

Molekulare Mechanismen der Regulierung der Expression von NF-κB-Zielgenen durch den LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor 1 Beta



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
- BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN -
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Anne-Sarah Raschta
aus Straubing

Regensburg, im November 2009

Promotionsgesuch eingereicht am: 02. November 2009

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Ralph Witzgall

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender	Prof. Dr. A. Kurtz
	1. Gutachter und Prüfer	Prof. Dr. R. Witzgall
	2. Gutachter und Prüfer	Prof. Dr. R. Warth
	3. Prüfer	Prof. Dr. S. Schneuwly
	Ersatzprüfer:	Prof. Dr. F. Schweda

**Meinen Eltern
In Liebe und Dankbarkeit**

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	6
1.1 Der LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor LMX1B.....	6
1.1.1 Struktur von LMX1B	6
1.1.2 Funktion von LMX1B.....	8
A Funktion von LMX1B im Menschen: Nagel-Patella Syndrom (NPS).....	8
B Funktion von LMX1B in der Maus: <i>Lmx1b</i> -Knockout Modelle	9
1.1.3 Transkriptionsregulation durch LMX1B.....	12
1.2 Der Transkriptionsfaktor NF-κB	14
1.2.1 Struktur und Funktion von NF-κB	14
1.2.2 Transkriptionsregulation durch NF-κB	17
1.3 Zielsetzung	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.1.2 Enzyme.....	22
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.4 Geräte und Instrumente	24
2.1.5 Software.....	26
2.1.6 Kits.....	27
2.1.7 Antikörper.....	27
2.1.8 Oligonukleotide	28
2.1.9 Vektoren	30
2.1.10 Zellen	31
2.1.11 Medien, Lösungen, Puffer	32
2.2 Methoden	35
2.2.1 Arbeiten mit Bakterien.....	35
A Lagerung und Kultivierung von Bakterien	35
B Herstellung kompetenter Zellen	36
C Transformation von Bakterien.....	37
2.2.2 Arbeiten mit DNA	38
A Plasmid-DNA-Minipräparation aus <i>E. coli</i>	38
B Plasmid-DNA-Midipräparation aus <i>E. coli</i>	38
C Konzentrationsbestimmung von DNA	39
D Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	39

E	Ortsspezifische Mutagenese	40
F	Restriktionsverdau von DNA.....	41
G	DNA-Sequenzierung.....	41
2.2.3	Arbeiten mit Proteinen.....	42
A	Bestimmung der Proteinkonzentration	42
B	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	42
C	Western-Blotting	43
D	Dual-Luciferase Reporter Assay	44
2.2.4	Arbeiten mit Säuger-Zelllinien	46
A	Kultivierung von HeLa-Zellen.....	46
B	Herstellung von Zelllysaten.....	49
C	Transfektion von HeLa-Zellen.....	51
D	Immunzytochemie	52
E	siRNA-Synthese	53
2.2.5	Arbeiten mit RNA	54
A	Kultivierung und Ernten von Zellen für die Gesamt-RNA-Isolierung	54
B	Isolierung von Gesamt-RNA	54
C	Konzentrationsbestimmung von RNA	55
D	Agarose-Gelelektrophorese von RNA.....	55
E	cDNA-Synthese	56
F	Echtzeit-PCR.....	56
3.	Ergebnisse.....	60
3.1	Bisheriger Forschungsstand	60
3.2	Induktion der Genexpression durch LMX1B ist spezifisch und benötigt eine funktionelle LIM2-Domäne	64
3.3	LMX1B aktiviert nicht den NF-κB-Signalweg im Zytosol.....	71
3.4	NF-κB ist an der Induktion der NF-κB Zielgene durch LMX1B beteiligt.....	77
3.5	Kooperation zwischen LMX1B und NF-κB auf Transkriptionsebene	88
3.6	LMX1B bindet <i>in vivo</i> an die Promotoren von <i>IL6</i> und <i>IL8</i>	89
3.7	Untersuchung der Transkriptionsaktivierung durch LMX1B.....	90
3.8	Etablierung des Dual-Luciferase Assays.....	90
3.8.1	Herstellung der Promotorkonstrukte	90
3.8.2	Etablierung der Zelltransfektion.....	93
3.9	Einfluss von LMX1B und NF-κB auf die <i>IL6</i> Promotoraktivität.....	98
3.10	Die LIM Domänen und die Homöodomäne sind essentiell für die transkriptionelle Aktivierung durch LMX1B.....	103

4. Diskussion	111
4.1 NF-κB ist direkt an der Geninduktion beteiligt	111
4.2 LMX1B ist direkt an der Geninduktion beteiligt.....	115
4.3 An der Regulierung der Geninduktion durch LMX1B ist ein gemeinsamer Kofaktor von LMX1B und NF-κB beteiligt	119
4.4 Modell der Regulierung der Geninduktion durch LMX1B.....	122
4.5 Schlussfolgerung	125
5. Zusammenfassung.....	126
6. Literaturverzeichnis	128
7. Veröffentlichungen.....	145
8. Lebenslauf	146
9. Eidesstattliche Erklärung.....	147
10. Danksagung.....	148

Abkürzungsverzeichnis

Chemische Elementsymbole wurden gemäß der IUPAC-Richtlinien verwendet.

Abkürzung	Bedeutung
2xLim1	Austausch der LIM2-Domäne durch eine zweite LIM1-Domäne bei LMX1B
3xLim2	Austausch der LIM1-Domäne durch drei LIM2-Domänen bei LMX1B
A213P	Austausch von Alanin gegen Phenylalanin an Position 213 von LMX1B
A	Ampere
A ₅₉₀	Absorption bei 590 nm
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BAP	„Bacterial alkaline phosphatase“
bidest	zweimal destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin („bovine serum albumin“)
C95F	Austausch von Cystein gegen Phenylalanin an Position 95 von LMX1B
cDNA	complementary DNA
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
C-Terminus	Karboxyterminus
CLIM	cofactor of LIM homeodomain proteins
CLIM2	cofactor 2 of LIM homeodomain proteins (Synonym für Ldb1)
Co-IP	Ko-Immunpräzipitation
COL4A3	Gen für die $\alpha 3$ -Kette von Kollagen IV
COL4A4	Gen für die $\alpha 4$ -Kette von Kollagen IV
Cys	Cystein
d	Tag
Δ LIM1	Deletion der LIM1-Domäne bei LMX1B
Δ LIM2	Deletion der LIM2-Domäne bei LMX1B
Δ LIM1+2	Deletion der LIM1- und der LIM2-Domäne bei LMX1B
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
DNase	Desoxyribonuklease
Dox	Dozyzyklin

dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
dsRNA	doppelsträngige RNA
E47/Pan1	ein Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor
ECL	verstärkte Chemolumineszenz („enhanced chemiluminescence“)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
et al.	et alteri
FCS	Fötales Kälberserum („fetal calf serum“)
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
Flat	Far-linked adenine and thymine-rich
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G1P3	Interferon-alpha-induzierbares Protein (Klon IFI-6-16)
G418	Geneticin
GBM	glomeruläre Basalmembran
H54L	Austausch von Histidin gegen Leucin an Position 54 von LMX1B
H54L-C95F	Austausch von Histidin gegen Leucin an Position 54 und Austausch von Cystein gegen Phenylalanin an Position 95 von LMX1B
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeacetylase
HD	Homöodomäne
HeLa	humane Zervixkarzinom-Zelllinie
HEPES	4-(2-Hydroxethyl)piperazine-1-ethansulfon-Säure
His	Histidin
HRP	Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“)
HtTA-1	HeLa-Zellklon, der konstitutiv den Tetrazyklin-Transaktivator produziert
IFN	Interferon
IFN β 2	Interleukin-6
IFNAR	Interferon-alpha/beta-Rezeptor
IC	Immunzytochemie
I κ B	inhibitor of κ B
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
<i>IFNB1</i>	Gen für IFN- β
<i>IL1B</i>	Gen für IL-1 β
IRF	interferon regulatory factor

IRF-E	IRF response element
IP	Immunpräzipitation
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
ISG15	Interferon-stimuliertes Protein, 15 kDa
ISRE	interferon-stimulated response element
JAK	Janus-Kinase
JSH-23	4-Methyl-N1-(3-Phenyl-Propyl)-Benzol-1,2-Diamin
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
LamA/C	Lamin A/C
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LB _{Amp}	mit Ampicillin versetztes LB-Medium
LDB1	LIM-domain-binding-protein 1 (Synonym für CLIM2)
LIM	in den Proteinen Lin-11, Isl-1, Mec-3 erstmals beschriebene Domäne
Lim6	LMX1B-Ortholog aus <i>Caenorhabditis elegans</i>
LMO	LIM-only
LMX	LIM-Homöobox-Protein
Lmx1	LMX1B-Ortholog des Huhns
Lmx1.1	LMX1A-Ortholog des Hamsters
Lmx1.2	LMX1B-Ortholog des Hamsters
LMX1B	LIM-Homöobox-Transkriptionsfaktor 1 beta
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mg ²⁺	Magnesium
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium
NaAc	Natriumazetat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	nuclear factor κB
NFKB-p50	Für p50 kodierendes Gen
NFKB1	für p105 kodierendes Gen

