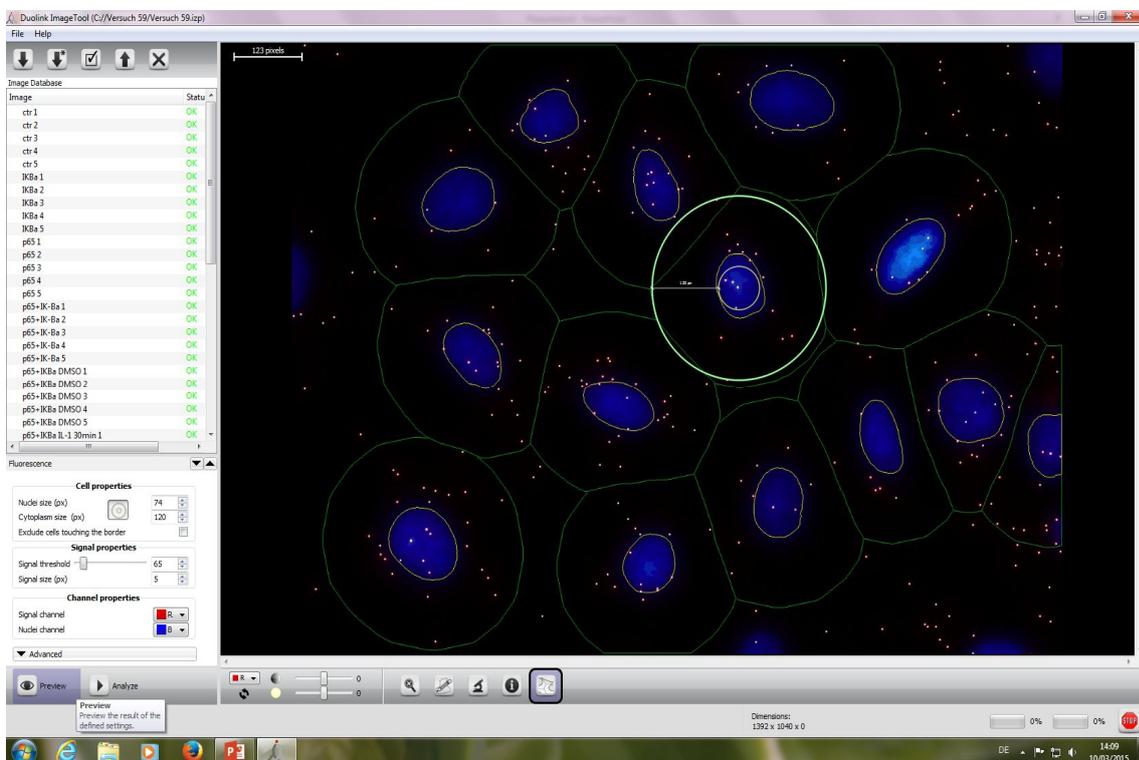
Bilder auswählen > "Öffnen"



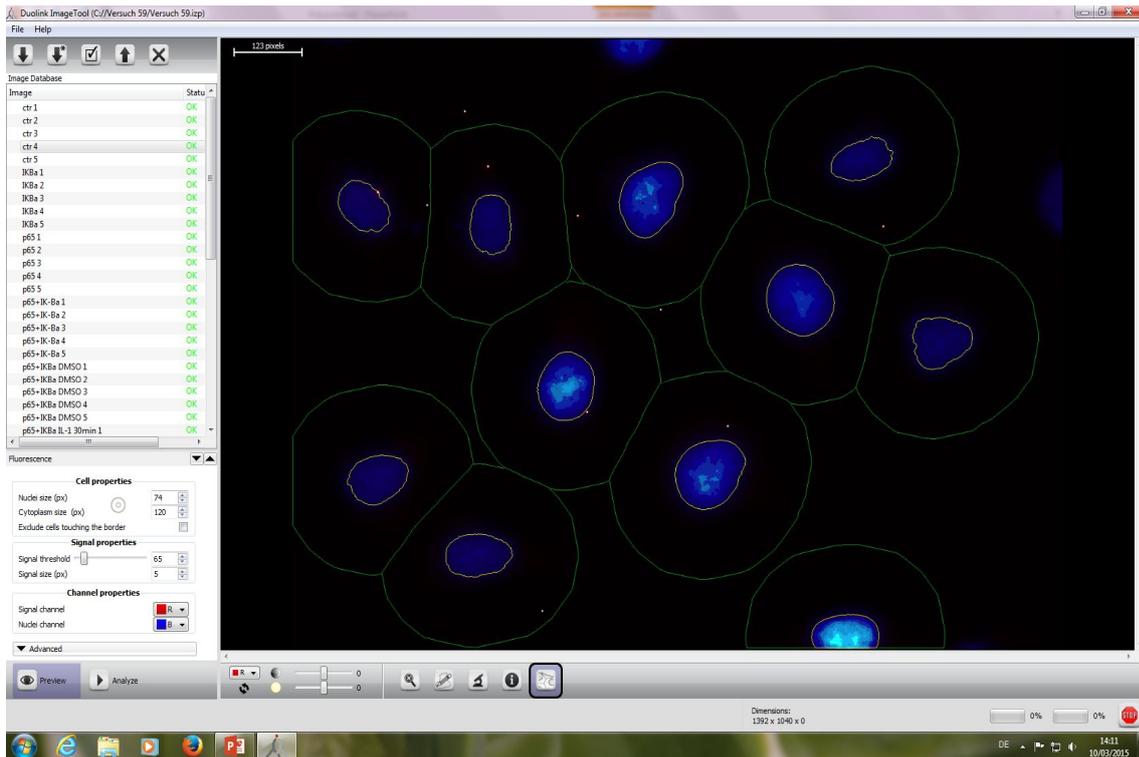
Überprüfen der Bildqualität ("Check image quality")



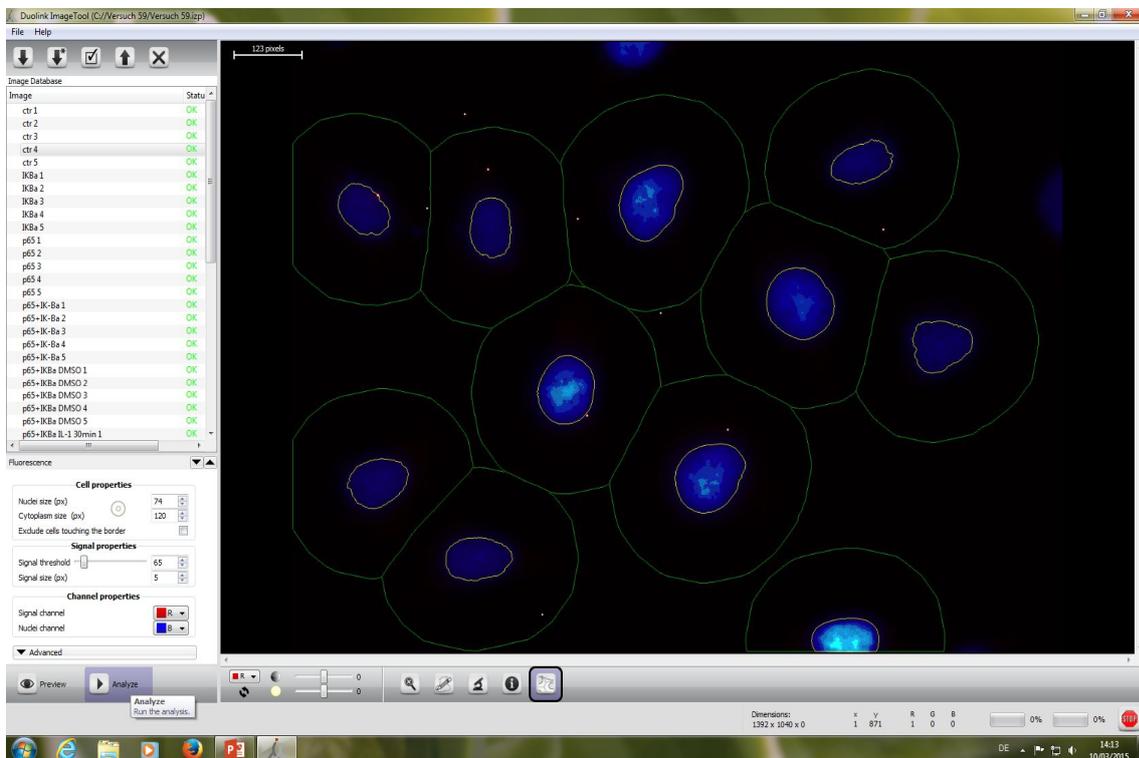
Einstellen der Zellgröße ("Cell properties") und der Größe der Zellkerne. Außerdem Auswählen der Option "Exclude cells touching the border".



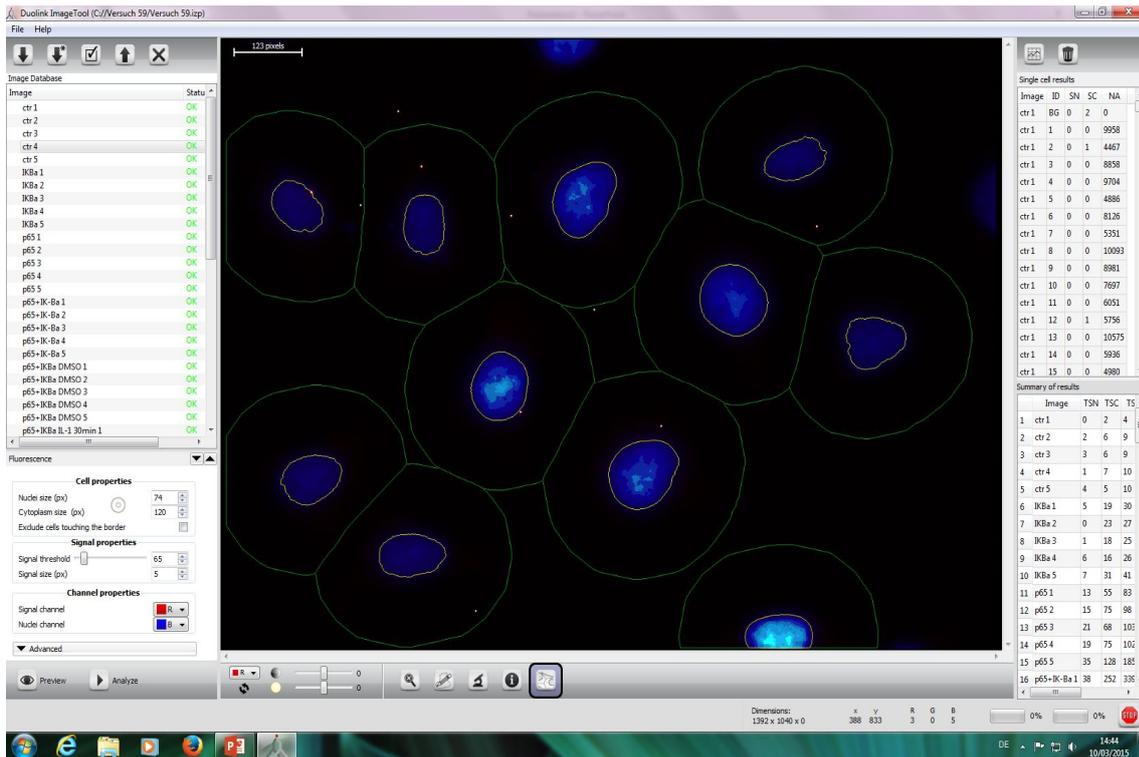
Vorschau erstellen lassen ("Preview"). Nun kann durch feinjjustieren an den Signaleigenschaften ("Signal properties"), eingestellt werden, welche Signale erkannt werden sollen.



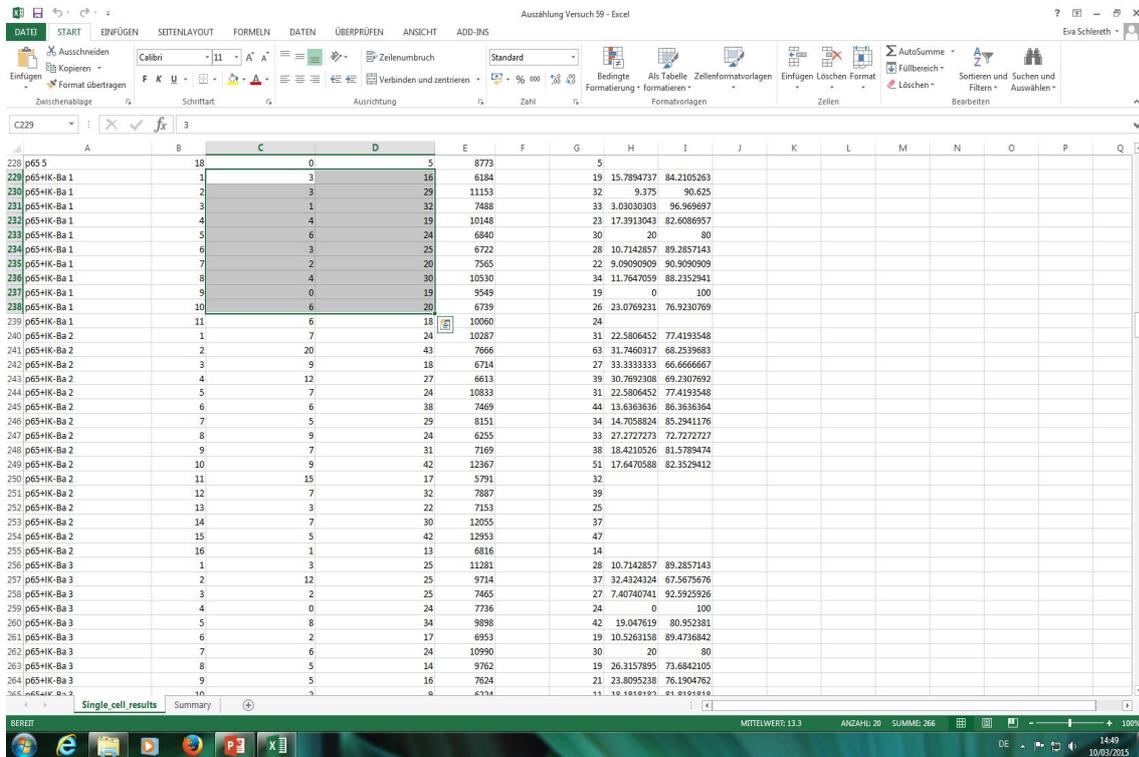
Überprüfen der Einstellungen an Kontrollbildern (Versuchsansätze mit keinem oder nur einem der beiden primären Antikörper).



Nun erfolgt die Analyse ("Analyse")



Nach der Analyse werden die Ergebnisse rechts in Tabellenform angezeigt. Durch Klicken auf einzelne Werte kann man sehen welche Zelle zum Wert zugehörig ist. Durch Klick auf das Statistik-Symbol links über der Tabelle können die Werte gespeichert und anschließend in Excel kopiert und weiterverarbeitet werden.



Pro Versuchsansatz wurden auf diese Weise jeweils fünf Bilder analysiert und dann zufällig die ersten zehn Werte jeden Bildes für die Datenanalyse herangezogen. Hierzu wurden die Daten in Sigma Plot kopiert und weiterverarbeitet.

## 4 Ergebnisse

### 4.0 Validierung der PLA Methode anhand der physiologischen Regulation des p65/I $\kappa$ B-Protein-Protein-Komplexes in HeLa-Zellen und einer p65-defizienten Zelllinie

Wie in der Einleitung in Kapitel 1.5 dargestellt, wurde die Regulation von NF $\kappa$ B-Faktoren durch inhibitorische  $\kappa$ B-Proteine unzählige Male beschrieben und ist im Gebiet der Signaltransduktion einer der am besten erforschten *feedback* Mechanismen. Im Folgenden werden Ergebnisse zu diesem Signalweg dargestellt, welche mittels unterschiedlicher Methoden generiert wurden. Diese Ergebnisse wurden anschließend genutzt, um den PLA als spezifische und valide Methode für die Detektion von Protein-Protein-Interaktionen zu verifizieren.

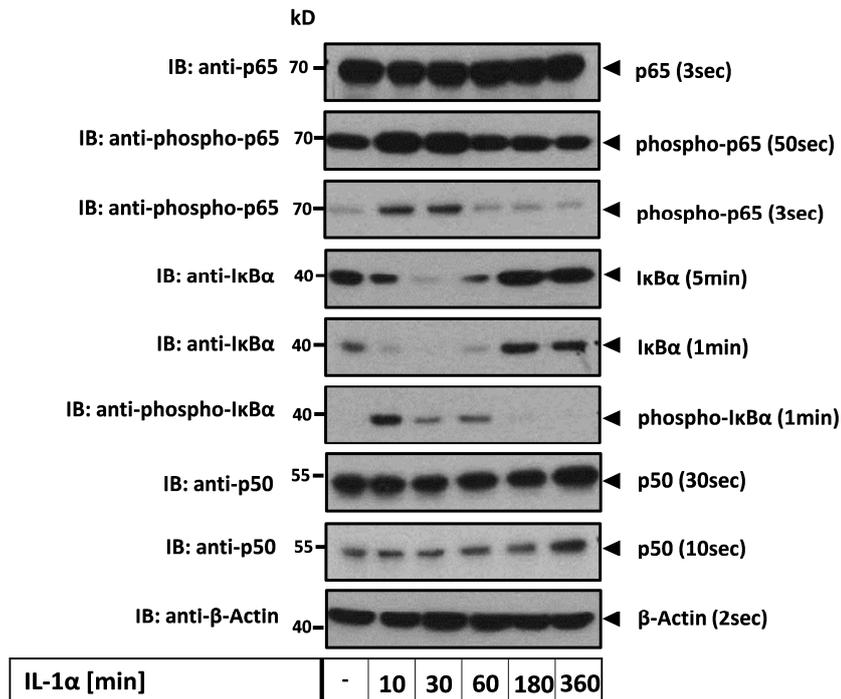
### 4.1 Untersuchung der IL-1-abhängigen Interaktion von p65/I $\kappa$ B $\alpha$ durch klassische proteinbiochemische und zellbiologische Verfahren

#### 4.1.1 IL-1 $\alpha$ Zeitreihe in HeLa-Zellen

Um den zeitlichen Effekt der Stimulation durch IL-1 $\alpha$  auf die Phosphorylierung von p65 und den Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  genauer zu untersuchen, wurden zunächst Westernblot Experimente mit entsprechend stimulierten Zelllysaten von HeLa-Zellen angefertigt. Diese wurden entweder extra für diesen Versuch generiert oder stammen aus den Versuchen, an denen nachfolgend eine Ko-Immünpräzipitation (Ko-IP) durchgeführt wurde.

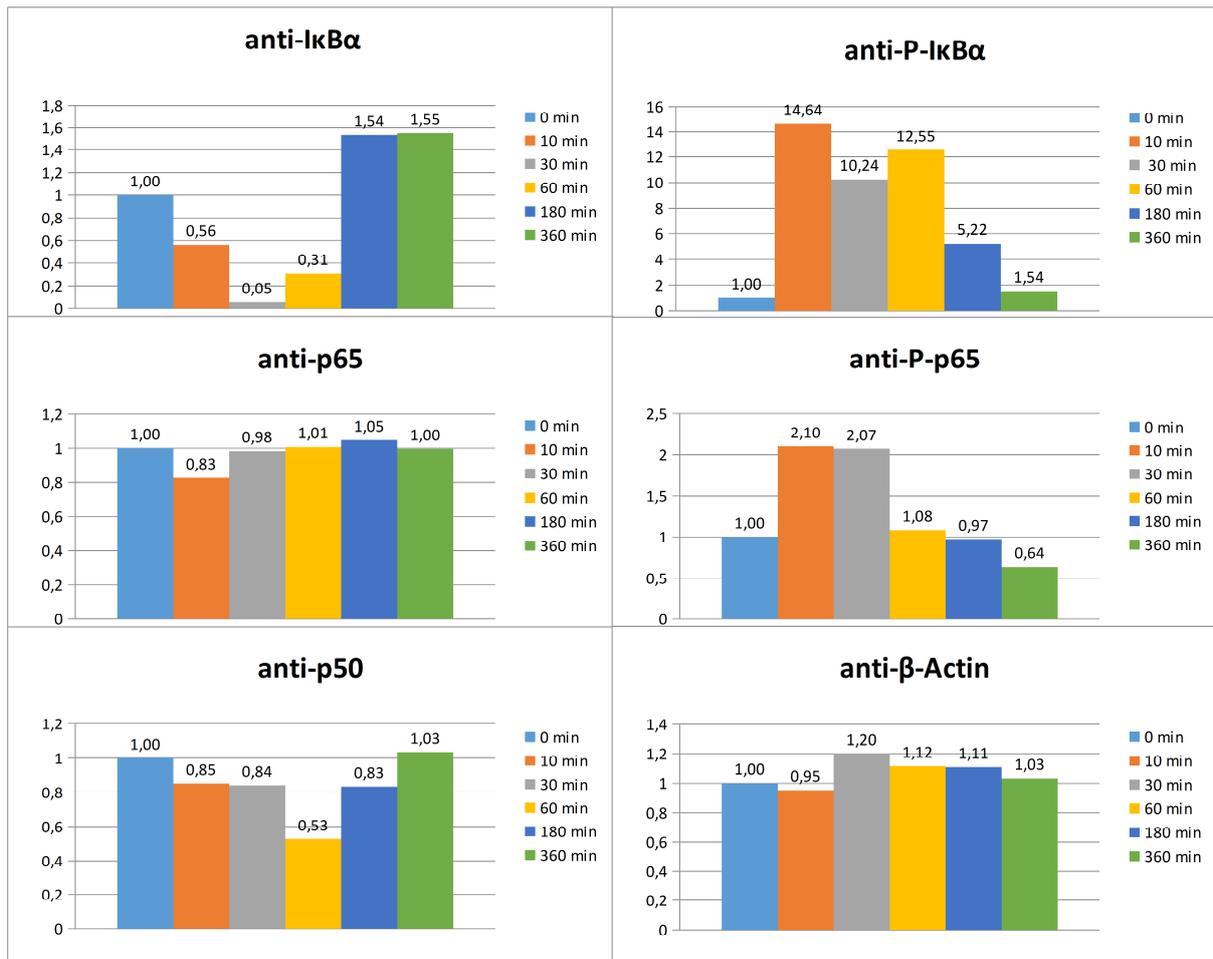
Die Expression des p65 (Molekulargewicht ca. 70 kDa) war weitestgehend unbeeinflusst von der Stimulation durch IL-1 $\alpha$ , d.h. sie blieb auf einem konstanten Level (siehe Abbildung 13 und 14). Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass durch die IL-1 $\alpha$ -Stimulation nach ca. zehn Minuten die Phosphorylierung von p65 an Serin 536 deutlich zunimmt. Diese Phosphorylierung des p65-Proteins war nach zehn Minuten bis zu einer halben Stunde Stimulation mit IL-1 $\alpha$  maximal. Durch Quantifizierung der Banden, zeigte sich, dass bei diesem Maximum etwa doppelt (2,1-fach bzw. 2,07-fach i.V. zum Ausgangswert) so viel an Serin 536 phosphoryliertes p65 vorliegt, wie in der nicht stimulierten Kontrolle. Nach einstündiger Behandlung mit IL-1 $\alpha$  nahm die Phosphorylierung des Proteins wieder deutlich ab und erreichte nach sechs Stunden Stimulierung einen Level unterhalb des Ausgangswertes (0,64-fach i.V. zum Ausgangswert). Für das I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein (Molekulargewicht ca. 39 kD), zeigte sich auf

dem Westernblot bereits ab einer IL-1 $\alpha$ -Stimulationsdauer für zehn Minuten ein deutlicher Rückgang und damit Abbau des Proteins.



**Abbildung 13:** Transiente Regulation des I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbaus durch IL-1 $\alpha$  in HeLa-Zellen

Die Zellen wurden entsprechend den, in der Abbildung angegebenen, Zeiten mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  stimuliert bzw. unbehandelt belassen und anschließend der Proteingehalt mittels Westernblot analysiert. Dabei diente  $\beta$ -Actin als Referenzprotein. Der hier gezeigte Versuchsansatz ist repräsentativ für insgesamt vier Replikate. Außerdem wurden Westernblots aus Ganzzellextrakten angefertigt und auf die oben gezeigten Proteine untersucht. (siehe Anhang, Abbildung Anhang 1) Modifiziert veröffentlicht in (Mayr-Buro et al. 2019).



**Abbildung 14:** Quantifizierung des Immunoblots der IL-1 $\alpha$ -Zeitreihe

Der, in Abbildung 13 gezeigte, Immunoblot wurde mit Hilfe der ImageJ-Software analysiert und anschließend die Daten mittels Excel in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Die Zahlen geben dabei die relative Schwärzung des Immunoblots, bezogen auf den Ausgangswert bei 0 Minuten, also ohne Stimulation durch IL-1 $\alpha$ , an.

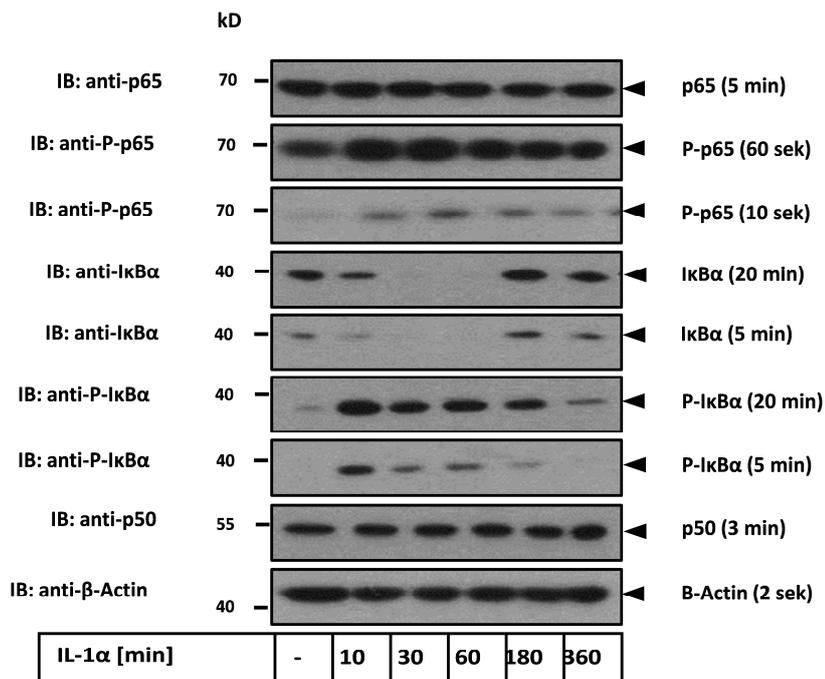
In der Quantifizierung wird deutlich, dass die Menge des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins nach zehn minütiger Stimulationszeit auf ca. 56 % des Ausgangswertes abfiel. Nach halbstündiger Stimulation exprimierten die Zellen kaum noch I $\kappa$ B $\alpha$ , sodass im Westernblot praktisch kein Signal mehr detektierbar war (5 % bezogen auf den Ausgangswert). Nach einer Stunde IL-1 $\alpha$ -Stimulierung nahm die Menge an I $\kappa$ B $\alpha$  wieder zu, das heißt ab diesem Zeitpunkt begannen die Zellen erneut I $\kappa$ B $\alpha$  zu exprimieren. Dies konnte auf dem Westernblot durch eine Zunahme der I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinbande auf 31 %, bezogen auf den Ausgangswert der unstimulierten Kontrolle, beobachtet werden. Nach drei und sechs Stunden Stimulation fiel ein Anstieg der Proteinexpression über den basalen Level hinaus, auf ca. 150 %, auf. Eine Phosphorylierung des I $\kappa$ B $\alpha$  am Serin 32 war vor allem im Zeitfenster zwischen zehn Minuten und einer Stunde IL-1 $\alpha$ -Behandlung zu beobachten (nach zehn Minuten 14,6-fach, nach 30 Minuten 10,2-fach, nach 60 Minuten 12,6-fach, jeweils i.V. zum Ausgangswert). Weiterhin wurde

für die erzeugten Proben die Expression von p50 untersucht, dessen eher schwache Bande knapp unterhalb der 55 kDa Markierung verläuft und dessen Expression, ähnlich wie die des p65, über die Stimulation mit IL-1 $\alpha$  hinweg konstant blieb. Als Beladungskontrolle diente  $\beta$ -Actin, welches unbeeinflusst vom Stimulus konstitutiv exprimiert wurde und im Westernblot über die verschiedenen Stimulationszeiträume etwa gleich starke Banden aufwies.

#### **4.1.2 Zeitkinetische Analyse der IL-1 $\alpha$ regulierbaren p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Interaktion mittels Ko-Immunpräzipitation**

In früheren Studien wurde gezeigt, dass ein entscheidender Regulationsmechanismus des NF $\kappa$ B-Signalweges die Retention der Komponenten p65 und p50 im Zytosol durch die inhibitorischen  $\kappa$ B Proteine I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  ist (siehe Einleitung Kapitel 1.5). Um den zeitlichen Verlauf dieser Interaktionen, insbesondere von p65 und I $\kappa$ B $\alpha$ , darzustellen, wurden Ko-Immunpräzipitationen mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Die Stimulationszeiten waren die gleichen wie in der, in Abschnitt 4.1.1 erwähnten, Kinetik.





**Abbildung 16:** Immunoblots der Inputkontrolle zu der in Abbildung 15 gezeigten Ko-IP

Die Zellen wurden entsprechend den, in der Abbildung angegebenen, Zeiten mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  stimuliert bzw. unbehandelt belassen und anschließend der Proteingehalt mittels Westernblot analysiert. Dabei diente  $\beta$ -Actin als Referenzprotein.

Im Ansatz der Ko-IP mit dem I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörper (siehe Abbildung 15, linke Seite) konnte p65 deutlich nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass p65 an I $\kappa$ B $\alpha$  gebunden ist und dieser Komplex durch Isolierung von I $\kappa$ B $\alpha$  aus dem Ganzzelllysat herausgelöst werden kann. Das p65-Signal nahm, deckungsgleich mit dem Signal für I $\kappa$ B $\alpha$ , nach einer halben Stunde IL-1 $\alpha$ -Stimulation in der I $\kappa$ B $\alpha$ -IP deutlich, auf ca. 55 % des Ausgangswertes ab, blieb über eine Stunde Behandlung niedrig und nahm dann wieder an Intensität zu. Dies ist auf den Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins zurückzuführen, woraufhin auch weniger p65 im Komplex herausgelöst wird. Insgesamt deckt sich dies mit den Ergebnissen der Ko-IP, die mit dem p65-Antikörper durchgeführt wurde. Es ließ sich auch hier eine entsprechende Kinetik des Auftretens von I $\kappa$ B-Proteinen im Westernblot nachweisen. Beginnend nach zehn Minuten, noch deutlicher nach 30 Minuten Stimulation, war ein Rückgang des I $\kappa$ B $\alpha$ -Signals in der p65-Ko-IP zu beobachten, was eine deutliche Abnahme der vorhandenen p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexe bedeutet. Nach drei Stunden IL-1 $\alpha$ -Behandlung wurde in der Ko-IP mit p65 wieder mehr I $\kappa$ B $\alpha$  nachgewiesen, da sich die Menge an I $\kappa$ B $\alpha$  regenerierte. Die Menge an p65 war in der mit p65-Antikörpern durchgeführten Ko-IP konstant. Als Kontrolle dienten jeweils IgG-Kaninchen-Antikörper, welche weder für den p65- noch für den I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörper eine spezifische Bande zeigten. So konnte mit der Ko-Immunpräzipitation bestärkt werden, dass eine Interaktion zwischen p65 und I $\kappa$ B $\alpha$

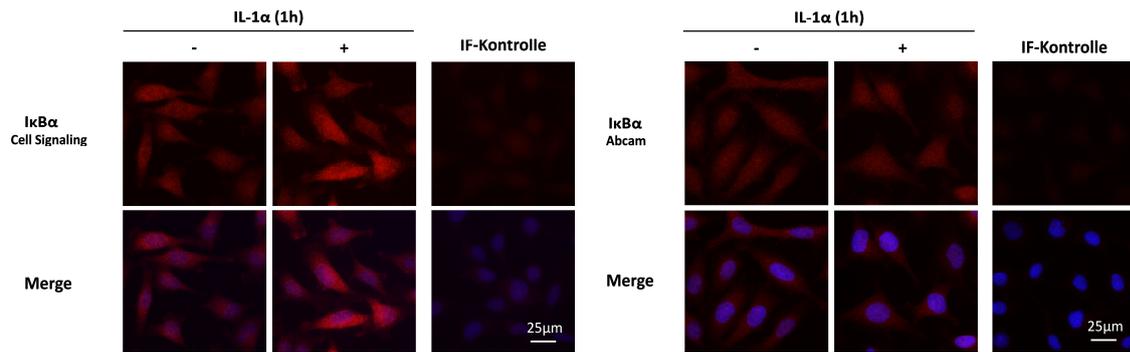
vorhanden ist, welche IL-1 $\alpha$ -abhängig reguliert wird. Dabei wird durch den IL-1 $\alpha$ -abhängigen Abbau des I $\kappa$ B $\alpha$ , welcher bereits im Westernblot zuvor detektiert wurde, im Zeitraum zwischen zehn und 60 Minuten, gleichzeitig die Interaktion zwischen p65 und I $\kappa$ B $\alpha$  aufgelöst.

Interessant war in diesem Zusammenhang, dass p50 mit Hilfe des entsprechenden Antikörpers nur auf der Membran der p65-Ko-IP, nicht aber in der I $\kappa$ B $\alpha$ -Ko-IP nachgewiesen werden konnte. Da p50 am häufigsten als Heterodimer im Komplex mit p65 zusammen vorliegt und im Zytosol zusammen mit diesem durch I $\kappa$ B $\alpha$  retiniert wird, wäre zu erwarten gewesen, dass dieses sowohl in der p65-Ko-IP also auch in der Ko-IP mit I $\kappa$ B $\alpha$  ko-präzipitiert werden kann. Da dies aber nicht der Fall war, ist es denkbar, dass p50 nur direkt an p65 bindet und dass durch den Abstand zum präzipitierten Protein (hier: I $\kappa$ B $\alpha$ ), p50 durch die Waschschriffe aus dem Komplex herausgelöst wird. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit wäre, dass der I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörper mit dem durch p50 gebundenen Anteil des p65-Proteins interferiert.

#### **4.1.3 Indirekte Immunfluoreszenz mit verschiedenen I $\kappa$ B $\alpha$ - und p65-Antikörpern zur Ermittlung der subzellulären Lokalisation der Proteine**

Durch die indirekte Immunfluoreszenz (IF) ist es, im Gegensatz zu Westernblot-Analysen, möglich genaue Aussagen über die Lokalisation und Verteilung von Proteinen in einzelnen Zellen zu treffen. Dies wird durch ein antikörperbasiertes Verfahren ermöglicht, welches zu einer Fluoreszenzmarkierung der Proteine führt.

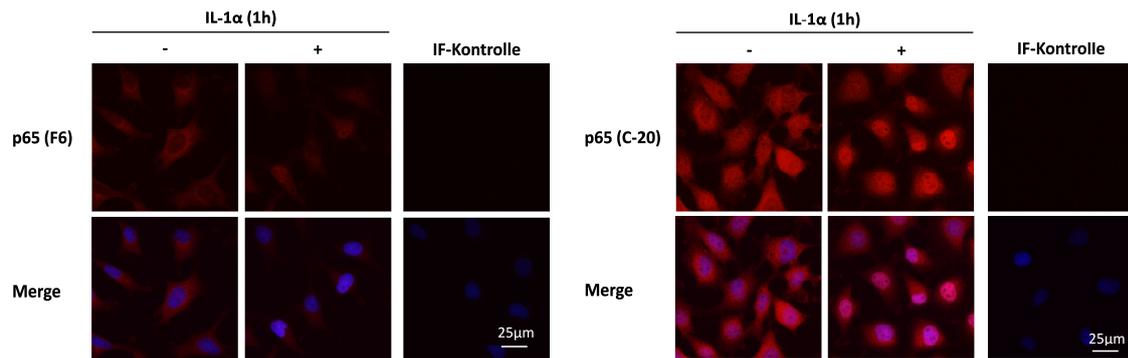
Die IF wurde mit Antikörpern zweier unterschiedlicher Anbieter durchgeführt, welche gegen I $\kappa$ B $\alpha$  gerichtet sind (Cell Signaling, Abcam, siehe Kapitel 2.9.1). Unter Verwendung der verschiedenen Antikörper wurde bei beiden Versuchsansätzen beobachtet, dass ein auf die gesamte Zelle verteiltes Signal entsteht, welches insgesamt eher schwach war (siehe Abbildung 17). Dabei konnte eine Fluoreszenzfärbung sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern beobachtet werden. Auch die Verwendung verschiedener Sekundärantikörper (grün-markierte Fluoreszenz durch FITC (Daten nicht gezeigt), oder rot durch Cy3 (siehe unten) führten weder zu einer Veränderung der Stärke des Signals, noch zu einer veränderter Lokalisierung. Ein Effekt durch die IL-1 $\alpha$ -Stimulation (zu erwarten wäre eine Abnahme des Signals durch den Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$ ), konnte mit Hilfe der IF-Experimente in diesem Sinne nicht beobachtet werden.



**Abbildung 17:** Indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von IκBα mit zwei verschiedenen IκBα-Antikörpern

HeLa-Zellen wurden für eine Stunde mit 10 ng/ml IL-1α behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend erfolgte die Analyse der Lokalisation von IκBα mittels indirekter Immunfluoreszenz. Beide primären Antikörper (anti-IκBα-Antikörper von Cell Signaling bzw. Abcam) wurden hier in einer Konzentration von 1:50 eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde ein anti-Kaninchen-Cy3-gekoppelter Antikörper (1:200) verwendet. Die Kerne wurden mit einer 1 µM Hoechst-Lösung gegengefärbt. Merge: Cy3 (IκBα) + DAPI (Hoechst); IF-Kontrolle: ohne primären Antikörper. Die Aufnahmen erfolgten mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 20-fache Vergrößerung. Messbalken: 25 µm

Bei der Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz mit verschiedenen p65-Antikörpern (F6 und C-20 von Santa Cruz; siehe Kapitel 2.9.1), konnte im basalen Zustand, vor der Stimulation mit IL-1α beobachtet werden, dass sich der größte Anteil des Proteins im Zytoplasma befindet (siehe Abbildung 18). Die Zellkerne waren größtenteils mit einem schwächeren p65-Signal markiert, was eine schwache Expression bzw. Funktion des Proteins in diesem Teil der Zelle indiziert. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass es auch vor der Behandlung mit IL-1α einige Zellen gab, die bereits ein deutliches p65-Signal im Zellkern aufwiesen. Nach Stimulierung der Zellen mit 10 ng/ml IL-1α für eine Stunde wurde beobachtet, dass in vielen Zellen das p65 verstärkt im Zellkern vorkam, also ein Transfer des Proteins in den Kern stattfand. Dieser Effekt war nicht in allen Zellen, die sich in den µ-Slides VI<sup>0,4</sup> (Ibi Treat von ibidi) befanden, zu beobachten, jedoch in der Mehrzahl der Zellen. Unter Verwendung der unterschiedlichen p65-Antikörper (F6 bzw. C-20 von Santa Cruz) ergaben sich ähnliche Ergebnisse, das heißt der IL-1α-bedingte Transfer des p65-Proteins war reproduzierbar.



**Abbildung 18:** Indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von p65 mit verschiedenen p65-Antikörpern

HeLa-Zellen wurden für eine Stunde mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend erfolgte die Analyse der Lokalisation von p65 mittels indirekter Immunfluoreszenz. Der anti-p65-Antikörper, F6, Maus, wurde in einer Konzentration von 1:50 eingesetzt, der anti-p65-Antikörper, C-20, Kaninchen, 1:200 und jeweils mit Cy3-gekoppelten sekundären Antikörpern (anti-Maus bzw. anti-Kaninchen; 1:200) markiert. Die Kerne wurden mit einer 1  $\mu$ M Hoechst-Lösung gegengefärbt. Merge: Cy3 (p65 (C-20) bzw. p65 (F6)) + Hoechst; IF-Kontrolle: ohne primären Antikörper. Die Aufnahmen erfolgten mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 20-fache Vergrößerung. Messbalken: 25  $\mu$ m

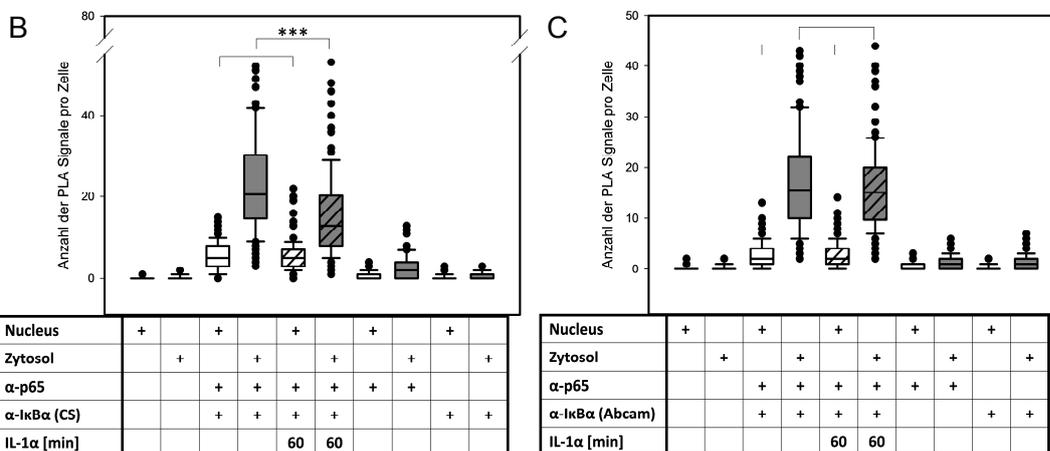
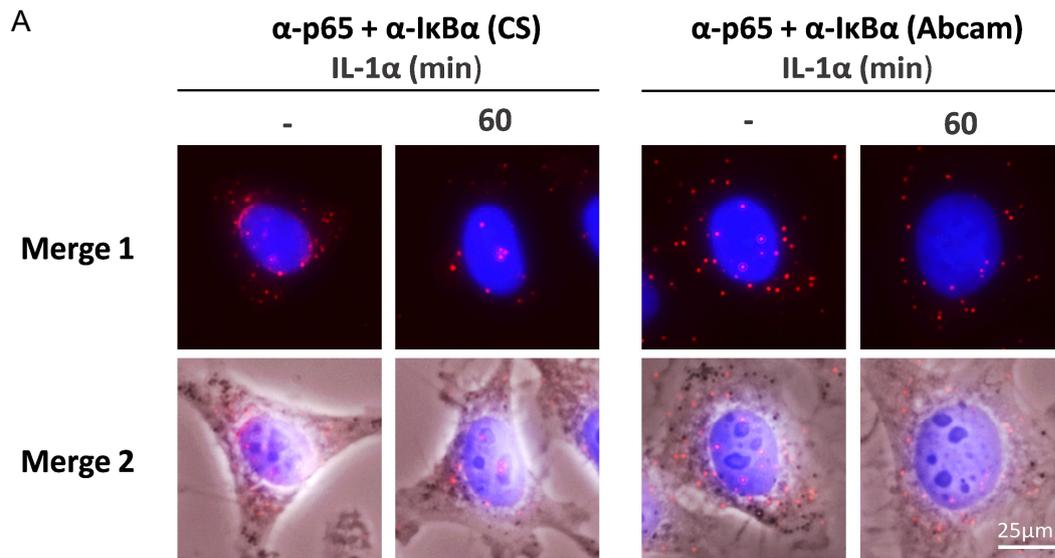
## 4.2 Rekapitulation der p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Interaktion und deren IL-1-regulierter Dynamik mit Hilfe des *Proximity Ligation Assays*

Wie im Kapitel 3.3.2 dieser Arbeit bereits beschrieben, eignet sich der PLA aufgrund seiner hohen Spezifität und Sensitivität dazu, Protein-Protein-Interaktionen auf dem endogenem Proteinlevel und vorallem auch in einzelnen Zellen nachzuweisen. So wurden PLAs unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt um u.a. die p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Interaktion mit dieser Methode darzustellen.