<i>NFKB2</i>	für p100 kodierendes Gen
<i>NFκBIA</i>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
<i>Nkip1</i>	NF- κ B interacting protein 1
<i>NLI</i>	Nuclear LIM interactor
<i>NPHS1</i>	für Nephrin kodierendes Gen
<i>NPHS2</i>	für Podocin kodierendes Gen
<i>NPS</i>	Nagel-Patella-Syndrom
<i>N-Terminus</i>	Aminoterminus
<i>OD</i>	optische Dichte
<i>ORF</i>	kodierende Sequenz eines Gens („open reading frame“)
<i>p50</i>	eine mögliche Untereinheit von NF- κ B-Dimeren
<i>p52</i>	eine mögliche Untereinheit von NF- κ B-Dimeren
<i>p65</i>	eine mögliche Untereinheit von NF- κ B-Dimeren
<i>p100</i>	eine mögliche Untereinheit von NF- κ B-Dimeren
<i>p105</i>	eine mögliche Untereinheit von NF- κ B-Dimeren
<i>P</i>	Pellet
<i>PAGE</i>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>PBS</i>	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphate-buffered saline“)
<i>PCR</i>	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
<i>PEG</i>	Polyethylenglykol
<i>PI3K</i>	Phosphatidylinositol-3-Kinase
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>PMSF</i>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>PVDF</i>	Polyvinylidendifluorid
<i>RAI</i>	RelA-assoziierter Inhibitor
<i>RHD</i>	Rel homology domain
<i>RLIM</i>	RING finger LIM-domain-binding protein
<i>RNA</i>	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
<i>RNAi</i>	RNA interference
<i>RNase</i>	Ribonuklease
<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
<i>rRNA</i>	Ribosomale RNA
<i>RT</i>	reverse Transkriptase
<i>RT-qPCR</i>	reverse Transkriptase-quantitative PCR
<i>S9</i>	Ribosomales Protein der 30S-Untereinheit
<i>Scl-siRNA</i>	unspezifische siRNA (scrambled)

SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulphate“)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese
siRNA	kurzes doppelsträngiges RNA-Stück („small interfering RNA“)
sog.	sogenannt
STAT	signal transducer and activator of transcription
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris/Azetat/EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBST	Tris-buffered saline-Tween
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
tetO	Tetrazyklin-Operator
TLR	Toll-like Rezeptor
T _M	Schmelztemperatur
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer-RNA
tTA	Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator
U	Unit (internationale Enzymeinheit)
Ü	Überstand
ü.N.	Über Nacht
UV-Licht	ultraviolettes Licht
VEGF	vascular endothelial growth factor
v:v	Verhältnis Volumen zu Volumen
WB	Western-Blot
WT1	Wilms Tumor 1
w:v	Verhältnis Gewicht zu Volumen

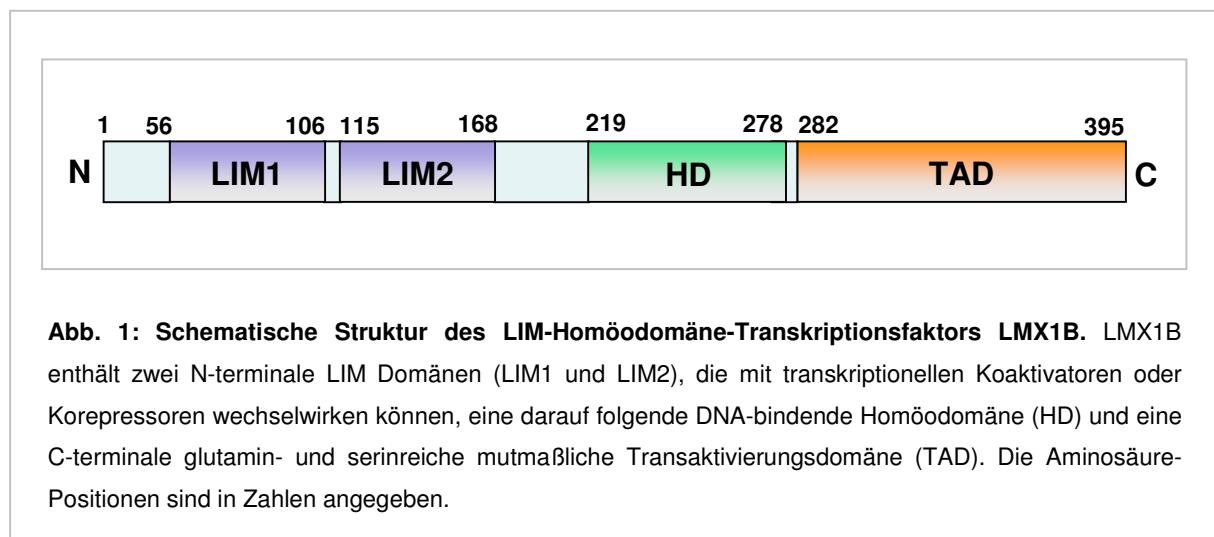
1. Einleitung

1.1 Der LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor LMX1B

1.1.1 Struktur von LMX1B

Bei LMX1B handelt es sich um ein Mitglied der LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren, (LIM-HD-Transkriptionsfaktoren), welche die Expression von Genen regulieren, die Körperbauplan und Zelldifferenzierung während der Entwicklung bestimmen [Curtis und Heilig, 1998]. Dabei gehört LMX1B zur LMX-Gruppe, eine der sechs Subgruppen in die die LIM-Homöodomäne-Proteine unterteilt werden, zu der auch Lmx1 (Huhn), Lmx1.2 (Hamster), Lmx1b (Maus) und Lim6 (*Caenorhabditis elegans*) zu zählen sind [Horbert und Westphal, 2000].

Das *LMX1B*-Gen besteht aus 8 Exonen, welche in ein ~7 kb großes Transkript umgeschrieben werden und für ein 395 Aminosäuren, bzw. durch alternatives Spleissen in ein um 7 Aminosäuren größeres Protein kodieren [Seri et al., 1999]. Dieses besitzt aminoterminal zwei proteinbindende LIM Domänen (LIM1 aus 51 Aminosäuren und LIM2 aus 54 Aminosäuren), eine DNA-bindende Homöodomäne (63 Aminosäuren) in der Mitte des Proteins und eine am Karboxyterminus gelegene glutamin- und serinreiche postulierte transkriptionelle Aktivatordomäne [McIntosh et al., 2005] (s. Abb. 1).



Die Abkürzung LIM leitet sich hierbei von den ersten Buchstaben der Proteine Lin-11 (*C.elegans*), Isl-1 (Ratte) und Mec-3 (*C.elegans*), in denen die LIM Domänen zuerst identifiziert wurden, ab. Neben diesen drei Transkriptionsfaktoren, die wichtig für die

Ontogenese sind [Freyd et al., 1990; Karlsson et al., 1990; Way und Chalfie, 1988], gehören mittlerweile auch zahlreiche andere Proteine zu der Familie der LIM-Proteine, wie zum Beispiel Protoonkogen-Produkte oder Zytoskelett-Proteine. All diesen Proteinen ist die cysteinreiche Konsensussequenz Cys-X₂-Cys-X₁₆₋₂₃-His-X₂-Cys-X₂-Cys-X₂-Cys-X₁₆₋₂₁-Cys-X₂-Cys/His/Asp gemein [Freyd et al., 1990]. Hierbei handelt es sich um eine Zink-bindende Struktur, die zwei Zinkfinger-ähnliche Module ausbildet [Michelsen et al., 1992] und essentiell für die Stabilisierung der Sekundär- und Tertiärstruktur der LIM Domäne ist. Im Gegensatz zu klassischen Zinkfingern können LIM Domänen nicht an DNA binden, sondern vermitteln Protein-Protein Interaktionen [Dawid et al., 1995]. An die LIM Domänen können folglich transkriptionelle Aktivatoren als auch Repressoren binden, wodurch sowohl die Aktivität des LIM-Homöodomänen Transkriptionsfaktors LMX1B reguliert werden kann [Rétaux und Bachy, 2002].

Bei der Homöodomäne handelt es sich um ein hochkonserviertes, etwa 63 Aminosäuren langes Strukturmotiv, welches die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen innerhalb von Zielgenen vermittelt. Der Name stammt von den homöotischen Genen des Hox-Clusters von *Drosophila melanogaster*, bei denen diese Domäne zum ersten Mal entdeckt wurde, wobei diese Gene für die Identität von Körperstrukturen und für die Kontrolle des Grundbauplans des Embryos verantwortlich sind [McGinnis et al., 1984]. Die Homöodomäne besteht aus drei α -Helices und einem verlängerten aminoterminalen Arm, wobei der C-terminale Teil der Domäne mit der zweiten und dritten Helix ein Helix-turn-helix-Motiv ausbildet. Folglich lagert sich die dritte, C-terminale, Helix an die große DNA-Furche an und ist zum größten Teil an den Protein-DNA-Kontakten beteiligt. In die kleine Furche tritt der N-terminale Abschnitt der Homöodomäne in Kontakt zur DNA [Gehring et al., 1994]. Bei der Erkennungssequenz der Mehrheit der identifizierten Homöodomänen handelt es sich um adenin- und thyminreiche Motive [Gehring et al., 1994], wobei für LMX1B mit Hilfe von EMSAs („electrophoretic mobility shift assays“) auch eine Bindung an diese sogenannten FLAT-Elemente (FLAT-E: TAATTA; FLAT-F: TTAATA) festgestellt werden konnte [German et al., 1992; Dreyer et al., 1998].

Die Transaktivierungsdomäne von Transkriptionsfaktoren tritt in Wechselwirkung mit der basalen Transkriptionsmaschinerie, wodurch die Transkription stimuliert wird. Entweder geschieht dies über die direkte Bindung an den Präinitiationskomplex oder indirekt mit Hilfe zwischengeschalteter Koaktivatoren. Transaktivierungsdomänen sind häufig durch einen erhöhten Anteil repetitiver Aminosäuresequenzen charakterisiert. Anhand dieser werden sie in glutamin-, serin/threonin- bzw. prolinreiche sowie saure Transaktivierungsdomänen untergliedert [Seipert et., 1992].

1.1.2 Funktion von LMX1B

A Funktion von LMX1B im Menschen: Nagel-Patella Syndrom (NPS)

Beim Nagel-Patella-Syndrom (MIM#161200), auch bekannt als hereditäre Onychoosteodysplasie (HOOD), Fong-Syndrom, Arthroonychodyplasie oder Turner-Kieser-Syndrom, handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung mit hoher Penetranz und variabler Expressivität. 1997 wurde der Lokus für das mutierte Gen auf einen 1-2 cM langen Bereich auf dem Chromosom 9q34 eingegrenzt, welcher gekoppelt mit dem ABO-Lokus vererbt wird [McIntosh et al., 1997]. Die Identifizierung des *LMX1B*-Gens auf Chromosom 9q34 führte dazu, dass Mutationen im *LMX1B*-Gen erstmals für das Nagel-Patella-Syndrom verantwortlich gemacht werden konnten [Chen et al., 1998; Dreyer et al., 1998; Iannotti et al., 1997]. Aufgrund dessen wurde die Funktion von LMX1B erstmals näher analysiert. Bis heute wurden mehr als 137 Mutationen im *LMX1B*-Gen bei NPS-Patienten beschrieben [Lin et al., 2008], wobei für den pathogenetischen Wirkmechanismus der Mutationen Haploinsuffizienz vermutet wird [Dreyer et al., 2000]. Es kommen sowohl Basenaustausche (Missense- und Nonsense-Mutationen) als auch Deletionen, Insertionen, Translokationen und verschiedene Spleißvarianten vor [Dunston et al., 2004; Hamlington et al., 2000; Clough et al., 1999; Seri et al., 1999]. Die identifizierten Mutationen treten hauptsächlich in den LIM Domänen (zu 44% in LIM1 und 38% in LIM2) sowie mit geringerer Häufigkeit in der Homöodomäne (18%) von LMX1B auf [Sato et al., 2005]. Hierbei handelt es sich überwiegend um Missense-Mutationen, die in der Homöodomäne dazu führen, dass LMX1B nicht mehr an die DNA von Zielgenen binden kann [McIntosh et al., 1998]. In den LIM Domänen bewirken die Mutationen die Zerstörung der Zinkfinger-Struktur, welche für die Bindung anderer Interaktionspartner benötigt wird [Bongers et al., 2002]. Dies unterstreicht sowohl die Rolle von LMX1B als Transkriptionsfaktor als auch die Bedeutung von mit den LIM Domänen interagierenden Kofaktoren für dessen Funktionalität.

Das Nagel-Patella-Syndrom tritt mit einer Prävalenz von ungefähr 1 pro 50.000 Lebendgeburten weltweit auf und wird üblicherweise im Kindesalter diagnostiziert [Bongers et al., 2002; Sweeney et al., 2003]. Die klinischen Symptome von NPS sind äußerst variabel in Häufigkeit und Schweregrad, dabei treten auch starke Schwankungen der Krankheitsausprägung innerhalb einzelner Familien auf [McIntosh et al., 2005]. Zu den typischen Charakteristika zählen dysplastische oder hypoplastische Fingernägel (90-98%), seltener auch Fußnägel, sowie Aplasien und Hypoplasien der Patellen (74-92%). Außerdem treten Skeletanomalien auf, wie z.B. Exostosen im Bereich der Darmbeinschaufeln, die als Beckenhörner bezeichnet werden (70-80%), oder Fehlbildungen im Bereich des Ellenbogens durch Radiusköpfchenluxation (70-90%), oder Hand- und Fußdeformationen. Neben diesen

Anomalien des Skelettsystems, bei denen Knochen, Sehnen, Bänder und Muskeln gleichermaßen betroffen sein können, werden auch gastrointestinale, neurologische, vasomotorische und okulare Symptome, wie z.B. in Form eines primären Offenwinkelglaukoms (50%), beschrieben. Die schwerwiegendste Ausprägung der Krankheit betrifft jedoch die Nieren, wie sie bei etwa 40% der Patienten auftritt. Erste Anzeichen einer solchen renalen Beteiligung sind Proteinurie mit oder ohne Hämaturie. Bei etwa 10% der Patienten kann sich die Nierensymptomatik bis zum chronischen Nierenversagen entwickeln [Granata et al., 2008]. Dafür sind vor allem Defekte der GBM als eine der Hauptursachen anzusehen [Sweeney et al., 2003]. So zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen eine unnatürlich verdickte glomeruläre Basalmembran, die sowohl mit irregulären Ablagerungen von Kollagenfibrillen-ähnlichem Material als auch mit an Mottenfraß erinnernden Aufhellungen einhergeht. Lichtmikroskopische Befunde wie eine Glomerulosklerose und Proteinzyylinder in den Tubuli sind eher unspezifischer Natur [del Pozo und Lapp, 1970; Ben-Bassat et al., 1971]. Des Weiteren können Verluste der podozytären Fußfortsätze und der Schlitzmembran beobachtet werden [Granata et al., 2008]. All diese strukturellen Veränderungen sind es, die zur Erscheinung von Protein- und Hämaturie führen, da sie eine höheren Durchlässigkeit des glomerulären Filters in der Niere für Proteine und korpuskuläre Blutbestandteile nach sich ziehen.

B Funktion von LMX1B in der Maus: *Lmx1b*-Knockout Modelle

Da der Phänotyp von Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom dem der *Lmx1b*-Knockout-Maus ähnelt, war mit der Generierung einer *Lmx1b*-Knockout-Maus die Möglichkeit gegeben, die Funktion von LMX1B und seiner Rolle während der Ontogenese näher charakterisieren zu können. Beim Menschen führt ein heterozygoter Genotyp bezüglich *LMX1B* zu den Krankheitssymptomen des Nagel-Patella-Syndroms, heterozygote Mäuse hingegen entwickeln keinen Phänotyp, was im Gegensatz zur dominanten Vererbung des Menschen steht [Rohr et al., 2002]. Es konnte gezeigt werden, dass LMX1B an vielen entwicklungsspezifischen Vorgängen beteiligt ist und in einer Vielzahl von Geweben, darunter Gliedmaßen, Niere, Auge und zentralem Nervensystem produziert wird [Hunter und Rhodes, 2005; McIntosh et al., 2005]. Am Lehrstuhl von Prof. Dr. Ralph Witzgall liegt speziell die Funktion von LMX1B in der Niere im Fokus des Interesses, weshalb im Folgenden detaillierter darauf eingegangen wird.

Die Niere ist in funktionelle Untereinheiten, die sogenannten Nephrene unterteilt, in denen der Harn gebildet wird. Ein Nephron selbst besteht aus einem Nierenkörperchen und einem daran angeschlossenen, unverzweigten Nierentubulus. Dieser Tubulusapparat mündet in ein Sammelrohr, das den gebildeten Harn in das Nierenbecken leitet. Ein Nierenkörperchen,

auch Malpighi-Körperchen genannt, setzt sich aus Bowman-Kapsel mit innerem und äußerem Blatt, Glomerulus (Kapillarknäuel) und Mesangium zusammen. Das innere Blatt besteht aus den sog. Podozyten und liegt dem Glomerulus, welches das zu filtrierende Blut führt und sich in die Bowman-Kapsel einstülpt, auf [Übersicht der Nierenstruktur in Sobotta und Welsch, 2003]. Der glomeruläre Filter, den das Ultrafiltrat passiert, besteht aus den drei folgenden Komponenten: dem fenestrierten Endothel der Glomeruluskapillaren, einer glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten.

Die Endothelporen der Glomeruluskapillaren besitzen einen Durchmesser von 70-100 nm, wobei unklar ist, ob die Poren von einem Diaphragma ausgekleidet werden [Rostgaard und Qvortrup, 2002]. Auf der Oberfläche der Endothelzellen befindet sich eine negativ geladene Glykokalix, für die eine Rolle für die Ladungsselektivität diskutiert wird [Jeansson und Haraldsson, 2005].

Die glomeruläre Basalmembran, bestehend aus einem 300-500 nm dichten Kollagen- und Laminin-Maschenwerk, bildet einen größenselektiven Filter für die meisten Serumproteine [Huber, 2008]. Die Hauptbestandteile dieser extrazellulären Matrix sind Kollagen vom Typ IV [Desjardins und Bendayan, 1991], Proteoglykane [Groffen et al., 1997], Laminin [Hansen und Abrass, 1999] und Nidogen/Entactin [Katz et al., 1991]. Dabei wirken die negativ geladenen Proteoglykane in der GBM zusätzlich als Barriere für anionische Proteine [Huber, 2008].

Die Podozyten, auch als glomeruläre viszerale Epithelzellen bezeichnet, besitzen einen voluminösen Zellkörper, der in den Kapselraum hineinragt und von dem mehrere kräftige Primärfortsätze abzweigen. Diese teilen sich wiederum in zahlreiche Sekundärfortsätze, die sog. Fußfortsätze, auf. Während der Zellkörper und die Primärfortsätze nicht mit der GBM in Kontakt treten, sind die Fußfortsätze direkt auf der GBM verankert und interdigitieren mit den Fußfortsätzen anderer Podozyten. Auf diese Weise bilden die Fußfortsätze der Podozyten ein dichtes Netzwerk um die Kapillarschlingen des Glomerulus [Pavenstädt et al., 2003]. Die 30-40 nm breiten Spalten zwischen den Fußfortsätzen nennt man Filtrationsschlüsse, welche basal von einer dünnen extrazellulären Proteinschicht, der sog. Schlitzmembran, überspannt werden. Die lumrale Seite der Membran ist von einer stark negativ geladenen Glykokalix überzogen, die in hoher Konzentration das Sialoglykoprotein Podocalyxin enthält [Kerjaschki et al., 1984]. Podozyten sind für die Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere und die Entstehung von Nierenerkrankungen von entscheidender Bedeutung [Huber und Benzing, 2005].