### 4.2.1 PLAs mit unterschiedlichen p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörperkombinationen

Zunächst wurden Versuche durchgeführt, bei denen HeLa-Zellen unstimuliert belassen oder für eine Stunde mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  behandelt wurden. Anschließend wurden die Zellen in einem PLA eingesetzt, die Ergebnisse mit Hilfe eines Mikroskops aufgenommen und die Bilder mittels Duolink®ImageTool Software (Vorgehensweise siehe Kapitel 3.4) auf die Anzahl der Spots in den Zellen analysiert. Hierbei wurde zunächst eine Antikörperkombination eines anti-p65-Maus-Antikörpers von Santa Cruz und einem anti-I $\kappa$ B $\alpha$ -Kaninchen-Antikörpers von Cell Signaling (siehe Kapitel 2.9.1) verwendet. Die graphische Darstellung des Experiments kann der Abbildung 19B entnommen werden, Ausschnitte repräsentativer Zellen finden sich in Abbildung 19A, auf der linken Seite.

Vor der IL-1 $\alpha$ -Stimulation befanden sich in den einzelnen Zellen im Median 20,5 Signale pro Zelle im Zytoplasma. Ein Signal weist dabei jeweils auf eine Interaktion zwischen p65 und I $\kappa$ B $\alpha$  hin. In diesem Experiment traten auch einige wenige Signale (Median: 5) im Zellkern auf. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Signale im Zytoplasma innerhalb der Zellen durch die IL-1 $\alpha$ -Stimulation statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ) auf 13 im Median abnahm, was darauf zurückzuführen ist, dass I $\kappa$ B $\alpha$  IL-1 $\alpha$ -abhängig phosphoryliert und anschließend im Proteasom abgebaut wird (Weber, Wasiliew et al. 2010). Hierdurch wird auch die Interaktion mit p65 aufgelöst, worauf dieses nun in den Zellkern dislozieren kann. Die Kontrollen zeigten, dass bei Einsatz nur eines der beiden bzw. keines primären Antikörpers deutlich weniger Signale auftreten (Mediane: anti-p65-Antikörper: 2, anti-I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörper: 0). Die wenigen Signale, welche dennoch zu beobachten waren, können auf unspezifische Bindungen der Antikörper zurückgeführt werden. Der Hersteller des PLA Kits gibt an, dass durchaus ein Signal pro zehn Zellen in der Kontrolle ohne primäre Antikörper als unspezifische Bindung auftreten kann (Duolink<sup>®</sup> using PLA<sup>®</sup> technology, Sigma-Aldrich, Handbuch). Der gleiche Versuchsansatz wurde auch noch mit einem weiteren anti-I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörper (Abcam, siehe Kapitel 2.9.1) durchgeführt. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abbildung 19C dargestellt. Eine Zelle enthielt im Median 15,5 Interaktionsspot im Zytoplasma und zwei im Zellkern. Eine statistisch signifikante IL-1 $\alpha$ -abhängige Abnahme der Komplexe im Zytoplasma konnte in diesem Falle bei einer Stunde IL-1 $\alpha$ -Stimulation nicht beobachtet werden (Median: 15). Auf der rechten Seite der Abbildung 19A werden Ausschnitte repräsentativer Zellen aus diesen Versuchen gezeigt. Hier wird auch deutlich, dass je nach verwendetem primären Antikörper eine etwas andere Verteilung der PLA Signale in der Zelle zu finden war. Dabei scheint der anti-I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörper von Cell Signaling dazu geführt zu haben, dass die Signale vorwiegend um den Zellkern herum lokalisiert sind. Unter Verwendung des anti-I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörpers von Abcam waren die Interaktionsspot weiter auf die ganze Zelle verteilt.



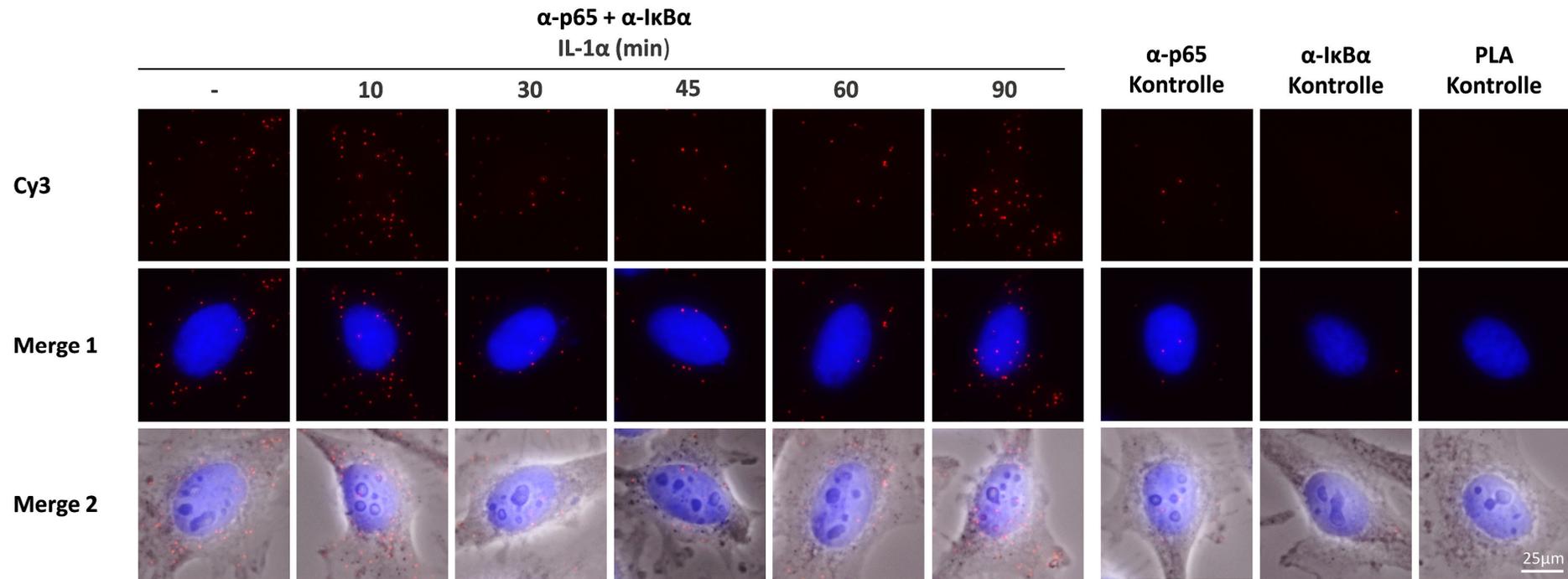
**Abbildung 19:** Proximity Ligation Assay mit unterschiedlichen p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörperkombinationen

A, B, C): HeLa-Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  für eine Stunde stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde ein PLA durchgeführt, die erhaltenen Signale aufgenommen und quantifiziert. A): Ausschnitte repräsentativer Zellen: Die Kerne wurden mit 1  $\mu$ M Hoechst-Lösung gefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Merge 1: Cy3 (PLA Signal) + Hoechst, Merge 2: Merge 1 + Phasenkontrast. Messbalken 25  $\mu$ m. B), C): Quantifizierung: Die Zellen wurden mit Hilfe der Duolink@ImageTool Software analysiert und die erhaltenen Signale pro Zelle in Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation mit SigmaPlot als Box-(Whisker)-Plot dargestellt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, sowie ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle). n=3, 150 Zellen pro Versuchsansatz wurden ausgezählt. Signifikanzniveau: \*\*\*: p<0,001 (Mann-Whitney Rank Sum Test) B): Anti-p65-Antikörper (F6, Maus, SC, 1:100), Anti-I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörper (Kaninchen, CS, 1:100) C): Anti-p65-Antikörper (F6, Maus, SC, 1:100), anti-I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörper (E130, Kaninchen, Abcam, 1:100).

#### 4.2.2 Erweiterte IL-1 $\alpha$ -Kinetik und Analyse mittels PLA

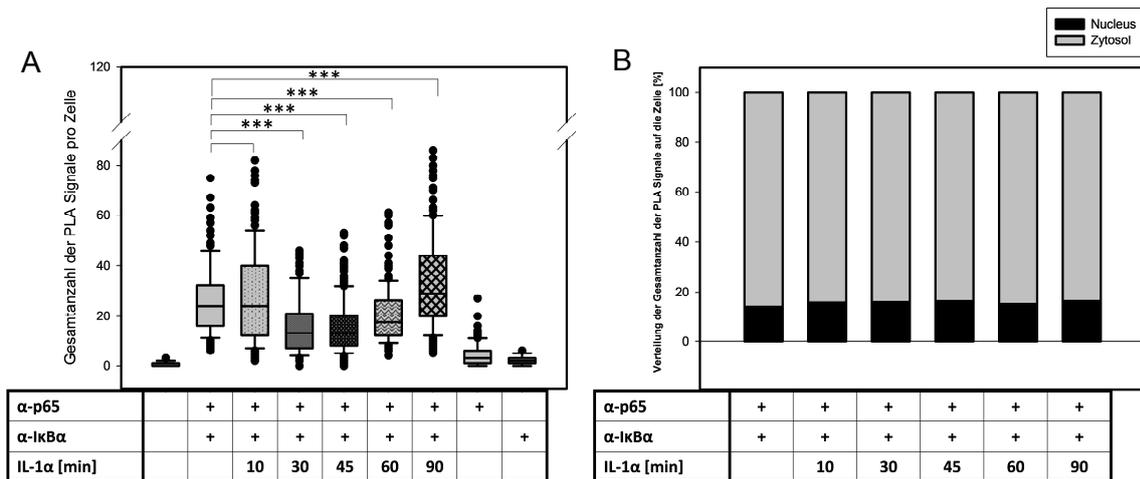
Um die Dynamik der Auflösung der p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexe noch genauer analysieren zu können, wurden weitere Stimulationszeitpunkte mit in den ansonsten gleichbleibenden Versuchsaufbau aufgenommen. So wurden die Zellen nicht nur für eine Stunde mit IL-1 $\alpha$  behandelt, sondern auch für 10, 30, 45 und 90 Minuten (siehe Abbildung 20 und 21). Es zeigte sich, dass der Median der Anzahl der Interaktionsspot in einer Zelle

ohne Behandlung mit IL-1 $\alpha$  bei 24 und damit im Bereich der vorhergehenden Versuche, lag. Die PLA Signale waren auf Zellkern und Zytoplasma verteilt. Nach zehn Minuten Stimulation änderte sich an diesem Zustand noch nichts (kein statistisch signifikanter Unterschied zur unstimulierten Kontrolle, Median: 24). Nach 30 Minuten IL-1 $\alpha$ -Behandlung kam es zu einer deutlichen und signifikanten Abnahme der Interaktionssots ( $p < 0,001$ ), so dass die meisten Zellen nur noch um die 10-15 (Median: 13) Spots zeigten. Dies entsprach auch weitestgehend dem Bild, das man nach 45 Minuten IL-1 $\alpha$ -Stimulation beobachten konnte (Median: 13). Nach 60 Minuten stieg die Anzahl der Signale dann wieder leicht auf 17 an, erreichte aber das Level der unstimulierten Kontrolle noch nicht. Nach 90 Minuten konnte beobachtet werden, dass im Vergleich zur unbehandelten Probe etwas mehr PLA Signale (im Median 29) in den Zellen auftraten. Dies lässt sich durch die p65-induzierte Resynthese von I $\kappa$ B $\alpha$  erklären, wodurch mehr I $\kappa$ B $\alpha$  gebildet wird und deckt sich damit mit den Westernblot-Ergebnissen (siehe Kapitel 4.1.1). Je mehr I $\kappa$ B $\alpha$  die Zelle enthält, desto wahrscheinlicher ist auch das Auftreten einer Interaktion von p65 mit I $\kappa$ B $\alpha$  und desto mehr Signale werden im PLA sichtbar. Durch die Untersuchung weiterer Stimulationszeitpunkte wurde nun auch deutlich, warum der Effekt im Versuch mit nur einer Stunde IL-1 $\alpha$ -Stimulation relativ gering ausfiel. Der größte Teil der Komplexe wurde bereits im Zeitfenster zwischen 30 und 45 Minuten Stimulation aufgelöst. Nach 60 Minuten Behandlung mit IL-1 $\alpha$  kehrt sich der Effekt schon wieder langsam um, so dass in den Versuchen mit nur einer Stunde IL-1 $\alpha$ -Stimulation der Abbau der Komplexe nicht zuverlässig gezeigt werden konnte. Abbildung 20 zeigt Bilder repräsentativer Zellen aus den Versuchen der Zeitreihe und die zugehörigen Kontrollen. In Abbildung 21B ist die Verteilung der Signale auf Nukleus und Zytosol, angegeben in Prozent, graphisch dargestellt. Durch dieses Ergebnis könnte man darauf schließen, dass die Verteilung der p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexe zwischen Nukleus und Zytosol unabhängig von der Anzahl der Interaktionen und der Stimulation durch IL-1 $\alpha$  reguliert wird und immer auf einem relativ konstanten Level gehalten wird. Allerdings muss auch in Erwägung gezogen werden, dass der Kernaufschluss mit dem verwendeten PLA Protokoll nicht ausreichend war und die vermeintlich im Kern lokalisierten Signale tatsächlich ober- oder unterhalb der Zellkernebene lagen. Im Anhang in Abbildung Anhang 2 finden sich Übersichtsaufnahmen der Zellen zu diesem Versuch.



**Abbildung 20:** Nachweis der IL-1 $\alpha$ - und zeitabhängigen Regulation der p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Interaktion mittels *Proximity Ligation Assay*

Ausschnitte repräsentativer Zellen: HeLa-Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  für die angegebenen Zeiten stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde ein PLA mit den Antikörpern anti-p65 (F6, Maus, SC, 1:100) und anti-I $\kappa$ B $\alpha$  (E130, Kaninchen, Abcam, 1:100) durchgeführt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, bzw. ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle). n=3. Die Kerne wurden mit 1  $\mu$ M Hoechst-Lösung gegengefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Merge 1: Cy3 (PLA Signal) + Hoechst, Merge 2: Merge 1 + Phasenkontrast. Messbalken 25  $\mu$ m. Übersichtsaufnahmen des Versuches finden sich im Anhang, Abbildung Anhang 2. Modifiziert veröffentlicht in (Mayr-Buro et al. 2019).



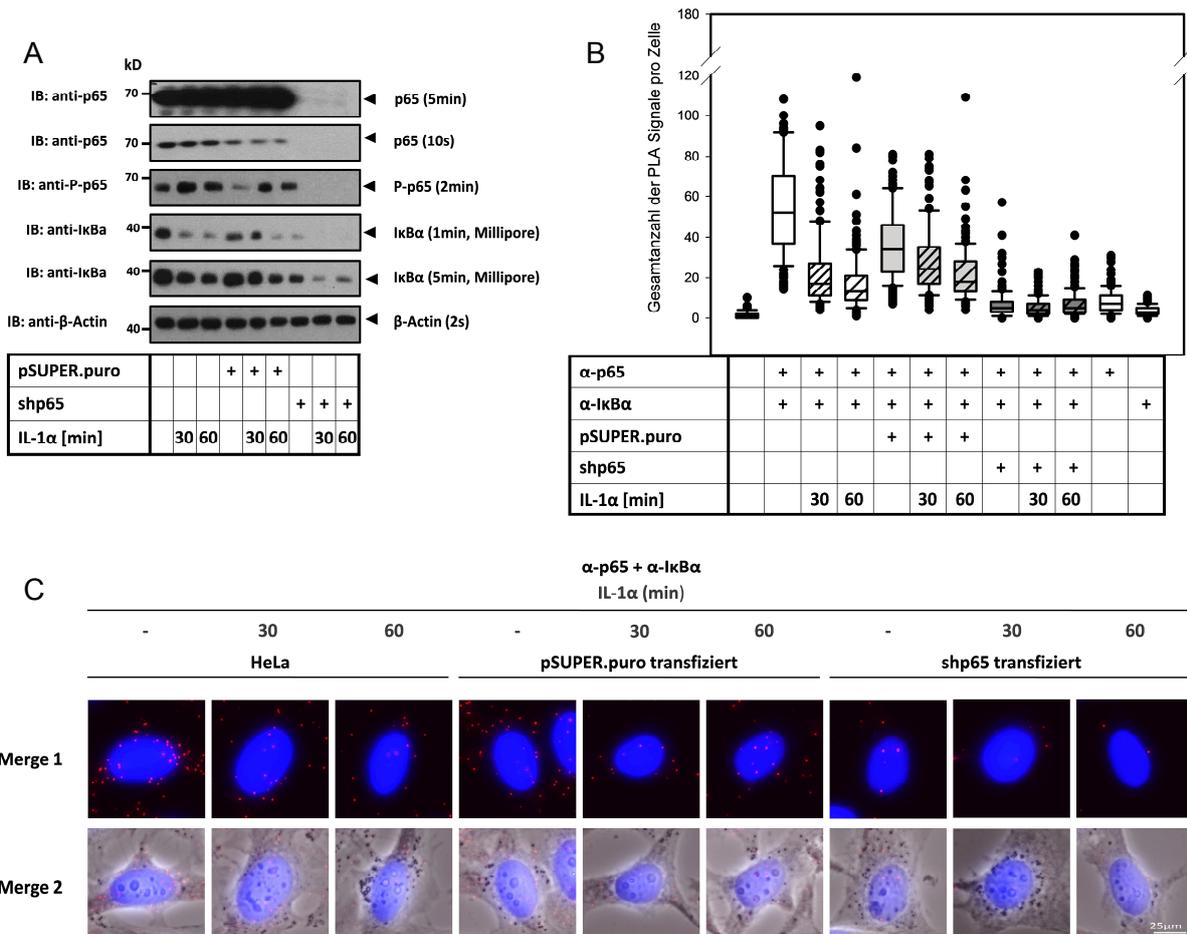
**Abbildung 21:** Quantitative Analyse der IL-1α- und zeitabhängigen Regulation der p65/IκBα-Interaktion mittels *Proximity Ligation Assay*

A, B): HeLa-Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-1α für die angegebenen Zeiten stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde ein PLA mit dem anti-p65-Antikörper (F6, Maus, SC, 1:100) und dem anti-IκBα-Antikörper (E130, Kaninchen, Abcam, 1:100) durchgeführt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, sowie ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle). Die Zellen wurden mikroskopisch aufgenommen und anschließend mit Hilfe der Duolink®ImageTool Software analysiert und mittels SigmaPlot graphisch dargestellt. n=3, 150 Zellen pro Versuchsansatz wurden ausgezählt. A): Quantifizierung: Die Box-(Whisker)-Plots stellen die Anzahl der Signale pro Zelle dar. Signifikanzniveau: \*\*\*: p<0,001 (Mann-Whitney Rank Sum Test) B): Verteilung der PLA Signale pro Zelle zwischen Zellkern und Zytoplasma in Prozent (%). Abb. 21A modifiziert veröffentlicht in (Mayr-Buro et al. 2019).

#### 4.2.3 Auswirkungen eines RNA Interferenz(RNAi)-vermittelten p65 knock downs auf die, mittels PLA gemessene, p65/IκBα-Wechselwirkung in humanen Zellen

Die genaue Abbildung der Dynamik des p65/IκBα-Komplexes mit dessen Abbau und Resynthese unter IL-1α-Stimulation ist bereits ein relativ sicherer Hinweis dafür, dass der PLA tatsächlich spezifisch die Interaktion zwischen p65 und IκBα abbildet. Um nun aber die Spezifität des Assays weiter zu überprüfen und ausschließen zu können, dass die PLA Signale, die sich bisher in den Versuchen zeigten, falsch Positive sind, wurden Versuchsansätze ermittelt, mit denen dieser Aspekt noch genauer untersucht werden kann. Wenn einer der beiden möglichen Interaktionspartner partiell oder komplett aus der Zelle entfernt wird und dadurch eine geringere Proteinexpression vorliegt, sollten im PLA weniger oder keine, bzw. vergleichbar viele Signale wie in den Kontrollen mit nur einem Antikörper, auftreten. Deshalb wurde in HeLa-Zellen mit Hilfe einer transienten Transfektion ein *short hairpin*-induzierter *knock down* von p65 herbeigeführt. Hierfür wurden HeLa-Zellen untransfiziert belassen, mit einem pSUPER.puro-Vektor (als Kontrolle) oder mit pSUPER.puro-shp65-Plasmiden transfiziert. Die Selektion der Zellen erfolgte anschließend über drei Tage mit Puromycin. Um zu zeigen, dass der *knock down* erfolgreich war, wurden parallel zu den Zellen, welche für den PLA in die μ-Slides VI<sup>0.4</sup> (Ibi Treat von ibidi) ausgesät

wurden, auch Zellen in 6 cm-Schalen ausgesät und entsprechend transfiziert, mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  behandelt bzw. unbehandelt belassen. Abbildung 22A zeigt den zugehörigen Westernblot. Dieser zeigte, dass der p65 *knock down* erfolgreich und fast vollständig war, da in den letzten drei Lanes kaum noch p65 nachgewiesen werden konnte. Erst in der Sättigung nach fünf Minuten ließ sich ein kleiner Restbestand an p65 in den Zellen detektieren. Weiterhin zeigte der Westernblot, dass die IL-1 $\alpha$ -Stimulation für 30 bzw. 60 Minuten, sowohl in den untransfizierten HeLa-Zellen (Spur 1-3) als auch in den pSUPER.puro-Leervektor transfizierten Zellen (Spur 4-6) zu einem Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  führt. In den p65 *knock down* Zellen ließ sich kaum noch I $\kappa$ B $\alpha$  detektieren. Dies lässt sich durch die, bei der langen Selektionszeit, fehlende Induktion der I $\kappa$ B $\alpha$ -Synthese durch p65 erklären.



**Abbildung 22:** RNAi-vermittelter p65 knock down mit anschließendem Proximity Ligation Assay mit p65- und IκBα-Antikörpern zum Nachweis der Spezifität des PLA

A, B, C): Verwendet wurden parentale HeLa-Zellen (Spuren 1-3) oder Zellen, die transient mit pSUPER.puro-Leervektor oder mit pSUPER.puro, welcher eine *short hairpin* RNA gegen p65 enthielt, transfiziert wurden. Nach drei Tagen Selektion (Puromycin 1 µg/ml) wurden die Zellen mit 10 ng/ml IL-1α für 30 oder 60 Minuten stimuliert oder unstimuliert belassen. A): Nach Ernte, Speziallyse und Aufbereitung wurden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteinexpression mittels Westernblot analysiert. Dabei dient β-Actin als Beladungskontrolle. B, C): Mit den, wie oben beschrieben, behandelten Zellen wurde ein PLA mit den Antikörpern anti-p65 (F6, Maus, SC, 1:100) und anti-IκBα (E130, Kaninchen, Abcam, 1:100) durchgeführt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, sowie ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle). B): Quantifizierung: Die Zellen wurden mit Hilfe der Duolink@ImageTool Software analysiert und die Daten als Box-(Whisker)-Plots mittels SigmaPlot dargestellt. Die Plots stellen die Anzahl der Interaktionssignale pro Zelle dar. n=3, 150 Zellen pro Versuchsansatz wurden ausgezählt. C): Ausschnitte repräsentativer Zellen: Die Kerne wurden mit 1 µM Hoechst-Lösung gegengefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Merge 1: Cy3 (PLA Signal) + Hoechst, Merge 2: Merge 1 + Phasenkontrast. Messbalken 25 µm. Modifiziert veröffentlicht in (Mayr-Buro et al. 2019).

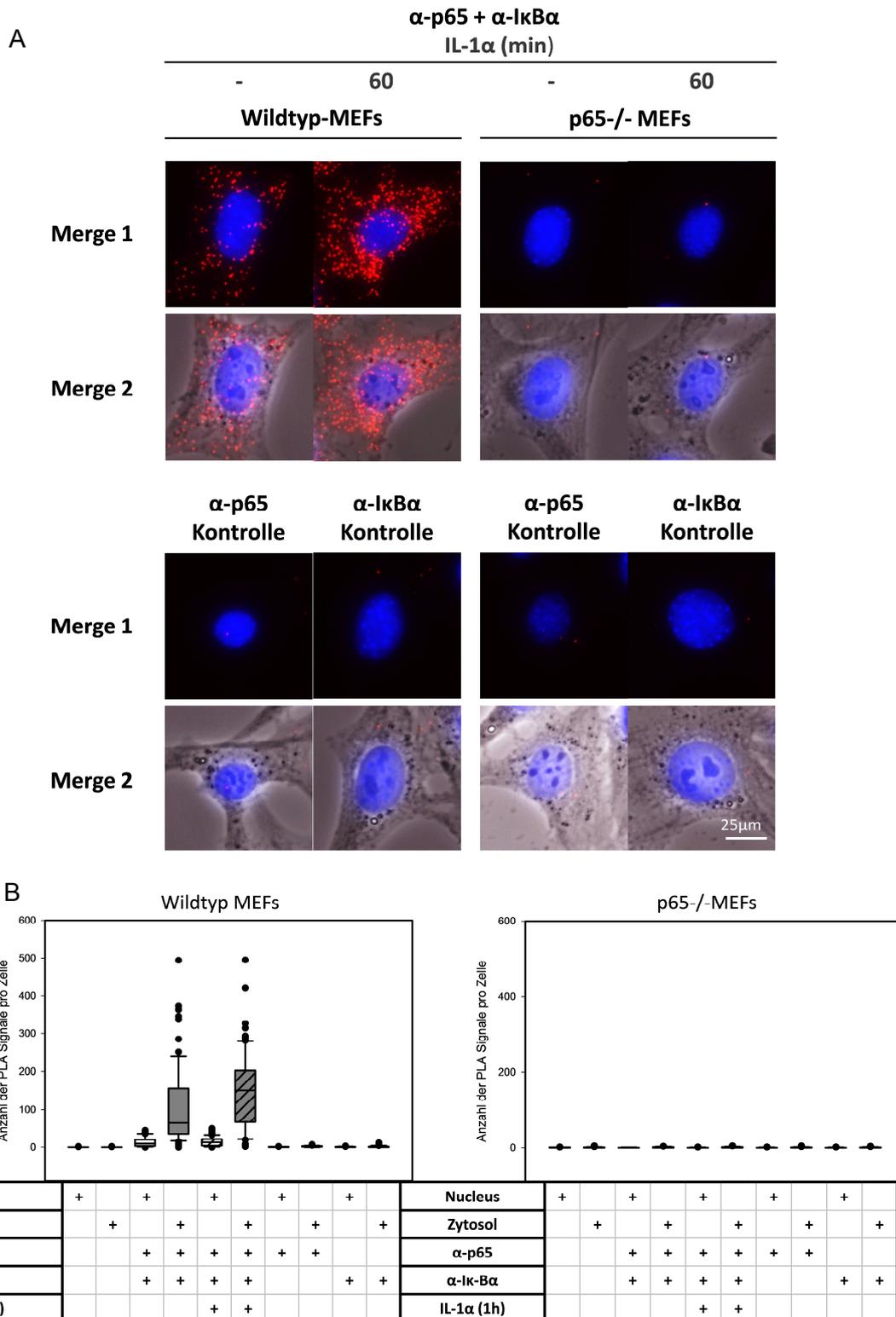
Abbildung 22B zeigt die Quantifizierung von insgesamt drei Wiederholungen dieses Versuches. Als Kontrollen dienten, wie auch in den anderen PLA Experimenten, untransfizierte HeLa-Zellen, die mit nur einem der beiden oder keinem primären Antikörper inkubiert wurden (Plots 1, 11 und 12). Bei der Analyse von insgesamt 150 Zellen pro Ansatz zeigte sich die bereits vorher an parentalen HeLa-Zellen gezeigte Reduktion der p65/IκBα-Komplexe nach Stimulation mit IL-1α für 30 bzw.

60 Minuten (Plots 2-4; von im Median 52 PLA Signalen in der unstimulierten Kontrolle, über 17 nach einer halben Stunde IL-1 $\alpha$ -Behandlung und schließlich 13 nach einer Stunde). Die Anzahl der p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexe in diesen Versuchen war auch ohne Stimulation, im Vergleich zu den vorherigen Versuchen, bereits deutlich erhöht (52; zuvor: Median: 24, vgl. Abschnitt 4.2.2). Der Unterschied zwischen den Versuchen bestand darin, dass die Zellen in den vorangegangenen Versuchen nur einen Tag in den  $\mu$ -Slides VI<sup>0,4</sup> (Ibi Treat von ibidi), statt, wie hier, drei Tage, kultiviert wurden. Bei den pSUPER.puro-Leervektor transfizierten Zellen war auffällig, dass sie bereits vor Stimulation mit IL-1 $\alpha$  deutlich weniger Interaktionssots als die untransfizierten Kontrollen zeigten (Plot 5, Median: 34). Dies kann eventuell auf den Transfektionsstress und die dadurch induzierte Aktivierung des Abbaus von I $\kappa$ B $\alpha$  zurückgeführt werden. Trotzdem reagierten auch diese Zellen auf die IL-1 $\alpha$ -Stimulation über 30 oder 60 Minuten mit einer Abnahme der PLA Signale (Plots 6 (Wert: 24,5) und 7 (Wert: 18)). Bei den p65 *knock down* Zellen (Plots 8-10) konnte, den Kontrollen vergleichbar, nur noch eine sehr geringe Anzahl PLA Signale, unabhängig vom IL-1 $\alpha$ -Stimulus, detektiert werden (Mediane: 5, 4, 5). Abbildung 22C zeigt Ausschnitte repräsentativer Zellen aus diesen Versuchen. Morphologisch unterschieden sich die transfizierten Zellen insofern von den parentalen HeLa-Zellen, dass sie dünnere und vermehrt Zellausläufer bildeten (hier nicht dargestellt).

#### **4.2.4 Auswirkungen eines p65 *knock outs* auf die, mittels PLA gemessene, p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Wechselwirkung in murinen Zellen**

Da durch die transiente Transfektion nur ein partieller, wenn auch sehr effektiver, *knock down* von p65 herbeigeführt werden kann, sollte nun auch überprüft werden, wie sich der Nachweis des p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplex in einem System mit vollständig ausgeschaltener Expression des p65-Proteins verhält. Hierzu wurden Wildtyp MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) und p65-defiziente MEFs, die durch eine genetische Modulation kein p65 mehr enthalten, einem PLA mit p65- und I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörpern unterzogen. Die Ergebnisse des Versuches zeigen Abbildungen 23A und B. Wie sowohl in den Ausschnitten repräsentativer Zellen, als auch in der Quantifizierung zu sehen ist, konnten in den Wildtyp MEFs vor der einstündigen IL-1 $\alpha$ -Stimulation im Zytoplasma um die 65 (Median: 64,5) p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Interaktionssots detektiert werden. Im Zellkern lag die Anzahl der zu detektierenden Spots bei 9,5 im Median. Nach einer Stunde Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  wurde eine deutliche Zunahme der Komplexe im Zytoplasma beobachtet (Median: 151; Zellekern: 13). Betrachtet man die rechte Seite der Abbildung, wird sofort deutlich, dass in den p65-defizienten MEFs

kaum PLA Signale detektiert wurden. Hier finden sich lediglich unspezifische Signale, deren Anzahl mit derer der Kontrollen mit nur einem oder keinem der beiden primären Antikörper vergleichbar ist (Median einheitlich zwischen 0 und 1). Dabei unterschieden sich die Kontrollen zwischen Wildtyp und p65-defizienten MEFs kaum.



**Abbildung 23:** Proximity Ligation Assay an Wildtyp und p65-defizienten MEFs mit p65- und I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörpern zum Nachweis der Spezifität des PLA

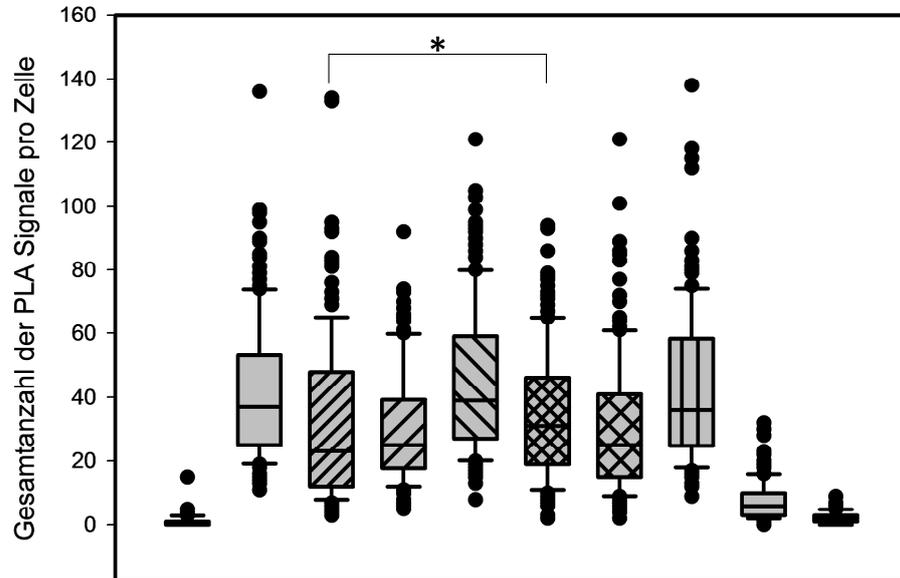
A, B): Wildtyp oder p65<sup>-/-</sup> MEFs wurden mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  für eine Stunde stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde ein PLA mit den Antikörpern anti-p65 (F6, Maus, SC, 1:100) und anti-I $\kappa$ B $\alpha$  (E130, Kaninchen, Abcam, 1:100) durchgeführt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, sowie ein Ansatz ohne primäre Antikörper. A): Ausschnitte repräsentativer Zellen: Die Kerne wurden mit 1  $\mu$ M Hoechst-Lösung gegengefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Merge 1: Cy3 (PLA Signal) + Hoechst, Merge 2: Merge 1 + Phasenkontrast. Messbalken 25  $\mu$ m; B): Quantifizierung: Die Zellen wurden mit Hilfe der Duolink@ImageTool Software analysiert und die Daten mittels SigmaPlot als Box-(Whisker)-Plot dargestellt. Die Plots stellen die Anzahl der PLA Signale pro Zelle dar. n=2, 80 Zellen pro Versuchsansatz wurden ausgezählt. Modifiziert veröffentlicht in (Mayr-Buro et al. 2019).

#### 4.2.5 Pharmakologische Modulation des p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexes durch 5Z-7-Oxozeaenol, einem Hemmstoff gegen die Proteinkinase TAK1

Eine Möglichkeit die IL-1-Abhängigkeit der Interaktion p65/I $\kappa$ B $\alpha$  weiter zu verifizieren, ist es, die IL-1-Antwort mit Hilfe eines möglichst weit *upstream* angreifenden Inhibitors zu hemmen. So sollte bei Einsatz des Inhibitors 5Z-7-Oxozeaenol, welcher TAK1 (TGF-*b-activated protein kinase 1*) irreversibel, durch die Ausbildung eines kovalenten Komplexes, hemmt (Wu, Powell et al. 2013), die IL-1 $\alpha$ -Stimulation keinen bzw. einen deutlich reduzierten Effekt haben und somit der Abbau der p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexe gehemmt werden. Es wurden Versuche durchgeführt, in denen HeLa-Zellen entweder unbehandelt belassen, oder für 30 bzw. 60 Minuten mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  behandelt wurden. Weiterhin wurden in diesem Versuchsaufbau Zellen für 30 Minuten mit 5Z-7-Oxozeaenol vorbehandelt und anschließend nicht weiter oder mit IL-1 $\alpha$  ebenfalls für 30 oder 60 Minuten behandelt. Außerdem wurde eine DMSO Kontrolle angefertigt. Das heißt, Zellen wurden nur mit DMSO, dem Lösungsmittel von 5Z-7-Oxozeaenol, behandelt, um eventuelle Effekte durch das Lösungsmittel selbst ausschließen zu können. In der unbehandelten Kontrolle traten dabei im Median 37 PLA Signale pro Zelle auf. Zwischen der nur mit 5Z-7-Oxozeaenol behandelten Kontrolle (Median: 39; Plot 5), der DMSO Kontrolle (Plot 8) und der unstimulierten Kontrolle (Plot 2) bestand in der Anzahl der Signale pro Zelle kein statistisch signifikanter Unterschied, wodurch eine hohe Vergleichbarkeit der Ansätze gegeben ist. Nach einer halben Stunde Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  war in den ansonsten nicht weiter behandelten Zellen eine Abnahme der Interaktionsspot auf 23 im Median zu beobachten (siehe Plot 3; i.V. zur unstimulierten Kontrolle:  $p < 0,001$ ). Nach einer Stunde IL-1 $\alpha$ -Behandlung lag der Median hier bei 25. Bei den Zellen, welche sowohl mit 5Z-7-Oxozeaenol als auch für eine halbe Stunde mit IL-1 $\alpha$  behandelt wurden, lag die Anzahl der PLA Signale pro Zelle bei 31 (Plot 6) und damit i.V. zur nur mit 5Z-7-Oxozeaenol behandelten Kontrolle etwas niedriger. Nach Behandlung mit dem TAK1-Inhibitor und weiterer Stimulation der Zellen für 60 Minuten mit IL-1 $\alpha$  nahm diese Anzahl auf 25 ab (Plot 7). Zwischen der Anzahl der Signale in den Zellen, die nur für eine halbe Stunde mit IL-1 $\alpha$  stimuliert wurden und den Zellen, die vor der Stimulation zusätzlich mit 5Z-7-Oxozeaenol behandelt wurden, bestand ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p = 0,048$ ) bzgl. der Anzahl der detektierten Signale. Dies spricht dafür, dass die IL-1 $\alpha$ -induzierte Auflösung der p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexe durch den eingesetzten TAK1-Inhibitor zumindest partiell gehemmt wurde.

Die Anzahl der Signale in den Kontrollen ohne primären Antikörper (Median: 0,5) bzw. mit nur jeweils einem der beiden primären Antikörper (Mediane: anti-p65: 6;

anti-IkBa: 2) waren, wie in vorangegangenen Experimenten, relativ niedrig (siehe Abbildung 24).