Die Schlitzmembran ist ein spezialisierter Zell-Zell-Kontakt und besitzt strukturelle

Homologien zu epithelialen Zellverbindungen [Kurihara et al., 1992; Schnabel et al., 1990]. Mittlerweile konnten einige Proteine identifiziert werden, die essentiell für die Funktion und die molekulare Struktur der Membran sind. Das erste Protein, dessen Lokalisation an der Schlitzmembran gezeigt wurde, war ZO-1 [Schnabel et al., 1990]. Später folgten weitere Proteine: P-Cadherin, FAT, Nephrin, CD2AP, Podocin und Neph1-3 [Donoviel et al., 2003; Inoue et al., 2001; Reiser et al., 2000; Roselli et al., 2002; Sellin et al., 2003; Shih et al., 1999].

In der Niere wird *Lmx1b* ab dem embryonalen Tag 13,5 in den S-förmigen Körpern exprimiert, aus welchen der spätere Glomerulus entsteht. Im Gegensatz zu einer vorübergehenden Expression bei der Gliedmaßenentwicklung bleibt die LMX1B-Synthese in der Niere auch postnatal bestehen und scheint auf die Podozyten beschränkt zu sein. Ein Ausschalten der Expression in *Lmx1b*^{-/-}-Mäusen führt zu einer starken Veränderung der Ultrastruktur der glomerulären Basalmembran sowie der Podozyten und gleichen somit den ultrastrukturellen Anomalien, wie sie für Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom beschrieben wurden [Chen et al., 1998]. Als mutmaßliche Zielgene von *Lmx1b* wurden mit Hilfe der *Lmx1b*-Knockout-Mäuse die Gene für Kollagen IV α 3 und Kollagen IV α 4, Podocin und CD2AP [Morello et al., 2001; Miner et al., 2002; Rohr et al., 2002] identifiziert, bei denen es sich wie bereits erwähnt um Proteine handelt, die an der Formation der Filtrationsbarriere der Niere beteiligt sind. Es wurde vermutet, dass deren Expression durch Bindung von LMX1B an FLAT-Elemente im Promotor oder Enhancer dieser Gene kontrolliert wird [Morello et al., 2001; Miner et al., 2002]. Da hingegen in Nierenbiopsien von Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom keine Beeinträchtigung der Synthese von Podocin, Kollagen IV α 3 und IV α 4 oder CD2AP festgestellt werden konnte [Heidet et al., 2003], liegt hier eine wesentliche Diskrepanz zwischen den Befunden bei Mensch und Maus vor.

Neben dieser maßgeblichen Funktion von LMX1B in den Podozyten konnte gezeigt werden, dass *Lmx1b* in den Gliedmaßenanlagen ab dem embryonalen Tag 8,5 exprimiert [Cygan et al., 1997] und für die Spezifikation dorsaler Strukturen wie Nägel und Patellen benötigt wird [Chen et al., 1998]. Die Beteiligung von LMX1B an der dorsoventralen Musterbildung und Entwicklung von Gliedmaßen wird ebenfalls durch den Phänotyp der Knockout-Maus unterstrichen. So zeigen *Lmx1b*^{-/-}-Mäuse eine Abwesenheit von dorsalen Gliedmaßenstrukturen und eine Verdopplung von ventralen Strukturen [Chen et al., 1998]. Ein Verlust des LMX1B-Gradienten entlang der dorsoventralen Achse während der Extremitätenausbildung erklärt in diesem Zusammenhang auch die skelettalen Symptome bei NPS-Patienten [Dreyer et al., 2000].

Lmx1b wird auch im sich entwickelnden Auge exprimiert und erklärt somit ein weiteres Symptom der Knockout-Maus [Pressmann et al., 2000]. Während der Entwicklung des Auges wird *Lmx1b* im periokularen Mesenchym synthetisiert, woraus die spätere Sklera und Hornhaut entstehen. Für die Sklera sind in der Knockout-Maus zwar keine phänotypischen Veränderungen festzustellen, in der Hornhaut hingegen ist eine abnorme Ausbildung der Kollagenfibrillen sowie das Fehlen des Keratinsulfat-Proteoglykans Keratocan zu beobachten. Im Trabekelwerk des Auges wird *Lmx1b* ebenfalls exprimiert, jedoch konnten daraus mögliche resultierende Anomalien in diesem Gewebe aufgrund der kurzen Lebensspanne der Knockout-Maus nicht untersucht werden. Die Beobachtungen bei der Knockout-Maus lassen darauf schließen, dass *Lmx1b* ein essentieller Regulator der Morphogenese der vorderen Augenabschnitte ist. Zusätzlich sprechen diese Befunde für eine direkte Beteiligung von *LMX1B* an der Entstehung von Glaukomen bei Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom [Pressmann et al., 2000].

Des Weiteren wird bei der Maus *Lmx1b* in der Hirnanlage sowie im dorsalen Rückenmark am embryonalen Tag 11,5 exprimiert [Chen et al., 1998]. Mit Hilfe dieser Daten konnte *Lmx1b* eine Beteiligung an der Entwicklung des mesenzephalen dopaminergen Systems [Smidt et al., 2000; Asbreuk et al., 2002] sowie eine Beteiligung an der Entwicklung serotonerger Neuronen des Kleinhirns [Cheng et al., 2003; Ding et al., 2003] zugewiesen werden. Durch diese und weitere Erkenntnisse über *Lmx1b* können sich verschiedene neuronale Symptome wie vermindertes Schmerzempfinden der Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom erklären lassen [Dunston et al., 2005].

1.1.3 Transkriptionsregulation durch LMX1B

Über die molekulare Funktionsweise von LMX1B ist bisher noch wenig bekannt. LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren können, wie bereits erwähnt, über ihre LIM Domänen mit anderen Proteinen, sogenannten Kofaktoren, oder auch mit anderen Transkriptionsfaktoren in Wechselwirkung treten. Wird die Aktivierung der Gene durch die Transkriptionsfaktoren dadurch gesteigert, spricht man von Koaktivatoren, wird sie inhibiert, von Korepressoren. Hierbei unterscheidet man zwischen direkter Interaktion zweier Transkriptionsfaktoren und indirekter Interaktion durch ein vermittelndes Protein. Durch Kofaktoren können LIM-Homöodomäne-Proteine zu homomeren oder heteromeren Aktivierungskomplexen höherer Ordnung assoziieren. Bereits bekannte Interaktionspartner von LMX1B sind LDB1 („LIM-domain-binding protein 1“) [Agulnick et al., 1996], welches auch als CLIM2 („cofaktor of LIM 2“) [Bach et al., 1997] oder NLI („nuclear LIM interactor“) [Jurata et al., 1996] bekannt ist, sowie E47/Pan1 [Dreyer et al., 2000]. Eine Interaktion mit RLIM

(„RING finger LIM-domain binding protein“) wird vermutet [McIntosh et al., 2005].

Bei dem Protein LDB1 handelt es sich um ein Adaptorprotein, das sowohl im sich entwickelnden als auch im adulten Organismus an vielen Stellen synthetisiert wird. Ursprünglich wurde LDB1 als ein transkriptioneller Aktivator beschrieben [Bach et al., 1997]. LDB1 bindet als Homodimer an LIM Domänen von LIM-Homöodomäne-Proteinen [Aguilnick et al., 1996; Matthews und Visvader, 2003; Suleiman et al., 2006], wodurch diese mit anderen Transkriptionsfaktoren in Verbindung treten können. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass bei Mäusen durch die Bindung des Proteins Otx an Lmx1b über ein Ldb1-Homodimer es zu einer Aktivierung von Genen, die während der Embryogenese von Bedeutung sind, kommt [Bach et al., 1997]. Dreyer et al (2000) zeigten allerdings, dass LDB1 die Fähigkeit von LMX1B, ein Insulinpromotorkonstrukt der Ratte zu aktivieren, hemmen kann. Die Tatsache, dass jedoch zuvor Jurata und Gill (1997) diesen inhibierenden Einfluss von LDB1 auf LMX1B bei einem vergleichbaren Ansatz nicht feststellen konnten, lassen eine endgültige Schlussfolgerung noch nicht zu. Als Kofaktor von LMX1B ist LDB1 sehr gut vorstellbar, nachdem gezeigt werden konnte, dass *in vivo* LDB1 für die Funktion von Podozyten essentiell ist [Suleiman et al., 2006].

Eine Interaktion des Helix-Loop-Helix-Proteins E47/Pan1 mit der LIM2-Domäne von LMX1B führt zur Bildung eines Minienhancerkomplexes, der den Ratten-Insulinpromotor aktiviert [McIntosh et al., 1998; Johnson et al., 1997; German et al., 1992]. Die Bindung von LMX1B erfolgt hierbei an FLAT-Sequenzen des Insulinpromotors, gleichzeitig bindet E47/Pan1 an benachbarte FAR-Sequenzen des Promotors. LDB1-Komplexe können wiederum an LMX1B binden, wodurch die synergistische Aktivierung des Promotors durch LMX1B und E47/Pan1 inhibiert wird [Jurata und Gill, 1997; Dreyer et al., 2000]. Im Gegensatz zu LDB1 hat E47 keine entscheidende Funktion in Podozyten, wodurch E47 als potentieller Kofaktor von LMX1B in der Niere eher auszuschließen ist [Suleiman et al., 2006].

Ebenfalls konnte eine Bindung des Proteins RLIM an LIM Domänen von LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden, wobei es sich hierbei um einen negativ regulierenden Kofaktor von LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren handelt. Dies resultiert aus der Rekrutierung des Sin3/Histondeacetylase (HDAC)-Korepressor-Komplexes durch RLIM, was zur Senkung der Transkriptionsrate führt [Bach et al., 1999]. Ldb1-Komplexe können auch hier zur Inhibition beitragen. Ein anderer Mechanismus, durch den RLIM als Korepressor fungiert, ist die Ubiquitinierung von LDB1 und anderen Kofaktoren von LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren durch dessen Ubiquitinligase-Aktivität und der sich daraus ergebenden Degradierung dieser Proteine über den 26S-Proteasom-Weg [Ostendorff et al., 2002]. Die Kompetition von Kofaktoren um

Bindungsstellen an Transkriptionsfaktoren durch den beschriebenen kontrollierten Abbau von Kofaktoren könnte einen wichtigen generellen Mechanismus der Transkriptionsregulation darstellen.

Des Weiteren konnte das Protein RAI (RelA-assoziierter Inhibitor) in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System als potentieller Interaktionspartner von LMX1B identifiziert werden [Rohr, Dissertation in Vorbereitung]. RAI ist eine verkürzte Form des iASPP Proteins (iASPP/RAI), welches zur ASPP (Apoptose-stimulierende Proteine von p53)-Familie gehört [Liu et al, 2005] und hauptsächlich im Kern lokalisiert ist. RAI inhibiert die NF-κB-Aktivität, indem es mit der Bindung der p65-Untereinheit von NF-κB an die DNA durch direkte Protein-Protein-Interaktion interferiert [Yang et al., 1999; Trigiante und Lu, 2006]. Welche Rolle RAI möglicherweise bei der Regulierung der LMX1B Aktivität spielt, ist jedoch noch ungeklärt.

1.2 Der Transkriptionsfaktor NF-κB

Dieser Arbeit vorangegangene Experimente zeigten, dass Zielgene von NF-κB in LMX1B-exprimierenden HeLa-Zellen hochreguliert werden, wodurch eine mögliche Verbindung von LMX1B mit dem NF-κB-Signalweg identifiziert wurde [Neumann, 2009; Rascl et al., 2009a].

1.2.1 Struktur und Funktion von NF-κB

Der Transkriptionsfaktor NF-κB wird ubiquitär produziert und reguliert die Expression einer großen Anzahl von Genen, die zum Beispiel an Immunreaktionen, Zelladhäsion, Zellproliferation und Apoptose beteiligt sind [Pahl, 1999]. Anhand von verschiedenen Nephritis-Modellen konnte gezeigt werden, dass NF-κB auch bei einer Reihe von Nierenkrankheiten eine Rolle spielt [Guijarro und Egido, 2001].

Die NF-κB-Familie besteht in Säugern aus fünf Mitgliedern: NF-κB1 (p105/p50), NF-κB2 (p100/p52), RelA (p65), RelB and c-Rel. p105 und p100 werden als höhermolekulare Vorläufer synthetisiert, die posttranslational zu p50 bzw. p52 prozessiert werden. Allen Proteinen gemeinsam ist eine konservierte Rel-Homologie-Domäne (RHD), RelA, RelB und c-Rel besitzen eine zusätzliche Transkriptionsaktivierungs-Domäne. Die RHD enthält ein nukleäres Lokalisations-Signal (NLS) und ist sowohl an der Dimerisierung als auch an der DNA-Bindung beteiligt. NF-κB liegt immer als Homo- oder Heterodimer aus diesen Untereinheiten vor. Zum Beispiel wirken p50 und p52 Homodimere als Repressoren, während Dimere aus den Untereinheiten p65 oder c-Rel transkriptionelle Aktivatoren sind. RelB kann sowohl als Aktivator und als Repressor agieren [Bonizzi und Karin, 2004]. Das in den meisten Zelltypen am häufigsten vorkommende Dimer ist das Heterodimer aus p50 und

RelA (p65), welches seine Zielgene über den klassischen NF-κB-Signalweg aktiviert [Hoffmann et al., 2006]. Zu diesen gehören z.B. die Gene für IFN β [Hiscott et al., 1989], diverse Interleukine wie IL-6 [Libermann und Baltimore, 1990; Shimizu et al., 1990], IL-8 [Kunsch und Rosen, 1993] oder IL-1 β [Hiscott et al., 1993], Chemokine, andere Transkriptionsfaktoren, Immunrezeptoren, Enzyme und viele andere [Pahl, 1999]. Die Induktion der Aktivität von NF-κB p50/p65 erfolgt ebenso durch eine große Anzahl von verschiedenen Stimuli. Darunter befinden sich Bakterien und Viren, Wachstumsfaktoren und Hormone, Mitogene und Chemikalien [Pahl, 1999].

In den meisten Zelltypen liegen die NF-κB-Dimere inaktiv im Zytoplasma an eines der Mitglieder der IκB- („inhibitor of κB“) Familie gebunden vor. Zu diesen Inhibitoren gehören IκB α , IκB β , IκB γ , IκB ϵ und BCL3 [Chen und Greene, 2004], die an die RHD von NF-κB binden und somit das nukleäre Lokalisations-Signal verdecken. Beim klassischen p50/p65-abhängigen NF-κB-Signalweg (Abbildung 2a) wird durch den entsprechenden Stimulus, wie z.B. durch den Tumornekrose Faktor α (TNF- α), der an seinen Rezeptor TNFR bindet, IκB durch den IκB-Kinase (IKK)-Komplex aus IKK α , IKK β und IKK γ phosphoryliert. Dadurch wird IκB von der Ubiquitin-Ligase-Maschinerie erkannt, polyubiquitiniert und schließlich vom 26S-Proteasom abgebaut. Das ungebundene NF-κB-Dimer kann nun über das nicht mehr verdeckte nukleäre Lokalisations-Signal in den Zellkern wandern und dort mit spezifischen DNA-Sequenzen im Promotor oder Enhancer seiner Zielgene interagieren [Bonizzi und Karin, 2004].

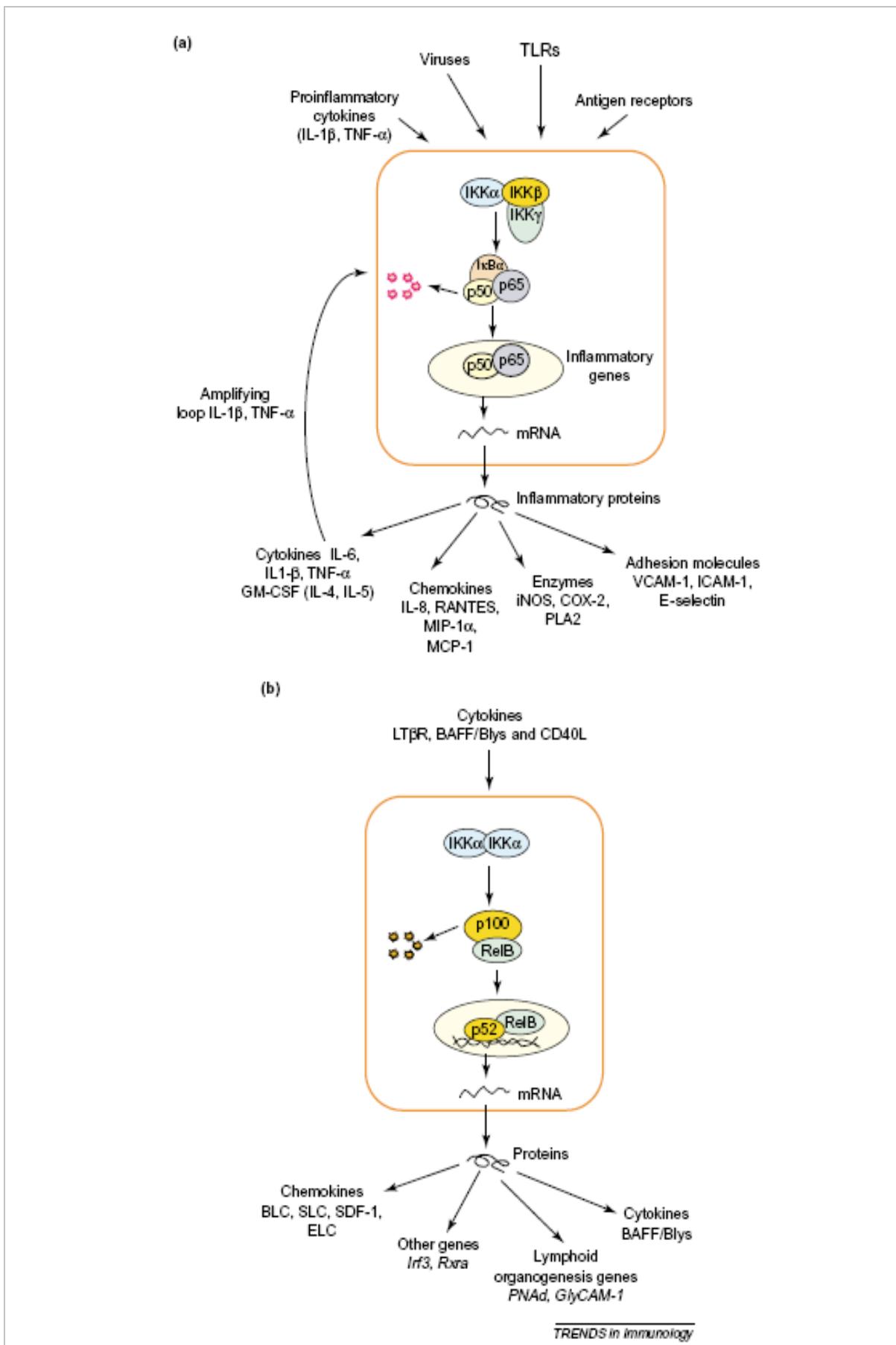


Abb. 2: Klassischer und alternativer NF-κB-Signalweg. (a) Klassischer Signalweg: Durch eine große Anzahl an Signalen von außerhalb der Zelle wird der Signalweg aktiviert, wodurch IκB-Kinasen (IKKs) aktiviert werden, die IκB α phosphorylieren. Dieses wird nach Ubiquitylierung im Proteasom abgebaut, das ungebundene NF-κB p50/p65-Dimer wandert in den Kern und aktiviert spezifische Zielgene. (b) Alternativer Signalweg: Signale von außerhalb der Zelle stimulieren spezifisch die IκB-Kinase α , wodurch das NF-κB p52/RelB-Dimer freigesetzt wird und in den Kern wandern kann, um spezifische Gene zu aktivieren. Abkürzungen: BAFF = B-Zellen aktivierender Faktor aus der TNF-Familie, BLC = B-lymphocytechemoattractant, CC = Chemokin, CD40L = CD40 Ligand, COX-2 = Cyclooxygenase-2, ELC = Epstein-Barr-Virus induziertes Molekül, GM-CSF = Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, ICAM-1 = interzelluläres Adhäsionsmolekül-1, IKK = IκB-Kinase, IL-1 β = Interleukin-1 β , iNOS = induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, LT = Lymphotoxin, MCP-1 = Monozyten-chemotaktisches Protein 1, MIP-1 α = Makrophagen inflammatorisches Protein 1 α , NIK = NF-κB-induzierte Kinase, PLA2 = Phospholipase A2, TLR = Toll-ähnliche Rezeptoren, SDF-1 = Stromazellen abgeleiteter Faktor 1, SLC = sekundäres Lymphgewebe Chemokin, TNF- α = Tumornekrose Faktor α , VCAM = vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1 [Bonizzi und Karin, 2004].