<b>α-p65</b>		+	+	+	+	+	+	+	+	
<b>α-IkBa</b>		+	+	+	+	+	+	+		+
<b>5Z-7-Oxozeaenol [1μM]</b>					+	+	+			
<b>DMSO [0,01%]</b>								+		
<b>IL-1α [min]</b>			30	60		30	60			

**Abbildung 24:** Proximity Ligation Assay nach IL-1α- und 5Z-7-Oxozeaenol-Behandlung mit p65- und IkBa-Antikörpern

HeLa-Zellen wurden zunächst mit 1 μM 5Z-7-Oxozeaenol bzw. 0,01 % DMSO behandelt oder unbehandelt belassen. Nach einer halben Stunden wurden die Zellen mit 10 ng/ml IL-1α für die angegebenen Zeiten stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde ein PLA mit den Antikörpern anti-p65 (F6, Maus, SC, 1:100) und anti-IkBa (E130, Kaninchen, Abcam, 1:100) durchgeführt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, außerdem ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle). Die Zellen wurden mit Hilfe der Duolink®ImageTool Software analysiert und die Daten mittels SigmaPlot als Box-(Whisker)-Plot dargestellt. Die Plots stellen die Anzahl der Signale pro Zelle dar. n=3, 150 Zellen pro Versuchsansatz wurden ausgezählt. Signifikanzniveau: \*: p<0,05 (Mann-Whitney Rank Sum Test)

### **4.3 Weitere Validierung des PLA als geeignete Methode für die Messung von Protein-Interaktionen, -Modifikationen und -Lokalisationen auf Einzelzellebene**

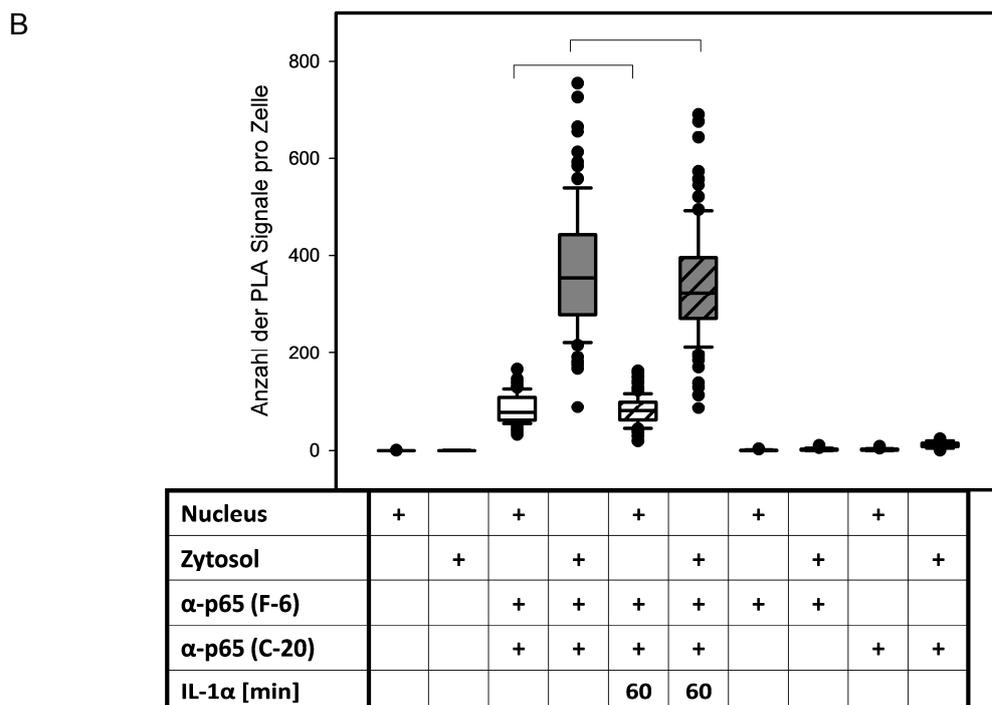
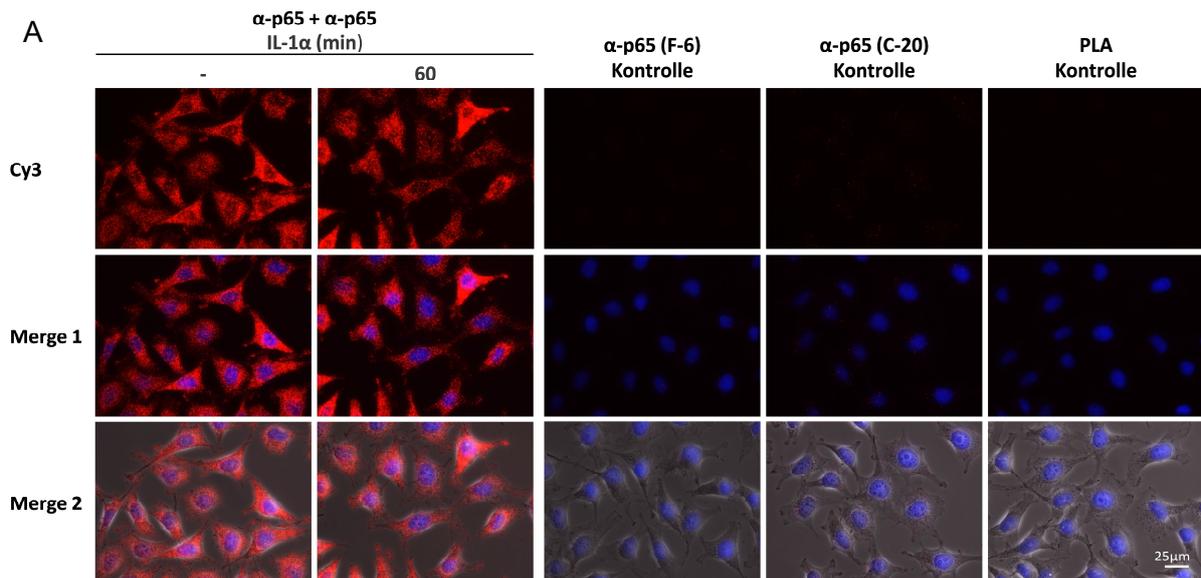
Der PLA bietet, bei geeigneter Auswahl der Antikörper, nicht nur die Möglichkeit Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen, sondern auch die Option die Expression einzelner Proteine darzustellen. Hierfür werden Antikörper benötigt, die zwar das gleiche Protein erkennen, aber an unterschiedlichen Epitopen binden, damit sie nicht um eine gemeinsame Bindestelle konkurrieren. Außerdem müssen die Antikörper, wie auch in anderen PLA Experimenten, in unterschiedlichen Spezies generiert worden sein, weil nur so die PLA *probes* jeweils spezifisch an die primären Antikörper binden können. Neben der Darstellung des p65 in der Zelle, soll in diesem Kapitel desweiteren auch das häufigste Heterodimer der NFκB-Transkriptionsfaktoren aus p65 und p50 im PLA visualisiert werden.

#### **4.3.1 Darstellung der Proteinexpression von zellulärem p65, sowie des Anteils an phosphoryliertem p65 im PLA**

##### **4.3.1.1 Untersuchung der Expression von p65 mittels *Proximity Ligation Assay***

Für die Detektion von p65 wurde zum einen der p65-Antikörper #372 (C-20) von Santa Cruz verwendet. Dieser bindet am C-Terminus des Proteins. Zum anderen wurde der p65-Antikörper #8008 (F6) von Santa Cruz eingesetzt, welcher gegen die Aminosäuren 1-286 und damit gegen den N-Terminus des p65-Proteins gerichtet ist. Die Verteilung des p65 innerhalb der Zelle im PLA kann den Abbildungen 25A und B entnommen werden. Wie die Übersichtsaufnahmen zeigen, waren in den Zellen sehr viele PLA Signale, jeweils entsprechend einem p65-Protein, zu detektieren. Dabei verteilten sich die Signale überwiegend auf das Zytoplasma. Einige Signale konnten aber auch im Zellkern gefunden werden. Detailansichten finden sich im Anhang (Abbildung Anhang 3). Die Quantifizierung (Abbildung 25B) zeigt, dass im Zytoplasma mehr als 350 (Median: 355) Signale nachgewiesen wurden. Die Anzahl der PLA Signale im Zellkern liegt bei 77,5 im Median. Durch die IL-1α-Stimulation mit 10 ng/ml kann keine statistisch signifikante Verminderung dieses Zustandes im Zytoplasma beobachtet werden (Mediane: Zytoplasma: 324, Zellkern: 81). Auch in Immunoblot-Versuchen von Jurida et al. wurde gezeigt, dass zwar eine Kerntranslokation von p65 unter Stimulation mit IL-1α stattfindet, dennoch aber der größte Teil des p65 als Pool im Zytoplasma verbleibt (Jurida et al. 2015). Die Kontrollen mit nur einem oder keinem der beiden primären Antikörper waren weitestgehend frei

und zeigten nur einige wenige, unspezifische PLA Signale (Mediane (Zytoplasma+Zellkern): p65 (F6): 2, p65 (C-20): 14).

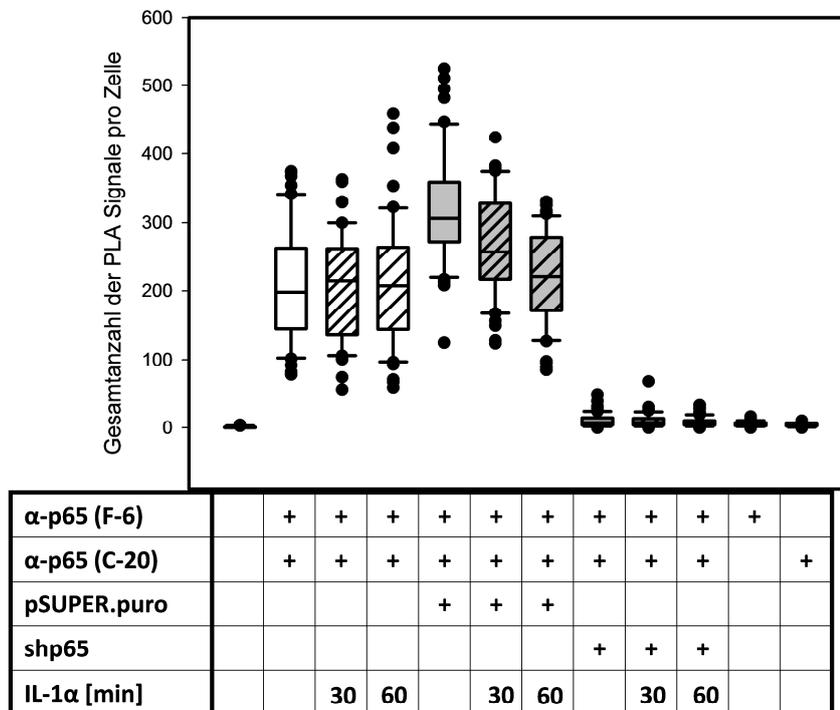


**Abbildung 25:** Proximity Ligation Assay mit zwei p65-Antikörpern zur Detektion der p65-Expression auf Einzelzellebene

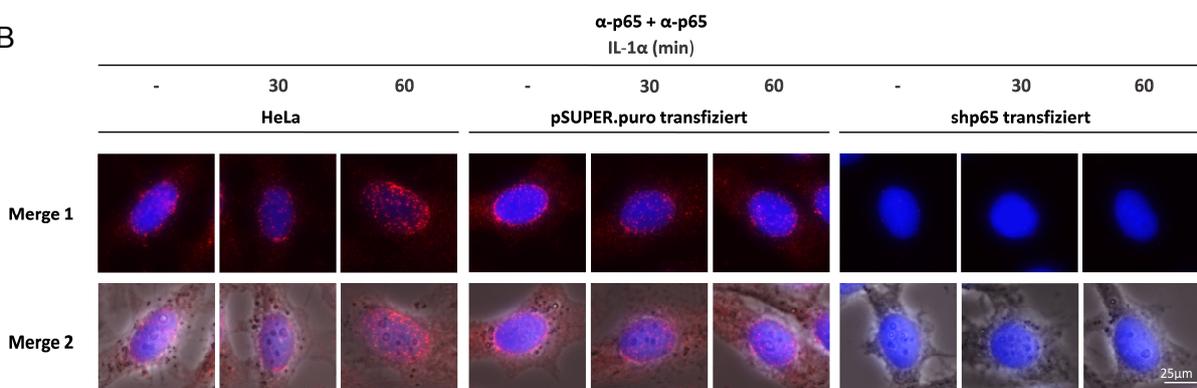
A, B): HeLa-Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  für eine Stunde stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde ein PLA mit den Antikörpern anti-p65 (F6, Maus, SC, 1:100) und anti-p65 (C-20, Kaninchen, SC, 1:200) durchgeführt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, zusätzlich ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle). A): Übersichtsbilder der Zellen: Die Kerne wurden mit 1  $\mu$ M Hoechst-Lösung gegengefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Merge 1: Cy3 (PLA Signal) + Hoechst, Merge 2: Merge 1 + Phasenkontrast. Messbalken 25  $\mu$ m B): Quantifizierung: Die Zellen wurden mit Hilfe der Duolink®ImageTool Software analysiert und die Daten mittels SigmaPlot als Box-(Whisker)-Plot dargestellt. Die Plots stellen die Anzahl der Signale pro Zelle dar. n=2, 100 Zellen pro Versuchsansatz wurden ausgezählt. (Signifikanztestung mittels Mann-Whitney Rank Sum Test).

Weiterhin wurde ein *short hairpin*-vermittelter *knock down* von p65 herbeigeführt (Vorgehensweise wie in 4.2.3) und anschließend ein PLA mit zwei p65-Antikörpern durchgeführt.

A



B



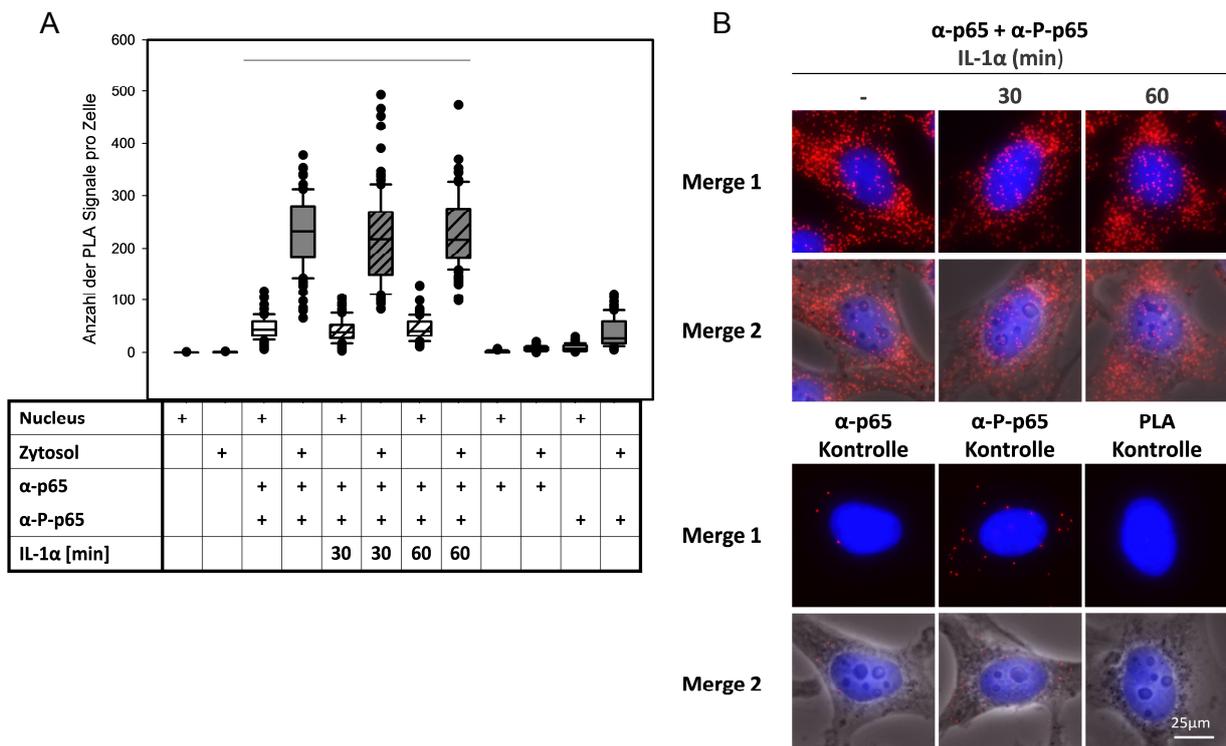
**Abbildung 26:** Proximity Ligation Assay mit zwei p65-Antikörpern zur Detektion der p65-Expression auf Einzelzellebene bei *knock down* von p65

A, B): Verwendet wurden parentale HeLa-Zellen oder Zellen, die transient mit pSUPER.puro-Leervektor bzw. mit pSUPER.puro, welcher eine *short hairpin* RNA gegen p65 enthielt, transfiziert wurden. Nach drei Tagen Selektion (Puromycin 1 µg/ml) wurden die Zellen mit 10 ng/ml IL-1α für 30 oder 60 Minuten stimuliert oder unstimuliert belassen. A, B): Mit den Zellen wurde anschließend ein PLA mit den Antikörpern anti-p65 (F6, Maus, SC, 1:100) und anti-p65 (C-20, Kaninchen, SC, 1:200) durchgeführt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, sowie ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle). A): Quantifizierung: Die Zellen wurden mit Hilfe der Duolink®ImageTool Software analysiert und die Daten als Box-(Whisker)-Plots mittels SigmaPlot dargestellt. Die Plots stellen die Anzahl der Interaktionssignale pro Zelle dar. n=1, 50 Zellen wurden ausgezählt. B): Ausschnitte repräsentativer Zellen: Die Kerne wurden mit 1 µM Hoechst-Lösung gegengefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Merge 1: Cy3 (PLA Signal) + Hoechst, Merge 2: Merge 1 + Phasenkontrast. Messbalken 25 µm. Modifiziert veröffentlicht in (Mayr-Buro et al. 2019).

Bei den parentalen HeLa-Zellen lag die Anzahl der PLA Signale unter der Verwendung der beiden p65-Antikörper um die 200. Dies veränderte sich durch die Stimulation mit IL-1 $\alpha$  statistisch nicht signifikant. Auffällig ist, dass in den mit pSUPER.puro-Leervektor transfizierten Zellen, deutlich höhere Anzahlen an Signalen registriert wurden. Diese waren nach 30 Minuten etwas und nach 60 Minuten Stimulation mit IL-1 $\alpha$  deutlich zurückgegangen. Nach *knock down* von p65 mittels p65-RNAi ging die Anzahl der detektierten PLA Signale erwartungsgemäß auf das Level der Kontrollen mit nur einem oder keinem primärem Antikörper zurück.

#### **4.3.1.2 Analyse von HeLa-Zellen auf phosphoryliertes p65 mit Hilfe des PLA**

Unter Verwendung von Antikörpern die spezifisch die Phosphorylierung eines Proteins erkennen, kann auch diese posttranslationale Modifikation im PLA nachgewiesen werden. Deswegen wurde ein PLA mit einem p65-Antikörper und einem Phospho-p65-Antikörper durchgeführt (siehe Kapitel 2.9.1), welcher p65 nur erkennt, wenn dieses an Serin 536 phosphoryliert wurde. Hierbei wurde zu zwei Zeitpunkten mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  stimuliert. Wie Abbildung 27 zeigt, erhält man für die Verteilung von phosphorylierten p65 ein ähnliches Bild wie zuvor für das p65-Protein an sich. Auch hier war ein großer Teil der PLA Signale im Zytoplasma der Zelle zu finden. In der Quantifizierung wurde dann aber deutlich, dass nur um die 230 (Median: 232) PLA Signale für phosphoryliertes p65 im Zytoplasma detektiert wurden. Dies ist konsistent mit der Theorie, dass nicht der gesamte Anteil von p65 in der phosphorylierten Form vorliegt (siehe Kapitel 1.4.2, Gesamtprotein p65 entspricht 355 PLA Signale). Im Zellkern befanden sich 44 Signale im Median. Die Kontrollen ohne primären Antikörper (Median: 0) bzw. mit dem p65-Antikörper (Median: 6) waren mit anderen Versuchen vergleichbar. Allerdings zeigte sich für die Kontrolle mit dem P-p65-Antikörper eine deutlich erhöhte Zahl an unspezifischen PLA Signalen (Median: 26). Dies wird sowohl in der Quantifizierung (Abbildung 27A), als auch in der nebenstehenden Abbildung (Abbildung 27B), welche repräsentative Zellen zeigt, deutlich. Eine zu erwartende Translokation von phosphoryliertem p65, in den Zellkern konnte weder nach 30 (Median: 39) noch 60 Minuten (Median: 41) IL-1 $\alpha$ -Stimulation beobachtet werden. Ein statistisch signifikanter Anstieg der PLA Signale im Zellkern nach Stimulation blieb also aus. Die Gesamtmenge an phosphoryliertem p65 blieb über die Stimulation mit IL-1 $\alpha$  hinweg weitestgehend konstant.



**Abbildung 27:** Proximity Ligation Assay mit p65- und P-p65-Antikörpern zur Detektion von phosphoryliertem p65

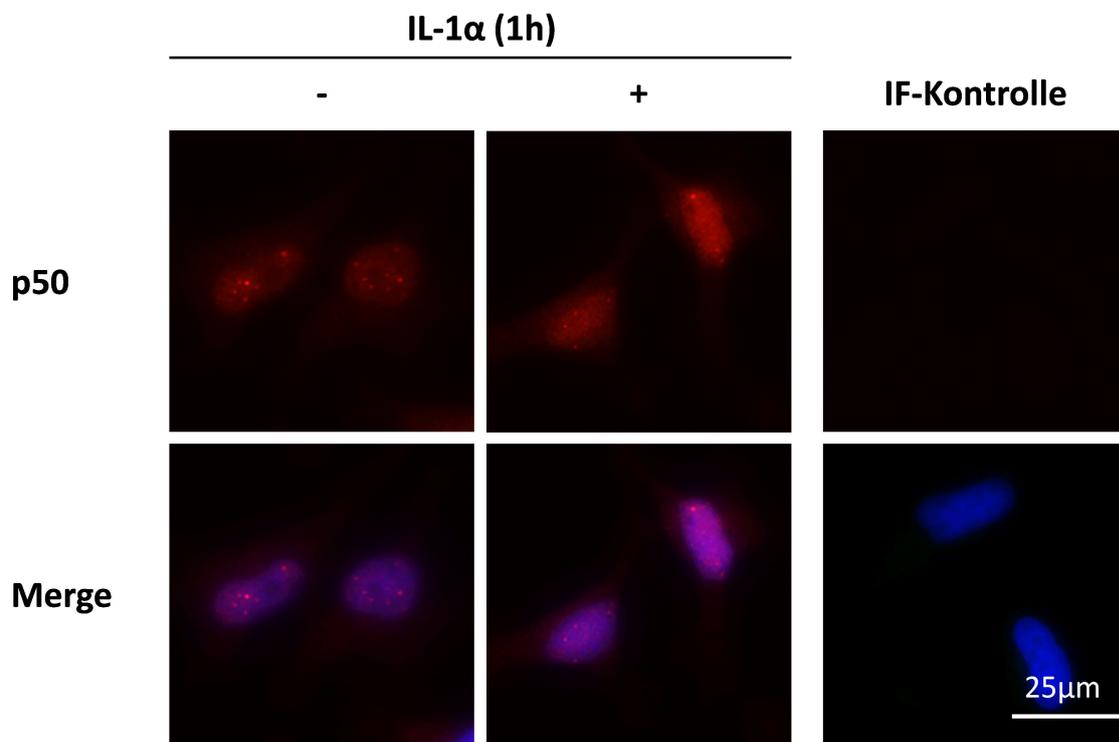
A, B): HeLa-Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  für 30 oder 60 Minuten stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde ein PLA mit den Antikörpern anti-p65 (A, Kaninchen, SC, 1:50) und anti-P-p65 (Ser536, Maus, CS, 1:100) durchgeführt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, sowie ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle). A): Quantifizierung: Die Zellen wurden mit Hilfe der Duolink®ImageTool Software analysiert und die Daten mittels SigmaPlot als Box-(Whisker)-Plot dargestellt. Die Plots stellen die Anzahl der Signale pro Zelle dar. n=2, 100 Zellen pro Versuchsansatz wurden ausgezählt. (Signifikanztestung mittels Mann-Whitney Rank Sum Test) B): Ausschnitte repräsentativer Zellen des PLA: Die Kerne wurden mit 1  $\mu$ M Hoechst-Lösung gegengefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Merge 1: Cy3 (PLA Signal) + , Merge 2: Merge 1 + Phasenkontrast. Messbalken 25  $\mu$ m.

### 4.3.2 Untersuchung des NF $\kappa$ B-Heterodimers p65/p50 im PLA

#### 4.3.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz von p50

Der häufigste Heterodimer der NF $\kappa$ B-Familie entsteht durch Interaktion von p65 und p50. Zur näheren Bestimmung dieses p65/p50-Komplexes wurde zunächst die Verteilung von p50 innerhalb der Zelle mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Für die indirekte Immunfluoreszenz wurde p50 mit Hilfe von Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern markiert. Der hier verwendete Antikörper (siehe Kapitel 2.9.1) reagiert sowohl mit p50 als auch mit dessen Vorläuferprotein p105 (siehe Datenblatt Antikörper ab7971). Für die Verteilung des Proteins über die Zelle, zeigte sich in der IF, dass der größte Anteil von p105/p50 im Zellkern zu finden ist, da hier ein deutlich stärkeres Signal zu detektieren war. Aber auch das Zytoplasma wurde leicht angefärbt

und enthält somit eine gewisse Menge p105/p50. Auffällig bei den Versuchen mit diesem Antikörper waren kleine Punkte im Nukleus, die für ein verstärktes Vorkommen von p50 an *nuclear speckles* sprechen. Auch hier wurde an einigen Zellen eine Stimulation mit IL-1 $\alpha$  für eine Stunde vorgenommen. In manchen, nicht aber in allen Zellen, führte dies, wie in der Abbildung 28 erkennbar, zu einer leichten Zunahme des Signals im Zellkern. Dies würde für eine Translokation des p50 nach Stimulation, ähnlich dem p65, sprechen. Diese Ergebnisse wären auch mit den Immunoblots der AG Kracht konsistent, bei welchen sich eine deutliche Zunahme von p50 in der löslichen nukleären Fraktion nach einstündiger Stimulation mit IL-1 $\alpha$  an HuH7-Zellen zeigte. Außerdem konnte im Immunoblot gezeigt werden, dass das p105 vor allem im Zytoplasma und kaum bis gar nicht im Zellkern lokalisiert (Poppe et al. 2017). Dadurch lässt sich schließen, dass das starke Signal in der IF im Zellkern hauptsächlich durch Darstellung des p50 ausgelöst wird.

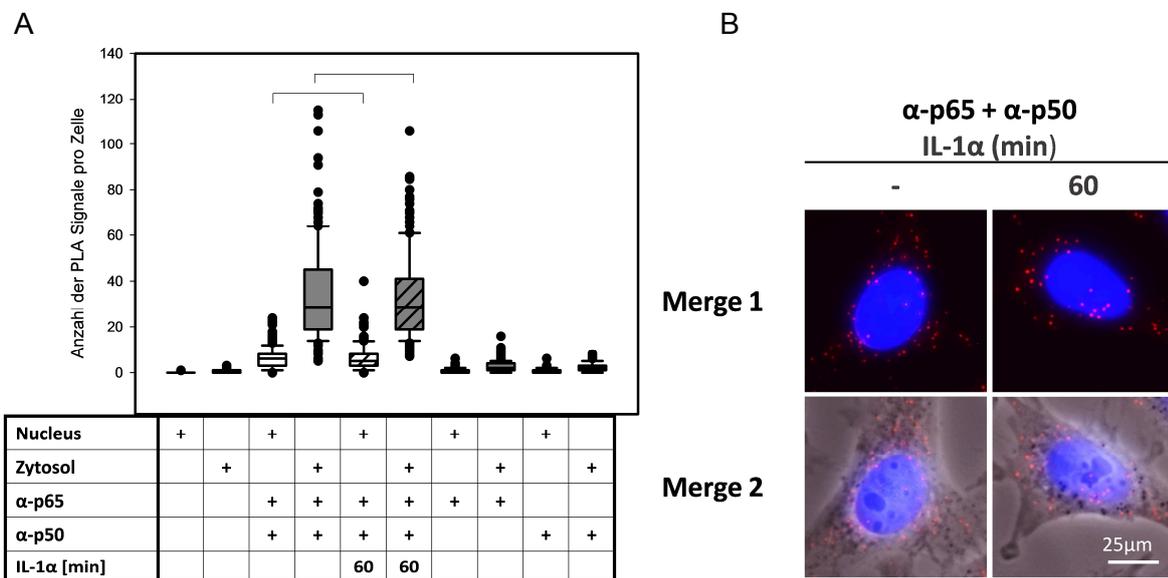


**Abbildung 28:** Indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von p50

HeLa-Zellen wurden für eine Stunde mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend erfolgte die Analyse der Lokalisation von p50 mittels indirekter Immunfluoreszenz. Der primäre Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:100 eingesetzt und mit Cy3-gekoppelten sekundären Antikörpern (1:200) markiert. Die Kerne wurden mit einer 1  $\mu$ M Hoechst-Lösung gegengefärbt. Merge: Cy3 (p50) + Hoechst; IF-Kontrolle: ohne primären Antikörper. Die Aufnahmen erfolgten mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Messbalken 25  $\mu$ m

#### 4.3.2.2 Analyse des p65/p50-Komplexes im PLA

Anschließend folgten nun Versuche, in denen ein p65-Antikörper mit dem, zuvor in der IF getesteten, p50-Antikörper in einem PLA kombiniert wurde. Abbildung 29B zeigt Ausschnitte repräsentativer Zellen aus den Experimenten. Es waren sowohl zytosolische als auch nukleäre PLA Signale detektierbar, wobei die Anzahl der Signale im Zytosol sowohl ohne, als auch nach einer Stunde IL-1 $\alpha$ -Stimulation deutlich höher ist als im Zellkern. Dies kann auch in der Abbildung 29A nachvollzogen werden. Es zeigte sich, dass im Median 29 Interaktionsspotspots im Zytosol detektiert werden konnten. Im Zellkern belief sich die Zahl der PLA Signale nur auf 6 bzw. 5. Weder zwischen der Anzahl der Spots im Zytosol, noch derer im Zellkern, war durch die IL-1 $\alpha$ -Behandlung eine statistisch signifikante Veränderung festzustellen.



**Abbildung 29:1** Proximity Ligation Assay mit p65- und p50-Antikörpern

A, B): HeLa-Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  für eine Stunde stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde ein PLA mit den Antikörpern anti-p65 (F6, Maus, SC, 1:100) und anti-NF $\kappa$ B p105/p50 (Kaninchen, Abcam, 1:100) durchgeführt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, sowie ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle). A): Quantifizierung: Die Zellen wurden mit Hilfe der Duolink®ImageTool Software analysiert und die Daten mittels SigmaPlot als Box-(Whisker)-Plot dargestellt. Die Plots stellen die Anzahl der Signale pro Zelle dar. n=3, 150 Zellen pro Versuchsansatz wurden ausgezählt. (Signifikanztestung mittels Mann-Whitney Rank Sum Test) B): Ausschnitte repräsentativer Zellen: Die Kerne wurden mit 1  $\mu$ M Hoechst-Lösung gefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Merge 1: Cy3 (PLA Signal) + Hoechst, Merge 2: Merge 1 + Phasenkontrast. Messbalken 25  $\mu$ m.

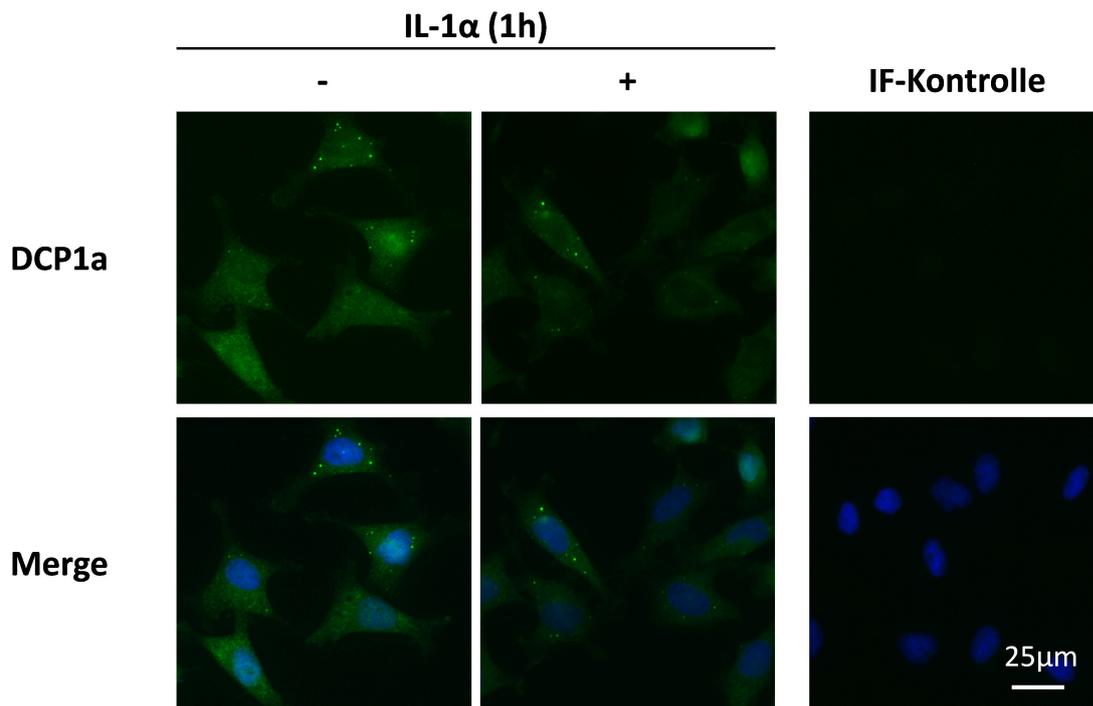
#### **4.4 Anwendung des *Proximity Ligation Assays* zur Validierung neuer Interaktionspartner von p65 NFκB**

Da mit Hilfe der vorangegangenen *knock down* und *knock out* Experimente für die dargestellten Antikörperkombinationen weitestgehend ausgeschlossen werden konnte, dass der PLA falsch positive Interaktionen wiedergibt, stellt er eine gute Möglichkeit dar, Protein-Protein-Interaktionen auf dem endogenen Level nachzuweisen. So können mit dieser äußerst sensitiven Methode Interaktionen detektiert werden, die bisher mit herkömmlichen Methoden, wie Ko-Immunpräzitationen endogen nicht, oder ausschließlich im Überexpressionsmodell, nachgewiesen werden konnten.

##### **4.4.1 Identifizierung des *decapping factors* DCP1a als weiteren Interaktionspartner von p65**

###### **4.4.1.1 Indirekte Immunfluoreszenz mit DCP1a-Antikörpern**

Einer der putativen Interaktoren des p65-Proteins ist der *decapping factor* DCP1a. Dieser konnte von der Arbeitsgruppe Kracht bereits im Überexpressionsmodell mit p65 ko-immunopräzipitiert werden (Rzeczkowski, Beuerlein et al. 2011). Ob diese Interaktion auch im endogenen System vorhanden ist und ob diese eventuell von der Stimulation durch IL-1α abhängig ist, sollte nun mittels PLA getestet werden. Zunächst wurden aber auch hier IF-Bilder von DCP1a angefertigt, um eine Aussage über die Verteilung des Proteins in der Zelle treffen zu können.



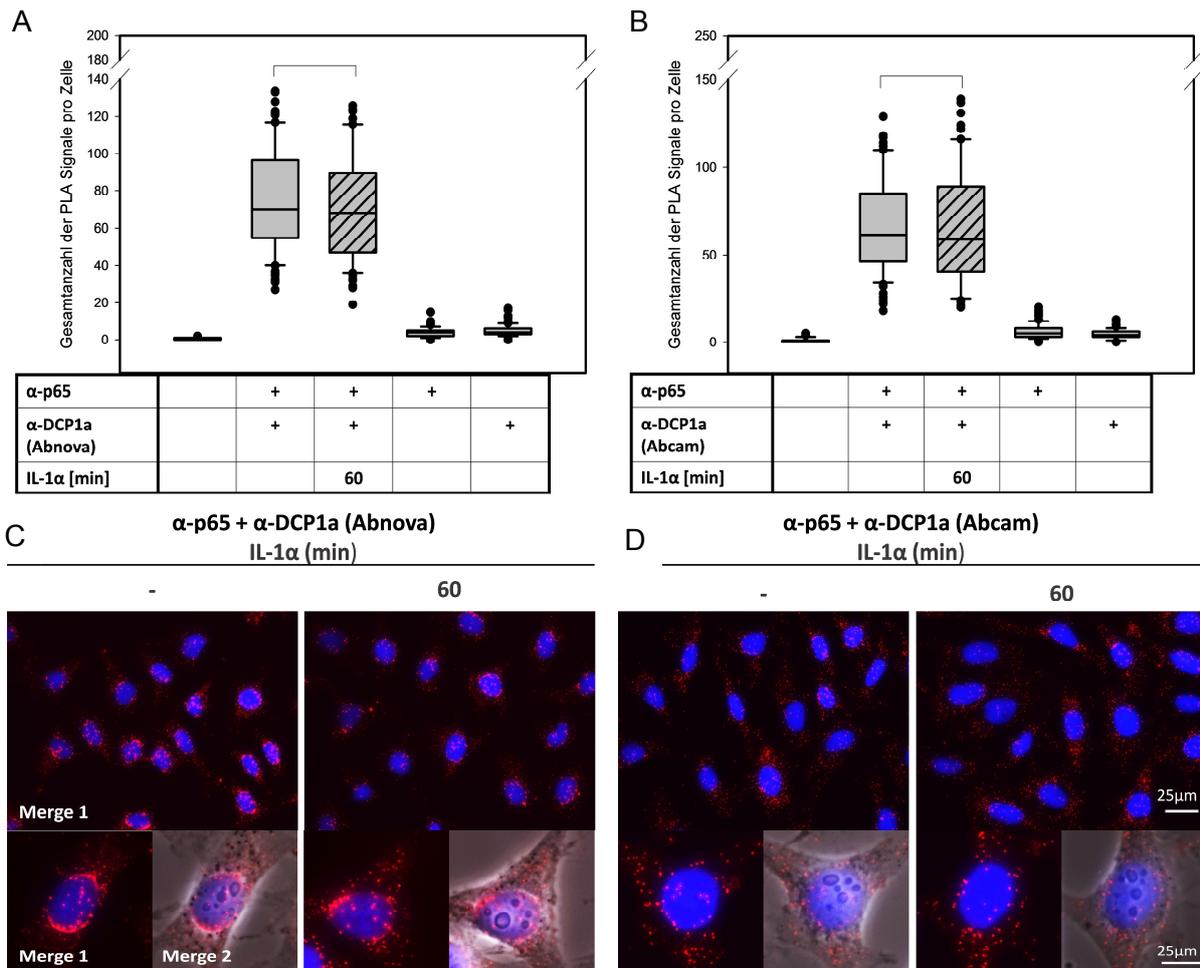
**Abbildung 30** Indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von DCP1a

HeLa-Zellen wurden für eine Stunde mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend erfolgte die Analyse der Lokalisation von DCP1a mittels indirekter Immunfluoreszenz. Der primäre Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:100 eingesetzt und mit Dylight488-gekoppelten sekundären Antikörpern (1:200) markiert. Die Kerne wurden mit einer 1  $\mu$ M Hoechst-Lösung gegengefärbt. Merge: Dylight (DCP1a) + Hoechst; IF-Kontrolle: ohne primären Antikörper. Die Aufnahmen erfolgten mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 20-fache Vergrößerung. Messbalken 25  $\mu$ m (Aufnahmen: Dr. Christin Mayr-Buro)

Wie Abbildung 30 zeigt, ergab sich für DCP1a, welches in diesem Falle mit einem Dylight488-markiertem Sekundärantikörper fluoreszenzmarkiert wurde, im unbehandelten Zustand eine Verteilung auf mehrere Kompartimente der Zelle. Zum einen fand sich im Zytoplasma ein relativ ausgeprägtes IF-Signal für DCP1a. Das Signal im Zellkern ist dagegen etwas schwächer. Außerdem konnten sogenannte *processing bodies* (*p-bodies*) detektiert werden, die eine Ansammlung von DCP1a und verschiedener weiterer *decapping* Faktoren darstellen. Nicht alle Zellen enthielten dabei *p-bodies*. Außerdem variierte deren Anzahl. Nach der Stimulation mit IL-1 $\alpha$  war vor allem eine Zunahme der Zahl der *p-bodies* auffällig. Diese veröffentlichte Beobachtung konnte auch von weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kracht in verschiedensten Versuchen bestätigt werden (Rzeczkowski, Beuerlein et al. 2011). Die IF-Kontrolle zeigte einen sehr geringen Hintergrund, wodurch auf eine spezifische Bindung des sekundären Antikörpers an den primären Antikörper gegen DCP1a geschlossen werden kann.

#### **4.4.1.2 PLA mit p65- und DCP1a-Antikörpern - Austestung verschiedener Antikörperkombinationen**

Zunächst wurde ein p65-Kaninchen-Antikörper von Santa Cruz #109 mit einem DCP1a-Maus-Antikörper von Abnova #186-285 (siehe Kapitel 2.9.1) kombiniert. Die Ergebnisse zu diesen Versuchen können den Abbildungen 31A und C entnommen werden. Hierbei war auffällig, dass die p65/DCP1a-Komplexe sowohl im unstimulierten Zustand, als auch nach einer Stunde IL-1 $\alpha$  Stimulation, vorwiegend um den Zellkern und den Bereich des rauen endoplasmatischen Retikulums lokalisiert waren (siehe Abbildung 31C, links). In der Quantifizierung der Anzahl aller PLA Signale, die in einer Zelle auftreten (Median: 70), zeigte sich, dass die IL-1 $\alpha$ -Behandlung keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Menge der auftretenden p65/DCP1a-Interaktionen hat (Median: 68). Die Anzahl der Signale in den Kontrollen war auch in diesen Versuchen deutlich geringer als in den eigentlichen Proben (Median: 4). Bei der Durchführung des Versuches mit gleichem Setting, jedoch unter Verwendung einer anderen Antikörperkombination (siehe Abbildung 31B und D; p65-Maus-Antikörper von Santa Cruz #8008, DCP1a-Kaninchen-Antikörper von Abcam #47811, siehe Kapitel 2.9.1), zeigte sich, bezogen auf die Anzahl der Interaktionen und den ausbleibenden Effekt durch die IL-1 $\alpha$ -Stimulation, ein ähnliches Ergebnis wie zuvor (Mediane: vor Stimulation: 61,5, danach 59). Betrachtet man aber das Übersichtsbild und die Ausschnitte repräsentativer Zellen im rechten Bereich der Abbildung 31D, ist die zuvor relativ markante Akkumulation der Interaktionsspotspots um den Zellkern (coronen-artig unter Verwendung des DCP1a-Antikörpers von Abnova) nun nach Verwendung des DCP1a-Antikörpers von Abcam nicht mehr vorhanden. Stattdessen würde man die Verteilung der PLA Signale in diesem Falle eher als diffus auf die ganze Zelle verteilt, beschreiben. Dabei lagen die mutmaßlichen p65/DCP1a-Komplexe im Zellkern nicht so dicht wie im Rest der Zelle. Da in anderen Experimenten der AG Kracht (z.B. Fluoreszenz in situ Hybridisierungen, hier nicht gezeigt), in denen Inkubationstemperaturen von 37 °C bzw. 40 °C und der DCP1a-Antikörper von Abnova verwendet wurden, ebenfalls dieser Artefakt des DCP1a-Antikörpers detektiert wurde, wird davon ausgegangen, dass die Umlagerung des Kerns durch die p65/DCP1a-Komplexe nicht der tatsächlichen Lokalisation entspricht. Deshalb wurde in den weiteren Experimenten mit der zweiten Antikörperkombination gearbeitet (DCP1a-Antikörper von Abcam).



**Abbildung 31:** Proximity Ligation Assay mit unterschiedlichen p65/DCP1a-Antikörperkombinationen

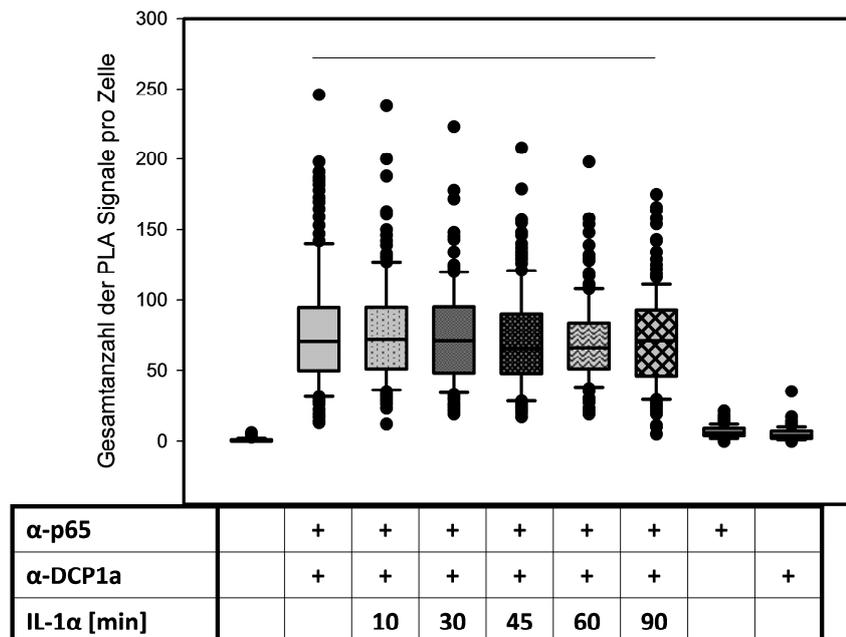
A, B, C, D): HeLa-Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  für eine Stunde stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde ein PLA mit den Antikörpern A, C) anti-p65 (A, Kaninchen, SC, 1:100) und anti-DCP1a (Maus, Abnova, 1:100) bzw. B, D) anti-p65 (F6, Maus, SC, 1:100) und anti-DCP1a (Kaninchen, Abcam, 1:100) durchgeführt. A, B): Quantifizierung: Die Zellen wurden mit Hilfe der Duolink®ImageTool Software analysiert und die Daten mittels SigmaPlot als Box-(Whisker)-Plots dargestellt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, sowie ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle). Die Plots stellen die Anzahl der Signale pro Zelle dar. n=2, 100 Zellen pro Versuchsansatz wurden ausgezählt. (Signifikanztestung mittels Mann-Whitney Rank Sum Test) C, D): Übersichtsaufnahmen und Ausschnitte repräsentativer Zellen. Die Kerne wurden mit 1  $\mu$ M Hoechst-Lösung gegengefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Merge 1: Cy3 (PLA Signal) + Hoechst, Merge 2: Merge 1 + Phasenkontrast. Messbalken 25  $\mu$ m.

#### 4.4.1.3 Weitere Analyse der endogenen Interaktion p65/DCP1a mit Hilfe einer erweiterten IL-1 $\alpha$ -Kinetik

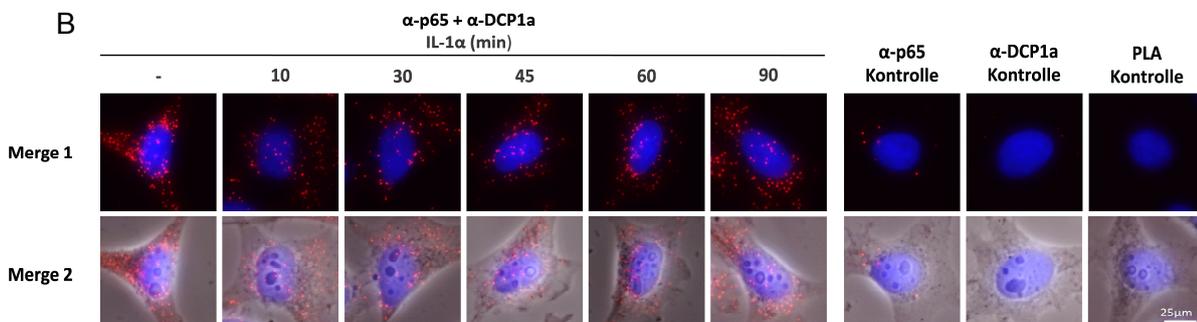
Um eine mögliche IL-1 $\alpha$ -Abhängigkeit ausschließen oder nachweisen zu können, wurden die Zellen auch für andere Zeitspannen mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  behandelt und anschließend ein Proximity Ligation Assay mit p65- und DCP1a-Antikörpern durchgeführt. Dabei wurde für 10, 30, 45, 60 und 90 Minuten mit IL-1 $\alpha$  stimuliert. Es zeigte sich für keinen der Zeitpunkte eine statistisch signifikante Veränderung der Gesamtanzahl der PLA Signale (siehe Abbildung 32) (Mediane: unstimuliert: 70,5;

10 Minuten: 72; 30 Minuten: 71; 45 Minuten: 65,5; 60 Minuten: 66; 90 Minuten: 71), so dass unter der Annahme einer erfolgreichen IL-1 $\alpha$ -Stimulation der Zellen, davon ausgegangen werden kann, dass diese Interaktion, falls sie reguliert wird, dies unabhängig von IL-1 $\alpha$  ist. In den Kontrollen zeigten sich für den p65-Antikörper 6, für den DCP1a-Antikörper 4 unspezifische PLA Signale im Median.

A



B



**Abbildung 32:** Proximity Ligation Assay mit erweiterter IL-1 $\alpha$ -Kinetik mit p65- und DCP1a-Antikörpern

A, B): HeLa-Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  für die angegebenen Zeiten stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde ein PLA mit den Antikörpern anti-p65 (F6, Maus, SC, 1:100) und anti-DCP1a (Kaninchen, Abcam, 1:100) durchgeführt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, sowie ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle). A): Die Zellen wurden mit Hilfe der Duolink@ImageTool Software analysiert und die Daten mittels SigmaPlot als Box-(Whisker)-Plots dargestellt. Die Plots stellen die Anzahl der Signale pro Zelle dar. n=3, 150 Zellen pro Versuchsansatz wurden gezählt. (Signifikanztestung mittels Mann-Whitney Rank Sum Test) B): Ausschnitte repräsentativer Zellen: Die Kerne wurden mit 1  $\mu$ M Hoechst-Lösung gegengefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Merge 1: Cy3 (PLA Signal) + Hoechst, Merge 2: Merge 1 + Phasenkontrast. Messbalken 25  $\mu$ m. Modifiziert veröffentlicht in (Mayr-Buro et al. 2019).

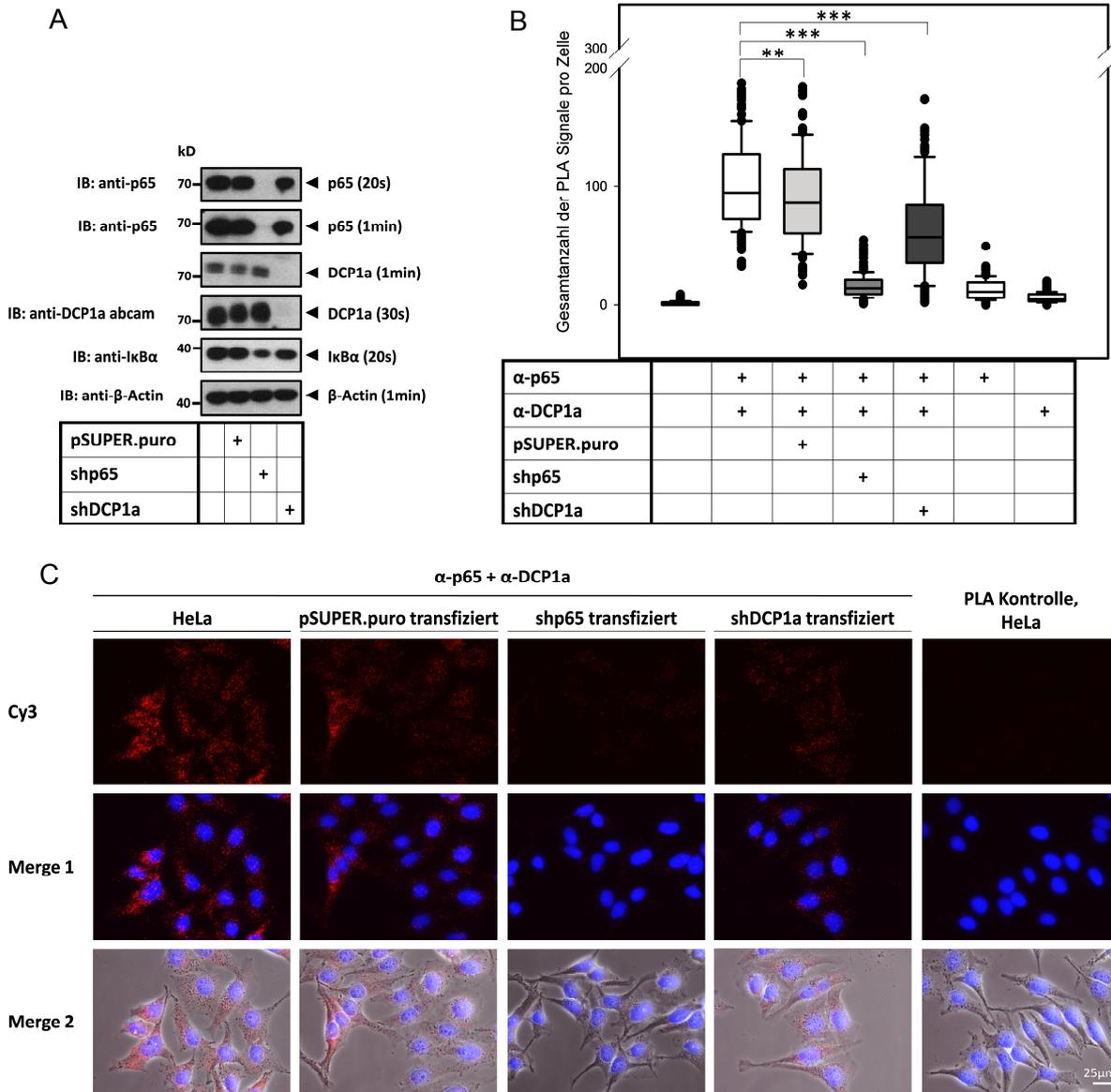
#### 4.4.1.4 Einfluss der RNAi-vermittelten Reduktion von p65 und DCP1a auf den Nachweis von p65/DCP1a-Komplexen im PLA

Mit Hilfe von Plasmiden, die für eine *short hairpin* RNA gegen p65 bzw. DCP1a codieren, kann die Expression der Proteine in den Zellen partiell posttranskriptionell ausgeschaltet werden. Nach Transfektion der entsprechenden Plasmide und anschließender Selektion mit Puromycin über drei Tage, wurde mit den Zellen erneut ein PLA mit p65- und DCP1a-Antikörpern durchgeführt. Parallel wurden Kulturschalen mit den so behandelten Zellen ausgesät um den *knock down* auch im Westernblot überprüfen zu können.

Der Westernblot (siehe Abbildung 33A) zeigte, dass der p65 *knock down* erfolgreich war (Lane 3). Erst nach längeren Belichtungszeiten kann auch in den p65 *knock down* Zellen bei um die 70 kD eine kleine Menge p65 nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass der *knock down* nicht vollständig, aber dennoch sehr effektiv war. In den untransfizierten, pSUPER.puro-Leervektor transfizierten und den DCP1a *knock down* Zellen war die Menge an p65 jeweils weitestgehend vergleichbar. Desweiteren ließ sich feststellen, dass die Menge an I $\kappa$ B $\alpha$  (39 kD) in den p65 *knock down* Zellen im Vergleich zu den weiteren untersuchten Zellen etwas reduziert war. Die I $\kappa$ B $\alpha$ -Bande war schwächer als in den anderen Lanes. In den ersten drei Lanes stellt sich im Westernblot eine typische DCP1a-Doppelbande dar, welche etwas oberhalb des 70 kD Markers verläuft. In den DCP1a *knock down* Zellen (Lane 4) war kaum noch DCP1a vorhanden. Dies zeigte sich daran, dass auch nach längeren Belichtungszeiten, bei denen die anderen Lanes (1-3) bereits in der Sättigung waren, nur eine minimale Schwärzung des Röntgenfilms zu detektieren war (längere Expositionszeiten nicht gezeigt). Die  $\beta$ -Actin Beladungskontrolle zeigte, dass das SDS-Gel gleichmäßig beladen wurde.

In Abbildung 33C sind Übersichtsaufnahmen der unterschiedlich behandelten Zellen im PLA zu sehen. In den untransfizierten Kontrollzellen, zeigte sich ein ähnliches Bild wie in den Vorversuchen mit p65- und DCP1a-Antikörpern. Allerdings wurden hier etwas mehr Interaktionen zwischen p65/DCP1a detektiert (Median: 94,5), was an der längeren Kultivierung der Zellen in den  $\mu$ -Slides VI<sup>0,4</sup> (Ibi Treat von ibidi) und der parallelen Selektion der transfizierten Zellen (drei Tage mit 1  $\mu$ g/ml Puromycin) liegen könnte. In den pSUPER.puro-Leervektor transfizierten Zellen wurden laut Quantifizierung (siehe Abbildung 33B) signifikant ( $p < 0,01$ ) weniger PLA Signale detektiert (Median: 86) als in der untransfizierten Kontrolle. Nach dem RNAi-vermittelten *knock down* von p65 konnte eine massive Reduktion der Anzahl der p65/DCP1a-Komplexe beobachtet werden ( $p < 0,001$ ). Hier traten nur noch 14 Signale im Median pro Zelle auf. Dies ist vergleichbar mit der Anzahl der PLA Signale in der

Kontrolle mit dem p65-Antikörper (Median: 11; DCP1a-Kontrolle: 5). Obwohl der DCP1a *knock down* im Westernblot ähnlich effektiv wie der p65 *knock down* war, traten im PLA noch 57,5 p65/DCP1a-Interaktionssots im Median pro Zelle auf. Dies stellte dennoch eine statistisch hoch signifikante Reduktion der Signale in Bezug auf die untransfizierte Kontrolle dar ( $p < 0,001$ ).



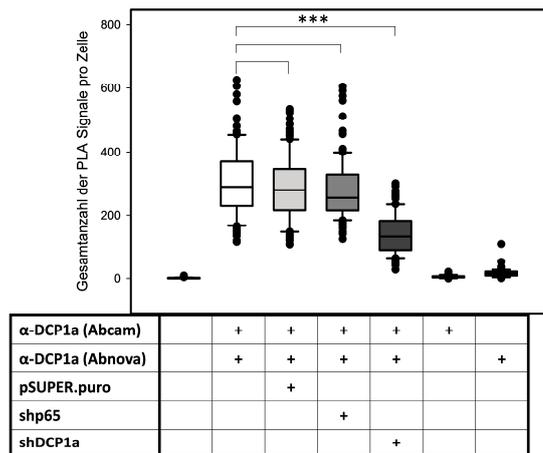
**Abbildung 33:** RNAi-vermittelter p65 bzw. DCP1a *knock down* führt zu einer Reduktion der Interaktionen, die mit p65- und DCP1a-Antikörpern im PLA erfasst werden

A, B, C): Verwendet wurden parentale HeLa-Zellen oder Zellen, die transient mit pSUPER.puro-Leervektor oder mit pSUPER.puro, welcher eine *short hairpin* RNA gegen p65 bzw. DCP1a enthielt, transfiziert wurden. Die Zellen wurden für drei Tage mit Puromycin (1 µg/ml) selektiert. A): Von entsprechend behandelten Zellen wurden Gesamtproteine isoliert, die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteinexpression mittels Westernblot analysiert. Dabei dient β-Actin als Beladungskontrolle. B, C): Mit den, wie oben beschrieben, behandelten Zellen wurde ein PLA mit anti-p65 (F6, Maus, SC, 1:100) und anti-DCP1a (Kaninchen, Abcam, 1:100) durchgeführt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, sowie ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle). B): Quantifizierung: Die Zellen wurden mit Hilfe der Duolink®ImageTool Software analysiert und die Daten mittels SigmaPlot als Box-(Whisker)-Plot dargestellt. Die Plots stellen die Anzahl der Signale pro Zelle dar. n=3, 150 Zellen pro Versuchsansatz wurden ausgezählt. Signifikanzniveau: \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001 (Mann-Whitney Rank Sum Test) C): Übersichtsaufnahmen von Zellen: Die Kerne wurden mit 1 µM Hoechst-Lösung gegengefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Merge 1: Cy3 (PLA Signal) + Hoechst, Merge 2: Merge 1 + Phasenkontrast. Messbalken 25 µm. Modifiziert veröffentlicht in (Mayr-Buro et al. 2019).

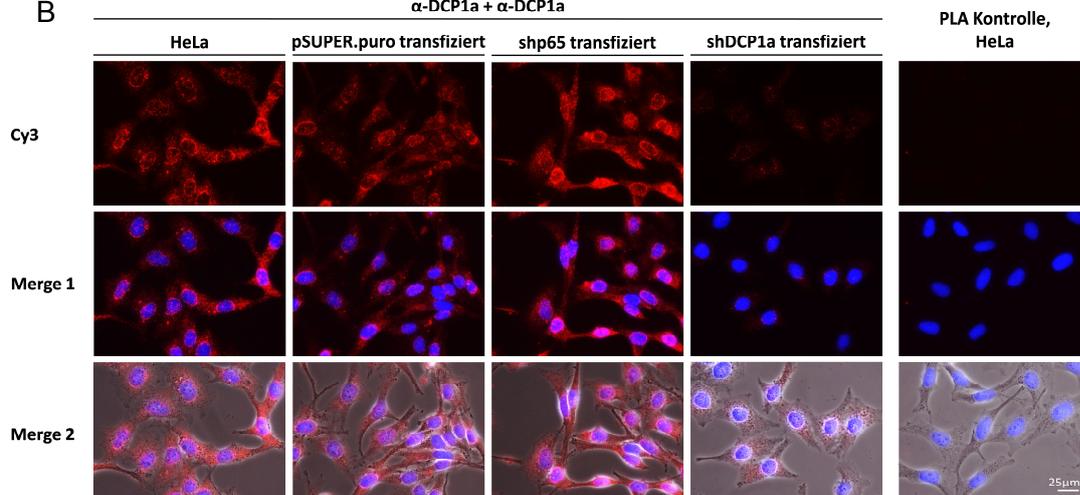
#### 4.4.1.5 Nachweis der Expression von DCP1a im PLA und Analyse des Einflusses eines p65 bzw. DCP1a knock downs

Wie auch in Kapitel 4.3.1 mit p65 gezeigt, sollte nun die Expression von DCP1a im PLA dargestellt und die Auswirkungen eines p65 bzw. DCP1a knock downs auf das Protein untersucht werden. Hierzu wurde ein PLA mit zwei unterschiedlichen DCP1a-Antikörpern an untransfizierten, sowie pSUPER.puro-Leervektor, shp65- und shDCP1a-transfizierten HeLa-Zellen durchgeführt.

A



B



**Abbildung 34:** RNAi-vermittelter p65 bzw. DCP1a knock down mit anschließendem PLA mit zwei DCP1a-Antikörpern zum Nachweis der DCP1a-Proteinexpression

A, B): Verwendet wurden parentale HeLa-Zellen oder Zellen, die transient mit pSUPER.puro-Leervektor oder mit pSUPER.puro, welcher eine *short hairpin* RNA gegen p65 bzw. DCP1a enthielt, transfiziert wurden. Die Zellen wurden für drei Tage mit Puromycin 1 µg/ml selektiert und anschließend ein PLA mit den Antikörpern anti-DCP1a (Maus, Abnova, 1:100) und anti-DCP1a (Kaninchen, Abcam, 1:100) durchgeführt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, sowie ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle). A): Quantifizierung: Die Zellen wurden mit Hilfe der Duolink®ImageTool Software analysiert und die Daten mittels SigmaPlot als Box-(Whisker)-Plots dargestellt. Die Plots stellen die Anzahl der Signale pro Zelle dar. n=2, 100 Zellen pro Versuchsansatz wurden ausgezählt. Signifikanzniveau: \*\*\*: p<0,001 (Mann-Whitney Rank Sum Test) B): Übersichtsaufnahmen von Zellen: Die Kerne wurden mit 1 µM Hoechst-Lösung gefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Merge 1: Cy3 (PLA Signal) + Hoechst, Merge 2: Merge 1 + Phasenkontrast. Messbalken 25 µm

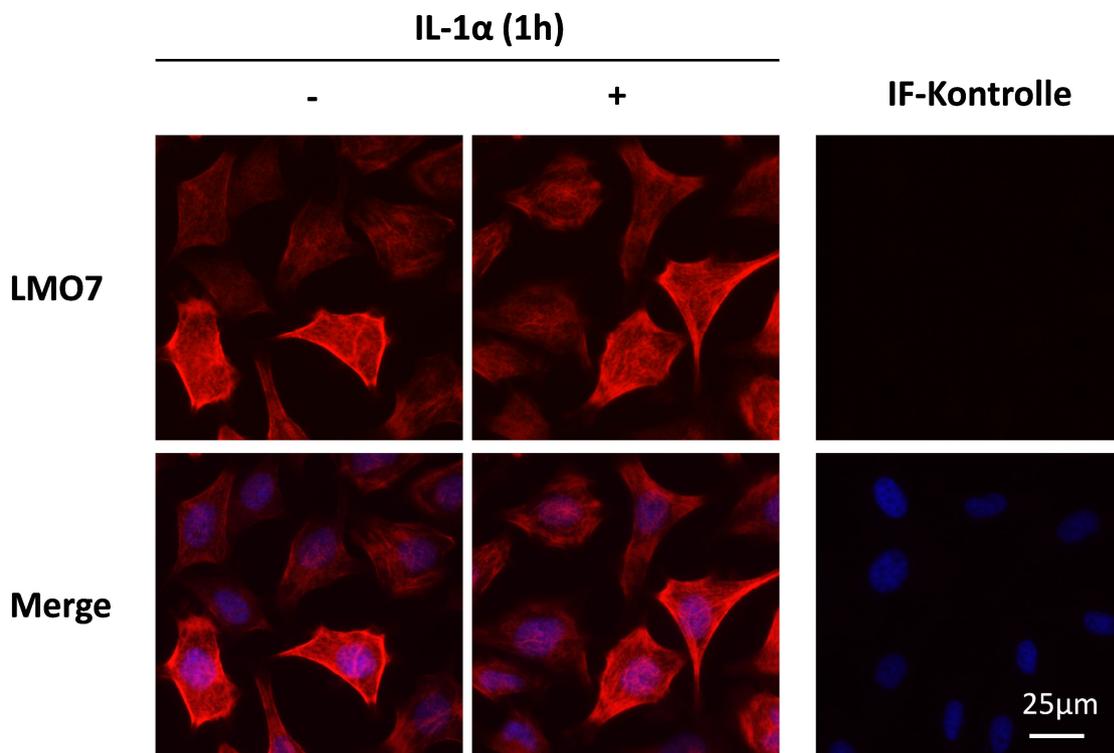
In den untransfizierten HeLa-Zellen wurden dabei im Median 290,5 PLA Signale pro Zelle detektiert (siehe Abbildung 34A), wobei jedes Signal jeweils ein DCP1a-Protein repräsentiert. Die Signale traten größtenteils im Zytoplasma auf, waren aber auch im Zellkern zu finden. Wie Abbildung 34B zeigt, war auch hier eine Ansammlung der PLA Signale um den Zellkern (coronen-artig) auffällig, was bereits zuvor unter Verwendung des DCP1a-Antikörpers von Abnova in der PLA in Kombination mit einem p65-Antikörper beobachtet wurde. Außerdem konnten im Zytoplasma vereinzelt größere bzw. stärkere PLA Signale detektiert werden, die für eine Anhäufung von DCP1a in diesem Bereich sprechen und somit höchstwahrscheinlich *p-bodies* entsprechen. Nach Transfektion des pSUPER.puro-Leervektors wurde im PLA ein ähnliches Ergebnis erzielt, sodass weder in der Anzahl der detektierten PLA Signale (Median: 280) noch in deren Verteilung ein Unterschied zur untransfizierten Kontrolle festgestellt werden konnte. Auch der RNAi-vermittelte *knock down* von p65 hatte auf das Auftreten der PLA Signale und damit auf die Expression des DCP1a-Proteins quantitativ (Median: 255,5) und qualitativ keine Auswirkung. In den shDCP1a-transfizierten Zellen konnte eine Reduktion der Anzahl der Signale auf etwas mehr als die Hälfte (Median: 132,5) beobachtet werden. Trotz relativ starkem *knock down* von DCP1a im Westernblot (nicht gezeigt), war im PLA dennoch eine nicht unbeträchtliche Menge DCP1a zu detektieren. Für die Kontrollen ergaben sich Werte von 5 Spots im Median für den DCP1a-Antikörper von Abcam und 15 für den Abnova-Antikörper.

#### **4.4.2 Identifizierung von LIM domain only 7 (LMO7) als weiteren Interaktionspartner von p65**

Bei Überexpression von p65 und dem LIM domain only 7 (LMO7)-Protein, konnte die Arbeitsgruppe Kracht, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Universität Gießen, eine Interaktion der beiden Proteine nachweisen (bisher unveröffentlichte Daten). So ließen sich die überexprimierten Proteine ko-immunpräzipitieren. Dies konnte bisher auf endogenem Proteinlevel nicht nachgewiesen werden. Um eine durch die Überexpression bedingte, artifizielle Interaktion auszuschließen, sollte nun mittels PLA Analysen getestet werden, ob diese Interaktion auch zwischen den endogenen Proteinen zu finden ist. Als Vorversuch wurde auch hier zunächst eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt, um genaueres über die Lokalisation des LMO7 und die Funktionalität des verwendeten Antikörpers zu erfahren.

#### 4.4.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz mit einem LMO7-Antikörper

Abbildung 35 zeigt Ausschnitte von Zellen die zunächst mit dem primären LMO7-Antikörper inkubiert und anschließend mittels Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper markiert wurden. Für die Verteilung von LMO7 zeigte sich, dass das Protein über die ganze Zelle netzartig gespannt ist. Auch im Zellkern war LMO7 zu finden. Teilweise war an den Zellmembranen ein verstärktes Signal zu beobachten, was für ein gehäuftes Vorkommen von LMO7 in diesem Bereich, in Übereinstimmung mit der Literatur, spricht (Wozniak et al. 2013), (Holaska et al. 2006). Die IF-Kontrolle zeigte nur ein minimales Hintergrundsignal und spricht für eine gute Qualität des sekundären Antikörpers und des Versuches an sich.



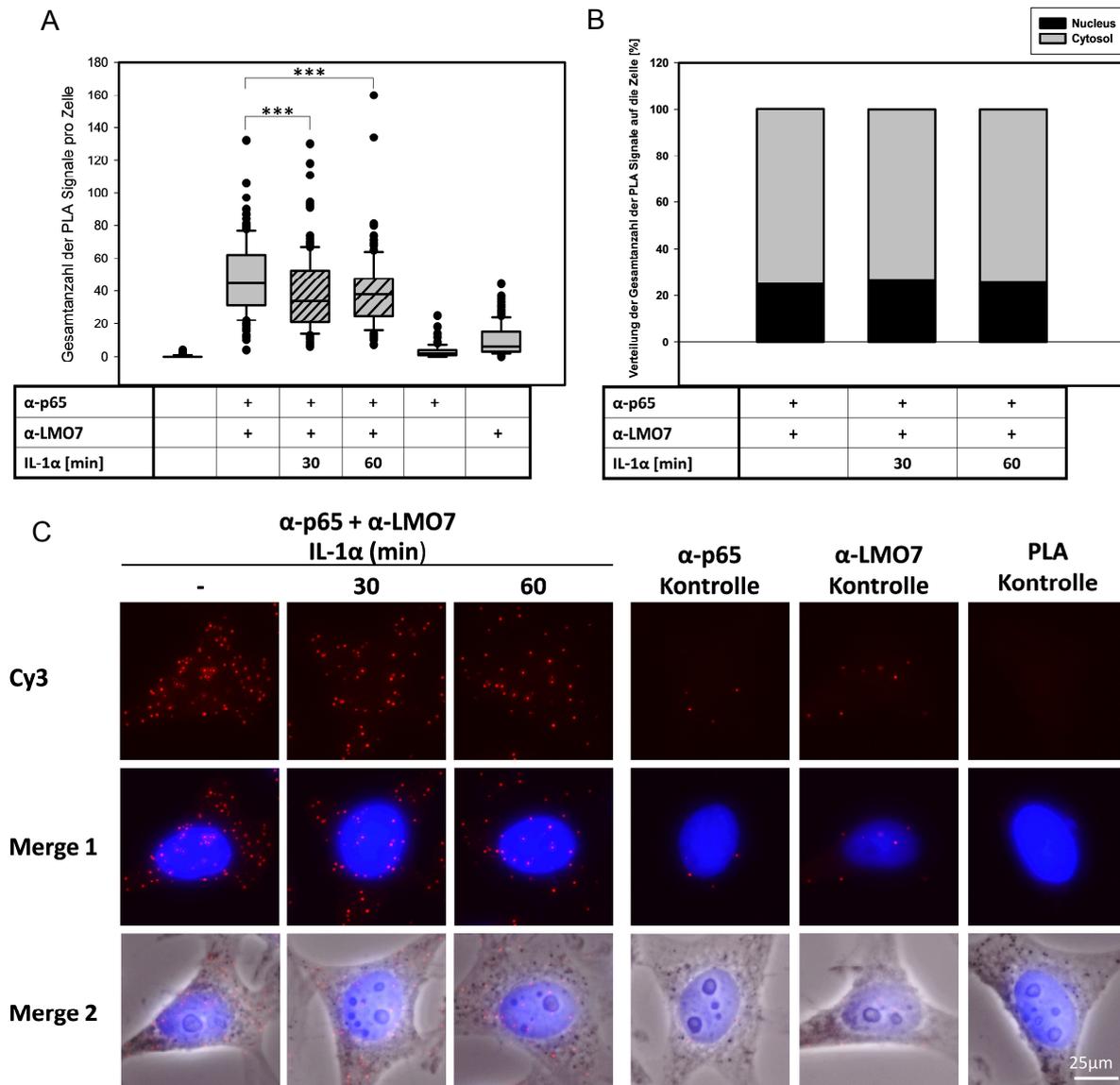
**Abbildung 35:** Indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von LMO7

HeLa-Zellen wurden für eine Stunde mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend erfolgte die Analyse der Lokalisation von LMO7 mittels indirekter Immunfluoreszenz. Der primäre Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:100 eingesetzt und mit Cy3-gekoppelten sekundären Antikörpern (1:200) markiert. Die Kerne wurden mit einer 1  $\mu$ M Hoechst-Lösung gegengefärbt. Merge: Cy3 (LMO7) + Hoechst; IF-Kontrolle: ohne primären Antikörper. Die Aufnahmen erfolgten mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 20-fache Vergrößerung. Messbalken 25  $\mu$ m.

#### 4.4.2.2 Identifizierung eines endogenen p65/LMO7-Komplexes mittels PLA und Testung auf eine mögliche Regulation durch IL-1 $\alpha$

Um eine mögliche Interaktion zwischen p65 und LMO7 auf endogenem Level nachzuweisen, wurde ein PLA mit p65- und LMO7-Antikörpern durchgeführt. Als Kontrollen dienten Ansätze, die entweder mit keinem oder nur einem der beiden

primären Antikörper inkubiert wurden. Um auch eine eventuell vorhandene Abhängigkeit der Interaktion von IL-1 $\alpha$  feststellen zu können, wurden Zellen neben der unstimulierten Kontrolle zusätzlich für eine halbe oder eine Stunde mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  behandelt.



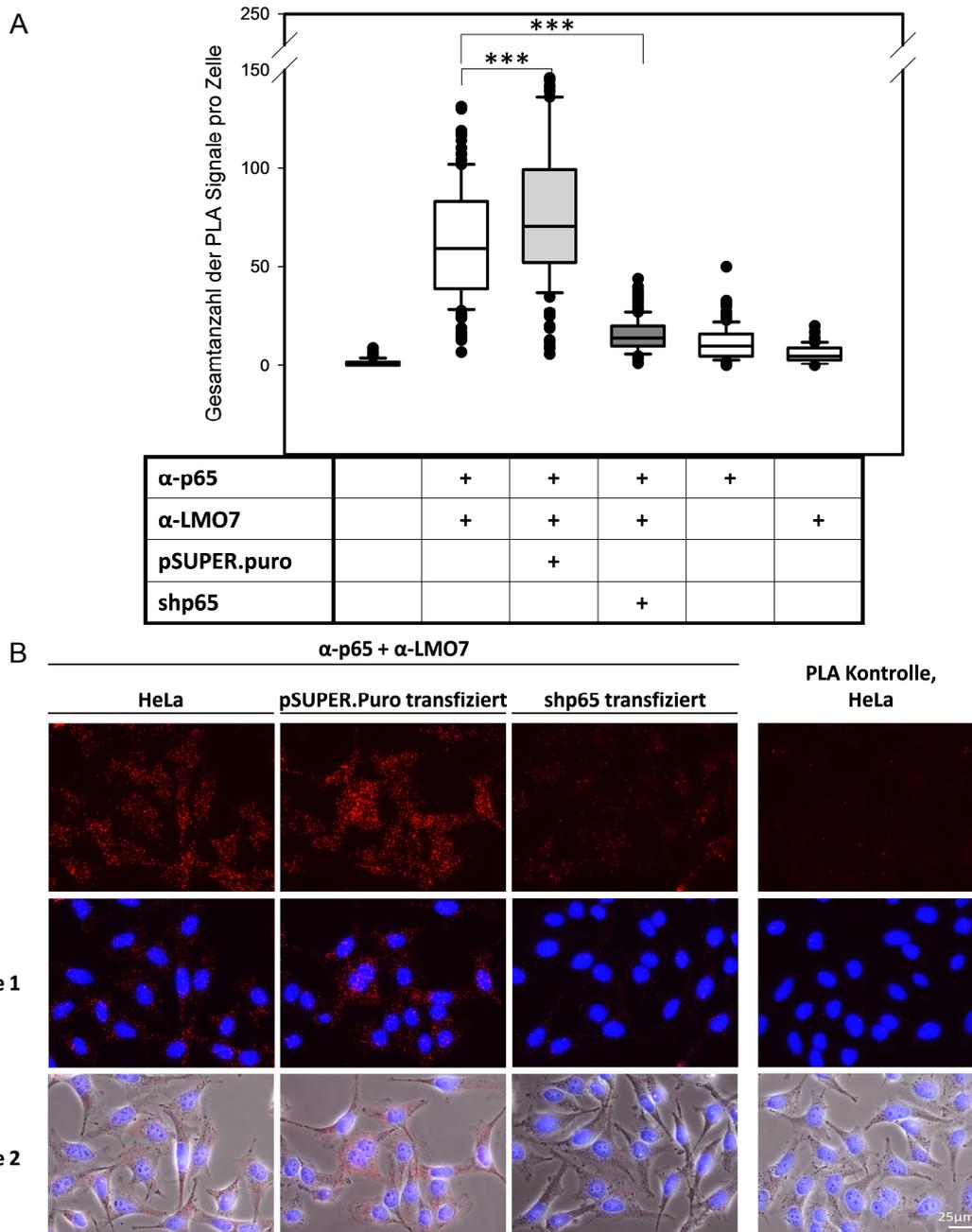
**Abbildung 36:** IL-1 $\alpha$ -abhängige Regulation der Interaktion von p65 und LMO7 im PLA

A, B, C): HeLa-Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  für 30 oder 60 Minuten stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde ein PLA mit den Antikörpern anti-p65 (F6, Maus, SC, 1:100) und anti-LMO7 (H-300, Kaninchen, SC, 1:200) durchgeführt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, sowie ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle). A, B): Die Zellen wurden mit Hilfe der Duolink®ImageTool Software analysiert und die Daten mittels SigmaPlot als Box-(Whisker)-Plots dargestellt. n=3, 150 Zellen pro Versuchsansatz wurden ausgezählt. A): Quantifizierung: Die Plots stellen die Anzahl der Signale pro Zelle dar. Signifikanzniveau: \*\*\*: p<0,001 (Mann-Whitney Rank Sum Test) B): Verteilung der PLA Signale zwischen Zellkern und Zytoplasma. C): Ausschnitte repräsentativer Zellen: Die Kerne wurden mit 1  $\mu$ m Hoechst-Lösung gegengefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Merge 1: Cy3 (PLA Signal) + Hoechst, Merge 2: Merge 1 + Phasenkontrast. Messbalken 25  $\mu$ m.

Wie Abbildung 36A zeigt, konnten in den unstimulierten HeLa-Zellen um die 45 PLA Signale (Median: 44,5) detektiert werden, wobei ein Signal jeweils für eine Interaktion von p65/LMO7 steht. Dabei waren die Interaktionsspotts relativ gleichmäßig auf Zytoplasma und Zellkern verteilt. Auch die Auswertung bezüglich der Verteilung der Komplexe zwischen Zytosol und Nukleus (Abbildung 36B) zeigte, dass ca. 25 % der Interaktionen im Zellkern lokalisiert waren. Dies war im Vergleich zu den bisherigen Versuchen, bei denen andere Interaktionspartner untersucht wurden etwas erhöht (Prozentzahl der im Kern befindlichen PLA Signale unter 20 %, für z.B. die p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Interaktion). Nach einer halben Stunde Stimulation der Zellen mit IL-1 $\alpha$ , konnte eine statistisch signifikante Reduktion der Anzahl der PLA Signale auf 33,5 Interaktionsspotts im Median pro Zelle detektiert werden ( $p < 0,001$ ). Auch nach 60-minütiger IL-1 $\alpha$ -Behandlung war die Zahl der PLA Signale noch vermindert (Median: 38,  $p < 0,001$ ). An der Verteilung der Interaktionsspotts zwischen Nukleus und Zytosol änderte sich durch die Stimulation kaum etwas (siehe Abbildung 36B). Für die Kontrollen zeigte der LMO7-Antikörper (Median: 6) etwas mehr unspezifische Signale als der p65-Antikörper (Median: 2; vgl. Abbildung 36A, Lane 5 und 6).

#### **4.4.2.3 Auswirkungen eines p65 knock downs auf die Ausbildung von p65/LMO7-Komplexen im PLA**

Durch die Reduzierung bzw. den *knock down* mindestens einer der beiden Bindungspartner kann sichergestellt werden, dass der PLA auch hier tatsächlich spezifisch die Interaktion zwischen p65 und LMO7 abbildet. Deshalb wurde ein shRNA-vermittelter *knock down* von p65 mittels transienter Transfektion eines shp65-Plasmides herbeigeführt. Als Kontrollen dienten hierbei untransfizierte HeLa-Zellen, sowie pSUPER.puro-Leervektor-transfizierte HeLas. Für die untransfizierten Kontrollzellen ergab die Quantifizierung eine Anzahl von 59,5 Interaktionssignalen pro Zelle im Median (siehe Abbildung 37A). Nach Transfektion des pSUPER.puro-Leervektors war unerwarteter Weise eine statistisch signifikante Zunahme der Anzahl der PLA Signale pro Zelle zu beobachten. So stieg die Zahl der Interaktionsspotts auf ca. 70,5 ( $p < 0,001$ ). Durch den *knock down* von p65 war ein massiver Rückgang der Anzahl der PLA Signale auf 14 Spots im Median zu beobachten ( $p < 0,001$ ). In der Kontrolle, in welcher nur mit dem p65-Antikörper inkubiert wurde, zeigten sich um die 10 unspezifische Signale pro Zelle. Für den LMO7-Antikörper fiel diese Kontrolle noch etwas geringer aus (Median: 5). Dass der *knock down* von p65 erfolgreich war, kann dem Westernblot (Abbildung 33A) in Kapitel 4.4.1.4 entnommen werden, da diese Versuche parallel durchgeführt wurden.

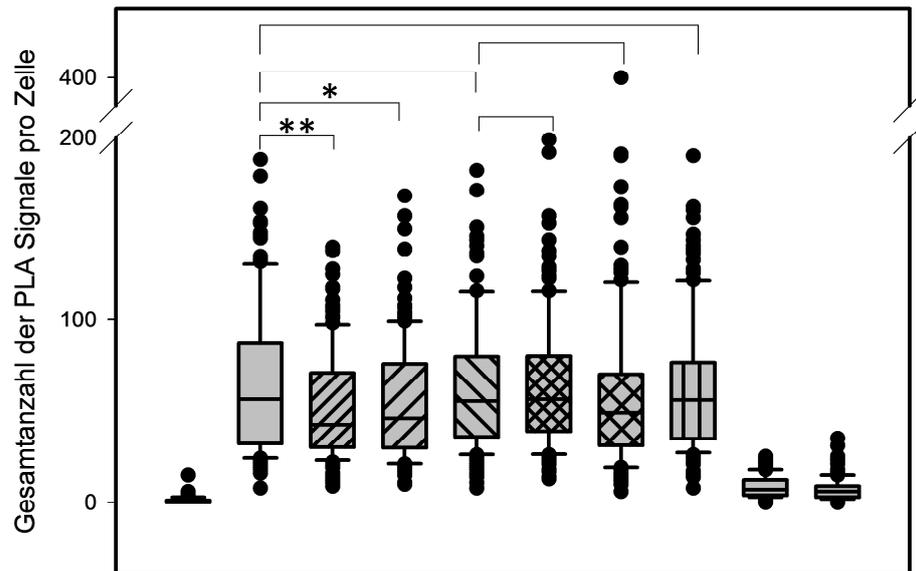


**Abbildung 37:** RNAi-vermittelter p65 knock down mit anschließendem *Proximity Ligation Assay* mit p65- und LMO7-Antikörpern

A, B): Verwendet wurden parentale HeLa-Zellen oder Zellen, die transient mit pSUPER.puro Leervektor oder mit pSUPER.puro, welcher eine *short hairpin* RNA gegen p65 enthielt, transfiziert wurden. Die Zellen wurden für drei Tage mit Puromycin 1  $\mu$ g/ml selektiert und anschließend ein PLA mit den Antikörpern anti-p65 (F6, Maus, SC, 1:100) und anti-LMO7 (H-300, Kaninchen, SC, 1:200) durchgeführt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, sowie ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle). A): Quantifizierung: Die Zellen wurden mit Hilfe der Duolink®ImageTool Software analysiert und die Daten mittels SigmaPlot als Box-(Whisker)-Plots dargestellt. Die Plots stellen die Anzahl der Signale pro Zelle dar. n=3, 150 Zellen pro Versuchsansatz wurden ausgezählt. Signifikanzniveau: \*\*\*: p<0,001 (Mann-Whitney Rank Sum Test) B): Übersichtsaufnahmen von Zellen: Die Kerne wurden mit 1  $\mu$ M Hoechst-Lösung gegengefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Merge 1: Cy3 (PLA Signal) + Hoechst, Merge 2: Merge 1 + Phasenkontrast. Messbalken 25  $\mu$ m.