Neben dem klassischen NF-κB-Signalweg existiert ein alternativer Signalweg (Abbildung 2b), der ebenfalls die Translokation von NF-κB-Dimeren in den Zellkern bewirkt und wahrscheinlich in sekundären lymphatischen Organen eine Rolle spielt. Der alternative Signalweg ist strikt abhängig von IKK α Homodimeren [Sentleben et al., 2001] und wird aktiviert durch Lymphotoxine, wie z.B. Lymphotoxin α/β (LT α/β). Dadurch wird NFκB2/p100 durch den IKK α -Komplex phosphoryliert, was entscheidend für die Prozessierung des p100-Vorläufers zu p52 ist. Nachdem die inhibitorische C-terminale Hälfte von p100 abgebaut wird, kann das NF-κB-Dimer, welches beim alternativen Signalweg sich meist aus p52 und RelB zusammensetzt, in den Kern wandern und seine Zielgene aktivieren oder reprimieren [Bonizzi und Karin, 2004].

1.2.2 Transkriptionsregulation durch NF-κB

Die große Anzahl der Gene, die durch NF-κB reguliert werden, lässt sich durch die Bildung unterschiedlicher Homo- und Heterodimerkombinationen der NF-κB-Untereinheiten, welche wiederum unterschiedliche Bindeaffinitäten an verschiedenen Promoterbereichen aufweisen, begründen [Hoffmann et al., 2006]. Die Konsensus DNA-Sequenzen, an die sie binden, setzen sich aus der Sequenz GGGRNWYYCC (R: Purin; N: irgendein Nukleotid; W: Adenin oder Thymin; Y: Pyrimidin) zusammen [Hoffmann et al., 2006]. Röntgenstrukturanalysen konnten zeigen, dass die NF-κB-Dimere die DNA in einer schmetterlingsähnlichen Struktur umschließen, wobei eine flexible Linker-Region die DNA-bindende und die Dimerisierungsdomäne verbindet [Huxford et al., 1998]. Aus diesen Befunden ergab sich interessanterweise, dass der Austausch einzelner Nukleotide innerhalb der NF-κB-Erkennungssequenz durch konformationelle Umlagerung eine Rekrutierung

unterschiedlicher Kofaktoren erlaubt [Saccani et al., 2001; Leung et al., 2004] und somit eine Art von allosterischer Modifikation der Transkriptionsfaktor-Spezifität bedingt.

Die Transkription der NF-κB-Zielgene wird neben der Dimer/DNA-Wechselwirkung ausschlaggebend durch die Interaktion von NF-κB mit Kofaktoren oder durch posttranskriptionale Modifikationen von NF-κB reguliert [Chen und Greene, 2003]. So agieren IκB-Proteine zum Beispiel nicht nur als Inhibitoren von NF-κB, sondern fungieren selektiv zugleich auch als Kofaktoren mit verschiedenen NF-κB-Dimeren [Hayden und Gosh, 2008]. Modifikationen der NF-κB-Untereinheiten, wie Phosphorylierung, Acetylierung oder Ubiquitinylierung sind weitere Regulations-Mechanismen der NF-κB-Aktivität. Hierbei am besten untersucht sind Modifikationen der p65-Untereinheit. So muss NF-κB p65 an einigen Serinresten phosphoryliert werden, um ein Transaktivierungspotential zu besitzen [Vermeulen et al., 2002]. Von besonderer Bedeutung ist hierbei Serin-276, welches unter Beteiligung der PKA oder der MSK-1 phosphoryliert werden kann und dadurch sowohl die DNA-Bindungs- als auch die Dimerisierungs-Eigenschaften von p65 beeinflusst [Zhong et al., 1998 ; Vermeulen et al., 2003]. Die Phosphorylierung an Serin-276 führt zusätzlich dazu, dass p65 besser an die Histonacetyltransferase CBP, einen seiner Kofaktoren, binden kann [Zhong et al., 1998]. Auch reversible Acetylierungen an p65 regulieren die NF-κB-Aktivität und dessen Fähigkeit, mit verschiedenen Koaktivatoren und/oder Korepressoren interagieren zu können [Chen und Greene, 2003]. Die Histonacetyltransferasen CBP und p300 acetylieren p65 an verschiedenen Lysinresten, wodurch die DNA-Bindung und Transaktivierungsaktivität gesteigert wird und eine Reassoziation von NF-κB p65 mit neu synthetisiertem IκB verhindert. Histondeacetylasen (HDAC) spalten die Acetylreste ab und lösen einen erhöhten Rücktransport von NF-κB ins Zytosol aus [Chen et al., 2002]. Eine Modifikation von NF-κB p65 durch Ubiquitinylierung führt zur Degradierung durch das Proteasom. Dadurch wird der NF-κB-Effekt beendet [Saccani et al., 2004]. Vermittelt wird die Ubiquitinylierung durch SOCS-1 („suppressor of cytokine signaling“), als Gegenspieler fungiert Pin-1, was eine Steigerung der NF-κB-Aktivität bewirkt. Pin-1 inhibiert die Interaktion von p65 mit IκB, wodurch die nukleäre Lokalisation von p65 gefördert und dessen Stabilität gesteigert wird [Ryo et al., 2003; Schmitz et al., 2004].

1.3 Zielsetzung

LMX1B ist ein LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor, der an der Entwicklung und der Funktion von vielen Geweben, wie zum Beispiel von zentralem Nervensystem, Auge oder auch von Extremitäten oder der Niere beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass beim Menschen heterozygote Mutationen in *LMX1B* zu den Krankheitssymptomen des Nagel-Patella-Syndroms führen. Bis dato ist jedoch kaum etwas über die molekulare Wirkungsweise von LMX1B bekannt und es wurden auch nur wenige mutmaßliche Zielgene von LMX1B identifiziert.

In der Arbeitsgruppe wurde ein experimentelles Zellsystem entwickelt, welches es ermöglicht, LMX1B regulierbar in HeLa-Zellen produzieren zu können. Durch Inkubation der Zellen mit Tetrazyklin bzw. dessen Analogon Dozyzyklin wird in dem hier verwendeten sogenannten Tet-off-System die Synthese von LMX1B inhibiert, während sie durch Auswaschen des Antibiotikums induziert werden kann. So konnte in Vorarbeiten mit Hilfe dieses HeLa-Zellsystems und RT-qPCR-Analysen gezeigt werden, dass in LMX1B-synthetisierenden Zellen einige NF-κB-Zielgene wie *IL6*, *IL8*, *IL1B* und *IFNB1* (kodieren für IL-6, IL-8, IL-1β und IFN-β) induziert sind und dass wiederum die Synthese von IFNβ zur Induktion vieler Interferon-stimulierter Gene (ISGs) in einer Sekundärantwort führt [Neumann, 2009; Raschle et al., 2009a]. Da nicht jedes Gen, sondern nur eine Gruppe von NF-κB-Zielgenen, wie die für IL-6, IL-8, IL-1β und IFNβ kodierenden durch LMX1B aktiviert werden, soll in diesem Zusammenhang erwähnt werden, dass in der vorliegenden Arbeit die letzteren gemeint sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekularen Mechanismen, durch die LMX1B die Transkription der NF-κB-Zielgene reguliert, aufzuklären. Ob an der transkriptionellen Regulierung dieser Gene sowohl LMX1B als auch NF-κB direkt beteiligt sind, war eine zentrale Frage, die mit der Methode der RNA-Interferenz und durch Genexpressions-Analysen anhand von RT-qPCRs untersucht werden sollte. Um die Funktionsweise des Transkriptionsfaktors LMX1B näher charakterisieren zu können, wurde mit Hilfe von Luciferase Reporter Assays analysiert, welche Domänen von LMX1B und welche regulatorischen DNA-Elemente für die Aktivierung des NF-κB-Zielgens *IL6* essentiell sind.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
Acidofix Fixierer	Agfa
38% Acrylamid/2% Bisacrylamid	Roth
Acrylamid 4 K Lösung	AppliChem
Agarose	Biozym
Aprotinin	Serva
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
Ampicillin	Serva
Bacto-Agar	Becton Dickinson
Bacto-Hefeextrakt	Becton Dickinson
Bacto-Trypton	Becton Dickinson
Roti®-Quant	Roth
Brij® 97	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Chloroform/Isoamylalkohol	Roth
Coomassie Brilliant Blau G 250	Serva
Coomassie Brilliant Blau R 250	Serva
DEAE-Dextran	Sigma
Desoxyukosidtriphosphat (dNTPs)	Fermentas
Dimethylsulfoxid (> 99%)	Sigma
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l)	PAA
Doxozyklin	PAA
Entwickler Eukobrom (Entwickler für Röntgenfilme bei Western-Blots)	TETENAL AG & CO. KG
Essigsäure	Merck
Ethanol	J. T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA
Formaldehyd	J. T. Baker
Geneticin (G418)	Invitrogen