#### **4.4.2.4 Auswirkung eines TAK1-Inhibitors auf die IL-1-induzierte Reduzierung der Anzahl an p65/LMO7-Komplexen**

Wie in Kapitel 4.2.5 bereits erörtert, kann mit Hilfe eines TAK1-Inhibitors (5Z-7-Oxozeaenol) eine IL-1 $\alpha$ -Abhängigkeit einer Interaktion bestätigt oder entkräftigt werden. Deshalb wurde dies für die p65/LMO7-Interaktion in einem Versuchsansatz überprüft. Das heißt, es wurden Zellen unbehandelt belassen oder mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  für verschiedene Zeitpunkte (30 und 60 Minuten) stimuliert. Weiterhin wurden Zellen nur mit 1  $\mu$ M 5Z-7-Oxozeaenol für eine halbe Stunde vorbehandelt oder mit dem TAK1-Inhibitor und zusätzlich für die angegebenen Zeiten mit IL-1 $\alpha$  behandelt. Dabei war die Erwartung, dass nach vorheriger Behandlung mit dem TAK1-Inhibitor die IL-1 $\alpha$ -Stimulation keinen bzw. einen geringeren Effekt auf die Anzahl der im PLA detektierten Signale für p65/LMO7 hat und somit die möglicherweise IL-1 $\alpha$ -abhängige Reduktion der p65/LMO7-Komplexe geringer ist. Wie auch in den Versuchen mit p65- und LMO7-Antikörpern zuvor, konnten in den unbehandelten HeLa-Zellen 56,5 PLA Signale im Median, welche auf die gesamte Zelle verteilt sind, detektiert werden (siehe Abbildung 38, Plot 2). Durch die Behandlung mit IL-1 $\alpha$  für 30 Minuten konnte eine Abnahme der Gesamtanzahl der Spots um etwa 12 auf 42,5 im Median beobachtet werden. Auch nach 60 Minuten IL-1 $\alpha$ -Stimulation war die Zahl der Interaktionen an p65/LMO7 noch reduziert (Median: 46). Der Median der Anzahl der PLA Signale der Zellen, die nur mit 5Z-7-Oxozeaenol behandelt wurden, lag auf etwa gleicher Höhe (Median: 55,5), wie der Median der unbehandelten Kontrolle. Nach 30 Minuten Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$ , der Zellen die zuvor für eine halbe Stunde mit 5Z-7-Oxozeaenol vorbehandelt wurden, zeigte sich, dass die Anzahl der PLA Signale der Anzahl der unbehandelten und der nur mit 5Z-7-Oxozeaenol behandelten Zellen gleich und bei 56,5 lag. Nach Vorbehandlung mit 5Z-7-Oxozeaenol und anschließender IL-1 $\alpha$ -Stimulation für eine Stunde, wurde eine leichte Abnahme der p65/LMO7-Komplexe auf 49 Interaktionsspot im Median festgestellt. Als weitere Kontrolle wurden Zellen parallel zu 5Z-7-Oxozeaenol nur mit dessen Lösungsmittel DMSO vorbehandelt, um einen Effekt durch DMSO selbst ausschließen bzw. detektieren zu können. Der Median der PLA Signale lag hier bei 56 und damit im Bereich der unbehandelten Kontrolle. Weiterhin wurden wie in allen PLA Versuchen Kontrollen mit keinem oder nur jeweils einem der beiden primären Antikörper angefertigt. Die Anzahl der Signale in diesen Ansätzen lag deutlich unter derer der Proben mit beiden Primärantikörpern (Mediane: ohne: 1; p65: 7, LMO7: 6).



<b>α-p65</b>		+	+	+	+	+	+	+	+	
<b>α-LMO7</b>		+	+	+	+	+	+	+		+
<b>5Z-7-Oxozeaenol [1μM]</b>					+	+	+			
<b>DMSO [0,01%]</b>								+		
<b>IL-1α [min]</b>			30	60		30	60			

**Abbildung 38:** Proximity Ligation Assay mit IL-1α- und 5Z-7-Oxozeaenol-Behandlung mit p65- und LMO7-Antikörpern

HeLa-Zellen wurden zunächst mit 1 μM 5Z-7-Oxozeaenol bzw. 0,01 % DMSO behandelt oder unbehandelt belassen. Nach einer halben Stunde wurden die Zellen mit 10 ng/ml IL-1α für die angegebenen Zeiten stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde ein PLA mit den Antikörpern anti-p65 (F6, Maus, SC, 1:100) und anti-LMO7 (H-300, Kaninchen, SC, 1:200). Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, sowie ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle). Die Zellen wurden mit Hilfe der Duolink®ImageTool Software analysiert und die Daten mittels SigmaPlot als Box-(Whisker)-Plots dargestellt. Die Plots stellen die Anzahl der Signale pro Zelle dar. n=3, 150 Zellen pro Versuchsansatz wurden ausgezählt. Signifikanzniveau: \*: p<0,05; \*\*: p<0,01 (Mann-Whitney Rank Sum Test).

## 5 Diskussion

### 5.1 Detektion der dynamischen IL-1-abhängigen Regulation des p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexes auf Einzelzellebene

Nach der Entdeckung von NF $\kappa$ B-Proteinen 1986 (Sen and Baltimore 1986) und der nachfolgenden Beschreibung von inhibitorischen  $\kappa$ B-Proteinen wenige Jahre später (Baeuerle, Lenardo et al. 1988), zeigte sich auch eine Abhängigkeit dieser Interaktion von verschiedenen Stimuli, wie z.B. Interleukin-1 (Siebenlist, Franzoso et al. 1994). Dieser Regulationsprozess kann in den Westernblotexperimenten in Kapitel 4.1.1, Abbildung 13 und 14, nachvollzogen werden. IL-1 $\alpha$ -abhängig kommt es zur verstärkten Phosphorylierung von p65 (maximal nach 10-30 Minuten der IL-1 $\alpha$ -Stimulation, Anstieg auf bis zu 210 % des Ausgangswertes), sowie zur Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  (Maximum nach zehn Minuten der IL-1 $\alpha$ -Stimulation, Anstieg auf das 14,6-fache des Ausgangswertes) und dessen nachfolgendem Abbau (Minimum nach 30 minütiger IL-1 $\alpha$ -Stimulation, Abfall auf 5 % des Ausgangswertes). Nach drei bis sechs Stunden Stimulation kommt es zu einer leicht überschießenden Expression an I $\kappa$ B $\alpha$  (auf ca. 150 % des Ausgangswertes). Diese Beobachtung reflektiert eine überschießende p65-abhängige Resynthese des I $\kappa$ B $\alpha$  (Sun et al. 1993). Dagegen geht die Phosphorylierung des p65 nach längeren Stimulationszeiten auf Werte zurück, die geringer sind als der Ausgangswert (ca. 64 % des Ausgangswertes). Die Expression von p65, p50 und  $\beta$ -Actin, wobei letzteres als Beladungskontrolle diente, blieb unter der Stimulation mit IL-1 $\alpha$  weitestgehend konstant. Mit Hilfe der Ko-Immunpräzipitation (siehe Abbildung 15) konnte gezeigt werden, dass p65 und I $\kappa$ B $\alpha$  Komplexe bilden, die durch IL-1 $\alpha$  reguliert werden. So lässt sich nach einer halben Stunde Stimulation mit IL-1 $\alpha$  zum Beispiel weniger I $\kappa$ B $\alpha$  über p65 ko-immunopräzipitieren als im basalen Zustand, was darauf hinweist, dass es durch die IL-1 $\alpha$ -Stimulation zu einer sukzessiven Auflösung des p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexes nach I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation kommt. Auch in der I $\kappa$ B $\alpha$ -IP spiegelt sich diese Dynamik wieder.

Der Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexen und der IL-1 $\alpha$ -Stimulation wurde bisher sehr oft in der Literatur beschrieben und ist sehr genau charakterisiert (Ben-Neriah and Schmitz 2004). Deshalb sollte diese Interaktion genutzt werden, um eine Methode wie den *Proximity Ligation Assay* zu validieren, die im Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen bisher nicht so weit verbreitet ist, wie beispielweise die Analyse bestimmter Interaktionen mittels Ko-Immunpräzipitation. Außerdem bietet der PLA die Möglichkeit die Interaktionen und deren Regulation auch auf Einzelzellebene abzubilden. Hierzu wurden im Vorfeld Versuche in Form von

indirekten Immunfluoreszenzen mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt, um zum einen, eine Aussage über die Lokalisation der Proteine p65 und I $\kappa$ B $\alpha$  in den Zellen im basalen oder stimulierten Zustand zu erhalten, zum anderen, um ggf. eine Aussage über die Spezifität der verwendeten Antikörper machen zu können, die später im PLA eingesetzt werden sollten.

Diese Vorversuche zeigten im direkten Vergleich zweier unterschiedlicher I $\kappa$ B $\alpha$ - bzw. p65-Antikörper jeweils ähnliche Lokalisationen der Proteine innerhalb der Zelle. Dabei konnte I $\kappa$ B $\alpha$  sowohl im basalen, als auch im stimulierten Zustand ubiquitär innerhalb der Zelle gefunden werden (siehe Abbildung 17). Im Gegensatz dazu wurde p65 basal hauptsächlich im Zytoplasma detektiert, während es durch eine einstündige Stimulation mit IL-1 $\alpha$  zu einer partiellen Translokation des Proteins in den Zellkern bei der Mehrheit der Zellen kam (siehe Abbildung 18).

## **5.2 Der Proximity Ligation Assay als Methode mit hoher Spezifität – Validierung des Assays anhand der bekannten IL-1 $\alpha$ -regulierten Interaktion p65/I $\kappa$ B $\alpha$**

Der PLA stellt, allein durch das Prinzip seiner Funktionsweise (siehe Kapitel 3.3.2), z.B. durch die Amplifikation des Signals mittels *Rolling Circle Amplification* über ein DNA-Template und die Polymerase, eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen dar. Außerdem kann er zusätzlich auf Einzelzellebene genutzt werden (Soderberg, Leuchowius et al. 2008). Durch Verwendung des PLAs sollte die oben beschriebene transiente, IL-1 $\alpha$ -abhängige Auflösung des p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexes nachvollzogen werden, um dadurch Aussagen über die Spezifität des Assays treffen zu können.

Die Grundlage für einen erfolgreichen PLA ist die möglichst spezifische Bindung der primären Antikörper an das Zielprotein. Für die Verifizierung des Assays wurden zunächst unterschiedliche Antikörperkombinationen getestet, die zwar das gleiche Zielmolekül erkennen, aber an unterschiedlichen Epitopen des Zielproteins binden. Zu erwarten wäre, dass sie im PLA sowohl für Lokalisation als auch Anzahl der Signale ein ähnliches Bild liefern. Bei den ersten PLA Experimenten mit p65- und I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörpern ergaben sich, entgegen dieser Erwartung, für die unterschiedlichen Antikörperkombinationen nicht exakt gleiche Ergebnisse. Die PLA Signale für die jeweilige p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Interaktion unterschieden sich sowohl in ihrer Gesamtanzahl der Signale pro Zelle, als auch in der IL-1 $\alpha$ -abhängigen Reduktion der Signale, d.h. diese Abnahme konnte nicht für beide Kombinationen detektiert werden (siehe Abbildung 19). Dieses Phänomen könnte durch die unterschiedlichen Bindungsstellen

der Antikörper erklärbar sein. Während der anti-I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörper der Firma Abcam das Protein in der Region um Serin 32 erkennt und bindet, befindet sich die Bindestelle des Antikörpers von Cell Signaling im Bereich des Arginins an Position 29. Tatsächlich spielt diese Region für p65 und seine Bindung an I $\kappa$ B $\alpha$  eine Rolle. So konnten Malek et al. zeigen, dass bei Modifikation der Aminosäuresequenz im N-Terminus von p65 (Aminosäuren 30-45) die Affinität zu I $\kappa$ B $\alpha$  deutlich geringer ist (Malek et al. 1998). Es wäre durchaus möglich, dass durch die Bindung des Antikörpers in diesem Bereich die Bindung von p65 an I $\kappa$ B $\alpha$  gestört wird und dadurch weniger p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexe detektiert werden. Weiterhin denkbar ist natürlich auch, dass die Bindungsstelle des Antikörpers an seinem Epitop am p65-Protein durch Bindung des I $\kappa$ B $\alpha$  blockiert wird und dadurch der Nachweis der Komplexe ausbleibt.

In Bezug auf die unterschiedliche Reaktion der Zellen auf die IL-1 $\alpha$ -Stimulation muss bedacht werden, dass sich die Zellen, der verschiedenen Experimente, da sie nicht extra synchronisiert wurden, an unterschiedlichen Zeitpunkten des Zellzyklus befinden könnten. Hierdurch kann auch die IL-1 $\alpha$ -Antwort, die hier anhand der Abnahme der Anzahl der p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Interaktionen gemessen werden soll, verzögert oder sogar reduziert sein. So wurde bei den Versuchen mit dem anti-I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörper der Firma Abcam die Abnahme der Komplexe als nicht signifikant klassifiziert. Dementsprechend würde man den eigentlichen IL-1 $\alpha$ -Effekt als falsch-negativ, bzw. nur sehr gering in die Auswertung nehmen, da nur wenige Zellen, eventuell eben aufgrund deren unterschiedlicher Stellung in den Phasen des Zellzyklus, auf den Stimulus reagieren konnten. Um diese Vermutung eindeutig zu klären, wäre es sinnvoll eine Synchronisation der Zellen durch Entzug von Serum herzustellen (Davis et al. 2001) und anschließend erneut einen PLA mit den verschiedenen Antikörpern durchzuführen. Diese Überlegungen müssen insgesamt natürlich vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass man von einer erfolgreichen, vergleichbaren und gleich starken Stimulation der Zellen mit IL-1 $\alpha$  ausgeht.

Im Folgenden wird auf die Antikörperkombination aus anti-p65 der Firma Santa Cruz und anti-I $\kappa$ B $\alpha$  von Abcam Bezug genommen. Insgesamt wurden mit dem PLA 15-20 p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexe vor bzw. um die 13 nach IL-1 $\alpha$ -Stimulation detektiert (siehe Abbildung 19C). Diese Anzahl erscheint zunächst etwas gering. Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass nicht alle tatsächlich vorhandenen p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexe mit Hilfe von primären Antikörpern markiert und somit später auch nicht im PLA sichtbar werden. Ursächlich könnte hierfür sein, dass durch weitere Proteininteraktionen oder durch die p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Interaktion selbst Bindungsstellen der Antikörper maskiert werden. Wie in der Literatur beschrieben, wird das p65 nicht nur durch Komplexbildung mit I $\kappa$ B $\alpha$  im Zytoplasma retiniert, sondern durch die Interaktion mit einer Vielzahl weiterer

inhibitorischer  $\kappa$ B-Proteine (Schmitz, Mattioli et al. 2004). Diese beschriebenen Interaktionen könnten dementsprechend ein Grund für die, in den vorliegenden Versuchen, relativ geringe Anzahl an p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexen sein.

Mit Hilfe einer erweiterten IL-1 $\alpha$ -Kinetik konnte im PLA der IL-1 $\alpha$ -induzierte Abbau der p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexe dargestellt werden (siehe Abbildungen 20 und 21). Die Ergebnisse sind konsistent mit denen, welche analog mit Hilfe von Westernblot- und Ko-IP-Experimenten generiert wurden. Auch im PLA ist die Abnahme der Signale nach 30 Minuten maximal. Nach 90 Minuten Stimulation nimmt die Anzahl der p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Interaktionen wieder zu. Dies lässt sich durch die bereits mehrfach beschriebene p65-induzierte Resynthese von I $\kappa$ B $\alpha$  erklären (Brown, Park et al. 1993). Die Detektion dieser dynamisch regulierten Interaktion war ein wichtiger Hinweis dafür, dass der PLA, unter Verwendung der entsprechenden Antikörper, spezifisch die physiologisch relevante Interaktion p65/I $\kappa$ B $\alpha$  abbildet.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexe in Bezug auf ihre Verteilung zwischen Zellkern und Zytoplasma, von der IL-1 $\alpha$ -Stimulation scheinbar unabhängig waren und unverändert blieben. In den Versuchen konnten 17-18 % der Interaktionen im Zellkern nachgewiesen werden (siehe Abbildung 21B). Dabei scheint die Gesamtanzahl der vorhandenen Komplexe keine Rolle zu spielen, so dass davon auszugehen ist, dass sich ein dynamisches Gleichgewicht einstellt. Bestärkt wurde diese Annahme durch die Ergebnisse von Jurida et al. von 2015. Hier konnte gezeigt werden, dass ein Großteil des zytosolischen p65 auch nach Stimulation durch IL-1 $\alpha$  im Zytoplasma verbleibt und damit auch weiter im Komplex mit I $\kappa$ B $\alpha$  vorliegen kann (Jurida et al. 2015). Dabei müssen jedoch folgende zwei Tatsachen mit in die Überlegungen einbezogen werden:

Zum einen ist die Auswertung bezüglich dessen, ob PLA Signale tatsächlich im Zellkern liegen oder sich nur ober- oder unterhalb des Kerns befinden, technisch bedingt, nicht ganz einfach. Dies liegt vor allem daran, dass die Aufnahme der Bilder nur zwei dimensional erfolgte. Außerdem ist es äußerst schwierig alle auftretenden PLA Signale gleichzeitig scharf zu stellen, da diese in unterschiedlichen Ebenen liegen. Um diese Problematik zu lösen, könnte es sinnvoll sein 3D-Bilder mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops zu erstellen und anschließend eine entsprechende Analyse der auftretenden Signale durchzuführen.

Zum anderen gab es Hinweise darauf, dass der Kernaufschluss unter Verwendung des PLA Protokolls, wie im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben, nicht optimal gelang (siehe hierzu Kapitel 5.4).

Insgesamt konnte mit Hilfe dieser Versuche dennoch gezeigt werden, dass der PLA durchaus valide ist, um eine regulierte Interaktion zweier Proteine spezifisch

abzubilden. Bezüglich der genauen Lokalisation der Komplexe, v.a. ob intra- oder extranukleär, sollte eine Interpretation allerdings vorsichtig erfolgen.

### **5.3 Verifizierung der Spezifität des PLAs durch *knock down* und *knock out* Experimente, sowie durch pharmakologische Intervention**

Im *knock down* von p65 wird mit Hilfe eines Plasmides, das für eine shRNA codiert, die komplementär zur p65-mRNA ist und diese dadurch für die Translation unzugänglich macht, die Expression von p65 innerhalb der Zelle gehemmt. Mittels Westernblot-Experimenten (siehe Abbildung 22A) konnte gezeigt werden, dass es durch die Transfektion des Plasmides zu einer sehr starken Reduktion des p65 innerhalb der untersuchten Zellen kommt. Da, wie oben beschrieben, die Synthese von I $\kappa$ B $\alpha$  durch p65 induziert wird, wird folglich auch weniger I $\kappa$ B $\alpha$  in den Zellen exprimiert, was ebenfalls im Westernblot zu detektieren war. Hierdurch sollte in den transfizierten Zellen auch die Wahrscheinlichkeit für die Bildung von p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexen sehr viel geringer sein, als in den untransfizierten Zellen. Somit wäre im PLA eine starke Reduktion der Signale zu erwarten. Tatsächlich konnte dies in den *knock down* Versuchen gezeigt werden. Dies stützt zusätzlich die Hypothese, dass der PLA spezifisch die Interaktion p65/I $\kappa$ B $\alpha$  detektiert. Aufgrund der stark reduzierten Expression von p65, einhergehend mit der verminderten Resynthese von I $\kappa$ B $\alpha$ , konnte für den Großteil der untersuchten Zellen (Box im Box-Whisker-Plot, Abbildung 22B) keine Reaktion auf die Stimulation mit IL-1 $\alpha$  im PLA der *knock down* Zellen mehr detektiert werden. Die Anzahl der erhaltenen Signale befand sich hierbei im Bereich der PLA Kontrollen mit jeweils nur einem Primärantikörper, wodurch diese Signale auch als "falsch positiv" gewertet werden könnten, da diese auf unspezifisch gebundene Antikörper zurückzuführen sein könnten.

Auch durch die Versuche in den *mouse embryonic fibroblasts* mit entweder den Wildtyp- oder den p65-defizienten MEFs konnte vergleichend gezeigt werden, dass, bei fehlender Expression von p65 in den Zellen, der PLA keine spezifischen Interaktionen von p65/I $\kappa$ B $\alpha$  abbildet (siehe Abbildung 23). Dass in den p65-Wildtyp-MEFs nach einer Stunde Stimulation mit IL-1 $\alpha$  eine Erhöhung der Anzahl an p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexe detektiert werden kann, könnte damit erklärt werden, dass in den wildtypischen MEFs der Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$ , wie es auch durch Solt et al. gezeigt wurde, bereits nach 15 Minuten Stimulation mit IL-1 $\alpha$  maximal ist. In diesen Versuchen war es nach einer Stunde IL-1 $\alpha$ -Behandlung bereits schon wieder zu einer Regeneration des Proteinlevels an I $\kappa$ B $\alpha$  innerhalb der Zelle gekommen. Diese wird

durch die p65-induzierte Neusynthese von I $\kappa$ B $\alpha$ , noch verstärkt (Solt et al. 2007). Unter Berücksichtigung dieser beschriebenen Daten könnte sich zum Zeitpunkt nach einer Stunde IL-1 $\alpha$ -Stimulation nun mehr I $\kappa$ B $\alpha$  in den Zellen befinden als im unstimulierten Zustand und folglich auch mehr p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexe im PLA nachgewiesen werden.

Alles in allem zeigten diese Versuche mit anti-p65- und anti-I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörpern in transient transfizierten p65 *knock down* HeLa-Zellen und in p65-defizienten MEFs, dass es unter Reduktion bzw. Ausbleiben der Expression von p65 im PLA ebenfalls zu einer Reduktion der Signale, korrespondierend der p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Interaktion, kommt und der assay somit spezifisch diese Interaktion abbildet.

Weiterhin zeigte ein Versuchsansatz unter Verwendung eines TAK1-Inhibitors, dass auch die pharmakologische Hemmung des IL-1-Signalweges im PLA nachgewiesen werden kann. So kam es unter vorrausgehender Behandlung mit 5Z-7-Oxozeaenol nach IL-1 $\alpha$ -Stimulation für 30 Minuten dazu, dass statistisch signifikant mehr PLA Signale nachgewiesen werden konnten als in der entsprechenden, nicht mit dem TAK1-Inhibitor behandelten, Kontrolle (siehe Abbildung 24). Dies geht auf den, wenn auch nur sehr schwach ausgeprägten, partiell reduzierten Abbau der p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexe nach IL-1 $\alpha$ -Behandlung zurück. Warum der Effekt durch den TAK-1-Hemmstoff 5Z-7-Oxozeaenol, im Vergleich zu beispielsweise Westernblot-Versuchen mit dem gleichen Inhibitor, dennoch nur so gering ausgeprägt ist, könnte daran liegen, dass die Verteilung des Inhibitors in den  $\mu$ -Slides VI<sup>0,4</sup> (Ibi Treat von ibidi) im Gegensatz zu Zellkulturschalen nicht optimal verläuft.

#### **5.4 Einsatz des PLA zur Untersuchung der Expression eines Proteins am Beispiel p65**

Durch den Einsatz von zwei anti-p65-Antikörpern die jeweils an unterschiedlichen Bereichen des p65-Proteins binden, konnte die Expression von p65 in der Zelle mit Hilfe des PLA dargestellt werden (siehe Kapitel 4.3.1.1). Insgesamt können im unstimulierten Zustand in den Zellen im Median etwa 430 PLA Signale nachgewiesen werden, wobei hiervon ca. 18 % im Zellkern lokalisiert sind (siehe Abbildung 25). Auch in der indirekten Immunfluoreszenz wird in den unbehandelten Zellen ein großer Teil des p65 im Zytoplasma detektiert (siehe Abbildung 18). Weiterhin ist in der indirekten Immunfluoreszenz für einen Großteil der Zellen, nach einstündiger IL-1 $\alpha$ -Stimulation mit 10 ng/ml, eine deutliche Translokation des p65-Signals vom Zytoplasma in den Zellkern zu beobachten. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen, steigt der Anteil an p65 im Zellkern nach einstündiger Stimulation mit IL-1 $\alpha$  im PLA lediglich auf 20 %. Dies

scheint zunächst etwas verwunderlich, da angenommen wird, dass durch die Translokation der Transkriptionsfaktoren in den Zellkern die Genexpression der pro-inflammatorischen Faktoren induziert wird und hierüber die IL-1-Antwort vermittelt wird. Versuche von Miyamoto et al. zeigten, dass sich auch in reifen B-Zellen ca. 10 % der NFκB-Proteine im basalen Zustand im Zellkern befinden und nach Stimulation innerhalb von 10 Minuten nur 10-20% des gesamten NFκBs in den Zellkern translozieren (Miyamoto, Chiao et al. 1994), (Verma, Stevenson et al. 1995), (Jurida et al. 2015). Weiter geht man davon aus, dass nicht unbedingt ein verstärktes Vorhandensein von NFκB im Nukleus, sondern vielmehr weitere Regulationsprozesse für die Aktivierung von Zielgenen entscheidend sind (Ashburner, Westerheide et al. 2001). Um ihre Transkriptionsaktivität ausüben zu können, sind z.B. posttranslationale Modifikationen an den NFκB-Untereinheiten essentiell (Urban and Baeuerle 1991). Hierfür wurden bereits v.a. Phosphorylierungen und Acetylierungen als wichtigste PTMs beschrieben (Schmitz, Mattioli et al. 2004) (Chen, Fischle et al. 2001). An der DNA könnte selbst die Bindung einiger weniger, ggf. posttranslational modifizierter, p65-Proteine zur Aktivierung der Transkription der Zielgene führen. Ein weiterer Grund, warum die Translokation von p65 in den Zellkern im PLA nur relativ gering ist, könnte sein, dass die p65-Moleküle durch weitere, bisher unerforschte Mechanismen im Zytoplasma retiniert werden und eventuell auch der nukleäre Import von NFκB-Untereinheiten mit der Zeit ein Maximum erreicht (Verma, Stevenson et al. 1995).

Dabei bleibt jedoch weiterhin die Frage ungeklärt, warum die Verschiebung von p65 in den Zellkern in der indirekten Immunfluoreszenz doch relativ deutlich nachgewiesen werden konnte und dies nur im PLA nicht abgebildet werden kann. Hierfür muss wieder der, bereits oben erwähnte, möglicherweise ineffiziente Kernaufschluss des verwendeten PLA Protokolls als Ursache in Erwägung gezogen werden. Eventuell können die PLA *probes* unter dem verwendeten Zellaufschluss die Kernmembran nur schlecht passieren, so dass insgesamt weniger PLA Signale im Zellkern detektiert werden, als tatsächlich p65-Moleküle dort vorhanden sind. Vielleicht kann auch die RCA nur schlecht im Zellkern erfolgen, da die Oligonukleotide und die eingesetzte Polymerase nur begrenzt in den Zellkern gelangen. Dies wäre ein methodenspezifischer Nachteil des hier verwendeten *Proximity Ligation Assays* Protokolls.

Um die Hypothese zu überprüfen, dass der PLA in dieser Form ungeeignet für die Detektion nukleärer Proteine und Interaktionen ist, wurden PLAs mit ausschließlich im Nukleus lokalisierten Proteinen oder Proteininteraktionen durchgeführt. Tatsächlich ergaben Versuche mit den vorwiegend nukleär lokalisierten Proteinen Polymerase-II

und Sin3a (siehe Anhang, Abbildung Anhang 4 und 5) Hinweise darauf, dass diese Annahme richtig ist. Die Versuche lieferten unter Verwendung des beschriebenen PLA Protokolls äußerst widersprüchliche Ergebnisse und zeigten überraschenderweise bevorzugt zytosolische Signale, die jedoch nicht mit Ergebnissen aus Westernblots mit Analyse von zytoplasmatischen und nukleären Fraktionen übereinstimmen (siehe auch Doktorarbeit Dr. Johanna Meier-Sölch, AG Kracht).

Tatsächlich gelang es Dr. Christin Mayr-Buro in der Zwischenzeit ein neues PLA Protokoll auszuarbeiten, unter dessen Verwendung die Translokation des p65/p50-Heterodimers in den Zellkern nach IL-1 $\alpha$ -Stimulation mittels PLA gezeigt werden konnte und deshalb von einem besseren Kernaufschluss ausgegangen wird. Hierfür wurden die Zellen zusätzlich nach der Inkubation mit Glycerol dreimalig für eine Minute eingefroren und wieder aufgetaut. Um diese These weiter zu stützen, sollten die hier gezeigten Versuchsansätze unter Verwendung des neuen PLA Protokolls wiederholt und mit den vorherigen Ergebnissen verglichen werden.

## **5.5 Nutzung des PLAs zur Detektion posttranslationaler Modifikationen**

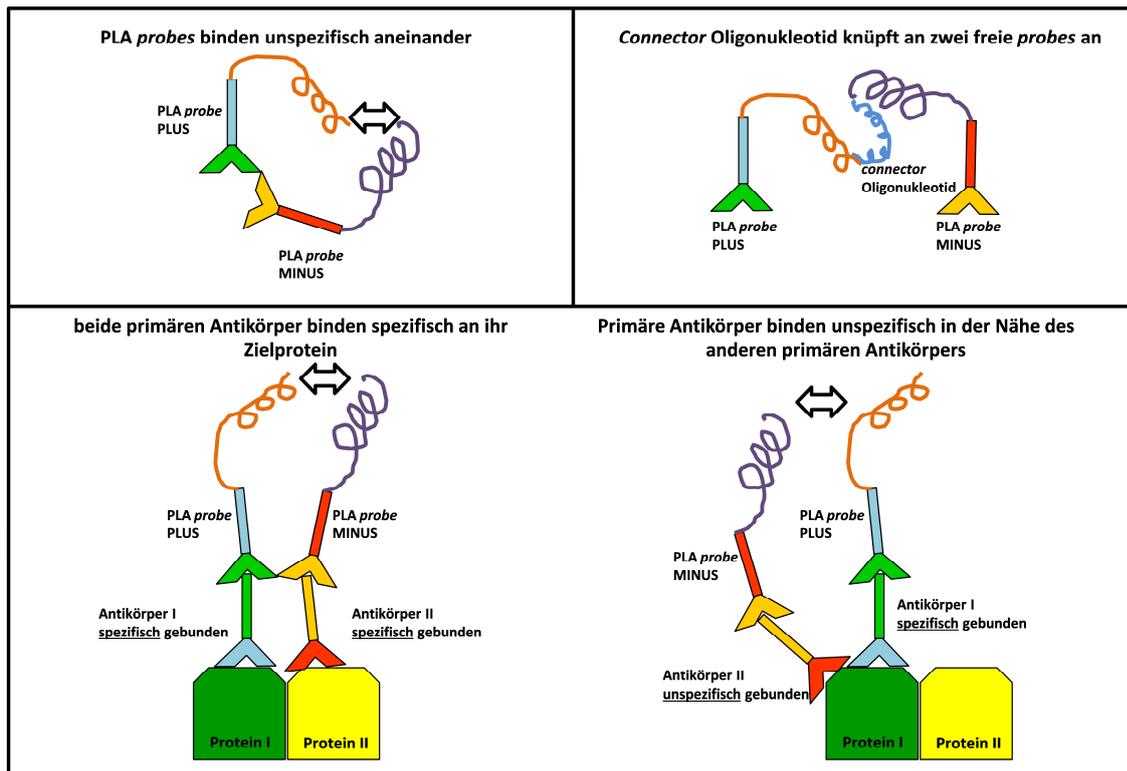
Wie Abbildung 10 zeigt, kann der PLA auch zur Detektion posttranslationaler Modifikationen eines Proteins genutzt werden. In dieser Arbeit wurde hierzu die Phosphorylierung des p65 an Serin 536 gewählt. Es wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben, dass die Phosphorylierung von p65 an dieser Aminosäure sowohl konstitutiv, als auch IL-1-induziert, von verschiedensten Proteinkinasen vermittelt wird (Buss, Dorrie et al. 2004). Weitere Experimente zeigten, dass Ser536-phosphoryliertes p65 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu finden ist (Leonard, Ajuh et al. 2003). Dabei blieb es bisher noch größtenteils ungeklärt, wozu genau die Phosphorylierung an dieser Stelle innerhalb der Transaktivierungsdomäne 1 des p65 dient. Sie scheint jedoch für die Interaktion mit Ko-Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie eine Rolle zu spielen (Schmitz, Mattioli et al. 2004). Im PLA zeigten sich, für das an Serin 536-phosphorylierte p65, 276 Signale pro Zelle (siehe Abbildung 27). Dies bedeutet, dass ca. 64 % des gesamten im PLA detektierten p65 (430 Signale) in der phosphorylierten Form (Ser536), vorlag. Von den 276 detektierten Signalen befanden sich ungefähr 16 % im Zellkern. Dies muss allerdings unter dem Aspekt des höchstwahrscheinlich ineffizienten Kernaufschlusses betrachtet werden. Die Westernblot-Ergebnisse deuteten ebenfalls darauf hin, dass nur ein gewisser Teil an p65 innerhalb der Zelle an Serin 536 phosphoryliert vorlag. Dieser Befund bestärkt die Spezifität der Ergebnisse des PLA, bezüglich der Menge der beiden Formen des p65-Proteins. Allerdings konnte die durch IL-1 $\alpha$ -induzierte Zunahme der

Phosphorylierung an Ser536 an p65 mittels PLA nicht gezeigt werden. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass der außerdem verwendete p65-Antikörper eventuell das Epitop der Phosphorylierung teilweise blockiert und deswegen der P-p65-Antikörper nicht binden kann.

Desweiteren muss auch auf die relativ hohe Anzahl an unspezifischen Signalen unter Verwendung des anti-Phospho-Ser536-p65-Antikörpers in der Kontrolle hingewiesen werden, die das Ergebnis verzerren könnte. Die Anzahl der in dieser Kontrolle detektierten Signale blieb zwar noch deutlich unterhalb der Anzahl der erhaltenen Signale unter Verwendung beider Antikörper, war aber im Vergleich zu Versuchen mit anderen Antikörpern wesentlich höher. Für die Entstehung unspezifischer Hintergrundsignale im PLA gibt es höchstwahrscheinlich zwei Gründe. Zum einen kommt es vor, dass die PLA *probes* unspezifisch aneinander binden. Zum anderen ist es möglich, dass das *connector* Oligonukleotid zufällig zwei freie *probes* bindet (Fredriksson, Dixon et al. 2007). In beiden Fällen erfolgt anschließend die RCA und es entsteht ein detektierbares unspezifisches PLA Signal.

Die Ergebnisse der Versuche in dieser Arbeit weisen darauf hin, dass hierbei auch die Verwendung der primären Antikörper eine Rolle spielt. Da es bei unterschiedlichen primären Antikörpern in den Kontrollen zu unterschiedlich hohen Hintergrundsignalen kommt, könnte die Vermutung aufkommen, dass manche primären Antikörper die unspezifische Bindung von PLA *probes* fördern.

Unspezifische PLA Signale, die unter Verwendung beider Antikörper entstehen, können in der Auswertung nicht von tatsächlich vorliegenden Protein-Komplexen unterschieden werden. Eine Ursache für deren Entstehung könnte beispielsweise eine Unterschreitung des, für die Detektion mittels PLA, notwendigen Abstands von 40 nm zwischen den beiden primären Antikörpern, sein. Das heißt, wenn ein primärer Antikörper sehr unspezifisch bindet, und diese unspezifische Bindung in großer Nähe zur Bindestelle des anderen primären Antikörpers liegt, entsteht ein unspezifisches PLA Signal. Abbildung 38 fasst die Faktoren, die zur Entstehung von Hintergrundsignalen in den Kontrollen und unspezifischen PLA Signalen beitragen können, zusammen.



**Abbildung 39:** Ursachen für die Entstehung von Hintergrundsignalen und unspezifischen PLA Signalen

Oben: Schematisch dargestellt sind mögliche Ursachen für die Entstehung unspezifischer Hintergrundsignale in den PLA Kontrollen. Dabei stellen die PLA probes die sekundären Antikörper dar, die mit einem Oligonukleotid (Spiralen) verknüpft sind. Die verwendeten primären Antikörper scheinen diese beiden Mechanismen unterschiedlich stark zu beeinflussen. Unten: Gezeigt ist eine mögliche Ursache für die Entstehung unspezifischer PLA Signale unter Verwendung beider primären Antikörper. Die Antikörper I und II stehen dabei für die primären Antikörper. Unten links wird gezeigt, wie ein spezifisches PLA Signal zustande kommen kann, rechts ist die Situation bei unspezifischer Bindung eines der beiden primären Antikörper dargestellt.

## 5.6 Detektion des NF $\kappa$ B-Transkriptionsfaktors p65/p50 im PLA

Am häufigsten ist unter den NF $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren das Heterodimer zwischen der p65- und der p50-Untereinheit zu finden (Schmitz, Bacher et al. 2001). Dieses kann aufgrund seiner Konformation gut an cis-Elemente in Promotor- und Enhancerregionen verschiedener Gene binden. Dabei wird die Bindung an die DNA vorwiegend über die p65-Untereinheit vermittelt (Urban and Baeuerle 1991). Bei der Untersuchung dieses Heterodimers mittels PLA konnten um die 35 Interaktionsspotspots detektiert werden, von welchen 29 im Zytoplasma lokalisiert waren (siehe Abbildung 29A). Verglichen mit der Gesamtanzahl an p65-Signalen pro Zelle (ca. 430) macht dieser, an p50 gebundene Anteil von p65 nur etwa 8 % aus. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass p65 über 300 Interaktionspartner besitzen soll (vgl. Kapitel 1.8), erscheint dieses Ergebnis geringer Interaktionsraten dennoch plausibel. Des Weiteren war auch in den Immunfluoreszenz Versuchen ein relativ schwaches Signal für p50 zu detektieren (siehe Abbildung 28). Dies spricht für eine geringe Menge an p50 in der Zelle oder eine schwache Bindung des Antikörpers an sein Zielprotein. Beide Zustände führen

letztendlich zu einer geringeren Wahrscheinlichkeit p65/p50-Interaktionen im PLA zu detektieren. Eine zu erwartende Translokation des Heterodimers nach IL-1 $\alpha$ -Stimulation konnte in den *Proximity Ligation Assays* in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Dies widerspricht wiederum Beobachtungen anderer Versuche, in denen mittels Westernblot nach fraktionierter Lyse eine eindeutige Verschiebung dieser beiden Proteine nach IL-1-Behandlung in den Zellkern detektiert werden konnte (Mukaida, Morita et al. 1994), (Poppe et al. 2017). Wie bereits oben beschrieben, liegt der Grund dafür, dass die Translokation hier nicht nachgewiesen werden konnte, höchstwahrscheinlich an der verminderten Permeabilisierung der Kernmembran bei Verwendung des Standardprotokolls des PLAs.

Insgesamt konnte aber insbesondere für zytosolische Proteinkomplexe, vor allem mit Hilfe der *knock out* und *knock down* Versuche, aber auch durch den Nachweis der IL-1 $\alpha$ -induzierten Auflösung von p65/I $\kappa$ B $\alpha$ -Komplexen, gezeigt werden, dass der PLA eine zuverlässige und sensitive Methode ist, um Protein-Protein-Interaktionen auf endogenem Level in Einzelzellen nachzuweisen. Deshalb sollten nun auch putative Interaktoren von p65 mittels PLA nachgewiesen werden, die zuvor nur im Überexpressionsmodell aufgezeigt werden konnten.

## **5.7 Nachweis der endogenen, IL-1 $\alpha$ -unabhängigen Interaktion von p65/DCP1a mittels PLA**

Wie in der indirekten Immunfluoreszenz gezeigt werden konnte, ist das DCP1a ein vorwiegend zytosolisches Protein, das schwächer exprimiert auch im Zellkern und stark konzentriert in *p-bodies* vorkommt (siehe Abbildung 30) (Rzeczkowski, Beuerlein et al. 2011). Die Arbeitsgruppe Kracht konnte eine Verbindung des DCP1a mit dem IL-1-Signalweg u.a. über die IL-1-abhängige Kinase JNK feststellen. So wurde gezeigt, dass JNK und DCP1a, nicht nur ko-lokalisieren und ko-immunopräzipitiert werden können, sondern dass DCP1a durch JNK am Serin 315 phosphoryliert wird. Im Überexpressionsmodell konnte zusätzlich eine Interaktion zwischen p65 und DCP1a nachgewiesen werden, die zu einer Reduktion der p65-vermittelten Transkriptionsaktivität führt (Rzeczkowski, Beuerlein et al. 2011).

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte nun auch auf endogenem Level mittels PLA eine mögliche Interaktion zwischen p65 und DCP1a überprüft werden. Hierbei konnten um die 70 PLA Signale pro Zelle, welche p65/DCP1a-Komplexe repräsentieren, detektiert werden (siehe Abbildung 31). Dies konnte auch mit unterschiedlichen Antikörperkombinationen gezeigt werden, wodurch die Spezifität dieses Ergebnisses erhöht wird (siehe Kapitel 4.4.1.2). Die zelluläre Verteilung und die Anzahl der

Interaktionsspot änderte sich dabei über verschiedene Stimulationszeitpunkte mit IL-1 $\alpha$  nicht (siehe Abbildung 32). Damit scheint diese Interaktion, unter Annahme einer erfolgreichen Stimulation der Zellen, unabhängig von IL-1 $\alpha$  zu sein.