Glukose	Merck
Glyzerin	Merck
Glycin	Roth
Harnstoff	Merck
4-(2-Hydroxethyl)piperazine-1-ethansulfon-Säure (HEPES)	Fluka
Hygromycin	Invitrogen
Immersol™518F: Immersionsöl zum Mikroskopieren	Carl Zeiss
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol (2-Propanol)	Merck
JSH-23 (4-Methyl-N ¹ -(3-phenylpropyl)benzen-1,2-diamin)	Calbiochem
Kaliumchlorid	Applichem
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Lambda DNA/ <i>Hind</i> III Marker; Φ X174 DNA/ <i>Bsu</i> RI (<i>Haell</i>)-Marker	Fermentas
2x Lämmli-Probenpuffer	Bio-Rad
Leupeptin	Roth
Lipofectamine™ 2000 Transfektionsreagenz	Invitrogen
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma
Lysozym	Biomol
Magermilchpulver	Sucofin
Magnesiumchlorid für die PCR	Qiagen
Magnesiumsulfat p.A.	Merck
β -Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Fluka
Natriumazetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid p.A.	Merck
Natriumdodecylsulfat	Sigma
NaOH-Pellets	Merck
Natronlauge	Merck
Oridonin, <i>R rubescens</i>	Calbiochem
10x PCR-Puffer	Qiagen
Phenol	Roth
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
Phenylmethansulfonsäurefluorid	Sigma
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England BioLabs
Puromycin	PAA

Rinder-Serum-Albumin (BSA)	Sigma
RNase A	Serva
RNase Dekontaminations Spray	Mercury
Roti-Phenol/C/I (Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol)	Roth
Saccharose	Merck
Salzsäure	Merck
Schwefelsäure	Merck
SYBR Green 1 Nucleic Acid Gel Stain	Roche Applied Science
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	Immunotools
Tris	Roth
Triton X-100	Merck
Trypsin-EDTA	PAA
Tween 20	Serva

Alle weiteren Substanzen wurden von der Firma Merck, Darmstadt in p.a. Qualität bezogen.

2.1.2 Enzyme

Die entsprechenden 10x Puffer und Reaktionszusätze wurden jeweils bei den entsprechenden Firmen mitbestellt.

A Restriktionsendonukleasen

Enzym	Hersteller
<i>Ase</i> I: 10 U/ μ l	New England BioLabs
<i>AwN</i> I: 10 U/ μ l	New England BioLabs
<i>Bam</i> H I: 20 U/ μ l	New England BioLabs
<i>Bgl</i> II: 10 U/ μ l	New England BioLabs
<i>Bsg</i> I: 3 U/ μ l	New England BioLabs
<i>Dpn</i> I: 20 U/ μ l	New England BioLabs
<i>Eco</i> 147 I: 10 U/ μ l	Fermentas
<i>Eco</i> R I: 10 U/ μ l	Fermentas
<i>Hind</i> III: 10 U/ μ l	Fermentas
<i>Nhe</i> I: 10 U/ μ l	New England BioLabs
<i>Xho</i> I: 10 U/ μ l	Fermentas

B DNA und RNA modifizierende Enzyme

Enzym	Hersteller
Klenow DNA Polymerase: 5 U/µl	New England BioLabs
T4 DNA Polymerase: 3 U/µl	New England BioLabs
T4 DNA Ligase : 400 U/µl	New England BioLabs
BAP (Bacterial alkaline phosphatase): 150 U/µl	Invitrogen
<i>Pfu</i> -DNA Polymerase: 2,5 U/µl	Fermentas
RNase A (lyophilisiert) → 1 µg/µl in H ₂ O lösen	Serva

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
0,1 ml-Röhrchen in 4er Streifen mit Deckel	Corbett Research
0,2 ml-Reaktionsgefäße	Biostep
1,5 ml-Reaktionsgefäße	Sarstedt
15 ml-Röhrchen	Sarstedt
50 ml-Röhrchen	Sarstedt
Autoklavierband	VWR
Chromatographie Papier „3MM Chr“	Whatmann
Deckgläschchen aus Glas: 12 mm Durchmesser (rund)	VWR
Deckgläschchen aus Glas: 24 x 60 cm	Roth
Einfrierröhrchen	VWR international
Film-Kassetten: Universal 100 (35,6 x 43,2 cm) mit Verstärkerfolie und blau emittierend EK 100 (für Röntgenfilme bei der Entwicklung von Western-Blots)	rego
Fluoreszenzmarker	Stratagene
Gewebekulturflaschen	Greiner bio-one
Gewebekulturplatten	Greiner bio-one
Gewebekulturschalen	Greiner bio-one
Glasobjektträger (76 x 26 cm)	R. Langenbrinck
Glaswaren/Plastikwaren: Flaschen, Kulturkolben etc.	Roth
Handschuhe Latex	Kimberley-Clark
Handschuhe Nitril	Roth
Haushaltstücher	Fripa
Klarsichtfolien (klar)	Leitz/Durable
Kosmetik-Tücher	Kimberley-Clark
Küvetten (Plastik) für Electroporator 2510: E.coli®PulserCuvette	Bio-Rad

Küvetten 100 (Plastik) (10 x 4 x 45 mm) für Spektralphotometer „U-2000“; 1 ml (Proteinbestimmung und OD-Messungen)	Sarstedt
Neubauer-Zählkammer mit Deckglas: 0,100 mm Tiefe / 0,0025 mm ²	BRAND
Papierfilter	Schleicher & Schüll
Parafilm	American National Can
Pasteurpipetten	BRAND
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt
PVDF-Membran: 0,45 µm Porengröße Immobilon-P Transfermembran	Millipore
Röntgenfilme: Fuji Medical X-Ray FILM 100 NIF 18 cm x 24 cm und 35 cm x 43 cm	gfh
Serologische Pipetten	Sarstedt
Spritzen (steril)	Braun
Sterilfilter (0,22 µm)	VWR
Western Lightning Chemoluminiscece Reagent	Perkin Elmer
Zellkulturbedarf: T75- und T25-Filterflaschen; P10-, P6- und P3-Schalen; 24-Loch-, 6-Loch- und 96-Loch-Platten	Sarstedt
Zell-Schaber	Sarstedt
Zentrifugenbecher aus Plastik für Kühlzentrifuge „Sigma 3K20“ (20 ml)	Beckman Coulter GmbH
Zentrifugenbecher aus Plastik mit Schraubverschluss (250 ml) für Kühlzentrifuge „Sorvall Superspeed RC2-B“ mit Rotor GSA	Beckman Coulter GmbH

2.1.4 Geräte und Instrumente

Gerät/Instrument	Hersteller
Autoklav „Systec 5050 ELV“	Systec
Autoklav Vakuklav® 30-B	Mela
Agarose-Gelelektrophorese Dokumentationssystem „Gel Max“	Intas
Agarose-Gelelektrophorese Midisystem „Easy-Cast“	Owl Scientific
Agarose-Gelelektrophorese Minisystem „Horizon 58“	GIBCO BRL
Bunsenbrenner	Usbeck
Centro XS3 LB 960 Mikroplatten Luminometer	Berthold Technologies
CMV-E: Dreharm für Eppendorf-Cups	Fröbel Labortechnik GmbH
Drehrad für Eppendorf-Cups	Werkstatt der Univ. Rbgg. NWF III

DMC 2-Kamera (für Fluoreszenzmikroskop-Axioskop)	Polaroid
Echtzeit-Thermocycler „Rotorgene™3000“	Corbett Research
Eismaschine AF-10	Scotsman
Electroporator: Gene Pulser Xcell™Electroporation System	Bio-Rad
Feinwaage „Mettler H10w“	Mettler
Flüssigstickstofftank: ARPEGE TP 100	Air Liquide
Fluoreszenzmikroskop „Axioskop“	Zeiss
Gefrierschränke -20 °C	Privileg
Gefrierschränke -80 °C „Herafreeze“	Heraeus
Heizblock „VLM LS 1“	VLM
Heizplatten mit Magnetrührer „MR 3001“	Heidolph
Inkubationsschrank „Kelvitron t“	Heraeus
Inkubationsschüttler „Unitron“	Infors
Konfokalmikroskop: LSM 510 Meta	Zeiss
Kühlschränke	Privileg
Kühlzentrifuge „Avanti® J-26 XP“ mit Rotor	Beckman Coulter
Kühlzentrifuge „Multifuge 3 L-R“ mit Rotor Ch. 2454	Heraeus
Kühlzentrifuge „Sigma 3K20“ mit Rotor Nr. 12154 oder 12158	Braun
Kühlzentrifuge „Sorvall Superspeed RC2-B“ mit Rotor GSA	Sorval
„Mastercycler Gradient“	Eppendorf
Mikroskop: Nikon Eclipse TS 100	Nikon
Mikrowelle „Privileg 8018 E“	Privileg
pH-Meter „766 Calimatic“	Knick
Pipetten	RAININ
Quarzküvette QS 1.000 (schwarz; 100 µl, Schichtdicke und Zentrum jeweils 10 mm) für Spektralphotometer „U-2000“	Hellma
Scanner DUOSCAN f40	Agfa
Schüttler für SDS-Gele und Western-Blot-Membranen	Heidolph
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System „SE 600 Series für Elektrophoresis Unit“ (14 cm x 12 cm x 1,5 mm)	Hoefer
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System (8 cm x 4 cm x 0,75 mm oder 1 mm): Mini Protean® II Electrophoresis Cell	Bio-Rad
Spannungsgeber „PS 608 Elektrophoresis Power Supply“	GIBCO BRL
Spannungsgeber „Standard Power Pack P25“	Biometra
Spektralphotometer „U-2000“	Hitachi
Thermo-Cycler „MyCycler“	Bio-Rad
Thermomixer 5436 für Eppendorf-Cups	Eppendorf