Fraglich bleibt nun welche Funktion die Interaktion zwischen dem weitverbreiteten NF $\kappa$ B p65 und dem *decapping*-Faktor DCP1a erfüllt. Neben seiner Aufgabe als katalytische und regulatorische Untereinheit des *decappings* im Zytoplasma und damit der Regulation des 5'→3'-mRNA-Abbaus (vgl. auch Kapitel 1.9.2) (She, Decker et al. 2008), erfüllt DCP1a auch Funktionen im Zellkern. Dort interagiert es beispielsweise mit der nukleären Exoribonuclease Xrn2 (Brannan, Kim et al. 2012) oder auch mit TTF2 (*transcription termination factor 2*) (Leonard, Ajuh et al. 2003). Dabei stellt Xrn2 das nukleäre Homolog der zytoplasmatischen Exonuclease Xrn1 dar. Xrn2 führt, nach einer ko-transkriptionellen Deadenylierung neuer, von der RNA-Polymerase-II synthetisierter mRNAs, im Zellkern zu deren 5'→3'-Abbau (Brannan, Kim et al. 2012). Das Enzym TTF2 unterstützt die Ablösung der Polymerase-II und der mRNAs von der DNA (Liu, Xie et al. 1998). Dabei konnten Brannan et al. mit Hilfe von Chromatin-IP Analysen feststellen, dass DCP1a, TTF2 und Xrn2 zusammen an den 5'-Enden verschiedener Gene binden und dort gemeinsam mit weiteren *decapping*-Faktoren zuständig für die sogenannte „*premature termination*“ sind, also den verfrühten Abbruch der Transkription. Weiterhin postulieren sie, dass durch die Interaktion dieser Moleküle auch die Verteilung der Polymerase-II auf die, von ihr zu transkribierenden Gene, und damit deren Expression beeinflusst wird (Brannan, Kim et al. 2012). Ob und wie dieser Mechanismus reguliert wird, bleibt noch zu klären. Dabei könnten die *decapping*-Faktoren, vor allem das DCP1a, über Interaktion mit Faktoren wie p65, auch Einfluss auf die transkriptionelle Regulation der Expression von Proteinen ausüben und somit über eine putative Repressorfunktion eine Verbindung mit der ko-transkriptionellen (*decapping*, mRNA-Abbau) und posttranslationalen Regulation herstellen. Bai et al. konnten 2002 bereits zeigen, dass DCP1a (= SMIF), durch TGF $\beta$  induziert, als transkriptioneller Ko-Aktivator an Smad4 (SMAD *family member 4*) bindet und dessen Aktivität fördert (Bai et al. 2002). Weiterhin weisen Ergebnisse aus Experimenten der AG Kracht über komplexe posttranslationale Modifikationen, wie v.a. Ubiquitierungen, welche für die Genregulation entscheidend sind, darauf hin, dass dem DCP1a ähnliche Funktionen wie den NF $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren zukommen und hierdurch die Expression verschiedener Gene reguliert wird (Tenekeci et al. 2016). Um die Rolle dieser Interaktion weiter aufzuklären, könnten zunächst für die Überprüfung der genauen Strukturen der beiden Proteine, die an der Interaktion beteiligt sind, Teilmutanten in Zellen erzeugt werden und anschließend erneut überprüft werden, ob die Interaktion weiter besteht. Anschließend könnte dann getestet werden, welche

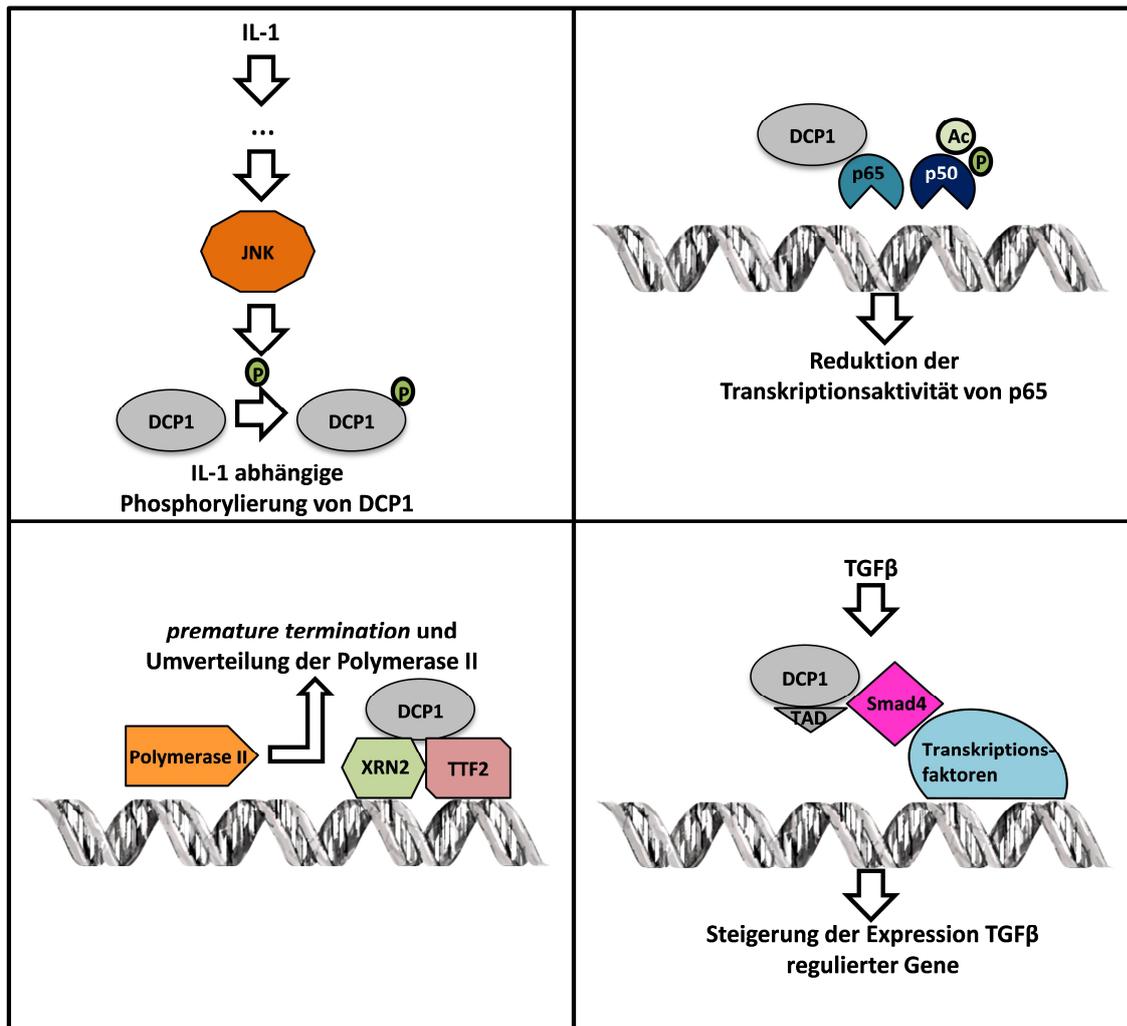
Auswirkung eine Reduktion dieser Interaktion auf z.B. die Genexpression verschiedener p65-Zielgene hat.

## **5.8 *knock down* von p65 bzw. DCP1a und die Auswirkungen auf die PLA Ergebnisse**

Durch Verringerung der p65-Expression in Form von *knock down* Experimenten waren deutlich weniger p65/DCP1a-Interaktionen zu detektieren (siehe Abbildung 32). Dies spricht für einen spezifischen Nachweis dieser Komplexe im PLA. Der shRNA-vermittelte *knock down* von DCP1a war im Westernblot vergleichbar effizient, wie der von p65 (vgl. Abbildung 33A). Bei längeren Expositionszeiten zeigte sich eine etwas höhere Restexpression von DCP1a in den Zellen, verglichen mit der von p65 nach dem entsprechenden p65 *knock down*. Konsistent hierzu konnten auch im *Proximity Ligation Assay* deutlich mehr Signale für p65/DCP1a-Komplexe nach DCP1a *knock down* detektiert werden, als nach dem p65 *knock down*. So sind nach *knock down* von DCP1a noch mehr als die Hälfte der p65/DCP1a-Interaktionen nachweisbar. Dies könnte daran liegen, dass durch die höhere Sensitivität des PLA und die daraus resultierende Signalverstärkung, die starken Effekte, des DCP1a *knock downs* im Westernblot geringer bzw. nicht mehr dargestellt werden, da dieser *knock down* nicht ganz vollständig ist. Außerdem kann die Permeabilisierung und der Zellaufschluss, die bei den beiden Methoden unterschiedlich sind, dazu führen, dass im PLA noch mehr p65- und DCP1a-Proteine in gebundener Form, also als Komplexe, vorliegen und dadurch detektiert werden. Eine weitere mögliche Erklärung besteht darin, dass die Zellen sehr viel p65-Protein enthalten (etwa 430 Signale). Wenn nach *knock down* von DCP1a, das restliche DCP1a-Protein in räumlicher Nähe, aber nicht zwangsläufig interagierend, mit p65 lokalisiert, dann ist die Wahrscheinlichkeit recht hoch, dass dies im PLA als p65/DCP1a-Komplexe detektiert wird.

Im Nachweis der DCP1a-Expression mit Hilfe von zwei unterschiedlichen DCP1a-Antikörpern innerhalb der Zelle wurden im PLA um die 290 Signale pro Zelle gefunden. Damit ist das DCP1a weniger abundant als p65 (ca. 430 Signale) (siehe Abbildung 34). Dies könnte an einer möglicherweise höheren *turn over* Rate des DCP1a liegen. Transfektionen mit den Plasmiden von pSUPER.puro oder shp65 hatten keine Auswirkung auf die Gesamtanzahl an DCP1a-PLA Signalen (vgl. ebenfalls Abbildung 34). Durch den DCP1a *knock down* reduzierte sich die Anzahl der DCP1a-Spots auf etwa 130, was im Vergleich zum erfolgreichen DCP1a *knock down* im Westernblot noch relativ viele PLA Signale sind. Möglicherweise ist, neben den

oben genannten Gründen für die doch relativ hohe Anzahl an verbleibenden PLA Signalen nach DCP1a *knock down*, auch die Selektion in den  $\mu$ -Slides VI<sup>0,4</sup> (Ibi Treat von ibidi) weniger erfolgreich als in anderen Kultivierungsgefäßen. Dies könnte z.B. durch die andere Oberflächenbeschaffenheit oder einer anderen Verteilung der benutzten Agentien im jeweiligen Gefäß bedingt sein und würde dazu führen, dass der *knock down* weniger erfolgreich ausfällt. Fraglich bleibt dann aber, warum dieses Phänomen nicht beim p65 *knock down* auftritt. Eventuell ist hier durch eine größere Spezifität der durch das shp65-kodierende Plasmid und der zugehörigen shRNA insgesamt ein effektiverer *knock down* gewährleistet. Zum anderen könnte eine geringere Transfektionsrate ursächlich für den geringeren DCP1a *knock down* sein. Zusammenfassend bleibt die exakte Aufgabe der p65/DCP1a-Interaktion noch weitestgehend ungeklärt. Unten stehende Abbildung fasst die Erkenntnisse zu DCP1a und seinen Interaktionspartnern zusammen. Insgesamt bestätigten die PLA Experimente in dieser Arbeit das Vorhandensein einer Interaktion von p65 mit DCP1a auf endogenem Level und zeigen zusätzlich, dass diese Protein-Protein-Interaktion unabhängig von der Stimulation mit IL-1 $\alpha$  ist.



**Abbildung 40:** Schematische Zusammenfassung der, über die Zusammenhänge von DCP1a mit seinen Interaktoren, bekannten Ergebnisse

Die Abbildung zeigt schematisch eine Zusammenfassung der bekannten Interaktionen und Regulationswege von DCP1a. Links oben: IL-1-abhängige Phosphorylierung von DCP1a durch JNK (Rzeczkowski, Beuerlein et al. 2011). Rechts oben: Interaktion von DCP1a mit p65 führt zur Reduktion der Transaktivierungsaktivität von p65 (Rzeczkowski, Beuerlein et al. 2011). Links unten: DCP1 im Komplex mit XRN2 und TTF2 führt zur *premature termination* und kann die Verteilung der Polymerase-II auf verschiedenen Gene regulieren (Brannan, Kim et al. 2012). Rechts unten: Durch Stimulation mit TGFβ kommt es zur Bindung von DCP1a an Smad4. Hierzu besitzt das DCP1 eine entsprechende Transaktivierungsdomäne und führt somit zu einer Steigerung der Expression der entsprechenden Zielgene (Bai et al. 2002).

## 5.9 Endogene Interaktion von LMO7 mit p65 in Abhängigkeit von IL-1α

Für LMO7 lieferte eine massenspektrometrische Analyse im Jahr 2005 Hinweise für eine mögliche Interaktion mit NFκB p65 (bisher unveröffentlichte Daten der AG Kracht, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Gießen). Überexpressionsversuche, mit anschließender Ko-IP von p65 und LMO7 zeigten, dass die beiden Proteine miteinander interagieren (ebenfalls unveröffentlichte Daten AG Kracht). Diese Interaktion sollte nun mit Hilfe des PLAs verifiziert werden.

So wurden in unbehandelten HeLa-Zellen ca. 45 p65/LMO7-Interaktionssignale pro Zelle gefunden (siehe Abbildung 36). Die Signale sind zu großen Teilen, unter Berücksichtigung des verwendeten Zellaufschlusses, im Zytoplasma lokalisiert. Lediglich 25 % befinden sich im Zellkern. Durch Behandlung der Zellen mit IL-1 $\alpha$  kommt es nach einer halben Stunde zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Anzahl der Komplexe, nach 60 Minuten ist die Anzahl der Interaktionen noch weiter vermindert. Durch die deutlich geringere Signalanzahl in den Kontrollen, ist die detektierte p65/LMO7-Interaktion als spezifisch anzusehen. Weiterhin sprechen die Ergebnisse der Versuche bei einem p65 *knock down* dafür, dass durch den PLA spezifisch eine Protein-Protein-Interaktion zwischen p65 und LMO7 abgebildet wird (siehe Kapitel 4.4.2.3). Zu klären bleibt allerdings die Funktion dieser Interaktion.

In Maus-Epithelzellen (MTD-1A-Zellen) ist die Lokalisation von LMO7 im Bereich der Zell-Zell-Kontakte identifiziert worden. Hier dient es höchstwahrscheinlich als Stabilisator in z.B. Adhärenzkontakten (Ooshio, Irie et al. 2004). In den IF-Versuchen zeigte sich ebenfalls ein verstärktes Vorkommen des LMO7 im Bereich der Zellmembranen und damit ggf. der Zellkontakte (siehe Abbildung 35). Nakamura et al. konnten zeigen, dass LMO7 in Folge von Behandlung von Zellen mit TGF $\beta$ 1 hochreguliert wird (Nakamura, Mukai et al. 2005) und dies, zusammen mit weiteren Faktoren wie z.B. EF1- $\alpha$  (*elongation factor 1- $\alpha$* ) (Taniguchi, Miyamoto et al. 1991) durch Umbauvorgänge am Zytoskelett, zu einer erhöhten Invasivität von Tumorzellen beiträgt (Mukai, Shinkai et al. 1989). In der indirekten Immunfluoreszenz, die in HeLa-Zellen durchgeführt wurden, wurde weiterhin deutlich, dass LMO7 nicht nur im Bereich der Zellmembranen sondern in der gesamten Zelle, sowie auch im Zellkern vorkommt (siehe ebenfalls Abbildung 35). Eine Funktion von LMO7 rein zur Stabilisation von Zell-Zell-Kontakten, scheint dadurch nicht plausibel. Weitere Autoren vermuteten bereits, dass LMO7 als *shuttleInDer* Transkriptionsfaktor Signale von fokalen Zellkontakten in den Zellkern übermittelt (Holaska, Rais-Bahrami et al. 2006), (Wozniak, Baker et al. 2013). Ferner ist bekannt, dass einige Bestandteile von fokalen Zellkontakten über die Aktivierung von MAP Kinasen die Genexpression über verschiedene Zwischenschritte beeinflussen können (Howe, Aplin et al. 2002) oder direkt in den Zellkern translozieren, um dort an der Genregulation teilzuhaben. Diese genregulatorischen Faktoren besitzen, wie LMO7 auch, häufig LIM-Domänen (Hervy, Hoffman et al. 2006). Diese LIM-Domänen vermitteln die Protein-Protein-Erkennung (Nakamura, Hori et al. 2011). Über die genaue Regulation dieser Vorgänge ist bisher relativ wenig bekannt. Allerdings identifizierten Wozniak et al. u.a. das p130Cas, welches ein wichtiges *scaffold*-Protein und Signalübermittler in fokalen Zellkontakten ist (Defilippi, Di Stefano et al. 2006), als negativen Regulator von

LMO7 (Wozniak, Baker et al. 2013). Weiterhin bindet LMO7 direkt an Emerin an der inneren Kernmembran, wodurch die Translokation in den Zellkern ermöglicht wird. Dabei wird es gleichzeitig durch diese Bindung in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor für die Induktion verschiedener Gene gehemmt (Holaska, Rais-Bahrami et al. 2006) (vgl. Kapitel 1.10.2).

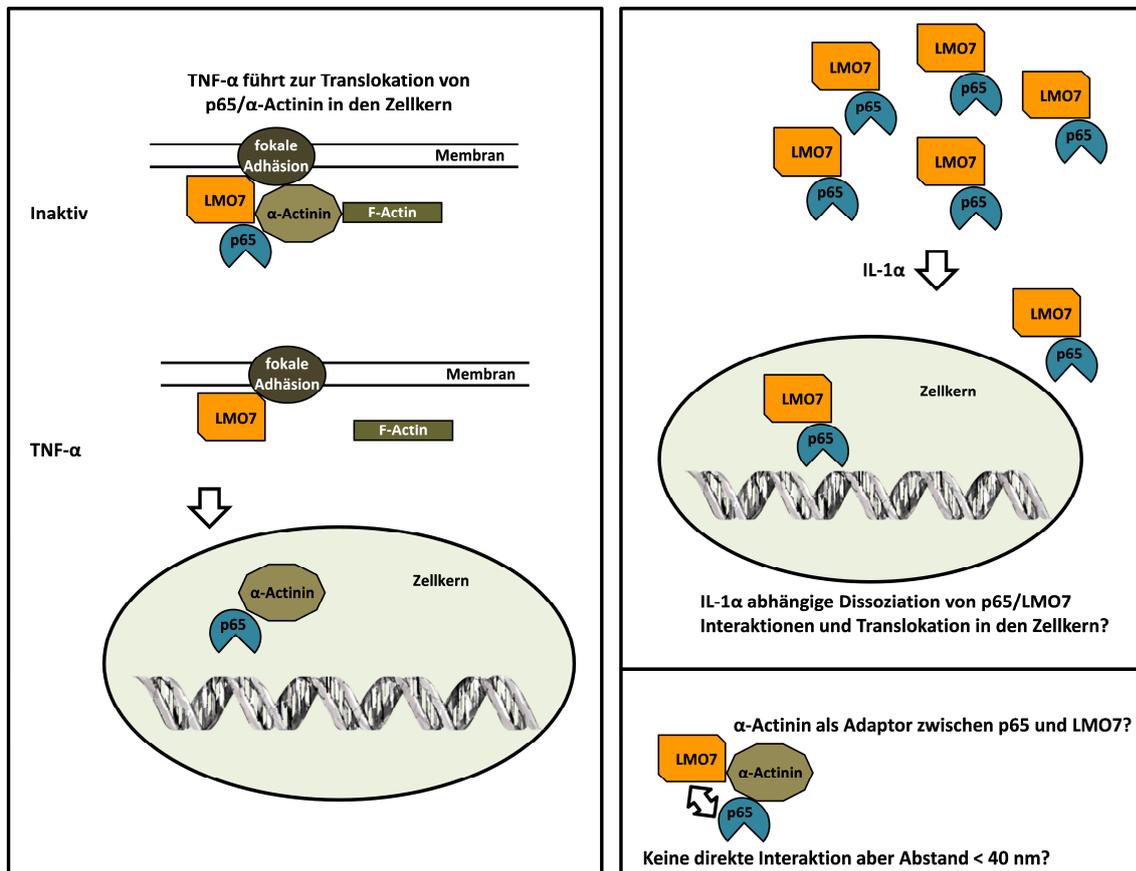
Sowohl das Vorhandensein verschiedener Proteininteraktionsdomänen, als auch die Aufgabe von LMO7 als Mediator und Regulator an verschiedenen Stellen von Signaltransduktionsprozessen, prädestiniert LMO7 zur Interaktion mit weiteren Proteinen, wie z.B. auch dem p65. Interessant ist, dass sowohl p65 (Babakov, Petukhova et al. 2008) als auch LMO7 (Ooshio, Irie et al. 2004) an  $\alpha$ -Actinin 4 binden können, welches ein Adaptorprotein zwischen dem Actin in fokalen Adhäsionen und dem Zytoskelett ist (siehe Kapitel 1.10.1). Dabei ist der p65/ $\alpha$ -Actinin 4-Komplex im inaktiven Zustand an F-Actin im Zytoplasma gebunden. Durch Behandlung der Zellen mit TNF $\alpha$ , wird dieser Komplex calciumabhängig freigegeben (Burrige and Feramisco 1981), so dass p65 und  $\alpha$ -Actinin als Komplex in den Zellkern translozieren können. Ist der Aufbau des Aktinzytoskeletts z.B. durch Cytochalasin D gestört, dann ist die nukleäre Translokation von p65 verstärkt. Dies weist darauf hin, dass der NF $\kappa$ B-Signalweg über die indirekte Bindung von p65 an das Zytoskelett über  $\alpha$ -Actinin, und damit über die Retention im Zytoplasma, reguliert wird (Babakov, Petukhova et al. 2008). Bei dieser Art der Regulation des NF $\kappa$ B-Signalweges könnte auch das LMO7 eine Rolle spielen. Aufgrund der Ergebnisse des PLAs scheint eine Retention von p65 durch LMO7 im Zytoplasma und an fokalen Adhäsionen möglich. Hierdurch wird p65 in seiner Wirkung als Transkriptionsfaktor blockiert bzw. eingeschränkt. Nach Stimulation mit IL-1 $\alpha$  reduziert sich dieser Effekt. Diese mögliche LMO7-abhängige Regulation der p65-Funktion könnte durch die direkte Bindung an p65 erfolgen, wofür die Ergebnisse des PLAs ebenfalls sprechen würden. Weiterhin wäre aber auch eine indirekte Beeinflussung des p65 durch LMO7, über  $\alpha$ -Actinin, denkbar. Dabei könnte  $\alpha$ -Actinin als Adapterprotein zwischen p65 und LMO7 fungieren. In diesem Fall wird an  $\alpha$ -Actinin-gebundenes p65 in der p65/LMO7-PLA detektiert, weil sich durch die Bindung von LMO7 an  $\alpha$ -Actinin eine räumliche Nähe (Abstand kleiner 40 nm) von p65 und LMO7 ergibt, ohne dass eine direkte Interaktion der beiden Proteine vorliegen muss. Die Reduktion der Anzahl der PLA Signale nach erfolgter Stimulation mit IL-1 $\alpha$  könnte in diesem Fall damit erklärt werden, dass der p65/ $\alpha$ -Actinin-Komplex aufgrund von Veränderungen des Zytoskeletts in den Zellkern transloziert (wie oben beschrieben), während das LMO7 z.B. an F-Actinfilamente im Zytoplasma gebunden bleibt und die beiden Proteine folglich nicht mehr in räumlicher Nähe zueinander liegen. Für eine stimulusabhängige

Interaktion sprechen auch die Ergebnisse der Versuche, in denen mit Hilfe eines TAK-1-Inhibitors (5Z-7-Oxozeaenol) die IL-1 $\alpha$ -Antwort gehemmt wurde. Bei Einsatz von 5Z-7-Oxozeaenol fand auf die Stimulation mit IL-1 $\alpha$  hin keine statistisch signifikante Reduktion der p65/LMO7-Komplexe im PLA mehr statt (siehe Abbildung 38).

Zumindest das Auftreten zytoplasmatischer p65/LMO7-Komplexe im PLA scheint auf eine Weise sinnvoll erklärbar zu sein. Weiterhin wurden allerdings auch Interaktionen im Zellkern nachgewiesen. Hier sei wieder auf die bereits oben erwähnte Problematik der zweidimensionalen Bilder und deren Auswertung, sowie den möglicherweise ineffizienten Kernaufschluss hingewiesen. Sollte es sich allerdings bei den nachgewiesenen nukleären Interaktionssignalen nicht nur um Artefakte handeln, bleibt die Frage welche Funktionen die p65/LMO7-Interaktion im Nukleus erfüllt und wie genau sie zu Stande kommt. Betrachtet man die Aufgaben der beiden Proteine als Transkriptionsfaktoren oder –Regulatoren, scheint es jedoch möglich zu sein, dass p65 und LMO7 sich gegenseitig in ihrer Transkriptionsaktivität im Zellkern modulieren. Um hierüber genauere Erkenntnisse zu gewinnen, könnten LMO7-defiziente Zellen herangezogen werden und in ihnen die Expression p65-abhängiger Gene untersucht werden. Unterschiede zu nicht-defizienten Zelllinien würden dann ggf. auf eine Beeinflussung der p65-induzierten Genexpression durch LMO7 hinweisen. Unveröffentlichte Versuche der AG Kracht zeigten in einem Microarray mit *knock down* von LMO7 durch geeignete siRNAs und zusätzlicher Stimulation mit IL-1 $\alpha$  von HeLa-Zellen, dass erstaunlich wenige Gene dereguliert wurden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Interaktion p65/LMO7 nicht unbedingt auf der transkriptionellen Ebene, sondern eventuell eher in anderen Zusammenhängen eine funktionelle Rolle spielt.

Ein Aspekt der im Zusammenhang mit der p65/LMO7-Interaktion noch erwähnenswert scheint, ist, dass im Rahmen der p65 *knock down* Versuche, in allen Wiederholungen eine statistisch signifikante Zunahme der p65/LMO7-Signale nach Transfektion mit dem pSUPER.puro-Leervektor, im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle, beobachtet werden konnte. Insgesamt unterschied sich auch die Morphologie der transfizierten Zellen von der der untransfizierten HeLa-Zellen. Da LMO7 eine wichtige Aufgabe in Zell-Zell-Kontakten übernimmt und auch eine Verbindung zum Zytoskelett herstellt (Ott, van den Akker et al. 2008), wäre es durchaus denkbar, dass LMO7 durch den Transfektionsstress (inklusive sich anschließende Selektion) hochreguliert wird, und sich hierdurch, und höchstwahrscheinlich auch noch weitere unbekannte Faktoren, die Morphologie der Zellen verändert. Würde das LMO7 tatsächlich vermehrt vorkommen, wäre auch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von p65/LMO7-Interaktionen erhöht und würde erklären, warum nach Transfektion des Leervektors auch vermehrt

p65/LMO7-Signale im PLA auftraten. Überprüfen ließe sich diese Annahme, indem die Expression von LMO7, z.B. mittels PLA oder Westernblot-Analysen, in Leervektor-transfizierten Zellen im Vergleich zu untransfizierten Zellen, ermittelt würde. Die PLA Versuche rund um die Interaktion p65/LMO7 zeigten insgesamt, dass eine Interaktion der beiden Proteine höchstwahrscheinlich ist und diese IL-1 $\alpha$ -abhängig reguliert wird.



**Abbildung 41:** Zusammenfassung der Erkenntnisse über die putative Interaktion LMO7/p65

Die Abbildung zeigt schematisch eine Zusammenfassung der Informationen über LMO7. Linke Seite: LMO7 kommt in fokalen Adhäsionen an der Zellmembran vor. Hier interagiert es mit  $\alpha$ -Actinin. Ob eine direkte Interaktion auch zu p65 vorliegt ist nicht geklärt. Im inaktiven Zustand liegt p65 gebunden an das, durch F-Actin im Zytoplasma retinierte  $\alpha$ -Actinin, vor. Durch Stimulation mit TNF $\alpha$  kommt es zu einer Translokation des p65/ $\alpha$ -Actinin-Komplexes in den Zellkern. (Babakov, Petukhova et al. 2008), (Ooshio, Irie et al. 2004), (Burrige and Feramisco 1981), (Babakov, Petukhova et al. 2008). Rechts oben: Ohne Stimulus liegen im PLA mehrere p65/LMO7-Interaktionen vor. Nach Stimulation mit IL-1 $\alpha$  nimmt deren Anzahl ab. Eventuell kommt es zu einer Translokation dieses Komplexes in den Zellkern. Rechts unten: Unklarheit herrscht auch noch darüber, ob tatsächlich eine direkte Interaktion zwischen p65 und LMO7 vorliegt, oder ob diese Interaktion nur durch eine Verbindung der beiden Proteine über den Adaptor  $\alpha$ -Actinin und damit einen enge räumliche Nähe zueinander zustande kommt.

## 5.10 Schwachstellen und Vorteile des *Proximity Ligation Assays*

Ein großer Vorteil von Ko-Immunopräzipitationen ist, dass Protein-Protein-Interaktionen relativ einfach in Zelllysaten, unter Anwesenheit weiterer Proteine, nachgewiesen werden können. Es ist jedoch schwierig zu beweisen, dass die Interaktion tatsächlich in der Zelle zustande kommt und nicht erst artifiziell durch die Zellyse herbeigeführt wird.

Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass sie nicht sehr sensitiv ist und größere Mengen an Material benötigt werden. Des Weiteren werden auch Proteine ko-immunopräzipitiert die nicht direkt miteinander, sondern eventuell nur durch ein Adapterprotein, interagieren (Phizicky and Fields 1995). Dieses Problem scheint auch durch den *Proximity Ligation Assay* nicht vollständig gelöst werden zu können (vgl. Kapitel 5.9). Auch hier kann es sein, dass Proteine nur in räumlicher Nähe zueinander liegen und nicht direkt miteinander interagieren, aber dennoch als Protein-Komplex im PLA dargestellt werden. Söderberg et al. schätzen, dass Proteine oder deren Interaktionen mittels PLA nachgewiesen werden können, wenn die Epitope, an denen jeweils die primären Antikörper binden, nur wenige Zehner-Nanometer (ca. 40 nm) voneinander entfernt liegen. Dieser Abstand ist abhängig von der Größe der Antikörper sowie der Oligonukleotide. Das heißt dementsprechend aber auch, dass diese Distanz z.B. durch die Verwendung kürzerer Oligonukleotide, konjugiert an die entsprechenden PLA *probes*, noch vermindert werden könnte (Soderberg, Leuchowius et al. 2008). Hierdurch würde die Wahrscheinlichkeit, dass nur Protein-Protein-Wechselwirkungen detektiert werden, die durch eine direkte Interaktion der Proteine zustande kommt, erhöht werden. Dennoch bietet der PLA gegenüber der Immunopräzipitation einige Vorteile. Durch die Amplifikation des Signals ist der PLA, z.B. im Vergleich zum Westernblot, eine hoch sensitive Methode. So können schon einzelne Proteine oder Protein-Komplexe in sehr kleinen Proben an Testmaterial nachgewiesen und quantifiziert werden (Fredriksson, Gullberg et al. 2002). Dabei kann der PLA sowohl in Lösung mit anschließender Quantifizierung über eine *real-time* PCR (*polymerase chain reaction*), oder wie in dieser Arbeit angewandt, *in situ*, mit Analyse der Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt werden (Gustafsdottir, Schallmeiner et al. 2005). Letzteres hat zusätzlich den Vorteil, dass auch Informationen über die Lokalisation der Protein-Komplexe in Erfahrung gebracht werden. An dieser Stelle muss jedoch noch einmal auf die Anfälligkeit des assays bezüglich der Abhängigkeit von der Bindung der primären Antikörper hingewiesen werden. Allein durch eine falsche Fixierung der Zellen kann die Zugänglichkeit untersuchter Epitope für die primären Antikörper extrem eingeschränkt werden, wenn die Bindestellen z.B. durch die Fixierung in ihrer Form verändert werden. Beide primären Antikörper müssen dabei exakt an ihrem Epitop binden. Ist dies nicht der Fall, kann dies zu einer starken Reduktion der detektierbaren Komplexe führen, so dass der PLA nur noch einen Bruchteil der tatsächlich vorhandenen Interaktionen abbildet (Soderberg, Leuchowius et al. 2008). Zum anderen können unspezifisch gebundene primäre Antikörper zu einer erhöhten Anzahl an falsch positiven PLA Signalen führen. Wichtig ist es deshalb also auch eine geeignete Blockierung zur Absättigung

unspezifischer Bindungsstellen zu verwenden. Der PLA ist also stark abhängig von Fixierung, Blockierung und der Wahl der primären Antikörper. Dennoch stellt er ein wichtiges innovatives *Tool* in der Detektion von Protein-Komplexen dar. Durch Erweiterung des *assays* um mehrere PLA *probes* und Variation der Sequenzen der Oligonukleotide könnten auch Protein-Komplexe aus mehr als zwei Interaktionspartnern nachgewiesen werden. Außerdem scheint auch eine Kopplung des PLAs an Immunfluoreszenzmarkierungen interessant zu sein, da hierdurch noch genauere Information über die tatsächliche Lage der Protein-Komplexe innerhalb der Zelle gewonnen werden könnten. Zur weiteren Erforschung des mRNA-Abbaus in, beispielsweise *p-bodies*, wäre auch die Detektion von Nukleoprotein-Komplexen, also von mRNAs die an Proteine gebunden sind oder sich in deren Nähe befinden, interessant. Hierfür müsste eine spezifische Sonde, die die mRNA detektiert mit einem Oligonukleotid, als PLA *probe*, verknüpft werden.

### **5.11 Der PLA in der klinischen Praxis**

Vor allem wegen seiner hohen Sensitivität ist der PLA auch für den Einsatz zur Untersuchung von Patientenproben, von denen oft nur kleinste Mengen vorliegen, im klinischen Alltag interessant. Zum einen deshalb, weil immer mehr Therapien spezifisch auf verschiedene Proteine oder Proteininteraktionen, wie auch Ligand-Rezeptor-Interaktionen, abzielen und mittels PLA eine Therapieüberwachung möglich wäre (Laporte et al. 2016). Zum anderen wird die Analyse von *low abundance* Proteinen in der Klinik immer wichtiger. Minimal erhöhte Transkriptionsfaktoren oder Tumorproteine könnten mit Hilfe des PLAs detektiert werden und demnach Tumorerkrankungen in einem eventuell noch gut behandelbarem Frühstadium erkannt werden. Auch einem Tumorprogress oder -rezidiv könnte so frühzeitig entgegen gewirkt werden (Blokzijl et al. 2016). Weiterhin könnten auch geringste Mengen an infektiösen Proteinen und Toxinen in Blutkonserven relativ kostengünstig nachgewiesen werden und so die Übertragung von Infektionskrankheiten über Blutprodukte weiter reduziert werden (Gustafsdottir, Schallmeiner et al. 2005). Der PLA kann außerdem genutzt werden, um weitere Proteininteraktionen zu erforschen, die an der Entstehung verschiedenster Krankheiten beteiligt sind. Nach genauer Kenntnis der Zusammenhänge können dann Strategien für neue Therapiekonzepte erarbeitet werden.

## 6 Summary

Protein:protein interactions are essential for regulating intracellular processes. A prominent example is the interaction of the p65 subunit of the transcription factor NF $\kappa$ B, with its inhibitory partner protein I $\kappa$ B $\alpha$ . This stable interaction leads to cytoplasmic retention of p65 in untreated cells. Stimulation of cells with the proinflammatory cytokine IL-1 $\alpha$  triggers the proteasomal destruction of I $\kappa$ B $\alpha$  thus liberating p65 for nuclear entry and regulation of gene expression. Although the sequential interactions of proteins within the NF $\kappa$ B signaling cascade are well established, assays allowing their determination in single cells are rarely available. In this dissertation, the single cell based proximity ligation assay (PLA) was evaluated as a new method for quantifying and visualizing known and new interactors of p65 at the endogenous protein level. To test the ability of the PLA to recapitulate physiological relevant formation of protein:protein complexes, the IL-1 $\alpha$ -dependent regulation of the p65/I $\kappa$ B $\alpha$  complex was investigated and compared to classical co-immunoprecipitation experiments. These results showed that it was possible to determine a transient decrease in p65/I $\kappa$ B $\alpha$  complexes upon IL-1 $\alpha$  stimulation. The specificity of the PLA was confirmed in cells lacking p65 or by pharmacological inhibition of TAK1, an upstream activator of the p65/I $\kappa$ B $\alpha$  complex. Besides determining protein:protein complexes, the PLA was also used to quantify the protein expression and phosphorylation levels of single proteins. This feature was used to monitor the distribution and subcellular localisation of p65, phospho-p65 and the mRNA decay factor DCP1a in individual cells. Furthermore we could show by PLA a novel interaction of endogenous p65 with endogenous DCP1a, an essential component of the decapping complex. The PLA signals for this interaction were specific, as they were absent in cells lacking p65 or DCP1a. The p65/DCP1a complex was not regulated by IL-1 $\alpha$ . Moreover we found a previously unknown interaction of the LMO7 protein with p65, whose specificity was also validated by including cells with knock down of p65. Unlike DCP1a the p65/LMO7 interaction decreased upon IL-1 $\alpha$  treatment. Collectively, the results obtained in this thesis reveal the PLA as a reliable method for the detection of protein:protein interactions occurring within the NF $\kappa$ B signaling pathway of cytokine-activated cells. An additional advantage of PLA is the possibility to examine protein:protein interactions within single cells and to investigate their subcellular localization at high resolution.

## 7 Zusammenfassung

Protein-Protein-Interaktionen sind essentiell für die Regulation intrazellulärer Prozesse. Ein prominentes Beispiel hierfür ist die Interaktion der p65 Untereinheit der NFκB Transkriptionsfaktoren mit seinem inhibitorischen Partnerprotein IκBα. Diese stabile Interaktion führt dazu, dass p65 in unstimulierten Zellen im Zytoplasma retiniert wird. Die Stimulation der Zelle mit dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-1α führt zum proteasomalen Abbau von IκBα, wodurch p65 für den Eintritt in den Zellkern und zur Genexpression frei gegeben wird. Obwohl die sequentiellen Interaktionen der Proteine innerhalb der NFκB-Signalkaskade relativ gut etabliert sind, gibt es nur wenige Methoden, um deren Vorkommen auf Einzelzell-Ebene zu untersuchen. In dieser Dissertation wurde der auf Einzelzell-Analyse basierende *Proximity Ligation Assay* (PLA) als eine neue Methode evaluiert, um bereits bekannte und neue Interaktoren von p65 auf dem endogenen Proteinlevel zu quantifizieren und visualisieren. Um die Fähigkeit des PLA zu testen, physiologisch relevante Protein-Protein-Komplexen abzubilden, wurde die IL-1α-abhängige Regulation des p65/IκBα-Komplexes untersucht und mit den Ergebnissen aus klassischen Ko-Immunopräzipitations-Experimenten verglichen. Diese Ergebnisse zeigten, dass es möglich ist mit dem PLA die transiente Reduktion der p65/IκBα-Komplexe während einer IL-1α-Stimulation abzubilden. Die Spezifität des PLA wurde zum einen durch Experimente bestätigt, bei welchen Zellen eingesetzt wurden, in denen p65 nicht exprimiert wurde und zum anderen durch pharmakologische Hemmung von TAK1, einem *upstream*-Aktivator des p65/IκBα-Komplexes. Außerdem wurde der PLA nicht nur zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen genutzt, sondern auch um die Expression und Phosphorylierung einzelner Proteine zu quantifizieren. Diese Eigenschaft des PLA wurde verwendet, um die Verteilung und die subzelluläre Lokalisation von p65, Phospho-p65 und des mRNA-*decay* Faktors DCP1a in einzelnen Zellen abzubilden. Außerdem konnte mit Hilfe des PLA eine neue Interaktion von endogenem p65 mit endogenem DCP1a, einem entscheidendem Faktor des *decapping*-Komplexes, nachgewiesen werden. Die PLA Signale für diese Interaktion waren spezifisch, da sie nicht nachzuweisen waren, wenn in den Zellen kein p65 bzw. DCP1a exprimiert wurde. Der p65/DCP1a-Komplex wurde hierbei nicht durch IL-1α reguliert. Des Weiteren gelang der Nachweis einer bisher unbekanntem Interaktion des LMO7-Proteins mit p65, deren Spezifität ebenfalls mittels Zellen, welche aufgrund eines *knock downs*, kein p65 exprimierten, nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu DCP1a, ging die Anzahl der p65/LMO7-Interaktionen unter Stimulation mit IL-1α zurück.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse, welche in dieser Dissertation erarbeitet wurden, dass der PLA eine zuverlässige Methode für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen des NFκB-Signalwegs unter Stimulation mit Zytokinen, darstellt. Ein weiterer Vorteil des PLA ist die Möglichkeit Protein-Protein-Interaktionen auf der Einzelzell-Ebene und deren subzelluläre Lokalisation mit hoher Auflösung untersuchen zu können.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	alpha/anti-
A	Ampere
A	Adenin
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Ac	Acetylierung
ADIP	<i>afadin DIL interacting protein</i>
AG	Arbeitsgruppe
Ago	<i>argonaute</i>
AJ	<i>adherens junctions</i>
AMD	<i>ARE-mediated mRNA decay</i>
Anh.	Anhang
AP	Aktivator Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	<i>adenine-uridine-rich elements</i>
AS	Aminosäure
ATF	<i>activating transcription factor</i>
$\beta$	beta
BAF	<i>Barrier-to-Autointegration</i> Faktor
bzw.	beziehungsweise
bp	Basenpaare
BRF	<i>butyrate response factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinder-Serumalbumin)
BSS	<i>balanced salt solution</i>
bzw.	beziehungsweise
$\gamma$	gamma
c	centi-
ca.	circa
CAPS	Cryopyrinassoziiertes periodisches Syndrom
CAT	Cytosin-Adenin-Thymin
CBP	<i>cAMP-responsive element-binding protein-binding protein</i> = CREBBP
CCR4-Caf	<i>CCR4 associated factor</i>
CDC	<i>cell division cycle</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
CH	<i>Calponin homology</i>
CINCA	<i>chronic infantile neurologic cutaneous articular</i>
COMMD	<i>copper metabolism gene MURR1 domain-containing</i> Protein
COX	Cyclooxygenase
CS	<i>Cell Signaling</i>
D	Dalton
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>

DCP	<i>decapping mRNA protein</i>
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
dd H <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DDX	<i>DEAD-(asp-glu-ala-asp)box helicase</i>
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
ε	Epsilon
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDC	<i>enhancer of decapping</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	<i>elongation factor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EPM	<i>Epilepsy, Progressive Myoclonus Type</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
et al.	und andere
etc	et cetera
FACS	<i>familiar cold associated syndrome</i>
f.c.	<i>final concentration</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GAL	<i>galactose-responsive transcription factor</i>
GCL	<i>germ cell-less</i>
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosin Triphosphat
GW	<i>glycine(G)-tryptophan(W)-repeats</i>
h	Stunden
H	Histon
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HDAC	Histon Deacetylase
Hedls	<i>human enhancer of decapping large subunit</i>
HeLa	Henrietta Lacks Zellen
HEPES	N-2Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfon-säure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IF	indirekte Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
IgG	Immunglobulin G
IκB	inhibitorische κB
IKK	IκB Kinase Komplex
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-activated protein kinase</i>
IP	Immunpräzipitation

i.V.	im Vergleich
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
κ	kappa
k	Kilo-
K	Lysin
kb	Kilobasen
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
KSRP	<i>KH-type splicing regulatory protein</i>
l	Liter
LEM	LAP2; emerin; MAN1
LIM	Lin11; Isl-1; Mec-3
LMO	<i>Lim-domain only</i>
Lsm	<i>Sm and Sm-like proteins</i>
LZ	Leuzin-zipper
μ	mikro-
m	milli-/meter
M	molar
MAD	<i>mothers against decapentaplegic homolog</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
miRNA	microRNA
min	Minuten
MEF	<i>myocyte-enhancer factor</i>
MEFs	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MEKK	<i>MAPK kinase kinase</i>
MK	<i>MAPK-activated protein kinase</i>
MKK	MAPK Kinase
MKKK	MAPK Kinase Kinase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MWS	Muckle-Wells Syndrom
Myd	<i>myeloid differentiation primary response gene</i>
MyoD	<i>myogenic differentiation</i>
n	nano-
NEMO	<i>NFκB essential modifier</i>
NF	<i>nuclear factor</i>
NHLRC	<i>NHL repeat containing U3 ubiquitin protein ligase</i>
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
NR	<i>N-terminal α-helical regulatory</i>
NRE	<i>negative response element</i>
NRF	<i>NFκB-repressing factor</i>
OCT	<i>Octamer</i>
P	phospho-/Phosphorylierung

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
Pan	<i>poly (A) specific ribonuclease subunit</i>
Pax	<i>paired box</i>
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDZ	<i>post synaptic density protein; Drosophila disc large tumor suppressor; Zonula occludens-1 protein</i>
pH	potentia hydrogenii
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PTC	<i>premature termination codon</i>
PTM	posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Ra	<i>receptor antagonist</i>
RAcP	<i>receptor accessory protein</i>
RCA	<i>rolling circle amplification</i>
RHD	<i>rel homology domain</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	<i>RNA interference</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
SC	<i>Santa Cruz</i>
sd	<i>second</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek; s	Sekunde
Ser	Serin
sh	<i>short hairpin</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAB	<i>TGF-<math>\beta</math>-activated protein kinase-binding protein</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAK	<i>TGF-<math>\beta</math>-activated protein kinase</i>
TAP	<i>tandem-affinity-purification</i>
TATA	Thymin-Adenin-Thymin-Adenin
TBK	<i>TANK-binding kinase</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS mit Tween 20
TE	Trypsin/EDTA
TEMED	N,N',N'-Tetramethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TIR	Toll- und IL-1R- <i>like</i>

TNF	Tumornekrosefaktor
TNRC	<i>trinucleotide repeat containing</i>
TRAF	<i>tumor necrosis factor-associated factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
tRNA	Transfer-RNA
TTF	<i>transcription termination factor</i>
TTP	Tristetraprolin
U	Units
u.a.	unter anderem
UBC	<i>ubiquitin-conjugating enzyme</i>
UEV	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant</i>
Upf	<i>up-frameshift</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
x	mal
x g	Erdbeschleunigung
XRN	<i>chromatin binding exonuclease XRN</i>
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
-/-	defizient

## 9 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung der Prinzipien der Entzündung und des IL-1- <i>signalings</i> .....	3
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung wichtiger Komponenten und Regulationsschritte des IL-1-Signalweges .....	6
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung des Aufbaus von NFκB- und IκB-Proteinen .....	10
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung des <i>IL-8</i> -Promotors und seiner Regulation im basalen und stimulierten Zustand .....	14
<b>Abbildung 5:</b> Ausschnitt aus dem p65-Interaktom .....	15
<b>Abbildung 6:</b> Schematische Darstellung des mRNA-Abbaus, einschließlich der Deadenylierung und des Abbaus über das Exosom und den <i>decapping</i> -Komplex .....	18
<b>Abbildung 7:</b> Schematische Darstellung des Vorkommens von LMO7 in Zell-Zell-Kontakten .....	23
<b>Abbildung 8:</b> Schematische Darstellung der Funktionsweise von LMO7 als Signaltransduktor und Transkriptionsfaktor .....	24
<b>Abbildung 9:</b> Schematische Darstellung der Durchführung und des Prinzips des <i>Proximity Ligation Assays</i> .....	27
<b>Abbildung 10:</b> Anwendungsmöglichkeiten des <i>Proximity Ligation Assays</i> .....	28
<b>Abbildung 11:</b> Schematische Darstellung der Interaktionen von p65, DCP1a und LMO7 .....	29
<b>Abbildung 12:</b> Durchführung der standardisierten, computergestützten Analyse der PLA Experimente mittels Duolink®Image Tool .....	51
<b>Abbildung 13:</b> Transiente Regulation des IκBα-Abbaus durch IL-1α in HeLa-Zellen .....	58
<b>Abbildung 14:</b> Quantifizierung des Immunoblots der IL-1α-Zeitreihe .....	59
<b>Abbildung 15:</b> Ko-Immünpräzipitation von p65 und IκBα in HeLa-Zellen .....	61
<b>Abbildung 16:</b> Immunoblot der Inputkontrolle zu der in Abbildung 15 gezeigten Ko-IP .....	62
<b>Abbildung 17:</b> Indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von IκBα mit zwei verschiedenen IκBα-Antikörpern .....	64
<b>Abbildung 18:</b> Indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von p65 mit verschiedenen p65-Antikörpern .....	65
<b>Abbildung 19:</b> <i>Proximity Ligation Assay</i> mit unterschiedlichen p65/IκBα-Antikörperkombinationen .....	67
<b>Abbildung 20:</b> Nachweis der IL-1α- und zeitabhängigen Regulation der p65/IκBα-Interaktion mittels <i>Proximity Ligation Assay</i> .....	69
<b>Abbildung 21:</b> Quantitative Analyse der IL-1α- und zeitabhängigen Regulation der p65/IκBα-Interaktion mittels <i>Proximity Ligation Assay</i> .....	70
<b>Abbildung 22:</b> RNAi-vermittelter p65 <i>knock down</i> mit anschließendem <i>Proximity Ligation Assay</i> mit p65- und IκBα-Antikörpern zum Nachweis der Spezifität des PLA .....	72

<b>Abbildung 23:</b> <i>Proximity Ligation Assay</i> an Wildtyp und p65-defizienten MEFs mit p65- und IκBα-Antikörpern zum Nachweis der Spezifität des PLA .....	75
<b>Abbildung 24:</b> <i>Proximity Ligation Assay</i> nach IL-1α und 5Z-7-Oxozeaenol-Behandlung mit p65- und IκBα-Antikörpern .....	77
<b>Abbildung 25:</b> <i>Proximity Ligation Assay</i> mit zwei p65-Antikörpern zur Detektion der p65-Expression auf Einzelzellebene .....	79
<b>Abbildung 26:</b> <i>Proximity Ligation Assay</i> mit zwei p65-Antikörpern zur Detektion der p65-Expression auf Einzelzellebene bei <i>knock down</i> von p65 .....	80
<b>Abbildung 27:</b> <i>Proximity Ligation Assay</i> mit p65- und P-p65-Antikörpern zur Detektion von phosphoryliertem p65 .....	82
<b>Abbildung 28:</b> Indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von p50 .....	83
<b>Abbildung 29:</b> <i>Proximity Ligation Assay</i> mit p65- und p50-Antikörpern.....	84
<b>Abbildung 30:</b> Indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von DCP1a .....	86
<b>Abbildung 31:</b> <i>Proximity Ligation Assay</i> mit unterschiedlichen p65/DCP1a-Antikörperkombinationen .....	88
<b>Abbildung 32:</b> <i>Proximity Ligation Assay</i> mit erweiterter IL-1α-Kinetik mit p65- und DCP1a-Antikörpern .....	89
<b>Abbildung 33:</b> RNAi-vermittelter p65- bzw. DCP1a <i>knock down</i> führt zu einer Reduktion der Interaktionen, die mit p65- und DCP1a-Antikörpern im PLA erfasst werden.....	92
<b>Abbildung 34:</b> RNAi-vermittelter p65- bzw. DCP1a <i>knock down</i> mit anschließendem PLA mit zwei DCP1a-Antikörpern zum Nachweis der DCP1a-Proteinexpression .....	93
<b>Abbildung 35:</b> Indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von LMO7 .....	95
<b>Abbildung 36:</b> IL-1α-abhängige Regulation der Interaktion von p65 und LMO7 im PLA.....	96
<b>Abbildung 37:</b> RNAi-vermittelter p65 <i>knock down</i> mit anschließendem PLA mit p65- und LMO7-Antikörpern .....	98
<b>Abbildung 38:</b> <i>Proximity Ligation Assay</i> mit IL-1α- und 5Z-7-Oxozeaenol-Behandlung mit p65- und LMO7-Antikörpern.....	100
<b>Abbildung 39:</b> Ursachen für die Entstehung von Hintergrundsignalen und unspezifischen PLA Signalen .....	110
<b>Abbildung 40:</b> Schematische Zusammenfassung der, über die Zusammenhänge von DCP1a mit seinen Interaktoren, bekannten Ergebnisse .....	115
<b>Abbildung 41:</b> Zusammenfassung der Erkenntnisse über die putative Interaktion LMO7/p65 .....	119

<b>Abbildung Anhang 1:</b> Regulation von Komponenten des NFκB-Signalweges .....	149
<b>Abbildung Anhang 2:</b> <i>Proximity Ligation Assay</i> mit erweiterter IL-1α-Kinetik mit p65- und IκBα-Antikörpern; Übersichtsaufnahmen.....	150
<b>Abbildung Anhang 3:</b> <i>Proximity Ligation Assay</i> mit zwei p65-Antikörpern zur Detektion der p65-Expression; Detailansicht .....	151
<b>Abbildung Anhang 4:</b> <i>Proximity Ligation Assay</i> mit Polymerase-II- und Sin3a-Antikörpern.....	152
<b>Abbildung Anhang 5:</b> Indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von Sin3a ...	153

## 10 Literaturverzeichnis

Aksentijevich, I., S. L. Masters, P. J. Ferguson, P. Dancey, J. Frenkel, A. van Royen-Kerkhoff, R. Laxer, U. Tedgard, E. W. Cowen, T. H. Pham, M. Booty, J. D. Estes, N. G. Sandler, N. Plass, D. L. Stone, M. L. Turner, S. Hill, J. A. Butman, R. Schneider, P. Babyn, H. I. El-Shanti, E. Pope, K. Barron, X. Bing, A. Laurence, C. C. Lee, D. Chapelle, G. I. Clarke, K. Ohson, M. Nicholson, M. Gadina, B. Yang, B. D. Korman, P. K. Gregersen, P. M. van Hagen, A. E. Hak, M. Huizing, P. Rahman, D. C. Douek, E. F. Remmers, D. L. Kastner and R. Goldbach-Mansky (2009). "An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist." N Engl J Med **360**(23): 2426-2437.

Ashburner, B. P., S. D. Westerheide and A. S. Baldwin, Jr. (2001). "The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression." Mol Cell Biol **21**(20): 7065-7077.

Babakov, V. N., O. A. Petukhova, L. V. Turoverova, I. V. Kropacheva, D. G. Tentler, A. V. Bolshakova, E. P. Podolskaya, K. E. Magnusson and G. P. Pinaev (2008). "RelA/NF-kappaB transcription factor associates with alpha-actinin-4." Exp Cell Res **314**(5): 1030-1038.

Bach, I. (2000). "The LIM domain: regulation by association." Mech Dev **91**(1-2): 5-17.

Bachvarova, R., V. De Leon, A. Johnson, G. Kaplan and B. V. Paynton (1985). "Changes in total RNA, polyadenylated RNA, and actin mRNA during meiotic maturation of mouse oocytes." Dev Biol **108**(2): 325-331.

Baeuerle, P. A. and D. Baltimore (1996). "NF-kappa B: ten years after." Cell **87**(1): 13-20.

Baeuerle, P. A., M. Lenardo, J. W. Pierce and D. Baltimore (1988). "Phorbol-ester-induced activation of the NF-kappa B transcription factor involves dissociation of an apparently cytoplasmic NF-kappa B/inhibitor complex." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **53 Pt 2**: 789-798.

Bai, R.-Y., C. Koester, T. Ouyang, S. Hahn, M. Hammerschmidt, C. Peschel, J. Duyster (2002). "SMIF, a Smad4-interacting protein that functions as a co-activator in TGFβ signalling". Nat Cell Biol. **4**(3): 181-90.

Banuelos, S., M. Saraste and K. Djinovic Carugo (1998). "Structural comparisons of calponin homology domains: implications for actin binding." Structure **6**(11): 1419-1431.

Bashkirov, V. I., H. Scherthan, J. A. Solinger, J. M. Buerstedde and W. D. Heyer (1997). "A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates." J Cell Biol **136**(4): 761-773.

Baud, V., Z. G. Liu, B. Bennett, N. Suzuki, Y. Xia and M. Karin (1999). "Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain." Genes Dev **13**(10): 1297-1308.

Ben-Neriah, Y. and M. L. Schmitz (2004). "Of mice and men." EMBO Rep **5**(7): 668-673.

Besmer, P., R. C. Miller Jr, M. H. Caruthers, A. Kumar, K. Minamotot, J. H. Van de Sande, N. Sidarova, H. G. Kohorana (1972). "Studies on polynucleotides. CXVII. Hybridization of polydeoxynucleotides with tyrosine transfer RNA sequences to the r-strand of phi80psu + 3 DNA." J Mol Biol **72**(3): 503-22.

BioGRID 3.4 Database, <https://thebiogrid.org>, zuletzt aufgerufen und Werte aktualisiert am 09.12.2018.

Blokzijl, A., L. E. Chen, S.M. Gustafsdottir, J. Vuu, G. Ullenhag, O. Kämpe, U. Landegren, M. Kamali-Moghaddam, H. Hedstrand (2016): "Elevated Levels of SOX10 in Serum from Vitiligo and Melanoma Patients, Analyzed by Proximity Ligation Assay." PLoS One **11**(4): e0154214.

Bobrich, M. A., S. A. Schwabe, A. Brobeil, M. Viard, M. Kamm, F. C. Mooren, K. Krüger, C. Tag, M. Wimmer (2013). „PTPIP51: a new interaction partner of the insulin receptor and PKA in adipose tissue.“ J Obes. **2013**: 476240.

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

Brannan, K., H. Kim, B. Erickson, K. Glover-Cutter, S. Kim, N. Fong, L. Kiemele, K. Hansen, R. Davis, J. Lykke-Andersen and D. L. Bentley (2012). "mRNA decapping factors and the exonuclease Xrn2 function in widespread premature termination of RNA polymerase II transcription." Mol Cell **46**(3): 311-324.

Brenques, M., D. Teixeira, R. Parker (2005). "Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies." Science **310**(5747): 486-9.

Briata, P., S. V. Forcales, M. Ponassi, G. Corte, C. Y. Chen, M. Karin, P. L. Puri and R. Gherzi (2005). "p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts." Mol Cell **20**(6): 891-903.

Brikos, C., R. Wait, S. Begum, L. A. O'Neill and J. Saklatvala (2007). "Mass spectrometric analysis of the endogenous type I interleukin-1 (IL-1) receptor signaling complex formed after IL-1 binding identifies IL-1RAcP, MyD88, and IRAK-4 as the stable components." Mol Cell Proteomics **6**(9): 1551-1559.

Brower, P. T., E. Gizang, S. M. Boreen and R. M. Schultz (1981). "Biochemical studies of mammalian oogenesis: synthesis and stability of various classes of RNA during growth of the mouse oocyte in vitro." Dev Biol **86**(2): 373-383.

Brown, K., S. Park, T. Kanno, G. Franzoso and U. Siebenlist (1993). "Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(6): 2532-2536.

Brummelkamp, T. R., R. Bernards and R. Agami (2002). "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells." Science **296**(5567): 550-553.

Burridge, K. and J. R. Feramisco (1981). "Non-muscle alpha actinins are calcium-sensitive actin-binding proteins." Nature **294**(5841): 565-567.

- Buss, H., A. Dorrie, M. L. Schmitz, E. Hoffmann, K. Resch and M. Kracht (2004). "Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- $\kappa$ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including  $\kappa$ B kinase (IKK)- $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\epsilon$ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription." *J Biol Chem* **279**(53): 55633-55643.
- Buss, H., K. Handschick, N. Jurrmann, P. Pekkonen, K. Beuerlein, H. Muller, R. Wait, J. Saklatvala, P. M. Ojala, M. L. Schmitz, M. Naumann and M. Kracht (2012). "Cyclin-dependent kinase 6 phosphorylates NF-kappaB P65 at serine 536 and contributes to the regulation of inflammatory gene expression." *PLoS One* **7**(12): e51847.
- Cao, Z., J. Xiong, M. Takeuchi, T. Kurama and D. V. Goeddel (1996). "TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1." *Nature* **383**(6599): 443-446.
- Chang, C. T., N. Bercovich, B. Loh, S. Jonas and E. Izaurralde (2014). "The activation of the decapping enzyme DCP2 by DCP1 occurs on the EDC4 scaffold and involves a conserved loop in DCP1." *Nucleic Acids Res* **42**(8): 5217-5233.
- Chen, C.-J., Y. Shi, A. Hearn, K. Fitzgerald, D. Golenbock, G. Reed, S. Akira, K. L. Rock (2006). "MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals." *J Clin Invest.* **116**(8): 2262-2271
- Chen, Lf., Fischle W., Verdin E., Greene WC. (2001): "Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation." *Science* **293**(5535): 1653-7.
- Chen, G. Y. and G. Nunez (2010). "Sterile inflammation: sensing and reacting to damage." *Nat Rev Immunol* **10**(12): 826-837.
- Chen, L. F., S. A. Williams, Y. Mu, H. Nakano, J. M. Duerr, L. Buckbinder and W. C. Greene (2005). "NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation." *Mol Cell Biol* **25**(18): 7966-7975.
- Chowdhury, A., J. Mukhopadhyay and S. Tharun (2007). "The decapping activator Lsm1p-7p-Pat1p complex has the intrinsic ability to distinguish between oligoadenylated and polyadenylated RNAs." *RNA* **13**(7): 998-1016.
- Choy, E. (2012). "Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Rheumatology (Oxford)* **51 Suppl 5**: v3-11.
- Chu, C. Y. and T. M. Rana (2006). "Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54." *PLoS Biol* **4**(7): e210.
- Cirillo, G., L. Casalino, D. Vallone, A. Caracciolo, D. De Cesare and P. Verde (1999). "Role of distinct mitogen-activated protein kinase pathways and cooperation between Ets-2, ATF-2, and Jun family members in human urokinase-type plasminogen activator gene induction by interleukin-1 and tetradecanoyl phorbol acetate." *Mol Cell Biol* **19**(9): 6240-6252.
- Cougot, N., A. Cavalier, D. Thomas and R. Gillet (2012). "The dual organization of P-bodies revealed by immunoelectron microscopy and electron tomography." *J Mol Biol* **420**(1-2): 17-28.

Cuellar, T.L., T.H. Davis, P.T. Nelson, G.B. Loeb, B.D. Harfe, E. Ullian, M.T. McManus (2008): "Dicer loss in striatal neurons produces behavioral and neuroanatomical phenotypes in the absence of neurodegeneration." PNAS **105**(14): 5614-5619

Davis, P. K., A. Ho, S. F. Dowdy (2001). "Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells." Biotechniques **30**(6): 1322-6

De Bosscher, K., W. Vanden Berghe and G. Haegeman (2003). "The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression." Endocr Rev **24**(4): 488-522.

Dedeic, Z., M. Cetera, T. V. Cohen and J. M. Holaska (2011). "Emerin inhibits Lmo7 binding to the Pax3 and MyoD promoters and expression of myoblast proliferation genes." J Cell Sci **124**(Pt 10): 1691-1702.

Defilippi, P., P. Di Stefano and S. Cabodi (2006). "p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks." Trends Cell Biol **16**(5): 257-263.

Delhase, M., M. Hayakawa, Y. Chen and M. Karin (1999). "Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation." Science **284**(5412): 309-313.

Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart and Z. J. Chen (2000). "Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain." Cell **103**(2): 351-361.

Deutsche Gicht-Liga e.V. - <http://www.gichtliga.de/Templates/>, aufgerufen am 20.06.2017, 8:50 Uhr.

Dinarello, C. A. (2005). "The many worlds of reducing interleukin-1." Arthritis Rheum **52**(7): 1960-1967.

Dinarello, C. A. (2009). "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family." Annu Rev Immunol **27**: 519-550.

Dong, J., E. Jimi, H. Zhong, M. S. Hayden and S. Ghosh (2008). "Repression of gene expression by unphosphorylated NF-kappaB p65 through epigenetic mechanisms." Genes Dev **22**(9): 1159-1173.

Dutra, A., E. Gillander, D. A. Stephan, J. Bailey-Wilson, S. H. Joo, T. Kainu, A. Arason, R. B. Barkardottir, H. Nevanlinna, A. Borg and O. P. Kallioniemi (2002). "A genomic map of a 6-Mb region at 13q21-q22 implicated in cancer development: identification and characterization of candidate genes." Hum Genet **110**(2): 111-12.

Dyxhoorn, D. M., C. D. Novina and P. A. Sharp (2003). "Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(6): 457-467.

Eulalio, A., I. Behm-Ansmant and E. Izaurralde (2007). "P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(1): 9-22.

Eystathioy, T., A. Jakymiw, E. K. Chan, B. Seraphin, N. Cougot and M. J. Fritzler (2003). "The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies." RNA **9**(10): 1171-1173.

Fagerlund, R., L. Kinnunen, M. Kohler, I. Julkunen and K. Melen (2005). "NF- $\kappa$ B is transported into the nucleus by importin  $\alpha$ 3 and importin  $\alpha$ 4." J Biol Chem **280**(16): 15942-15951.

Fenger-Gron, M., C. Fillman, B. Norrild and J. Lykke-Andersen (2005). "Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping." Mol Cell **20**(6): 905-915.

Finch, A., W. Davis, W. G. Carter and J. Saklatvala (2001). "Analysis of mitogen-activated protein kinase pathways used by interleukin 1 in tissues in vivo: activation of hepatic c-Jun N-terminal kinases 1 and 2, and mitogen-activated protein kinase kinases 4 and 7." Biochem J **353**(Pt 2): 275-281.

Fiorini, E., I. Schmitz, W. E. Marissen, S. L. Osborn, M. Touma, T. Sasada, P. A. Reche, E. V. Tibaldi, R. E. Hussey, A. M. Kruisbeek, E. L. Reinherz and L. K. Clayton (2002). "Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF- $\kappa$ B inhibitor." Mol Cell **9**(3): 637-648.

Fontes, J. A., N. R. Rose and D. Cihakova (2015). "The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure." Cytokine **74**(1): 62-8.

Fredriksson, S., W. Dixon, H. Ji, A. C. Koong, M. Mindrinos and R. W. Davis (2007). "Multiplexed protein detection by proximity ligation for cancer biomarker validation." Nat Methods **4**(4): 327-329.

Fredriksson, S., M. Gullberg, J. Jarvius, C. Olsson, K. Pietras, S. M. Gustafsdottir, A. Ostman and U. Landegren (2002). "Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays." Nat Biotechnol **20**(5): 473-477.

Furuya, M., N. Tsuji, T. Endoh, R. Moriai, D. Kobayashi, A. Yagihashi and N. Watanabe (2002). "A novel gene containing PDZ and LIM domains, PCD1, is overexpressed in human colorectal cancer." Anticancer Res **22**(6C): 4183-4186.

Ganesh, S., R. Puri, S. Singh, S. Mittal and D. Dubey (2006). "Recent advances in the molecular basis of Lafora's progressive myoclonus epilepsy." J Hum Genet **51**(1): 1-8.

Garneau, N. L., J. Wilusz and C. J. Wilusz (2007). "The highways and byways of mRNA decay." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(2): 113-126.

Geng, H., T. Wittwer, O. Dittrich-Breiholz, M. Kracht and M. L. Schmitz (2009). "Phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 at Ser468 controls its COMMD1-dependent ubiquitination and target gene-specific proteasomal elimination." EMBO Rep **10**(4): 381-386.

Gerritsen, M. E., A. J. Williams, A. S. Neish, S. Moore, Y. Shi and T. Collins (1997). "CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 2927-2932.

Ghosh, S. and D. Baltimore (1990). "Activation in vitro of NF- $\kappa$ B by phosphorylation of its inhibitor I  $\kappa$ B." Nature **344**(6267): 678-682.

Ghosh, S., A. M. Gifford, L. R. Riviere, P. Tempst, G. P. Nolan and D. Baltimore (1990). "Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF- $\kappa$ B: homology to rel and dorsal." Cell **62**(5): 1019-1029.

- Ghosh, S. and M. Karin (2002). "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle." Cell **109 Suppl**: S81-96.
- Goulding, M., A. Lumsden and A. J. Paquette (1994). "Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development." Development **120**(4): 957-971.
- Greenwood, C., D. Ruff, S. Kirvell, G. Johnson, H. S. Dhillon, S. A. Bustin (2015). "Proximity assays for sensitive quantification of proteins". Biomol Detect Quantif. **4**: 10-16.
- Grzenda, A., G. Lomberk, J.-S. Zhang, R. Urrutia (2009). "Sin3: Master scaffold and transcriptional corepressor". Biochimica et Biophysica Acta **1789**: 443-450.
- Gumbiner, B. M. (1996). "Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis." Cell **84**(3): 345-357.
- Gustafsdottir, S. M., E. Schallmeiner, S. Fredriksson, M. Gullberg, O. Soderberg, M. Jarvius, J. Jarvius, M. Howell and U. Landegren (2005). "Proximity ligation assays for sensitive and specific protein analyses." Anal Biochem **345**(1): 2-9.
- Hahn, S. (2004). "Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery." Nature Structural & Molecular Biology **11**: 394-403.
- Han, J., Y. Jiang, Z. Li, V. V. Kravchenko and R. J. Ulevitch (1997). "Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation." Nature **386**(6622): 296-299.
- Haskill, S., A. A. Beg, S. M. Tompkins, J. S. Morris, A. D. Yurochko, A. Sampson-Johannes, K. Mondal, P. Ralph and A. S. Baldwin, Jr. (1991). "Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity." Cell **65**(7): 1281-1289.
- Hatada, E. N., M. Naumann and C. Scheidereit (1993). "Common structural constituents confer I kappa B activity to NF-kappa B p105 and I kappa B/MAD-3." EMBO J **12**(7): 2781-2788.
- Henkel, T., T. Machleidt, I. Alkalay, M. Kronke, Y. Ben-Neriah and P. A. Baeuerle (1993). "Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B." Nature **365**(6442): 182-185.
- Herold G. und Mitarbeiter (2013). "Innere Medizin"; ISBN: 978-3-9814660-2-7: 657-665
- Hervy, M., L. Hoffman and M. C. Beckerle (2006). "From the membrane to the nucleus and back again: bifunctional focal adhesion proteins." Curr Opin Cell Biol **18**(5): 524-532.
- Hoberg, J. E., A. E. Popko, C. S. Ramsey and M. W. Mayo (2006). "IkkappaB kinase alpha-mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300." Mol Cell Biol **26**(2): 457-471.
- Hoffman, H. M., J. L. Mueller, D. H. Broide, A. A. Wanderer, R. D. Kolodner (2001): "Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome." Nature Genetics **29**: 301-305.

- Hoffmann, E., O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann and M. Kracht (2002). "Multiple control of interleukin-8 gene expression." J Leukoc Biol **72**(5): 847-855.
- Holaska, J. M., K. K. Lee, A. K. Kowalski and K. L. Wilson (2003). "Transcriptional repressor germ cell-less (GCL) and barrier to autointegration factor (BAF) compete for binding to emerin in vitro." J Biol Chem **278**(9): 6969-6975.
- Holaska, J. M., S. Rais-Bahrami and K. L. Wilson (2006). "Lmo7 is an emerin-binding protein that regulates the transcription of emerin and many other muscle-relevant genes." Hum Mol Genet **15**(23): 3459-3472.
- Holaska, J. M., K. L. Wilson and M. Mansharamani (2002). "The nuclear envelope, lamins and nuclear assembly." Curr Opin Cell Biol **14**(3): 357-364.
- Holtmann, H., J. Enninga, S. Kalble, A. Thiefes, A. Dorrie, M. Broemer, R. Winzen, A. Wilhelm, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto, K. Resch and M. Kracht (2001). "The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation." J Biol Chem **276**(5): 3508-3516.
- Holtmann, H., R. Winzen, P. Holland, S. Eickemeier, E. Hoffmann, D. Wallach, N. L. Malinin, J. A. Cooper, K. Resch and M. Kracht (1999). "Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways." Mol Cell Biol **19**(10): 6742-6753.
- Howe, A. K., A. E. Aplin and R. L. Juliano (2002). "Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences." Curr Opin Genet Dev **12**(1): 30-35.
- Hu, Y., V. Baud, M. Delhase, P. Zhang, T. Deerinck, M. Ellisman, R. Johnson and M. Karin (1999). "Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK $\alpha$  subunit of I $\kappa$ B kinase." Science **284**(5412): 316-320.
- Inoue, J., L. D. Kerr, A. Kakizuka and I. M. Verma (1992). "I $\kappa$ B gamma, a 70 kd protein identical to the C-terminal half of p110 NF- $\kappa$ B: a new member of the I $\kappa$ B family." Cell **68**(6): 1109-1120.
- Ishitani, T., G. Takaesu, J. Ninomiya-Tsuji, H. Shibuya, R. B. Gaynor and K. Matsumoto (2003). "Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling." EMBO J **22**(23): 6277-6288.
- Israël, A. (2010). "The IKK complex, a Central Regulator of NF- $\kappa$ B Activation." Cold Spring Harb Perspect Biol. **2**; a000158.
- Jain, S. and R. Parker (2013). "The discovery and analysis of P Bodies." in Chan E., Fritzler M. (eds) "Ten years of Progress in GW/P Body Research." Adv Exp Med Biol **768**: 23-43. Springer , New York.
- Jurida, L., J. Soelch, M. Bartkuhn, K. Handschick, H. Müller, D. Newel, A. Weber, O. Dittrich-Breitholz, H. Schneider, S. Bhujju, V. V. Saul, M. L. Schmitz, M. Kracht (2015). "The Activation of IL-1-Induced Enhancers Depends on TAK1 Kinase Activity and NF- $\kappa$ B p65." Cell Rep **10**(5): 726-739.

- Kanayama, A., R. B. Seth, L. Sun, C. K. Ea, M. Hong, A. Shaito, Y. H. Chiu, L. Deng and Z. J. Chen (2004). "TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains." Mol Cell **15**(4): 535-548.
- Kang, S., H. Xu, X. Duan, J. J. Liu, Z. He, F. Yu, S. Zhou, X. Q. Meng, M. Cao and G. C. Kennedy (2000). "PCD1, a novel gene containing PDZ and LIM domains, is overexpressed in several human cancers." Cancer Res **60**(18): 5296-5302.
- Karin, M. (1995). "The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases." J Biol Chem **270**(28): 16483-16486.
- Karin, M., Z. Liu and E. Zandi (1997). "AP-1 function and regulation." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 240-246.
- Kawagoe, T., S. Sato, K. Matsushita, H. Kato, K. Matsui, Y. Kumagai, T. Saitoh, T. Kawai, O. Takeuchi and S. Akira (2008). "Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2." Nat Immunol **9**(6): 684-691.
- Kracht, M. and J. Saklatvala (2002). "Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation." Cytokine **20**(3): 91-106.
- Krause, A., H. Holtmann, S. Eickemeier, R. Winzen, M. Szamel, K. Resch, J. Saklatvala and M. Kracht (1998). "Stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase is required for interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB." J Biol Chem **273**(37): 23681-23689.
- Krcmery, J., T. Camarata, A. Kulisz and H. G. Simon (2010). "Nucleocytoplasmic functions of the PDZ-LIM protein family: new insights into organ development." Bioessays **32**(2): 100-108.
- Kulkarni, M., S. Ozgur and G. Stoecklin (2010). "On track with P-bodies." Biochem Soc Trans **38**(Pt 1): 242-251.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." Physiol Rev **81**(2): 807-869.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lai, W. S., E. A. Kennington and P. J. Blackshear (2002). "Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: non-binding tristetraprolin mutants exert an inhibitory effect on degradation of AU-rich element-containing mRNAs." J Biol Chem **277**(11): 9606-9613.
- Laporte, A. N., J. X. Ji, L. Ma, T. O. Nielsen, B. A. Brodin (2016). "Identification of cytotoxic agents disrupting synovial sarcoma oncoprotein interactions by proximity ligation assay." Oncotarget **7**(23): 34384-94.
- Leonard, D., P. Ajuh, A. I. Lamond and R. J. Legerski (2003). "hLodestar/HuF2 interacts with CDC5L and is involved in pre-mRNA splicing." Biochem Biophys Res Commun **308**(4): 793-801.

Li, H., T. Wittwer, A. Weber, H. Schneider, R. Moreno, G. N. Maine, M. Kracht, M. L. Schmitz and E. Burstein (2012). "Regulation of NF-kappaB activity by competition between RelA acetylation and ubiquitination." Oncogene **31**(5): 611-623.

Lin, L., G. N. DeMartino and W. C. Greene (2000). "Cotranslational dimerization of the Rel homology domain of NF-kappaB1 generates p50-p105 heterodimers and is required for effective p50 production." EMBO J **19**(17): 4712-4722.

Lindvall, J. M., K. E. Blomberg, A. Wennborg and C. I. Smith (2005). "Differential expression and molecular characterisation of Lmo7, Myo1e, Sash1, and Mcoln2 genes in Btk-defective B-cells." Cell Immunol **235**(1): 46-55.

Liu, M., Z. Xie and D. H. Price (1998). "A human RNA polymerase II transcription termination factor is a SWI2/SNF2 family member." J Biol Chem **273**(40): 25541-25544.

Ma, J., M. Flemr, H. Strnad, P. Svoboda and R. M. Schultz (2013). "Maternally recruited DCP1A and DCP2 contribute to messenger RNA degradation during oocyte maturation and genome activation in mouse." Biol Reprod **88**(1): 11.

Mahtani, K. R., M. Brook, J. L. Dean, G. Sully, J. Saklatvala and A. R. Clark (2001). "Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability." Mol Cell Biol **21**(19): 6461-6469.

Malek, S., Huxford T., Ghosh G. (1998): "Ikappa Balpha functions through direct contacts with the nuclear localisation signals and the DNA binding sequence of NF-kappaB." J Biol Chem **273**(39): 25427-35.

Mamoudjy, N., H. Maurey, I. Marie, I. Koné-Paut, K. Deiva (2017): "Neurological outcome of patients with cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS)." Orphanet Journal of Rare Diseases **12**(1): 33.

Markiewicz, E., K. Tilgner, N. Barker, M. van de Wetering, H. Clevers, M. Dorobek, I. Hausmanowa-Petrusewicz, F. C. Ramaekers, J. L. Broers, W. M. Blankesteyn, G. Salpingidou, R. G. Wilson, J. A. Ellis and C. J. Hutchison (2006). "The inner nuclear membrane protein emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus." EMBO J **25**(14): 3275-3285.

Mattioli, I., A. Sebald, C. Bucher, R. P. Charles, H. Nakano, T. Doi, M. Kracht and M. L. Schmitz (2004). "Transient and selective NF-kappa B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I kappa B kinase beta and controls the kinetics of p65 nuclear import." J Immunol **172**(10): 6336-6344.

Mayr-Buro, C., E. Schlereth, K. Beuerlein, U. Tenekeci, J. Meier-Soelch, M. L. Schmitz, M. Kracht (2019). "Single-Cell Analysis of Multiple Steps of Dynamic NF-κB Regulation in Interleukin-1α-Triggered Tumor Cells Using Proximity Ligation Assays." Cancers **11**(8): E1199

Medzhitov, R. (2010). "Inflammation 2010: new adventures of an old flame." Cell **140**(6): 771-776.

Meister, G., M. Landthaler, L. Peters, P. Y. Chen, H. Urlaub, R. Luhrmann and T. Tuschl (2005). "Identification of novel argonaute-associated proteins." Curr Biol **15**(23): 2149-2155.

Mercurio, F., J. A. DiDonato, C. Rosette and M. Karin (1993). "p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF-kappa B-mediated signal transduction." Genes Dev **7**(4): 705-718.

Mereiter, S., M. Balmaña, J. Gomes, A. Magalhães, C. A. Reis (2016). "Glycomic Approaches for the Discovery of Targets in Gastrointestinal Cancer." Front Oncol. **6**: 55.

Miyamoto, S., P. J. Chiao and I. M. Verma (1994). "Enhanced I kappa B alpha degradation is responsible for constitutive NF-kappa B activity in mature murine B-cell lines." Mol Cell Biol **14**(5): 3276-3282.

Montarras, D., J. Morgan, C. Collins, F. Relaix, S. Zaffran, A. Cumano, T. Partridge and M. Buckingham (2005). "Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration." Science **309**(5743): 2064-2067.

Mukai, M., K. Shinkai, K. Komatsu and H. Akedo (1989). "Potentiation of invasive capacity of rat ascites hepatoma cells by transforming growth factor-beta." Jpn J Cancer Res **80**(2): 107-110.

Mukaida, N., M. Morita, Y. Ishikawa, N. Rice, S. Okamoto, T. Kasahara and K. Matsushima (1994). "Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression." J Biol Chem **269**(18): 13289-13295.

Mukaida, N., S. Okamoto, Y. Ishikawa and K. Matsushima (1994). "Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression." J Leukoc Biol **56**(5): 554-558.

Nagafuchi, A. (2001). "Molecular architecture of adherens junctions." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 600-603.

Nagano, A., R. Koga, M. Ogawa, Y. Kurano, J. Kawada, R. Okada, Y. K. Hayashi, T. Tsukahara and K. Arahata (1996). "Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy." Nat Genet **12**(3): 254-259.

Nakamura, H., K. Hori, M. Tanaka-Okamoto, M. Higashiyama, Y. Itoh, M. Inoue, S. Morinaka and J. Miyoshi (2011). "Decreased expression of LMO7 and its clinicopathological significance in human lung adenocarcinoma." Exp Ther Med **2**(6): 1053-1057.

Nakamura, H., M. Mukai, K. Komatsu, M. Tanaka-Okamoto, Y. Itoh, H. Ishizaki, M. Tatsuta, M. Inoue and J. Miyoshi (2005). "Transforming growth factor-beta1 induces LMO7 while enhancing the invasiveness of rat ascites hepatoma cells." Cancer Lett **220**(1): 95-99.

Netea, M. G., C. A. Nold-Petry, M. F. Nold, L. A. Joosten, B. Opitz, J. H. van der Meer, F. L. van de Veerdonk, G. Ferwerda, B. Heinhuis, I. Devesa, C. J. Funk, R. J. Mason, B. J. Kullberg, A. Rubartelli, J. W. van der Meer and C. A. Dinarello (2009). "Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages." Blood **113**(10): 2324-2335.

Newton, K., M. L. Matsumoto, I. E. Wertz, D. S. Kirkpatrick, J. R. Lill, J. Tan, D. Dugger, N. Gordon, S. S. Sidhu, F. A. Fellouse, L. Komuves, D. M. French, R. E. Ferrando, C. Lam, D. Compaan, C. Yu, I. Bosanac, S. G. Hymowitz, R. F. Kelley and V. M. Dixit (2008). "Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies." Cell **134**(4): 668-678.

Nourbakhsh, M., S. Kalble, A. Dorrie, H. Hauser, K. Resch and M. Kracht (2001). "The NF-kappa b repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF-kappa b-flanking sequence element." J Biol Chem **276**(6): 4501-4508.

Nowak, D. E., B. Tian, M. Jamaluddin, I. Boldogh, L. A. Vergara, S. Choudhary and A. R. Brasier (2008). "RelA Ser276 phosphorylation is required for activation of a subset of NF-kappaB-dependent genes by recruiting cyclin-dependent kinase 9/cyclin T1 complexes." Mol Cell Biol **28**(11): 3623-3638.

Ooshio, T., K. Irie, K. Morimoto, A. Fukuhara, T. Imai and Y. Takai (2004). "Involvement of LMO7 in the association of two cell-cell adhesion molecules, nectin and E-cadherin, through afadin and alpha-actinin in epithelial cells." J Biol Chem **279**(30): 31365-31373.

Ott, E. B., N. M. van den Akker, P. A. Sakalis, A. C. Gittenberger-de Groot, A. J. Te Velthuis and C. P. Bagowski (2008). "The lim domain only protein 7 is important in zebrafish heart development." Dev Dyn **237**(12): 3940-3952.

Perez-Moreno, M., C. Jamora and E. Fuchs (2003). "Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions." Cell **112**(4): 535-548.

Phizicky, E. M. and S. Fields (1995). "Protein-protein interactions: methods for detection and analysis." Microbiol Rev **59**(1): 94-123.

Poppe, Michael; Masterthesis (2013): "shRNA mediated knockdown and reconstitution of RNAi resistant variants of decapping factors." Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, Gießen.

Poppe, M., S. Wittig, L. Jurida, M. Bartkuhn, J. Wilhelm, H. Müller, K. Beuerlein, N. Karl, S. Bhujju, J. Ziebuhr, M. L. Schmitz, M. Kracht (2017). "The NF-κB-dependent and -independent transcriptome and chromatin landscapes of human coronavirus 299E-infected cells." PLoS Pathog. **13**(3): e1006286.

Radons, J., S. Dove, D. Neumann, R. Altmann, A. Botzki, M. U. Martin and W. Falk (2003). "The interleukin 1 (IL-1) receptor accessory protein Toll/IL-1 receptor domain: analysis of putative interaction sites in vitro mutagenesis and molecular modeling." J Biol Chem **278**(49): 49145-49153.

Ragab, G., M. Elshahaly, T. Bardin (2017): "Gout: An old disease in new perspective - A review." J Adv Res. **8**(5): 495-511.

Reddy, S., S. Jia, R. Geoffrey, R. Lorier, M. Suchi, U. Broeckel, M. J. Hessner and J. Verbsky (2009). "An autoinflammatory disease due to homozygous deletion of the IL1RN locus." N Engl J Med **360**(23): 2438-2444.

Renoux, A. J. and P. K. Todd (2012). "Neurodegeneration the RNA way." Prog Neurobiol **97**(2): 173-189.

Rice, N. R. and M. K. Ernst (1993). "In vivo control of NF-kappa B activation by I kappa B alpha." EMBO J **12**(12): 4685-4695.

Rice, N. R., M. L. MacKichan and A. Israel (1992). "The precursor of NF-kappa B p50 has I kappa B-like functions." Cell **71**(2): 243-253.

Rosette, C. and M. Karin (1995). "Cytoskeletal control of gene expression: depolymerization of microtubules activates NF-kappa B." J Cell Biol **128**(6): 1111-1119.

Rozenblum, E., P. Vahteristo, T. Sandberg, J. T. Bergthorsson, K. Syrjakoski, D. Weaver, K. Haraldsson, H. K. Johannsdottir, P. Vehmanen, S. Nigam, N. Golberger, C. Robbins, E. Pak, Ryo, A., F. Suizu, Y. Yoshida, K. Perrem, Y. C. Liou, G. Wulf, R. Rottapel, S. Yamaoka and K. P. Lu (2003). "Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA." Mol Cell **12**(6): 1413-1426.

Rzeczkowski, K., K. Beuerlein, H. Muller, O. Dittrich-Breiholz, H. Schneider, D. Kettner-Buhrow, H. Holtmann and M. Kracht (2011). "c-Jun N-terminal kinase phosphorylates DCP1a to control formation of P bodies." J Cell Biol **194**(4): 581-596.

Saccani, S., I. Marazzi, A. A. Beg and G. Natoli (2004). "Degradation of promoter-bound p65/RelA is essential for the prompt termination of the nuclear factor kappaB response." J Exp Med **200**(1): 107-113.

Saccani, S., S. Pantano and G. Natoli (2002). "p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment." Nat Immunol **3**(1): 69-75.

Saccani, S., S. Pantano and G. Natoli (2003). "Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers." Mol Cell **11**(6): 1563-1574.

Sachs, A. B., P. Sarnow and M. W. Hentze (1997). "Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes." Cell **89**(6): 831-838.

Sakurai, H., H. Chiba, H. Miyoshi, T. Sugita and W. Toriumi (1999). "IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain." J Biol Chem **274**(43): 30353-30356.

Sakurai, H., H. Miyoshi, J. Mizukami, T. Sugita (2000). "Phosphorylation-dependant activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1." FEBS Lett. **474**(2-3): 141-145.

Sasaki, M., N. Tsuji, M. Furuya, K. Kondoh, C. Kamagata, D. Kobayashi, A. Yagihashi and N. Watanabe (2003). "PCD1, a novel gene containing PDZ and LIM domains, is overexpressed in human breast cancer and linked to lymph node metastasis." Anticancer Res **23**(3B): 2717-2721.

Schmitz, M. L., S. Bacher and M. Kracht (2001). "I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations." Trends Biochem Sci **26**(3): 186-190.

Schmitz, M. L. and P. A. Baeuerle (1991). "The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B." EMBO J **10**(12): 3805-3817.

- Schmitz, M. L. and M. Kracht (2013). "The coactivator role of histone deacetylase 3 in IL-1-signaling involves deacetylation of p65 NF-kappaB." Nucleic Acids Res **41**(1): 90-109.
- Schmitz, M. L., I. Mattioli, H. Buss and M. Kracht (2004). "NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels." Chembiochem **5**(10): 1348-1358.
- Schmitz, M. L., A. Weber, T. Roxlau, M. Gaestel and M. Kracht (2011). "Signal integration, crosstalk mechanisms and networks in the function of inflammatory cytokines." Biochim Biophys Acta **1813**(12): 2165-2175.
- Segura-Totten, M., A. K. Kowalski, R. Craigie and K. L. Wilson (2002). "Barrier-to-autointegration factor: major roles in chromatin decondensation and nuclear assembly." J Cell Biol **158**(3): 475-485.
- Sen, R. and D. Baltimore (1986). "Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences." Cell **46**(5): 705-716.
- Sen, G. L. and H. M. Blau (2005). "Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies." Nat Cell Biol **7**(6): 633-636.
- Shaulian, E. and M. Karin (2002). "AP-1 as a regulator of cell life and death." Nat Cell Biol **4**(5): E131-136.
- Shaw, E. and J. Zheng (1998). "Western immunoblot analysis." Methods Mol Biol. **105**: 295-306.
- Shaw, G. and R. Kamen (1986). "A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation." Cell **46**(5): 659-667.
- She, M., C. J. Decker, D. I. Svergun, A. Round, N. Chen, D. Muhlrud, R. Parker and H. Song (2008). "Structural basis of dcp2 recognition and activation by dcp1." Mol Cell **29**(3): 337-349.
- Sheng, M. and C. Sala (2001). "PDZ domains and the organization of supramolecular complexes." Annu Rev Neurosci **24**: 1-29.
- Sheth, U. and R. Parker (2003). "Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies." Science **300**(5620): 805-808.
- Sheth, U. and R. Parker (2006). "Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies." Cell **125**(6): 1095-1109.
- Sims, J. E., M. A. Gayle, J. L. Slack, M. R. Alderson, T. A. Bird, J. G. Giri, F. Colotta, F. Re, A. Mantovani, K. Shanebeck and et al. (1993). "Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(13): 6155-6159.
- Singh, S. and S. Ganesh (2009). "Lafora progressive myoclonus epilepsy: a meta-analysis of reported mutations in the first decade following the discovery of the EPM2A and NHLRC1 genes." Hum Mutat **30**(5): 715-723.
- Singh, S., P. K. Singh, P. Bhadauriya and S. Ganesh (2012). "Lafora disease E3 ubiquitin ligase malin is recruited to the processing bodies and regulates the microRNA-mediated gene silencing process via the decapping enzyme Dcp1a." RNA Biol **9**(12): 1440-1449.

Soderberg, O., M. Gullberg, M. Jarvius, K. Ridderstrale, K. J. Leuchowius, J. Jarvius, K. Wester, P. Hydring, F. Bahram, L. G. Larsson and U. Landegren (2006). "Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation." Nat Methods **3**(12): 995-1000.

Soderberg, O., K. J. Leuchowius, M. Gullberg, M. Jarvius, I. Weibrecht, L. G. Larsson and U. Landegren (2008). "Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay." Methods **45**(3): 227-232.

Solt, Madge, Orange, May (2007): "Interleukin-1-induced NF-kappaB activation is NEMO-dependent but does not require IKKbeta." J Biol Chem **282**(12): 8724-33.

Srinivasa Rao, V., K. Srinivas, G. N. Sujini, G. N. Sunand Kumar (2014): "Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis." Int J Proteomics **2014**: 147648.

Stein, B. and A. S. Baldwin, Jr. (1993). "Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B." Mol Cell Biol **13**(11): 7191-7198.

Stoecklin, G., M. Colombi, I. Raineri, S. Leuenberger, M. Mallaun, M. Schmidlin, B. Gross, M. Lu, T. Kitamura and C. Moroni (2002). "Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover." EMBO J **21**(17): 4709-4718.

STRING Database, Version 10.5, functional protein association networks, zuletzt aufgerufen und Werte aktualisiert am 20.06.2017

Su, Y. Q., K. Sugiura, Y. Woo, K. Wigglesworth, S. Kamdar, J. Affourtit and J. J. Eppig (2007). "Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes." Dev Biol **302**(1): 104-117.

Sun, M., L. P. Bernard, V. L. DiBona, Q. Wu, H. Zhang (2013). "Calcium Phosphate Transfection of Primary Hippocampal Neurons." J Vis Exp. 2013 (**81**): 50808.

Sun, S.C., P.A. Ganchi, D.W. Ballard, W.C. Greene (1993). "NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway." Science **259**(5103):1912-5.

Szklarczyk, D., Morris JH., Cook H., Kuhn M., Wyder S., Simonovic M., Santos A., Doncheva NT., Roth A., Bork P., Jensen LJ., von Mering C. (2017). "The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible." Nucleic Acids Research **45**(D1): D362-D368.

Tajbakhsh, S., D. Rocancourt, G. Cossu and M. Buckingham (1997). "Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD." Cell **89**(1): 127-138.

Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell **140**(6): 805-820.

Tanaka-Okamoto, M., K. Hori, H. Ishizaki, A. Hosoi, Y. Itoh, M. Wei, H. Wanibuchi, A. Mizoguchi, H. Nakamura and J. Miyoshi (2009). "Increased susceptibility to spontaneous lung cancer in mice lacking LIM-domain only 7." Cancer Sci **100**(4): 608-616.

Taniguchi, S., S. Miyamoto, H. Sadano and H. Kobayashi (1991). "Rat elongation factor 1 alpha: sequence of cDNA from a highly metastatic fos-transferred cell line." Nucleic Acids Res **19**(24): 6949.

Tenekeci, U., M. Poppe, K. Beuerlein, C. Buro, H. Müller, H. Weiser, D. Kettner-Buhrow, K. Porada, D. Newel, M. Xu, Z. J. Chen, J. Busch, M. L. Schmitz, M. Kracht (2016). "K63-Ubiquitylation and TRAF6 Pathways Regulate Mammalian P-Body Formation and mRNA Decapping." Mol Cell **62**(6): 943-57.

Tucker, M., M. A. Valencia-Sanchez, R. R. Staples, J. Chen, C. L. Denis and R. Parker (2001). "The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*." Cell **104**(3): 377-386.

Urban, M. B. and P. A. Baeuerle (1991). "The role of the p50 and p65 subunits of NF-kappa B in the recognition of cognate sequences." New Biol **3**(3): 279-288.

van Dijk, E., N. Cougot, S. Meyer, S. Babajko, E. Wahle and B. Seraphin (2002). "Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures." EMBO J **21**(24): 6915-6924.

Vanden Berghe, W., K. De Bosscher, E. Boone, S. Plaisance and G. Haegeman (1999). "The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter." J Biol Chem **274**(45): 32091-32098.

Verma, I. M., J. K. Stevenson, E. M. Schwarz, D. Van Antwerp and S. Miyamoto (1995). "Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation." Genes Dev **9**(22): 2723-2735.

Vlcek, S. and R. Foisner (2007). "Lamins and lamin-associated proteins in aging and disease." Curr Opin Cell Biol **19**(3): 298-304.

Wagner, E. F. and R. Eferl (2005). "Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system." Immunol Rev **208**: 126-140.

Wang, X., S. Xu, C. Rivolta, L. Y. Li, G. H. Peng, P. K. Swain, C. H. Sung, A. Swaroop, E. L. Berson, T. P. Dryja and S. Chen (2002). "Barrier to autointegration factor interacts with the cone-rod homeobox and represses its transactivation function." J Biol Chem **277**(45): 43288-43300.

Weber, A., P. Wasiliew and M. Kracht (2010). "Interleukin-1 (IL-1) pathway." Sci Signal **3**(105): cm1.

Weiss, C., S. Schneider, E. F. Wagner, X. Zhang, E. Seto and D. Bohmann (2003). "JNK phosphorylation relieves HDAC3-dependent suppression of the transcriptional activity of c-Jun." EMBO J **22**(14): 3686-3695.

Wesche, H., C. Korherr, M. Kracht, W. Falk, K. Resch and M. U. Martin (1997). "The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases)." J Biol Chem **272**(12): 7727-7731.

Whiteside, S. T., J. C. Epinat, N. R. Rice and A. Israel (1997). "I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity." EMBO J **16**(6): 1413-1426.

Wietek, C. and L. A. O'Neill (2007). "Diversity and regulation in the NF-kappaB system." Trends Biochem Sci **32**(7): 311-319.

Windheim, M., M. Stafford, M. Peggie and P. Cohen (2008). "Interleukin-1 (IL-1) induces the Lys63-linked polyubiquitination of IL-1 receptor-associated kinase 1 to facilitate NEMO binding and the activation of IkappaBalpha kinase." Mol Cell Biol **28**(5): 1783-1791.

Winzen, R., M. Kracht, B. Ritter, A. Wilhelm, C. Y. Chen, A. B. Shyu, M. Muller, M. Gaestel, K. Resch and H. Holtmann (1999). "The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism." EMBO J **18**(18): 4969-4980.

Wozniak, M. A., B. M. Baker, C. S. Chen and K. L. Wilson (2013). "The emerin-binding transcription factor Lmo7 is regulated by association with p130Cas at focal adhesions." PeerJ **1**: e134.

Wu, G. D., E. J. Lai, N. Huang and X. Wen (1997). "Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor." J Biol Chem **272**(4): 2396-2403.

Wu, J., Powell F., Larsen N.A., Lai Z., Byth K.F., Read J., Gu R.F., Roth M., Toader D., Saeh J.C., Chen H. (2013). "Mechanism and in vitro pharmacology of TAK1 inhibition by (5Z)-7-Oxozeaenol". ACS Chem Biol **8**(3): 643-50.

Xing, S., N. Wallmeroth, K. W. Berendzen, C. Grefen (2016): "Techniques for the Analysis of Protein-Protein Interactions in Vivo." Plant Physiology **171**: 727-758.

Yamazaki, K., J. Gohda, A. Kanayama, Y. Miyamoto, H. Sakurai, M. Yamamoto, S. Akira, H. Hayashi, B. Su and J. Inoue (2009). "Two mechanistically and temporally distinct NF-kappaB activation pathways in IL-1 signaling." Sci Signal **2**(93): ra66.

Yamochi, T., K. Ohnuma, O. Hosono, H. Tanaka, Y. Kanai and C. Morimoto (2008). "SSA/Ro52 autoantigen interacts with Dcp2 to enhance its decapping activity." Biochem Biophys Res Commun **370**(1): 195-199.

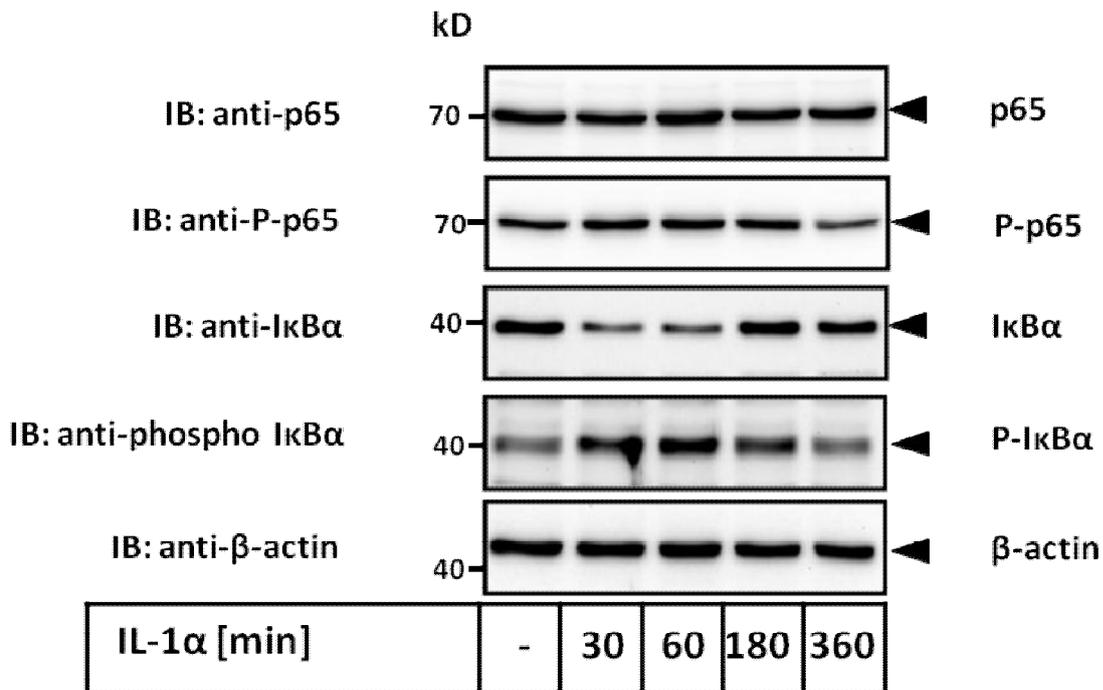
Yang, S. H., A. D. Sharrocks and A. J. Whitmarsh (2003). "Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades." Gene **320**: 3-21.

Yao, J., T. W. Kim, J. Qin, Z. Jiang, Y. Qian, H. Xiao, Y. Lu, W. Qian, M. F. Gulen, N. Sizemore, J. DiDonato, S. Sato, S. Akira, B. Su and X. Li (2007). "Interleukin-1 (IL-1)-induced TAK1-dependent Versus MEKK3-dependent NFkappaB activation pathways bifurcate at IL-1 receptor-associated kinase modification." J Biol Chem **282**(9): 6075-6089.

Ziesche, E., D. Kettner-Buhrow, A. Weber, T. Wittwer, L. Jurida, J. Soelch, H. Muller, D. Newel, P. Kronich, H. Schneider, O. Dittrich-Breiholz, S. Bhaskara, S. W. Hiebert, M. O. Hottiger, H. Li, E. Burstein, Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-127.

## 11 Anhang

### 11.1 Regulation von Komponenten des NF $\kappa$ B-Signalweges durch IL-1 $\alpha$ in HeLa Zellen

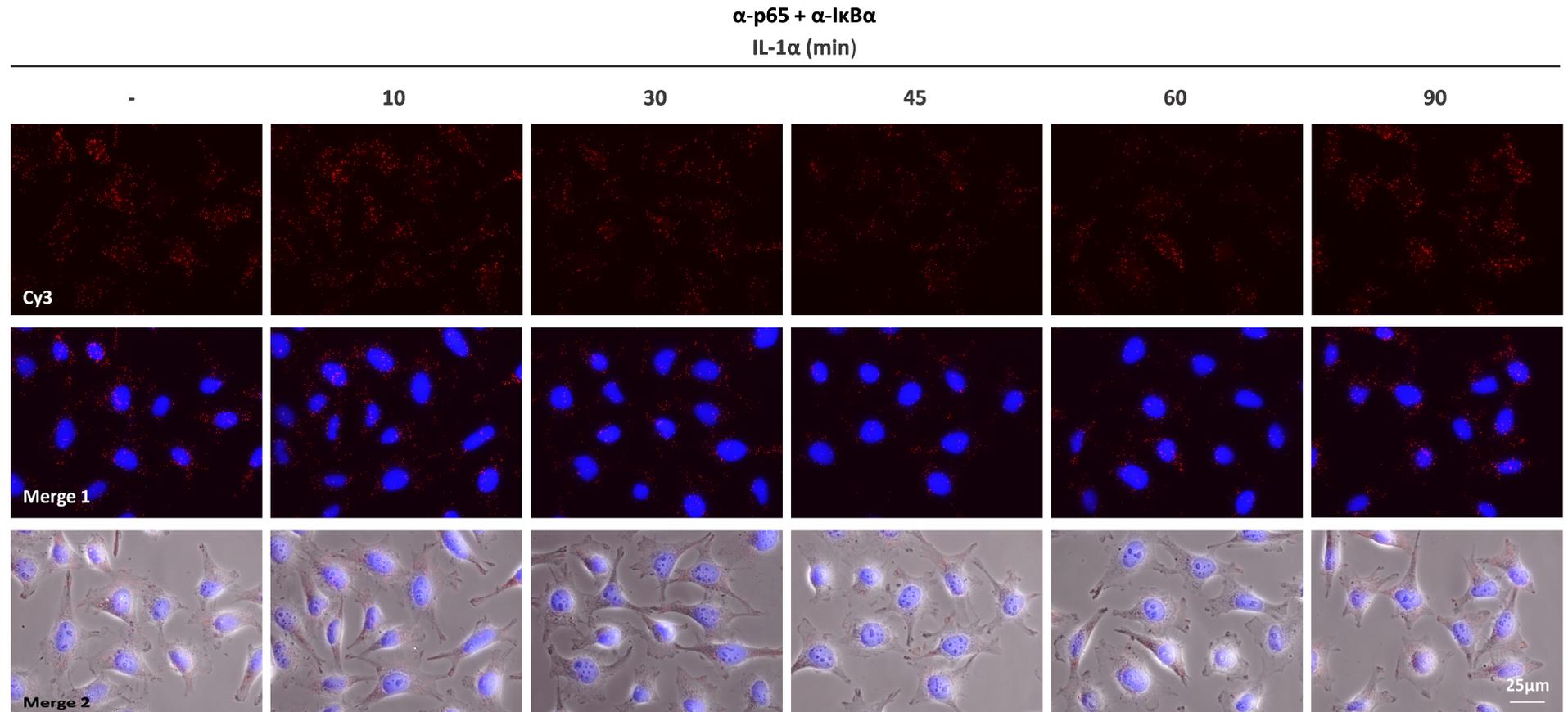


**Abbildung Anhang 1:** Regulation von Komponenten des NF- $\kappa$ B-Signalweges

Die Zellen wurden nach Ganzzelllyse entsprechend der, in der Abbildung angegebenen, Zeiten mit 10ng/ml IL-1 $\alpha$  stimuliert bzw. unbehandelt belassen und anschließend der Proteingehalt mittels Westernblot analysiert. Dabei diente  $\beta$ -Actin als Referenzprotein. Die Detektion der Proteine erfolgte, soweit nicht anders angegeben, mit dem Immobilion Western Chemiluminescent von Millipore, durch Helmut Müller am Imager. n=2

Es zeigte sich die, bereits in Kapitel 4.1.1 beschriebene, IL-1 $\alpha$ -induzierte Zunahme der Phosphorylierung an p65 nach ca. 30 Minuten. Diese war bis 180 Minuten Stimulation mit IL-1 $\alpha$  zu beobachten und nahm dann nach 360 Minuten wieder ab. Die Konzentration an p65 blieb über die unterschiedlichen Stimulationszeitpunkte hinweg konstant. Desweiteren zeigte sich die, ebenfalls durch IL-1 $\alpha$ -Stimulation herbeigeführte, Degradation des I $\kappa$ B $\alpha$  nach 30 bis 60 Minuten, sowie dessen vermehrte Phosphorylierung in diesem Zeitraum. Die Konzentration des Referenzproteins  $\beta$ -Actin blieb von der Stimulation, wie erwartet, unbeeinflusst und deutete somit auf eine gleichmäßige Beladung hin.

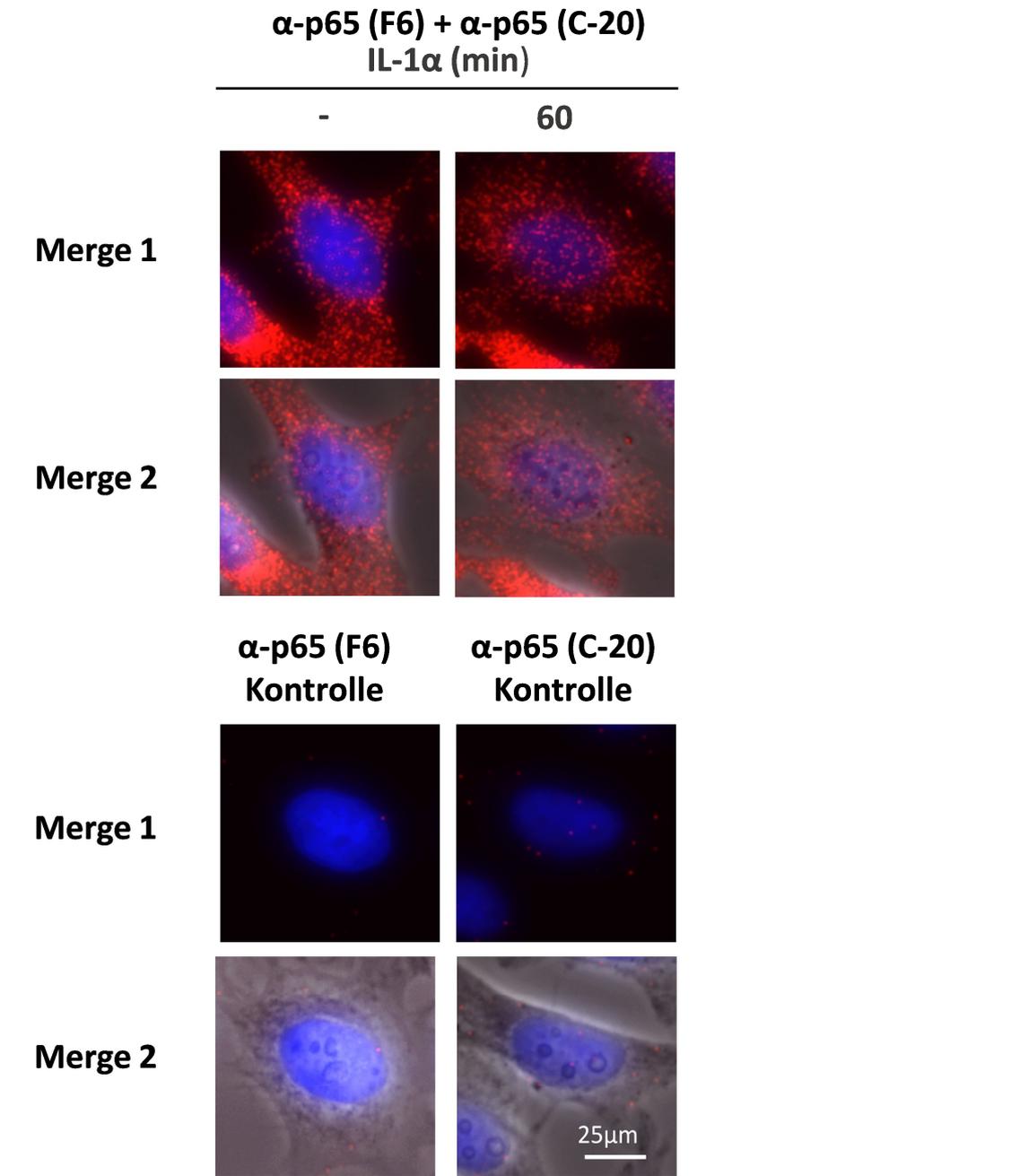
## 11.2 Proximity Ligation Assay mit p65- und IκBα-Antikörpern und erweiterter IL-1α-Kinetik



**Abbildung Anhang 2:** Proximity Ligation Assay mit erweiterter IL-1α-Kinetik mit p65- und IκBα-Antikörpern; Übersichtsaufnahmen

HeLa-Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-1α für die angegebenen Zeiten stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde ein PLA mit den Antikörpern anti-p65 (F6, Maus, SC, 1:100) und anti-IκBα (E130, Kaninchen, Abcam, 1:100) durchgeführt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, bzw. ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle). n=3. Die Kerne wurden mit 1 µM Hoechst-Lösung gegengefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Merge 1: Cy3 (PLA Signal) + Hoechst, Merge 2: Merge 1 + Phasenkontrast. Messbalken 25 µm

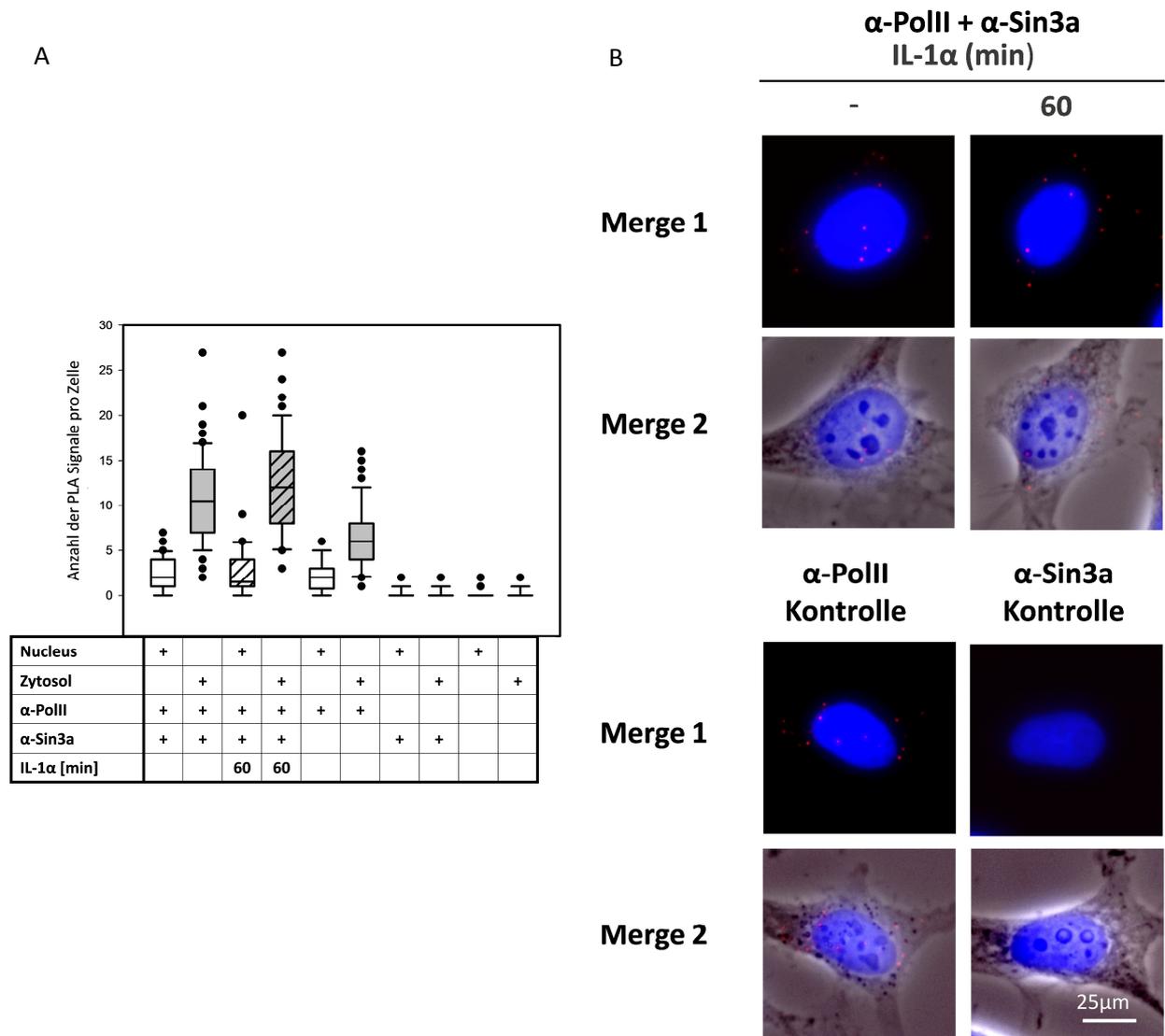
**11.3 PLA mit zwei p65-Antikörpern zum Nachweis der Lokalisation von p65**



**Abbildung Anhang 3:** *Proximity Ligation Assay* mit zwei p65-Antikörpern zur Detektion der p65-Expression; Detailansicht

HeLa-Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  für eine Stunde stimuliert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurde ein PLA mit den Antikörpern anti-p65 (F6, Maus, SC, 1:100) und anti-p65 (C-20, Kaninchen, SC, 1:200) durchgeführt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, zusätzlich ein Ansatz ohne primäre Antikörper (PLA Kontrolle, hier nicht gezeigt). Detailansichten der Zellen: Die Kerne wurden mit 1  $\mu$ M Hoechst-Lösung gegengefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Merge 1: Cy3 (PLA Signal) + Hoechst, Merge 2: Merge 1 + Phasenkontrast. Messbalken 25  $\mu$ m

## 11.4 Proximity Ligation Assays mit Sin3a- und Polymerase-II-Antikörpern, sowie IF mit Sin3a-Antikörpern

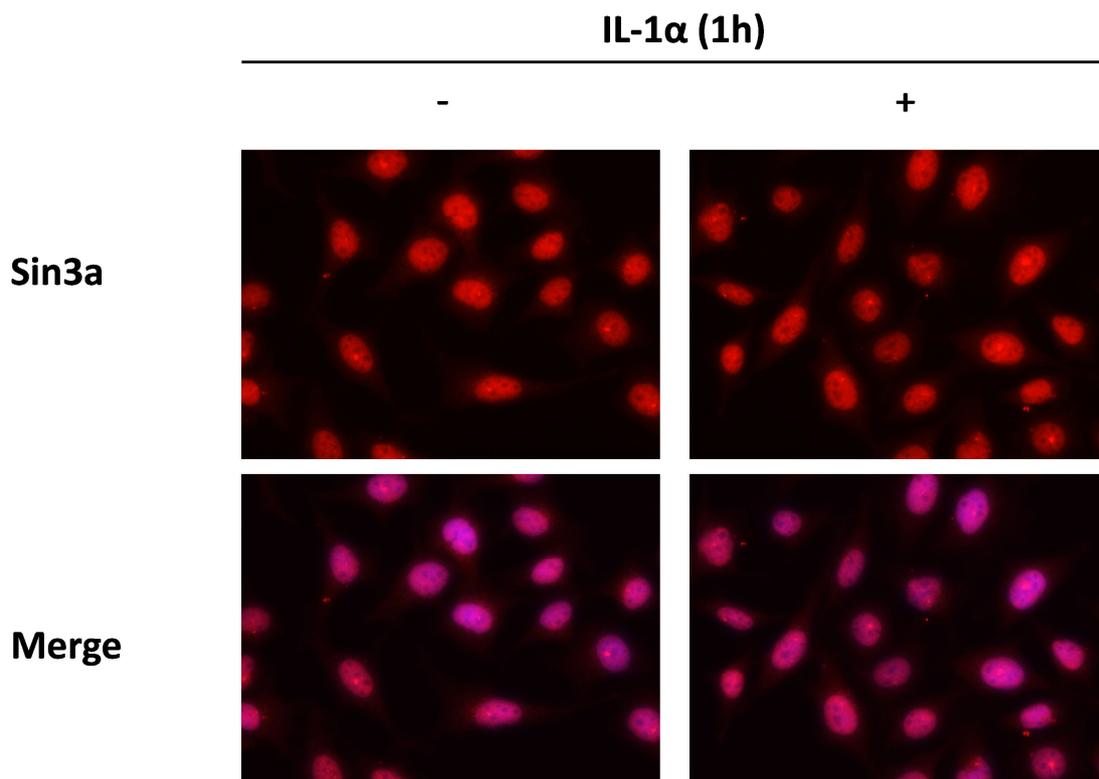


**Abbildung Anhang 4: Proximity Ligation Assay mit Polymerase-II und Sin3a-Antikörpern**

A, B): HeLa-Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  für 60 Minuten stimuliert oder unstimuliert belassen. A, B): Mit den Zellen wurde ein PLA mit den Antikörpern anti-Polymerase-II (Maus, Millipore, 1:100) und anti-Sin3a (Kaninchen, CS, 1:200) durchgeführt. Als Kontrollen wurde in einem Ansatz nur jeweils einer der beiden primären Antikörper verwendet, sowie ein Ansatz ohne primäre Antikörper. A): Quantifizierung: Die Zellen wurden mit Hilfe der Duolink®ImageTool Software analysiert und die Daten als Box-(Whisker)-Plots mit SigmaPlot dargestellt. Die Plots stellen die Anzahl der Interaktionssignale pro Zelle dar. n=1, 50 Zellen wurden ausgezählt. B) Ausschnitte repräsentativer Zellen: Die Kerne wurden mit 1  $\mu$ M Hoechst-Lösung gegengefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung. Merge 1: Cy3 + Hoechst, Merge 2: Merge 1 + Phasenkontrast. Messbalken 25  $\mu$ m

Da insbesondere bei der Lokalisation von nukleären PLA Signalen Unklarheit über deren tatsächliche Lage bestand, wurden zwei Proteine gesucht, welche ausschließlich im Zellkern vorkommen und möglicherweise miteinander interagieren. Wir entschieden

uns für die Durchführung eines PLAs mit Sin3a- und Polymerase-II (Pol II)-Antikörpern. Die RNA Polymerase-II ist für die Transkription von DNA in RNA zuständig (Hahn 2004). Sin3a (*SIN3 transcription regulator family member A*) stellt ein nukleäres Protein dar, welches als Gerüstprotein und Ko-Repressor, insbesondere durch die Interaktion mit Histondeazetylasen, maßgeblich an der Regulation der Transkription vieler Gene beteiligt ist (Grzenda et al. 2009). In den PLAs mit diesen beiden Antikörpern zeigten sich PLA Signale, die teilweise im Nukleus, aber zu großen Teilen auch im Zytoplasma, lokalisiert waren. Da die beiden Proteine aber nukleäre Proteine darstellen, wäre zu erwarten gewesen, dass ausschließlich nukleäre Signale im PLA auftreten würden. Da dies aber nicht der Fall war, erhärtete sich der Verdacht, dass Interaktionen im Nukleus mit dieser Form des PLA Protokolls und einem auf diese Weise wahrscheinlich ineffizienten Kernaufschluss, nicht sicher abgebildet werden können. Auch in der IF mit Sin3a-Antikörpern konnte die überwiegend nukleäre Lokalisation des Proteins gezeigt werden (siehe Abbildung unten).



**Abbildung Anhang 5:** Indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von Sin3a

HeLa-Zellen wurden für eine Stunde mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend erfolgte die Analyse der Lokalisation von Sin3a mittels indirekter Immunfluoreszenz. Der primäre Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:100 eingesetzt und mit Cy3-gekoppelten sekundären Antikörpern (1:200) markiert. Die Kerne wurden mit einer 1  $\mu$ M Hoechst-Lösung gegengefärbt. Merge: Cy3 (Sin3a) + Hoechst. Die Aufnahmen erfolgten mit dem DM IRE 2 Mikroskop von Leica und der Software Leica FW4000. 40-fache Vergrößerung

# 12 Publikationen

- Ergebnisse aus dieser Dissertation wurden auf dem Poster 211 auf dem 2nd German Pharm-Tox Summit im März 2017 der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Heidelberg vorgestellt.



## Single cell-based analyses of the cytokine-regulated NF-κB signalling by proximity ligation assay

Christin Mayr-Buro, Eva Schlereth, Bihad Sharifi, Knut Beuerlein and Michael Kracht  
Rudolf-Buchheim-Institute of Pharmacology; Justus-Liebig-University Gießen; 35392 Gießen; Germany

A major event during inflammation is the release of cytokines, such as interleukin (IL)-1, which are able to prime a broad range of further inflammatory mediators by activation of different signalling cascades. The NF-κB pathway is essential for IL-1 dependent gene regulation. A crucial step during NF-κB activation is the phosphorylation-dependent proteasomal degradation of the inhibitory subunit of the NF-κB complex (IκBα) which releases the RelA (p65) subunit and allows its nuclear translocation. Here, p65 acts as a strong and essential transcriptional inducer of different pro-inflammatory genes, e.g. *IL-8* and *IL-6*. While biochemical methods allow determining individual steps of NF-κB activation at high resolution, assays that (i) assess protein:protein interactions in the cytoplasm, (ii) work at the single cell level and (iii) can be applied to small amounts of cells are still lacking. Here, we show that the proximity ligation assay (PLA) can be used to measure protein:protein interactions within the NF-κB pathway in single cells. Detailed investigations show that PLA faithfully reproduces the dynamic regulation of the p65:IκBα complex in human epithelial cells (HeLa) using primary antibodies from two different species directed at these proteins. Furthermore, the specificity of the assay was verified in mouse embryonic fibroblasts (MEF) deficient of p65 as well as in HeLa cells showing a shRNA-dependent transient knockdown of p65. By both approaches PLA signals were almost completely absent, revealing a high specificity of the antibody-based detection of the p65:IκBα complex by this method. Upon IL-1α stimulation, a prototypical decrease of p65:IκBα complexes was observed by PLA, which correlates well with the phosphorylation-dependent degradation of IκBα that leads to the release of p65 from the complex and a reduction of PLA signals. The IL-1α dependent regulation of the p65:IκBα interaction was inhibited using a TAK1 kinase inhibitor (5-Z-7-oxozeaenol) that indirectly blocks IκBα phosphorylation. Furthermore, this assay can be used for upstream analyses of the NF-κB pathway, such as phosphorylation of IKKβ following IL-1α stimulation. In conclusion, these results reveal PLA as a suitable method for analysing the cytokine-regulated dynamics of the NF-κB pathway at the single cell level.

Figure 1: Procedure and applications of in situ proximity ligation assay (PLA)

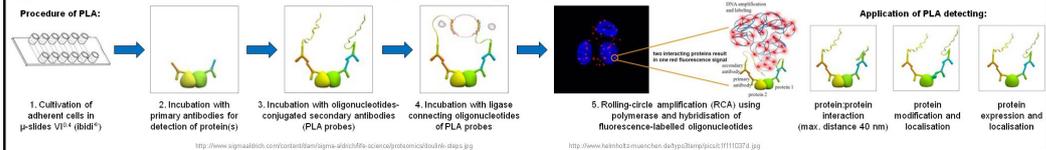


Figure 2: Application of in situ PLA recapitulating major protein:protein interactions of IL1 signalling

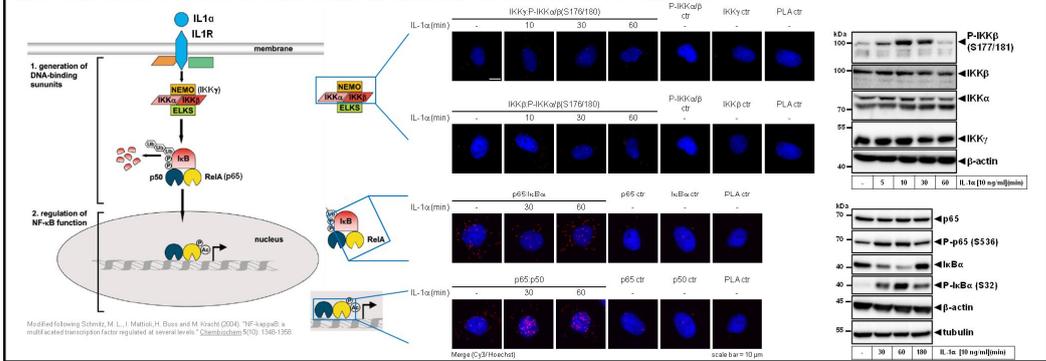


Figure 3: Analysis of IL1α-dependent kinetics of the p65:IκBα interaction

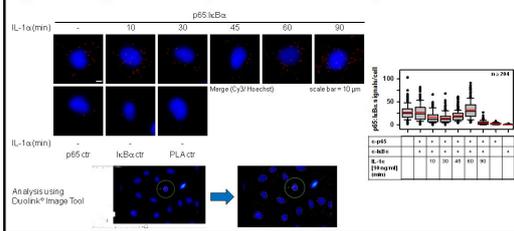


Figure 4: Validating the specificity of PLA using p65-deficient mouse embryonic fibroblasts (MEFs)

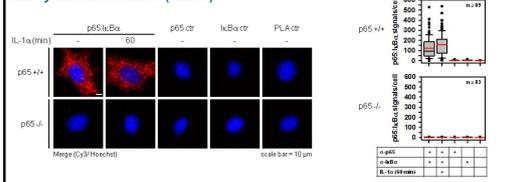


Figure 5: Validating the specificity of PLA using a shRNA-mediated transient p65 knockdown in HeLa cells

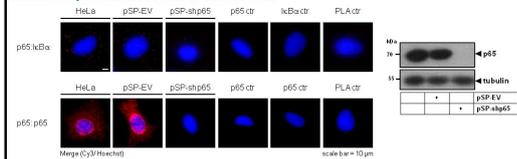
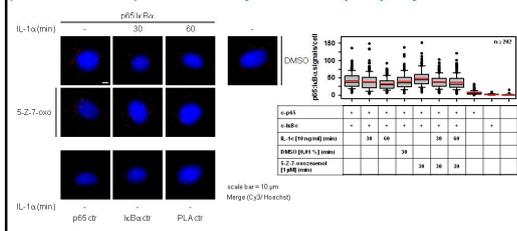


Figure 6: Validating the specificity of PLA using a TAK1 kinase inhibitor (5-Z-7-oxozeaenol) which indirectly blocks IκBα phosphorylation



- Erstautorenschaft im Cancers-Artikel "Single-Cell Analysis of Multiple Steps of Dynamic NF- $\kappa$ B Regulation in Interleukin-1 $\alpha$ -Triggered Tumor Cells Using Proximity Ligation Assays." (2019; Cancers **11**(8): E1199), mit C. Mayr-Buro, K. Beuerlein, U. Tenekeci, J. Meier-Soelch, M. L. Schmitz und M. Kracht.

## 13 Erklärung zur Dissertation

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines Promotionsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden."

Ort, Datum

Unterschrift

## 14 Danksagung

Ich danke allen, die es mir ermöglicht haben diese Arbeit anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Kracht. Für die stetige fachliche Betreuung, für die anregenden Diskussionen und die Möglichkeit ein ganz anderes Feld der Medizin kennen und schätzen zu lernen.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Rudolf-Buchheim-Instituts für Pharmakologie in Gießen. Dafür, dass ihr mir immer mit Rat und Tat zur Seite standet, für die spannenden Auswertungsgespräche und dafür, dass ich besonders auch wegen euch jeden Tag gerne ins Labor gekommen bin.

Vielen Dank an Helmut Müller für die geduldige und perfekte Einarbeitung.

Von ganzem Herzen möchte ich mich auch bei Christin Mayr-Buro bedanken, für deine ausnahmslose Unterstützung, für deine Geduld und dein ganzes Wesen.

Die Zeit bei euch wird mir immer in guter Erinnerung bleiben.