Tischzentrifuge „Biofuge pico“ mit Rotor Sorvall 3329	Heraeus
Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad
Vortexer „Vortex-Genie 2“	Scientific Industries
Waage „BL 1500 S“	Sartorius
Wasseraufbereitungsanlage „Seralpur PRO 90 CN“	Seral
Western-Transferkammer „TE 62“ (Tank-Blotting)	Hoefer
Zellkulturarbeitsbank: Heraeus Lamin Air HA 2448 GS	Heraeus
Zellkultur-Brutschrank APT.line™CB	Binder

2.1.5 Software

A Programme

Programm	Verwendungszweck	Firma
Adobe Photoshop	Digitale Bildbearbeitung	Adobe Systems Incorporated
File Maker Pro 6	Institutseigene Datenbanken	FileMaker, Inc.
Image Pro Express	Bildaufnahme-Programm am Fluoreszenz- mikroskop Axioskop 200(M) mit DMC 2-Kamera	Media Cybernetics
Microsoft Excel	Diagramme, Berechnungen und Tabellen	Microsoft
Microsoft Word	Textverarbeitung	Microsoft
Primer Express 2.0	Errechnung von Schmelz-Temperaturen bei der Konzipierung von Primern	Applied Biosystems
Rotor-Gene 6	Echtzeit-PCR Analysen-Software	Qiagen (ehemals Corbett)
Vector NTI	Sequenzanalysen-Software	Invitrogen

B Internetdatenbanken

Internetdatenbank	Verwendungszweck
NCBI	Quelle für cDNA-, mRNA- sowie Aminosäuresequenzen und für den Vergleich von 2 DNA Sequenzen
Pubmed	Literaturrecherche
Swissprot	Quelle für Aminosäuresequenzen

2.1.6 Kits

Kits	Hersteller	Katalognummer
CompactPrep Plasmid Midi Kit	Qiagen	12843
DNA Extraction Kit	Fermentas	K0513
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega	E910
GeneElute™HP Plasmid Midiprep Kit	Sigma	NA0200-1KT
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas	K0502
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad	170-8897
NucleoSpin® RNA II	Macherey-Nagel	74095550
Silencer® siRNA Construction Kit	Ambion	AM1620
Western Lightning Chemiluminescence Reagent	Perkin Elmer	NEL100001EA
Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System	Promega	A7640

2.1.7 Antikörper

Tab. 1: Primärantikörper - Immunzytochemie: IC / Western-Blot: WB

Name	Immunogen/Epitop	Spezies	Verdünnung	Anwendung	Quelle
anti-Aktin	Aktin, alpha1 (α -Aktin)	Kaninchen, polyklonal	1:5.000	WB	Sigma (A2066)
anti-LMX1B	AS 322-395 von hLMX1B	Maus, monoklonal Klon 193-67 (Hybridom)	1:10	WB	Daniel Heudobler; Suleiman et al., 2007
HDAC1	AS 467-482 von Maus-HDAC1	Maus, monoklonal Klon 2E10 (Hybridom)	1:1.000	WB	Millipore (05-100) (ehemals Upstate 05-614)
NF- κ B p65	Peptid am C-Terminus von humanem NF- κ B p65	Kaninchen, polyklonal (aufgereinigtes Serum)	1:1.000	WB, IC	Santa Cruz Biotech (sc_372)

Tab. 2: Sekundärantikörper - Immunzytochemie: IC / Western-Blot: WB

Name	Immunogen/Epitop	Spezies	Verdünnung	Anwendung	Quelle
Cy3-Ziege-anti-Maus IgG	Erkennung der schweren und leichten Ketten von IgG-Immunglobulinen aus der Maus	Ziege, polyklonal	1:300	IC	Jackson Immuno Research/Dianova

FITC-Ziege-anti-Kaninchen IgG	Erkennung von IgG-Immunglobulinen (gesamtes Molekül) aus Kaninchen	Ziege, polyklonal	1:200	IC	ICN Biomedicals
FITC-Ziege-anti-Maus IgG	Erkennung von IgG-Immunglobulinen (gesamtes Molekül) aus der Maus	Ziege, polyklonal	1:200	IC	ICN Biomedicals
Cy3-Ziege-anti-Kaninchen IgG	Erkennung der schweren und leichten Ketten von IgG-Immunglobulinen aus Kaninchen	Ziege, polyklonal	1:400	IC	Jackson Immuno Research/Dianova
HRP-Ziege-anti-Maus IgG	Erkennung von IgG-Immunglobulinen (G1, G2a/b und G3) aus der Maus sowie den Fab-Fragmenten von Maus IgG-Immunglobulinen; ebenfalls Erkennung von IgA-, IgM- und IgE-Immunglobulinen aus der Maus	Ziege, polyklonal	1:10.000	WB	Sigma
HRP-Ziege-anti-Kaninchen IgG	Erkennung von IgG-Immunglobulinen (gesamtes Molekül) aus Kaninchen	Ziege, polyklonal	1:20.000	WB	Sigma

2.1.8 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) und Metabion (Martinsried) bezogen.

Tab. 3: Echtzeit-PCR Oligonukleotide. In der Echtzeit-PCR verwendete Oligonukleotide für humane mRNAs. T_m , Schmelztemperatur berechnet mit PrimerExpress Software (Applied Biosystems). "F" steht für "Forward" und "R" für "Reverse"

Name	Sequenz (5' nach 3')	T_m [°C]
hG1P3 F1	GCAGAACGGCGGTATCGCTT	59,0
hG1P3 R1	TCTTACCTGCCTCCACCCCC	58,5
hIFN- β F1	TCAGAACGCTCCTGTGGCAATT	58,5
hIFN- β R1	GTTCATCCTGTCCTTGAGGCA	58,7
hI κ B- α F1	CTGTGATCCTGAGCTCCGAGA	59,1
hI κ B- α R1	GGGTGGTGCAGGACTGAGTC	59,1
hIL-1 β F1	CCTGAGCTGCCAGTGAAA	58,7
hIL-1 β R1	CAGAGGTCCAGGTCTGGAA	58,7
hIL-6 F1	CTGCGCAGCTTAAGGAGTTC	58,0

hIL-6 R1	CTGAGGTGCCCATGCTACATT	58,7
hIL-8 F1	CTGCAGCTCTGTGTGAAGGTG	58,3
hIL-8 R1	TCTGTGTTGGCGCAGTGTG	59,0
hISG15 F1	GCTGGTGGTGGACAAATGC	58,5
hISG15 R1	CGGCCCTGTTATTCCCTCAC	58,1
hLamA/C F	TGCGTACGGCTCTCATCACT	59,5
hLamA/C R	CTCGTCGTCCCTAACACAGT	58,8
hLMX1B F7	GTGTGAACGGCAGCTACGC	59,1
hLMX1B R7	TCATCCTCGCTCTCACGG	58,5
hNF-κB p50 F1	GGCTACACCGAAGCAATTGAA	58,8
hNF-κB p50 R1	GAGTGGGCCTGAGAGGTGG	59,2
hNF-κB p65 F1	GATCTGCCGAGTGAACCGA	58,3
hNF-κB p65 R1	GATCTCATCCCCACCGAGG	58,8
hPKD2 F2	GGAAAGCAGCACTAACCGAGA	58,2
hPKD2 R2	GCCGTAGGTCAAGATGCACA	58,3

Tab. 4: Mutagenese-PCR Oligonukleotide. In der Mutagenese-PCR (2.2.2 E) verwendete Oligonukleotide zur Generierung von Konstrukten (2.1.9). TM: Schmelztemperatur berechnet mit PrimerExpress Software (Applied Biosystems). "F", "up" stehen für "Forward" und "R", "low" für "Reverse"

Name	Sequenz (5' nach 3')	TM [°C]
FLATmut_F	CGTCACATTGCACAATCTCGAGAAGGTTCCAATCAGCCC	79,0
FLATmut_R	GGGCTGATTGGAAACCTCTCGAGATTGTGCAATGTGACG	79,0
LMX1B (C95F) up	GCCAAGTGCAGCGGCTTCATGGAGAAGATGCC	74,5
LMX1B (C95F) low	GGCGATCTTCTCCATGAAGCCGCTGCACTTGGC	74,5
LMX1B (A213P) up	CAGCGAAGAGCCTCAAGCCCTCCTCGAGGTCTCGT	75,0
LMX1B (A213P) low	ACGAGACCTCGAAGGAGGGCTTGAAGGCTTCGCTG	75,0
LMX1B (H54L)_F1	GTCAACGAGTCGTCCTGGCTCGAGGAGTGTTCGAGT	80,0
LMX1B (H54L)_R1	ACTGCAAACACTCCTCGAGCCAGGACGACTCGTTGAC	80,0

Tab. 5: siRNA Templates. Verwendete Oligonukleotide für die siRNA Herstellung (2.2.4 E) mittels Silencer® siRNA Construction Kit (Ambion). „AS“ steht für „Antisense“ und „S“ für „Sense“

Name	Sequenz (5' nach 3')	Referenz
siNF-κB-p65 (1)-AS	AAGATTGAGGAGAACGTAACCTGTCTC	Lee et al., 2007
siNF-κB-p65 (1)-S	AATTTACGTTCTCCTCAATCCCTGTCTC	
siNF-κB-p65 (2)-AS	AAGCCCTATCCCTTACGTACCTGTCTC	Takaesu et al., 2003
siNF-κB-p65 (2)-S	AATGACGTAAAGGGATAGGGCCCTGTCTC	und Guo et al., 2004

2.1.9 Vektoren

Tab. 6: Vektoren.

Vektor	Größe (kbp)	Selektionsmarker	Beschreibung	Quelle
pcDNA3	5,4	Amp	enthält CMV-, T7- und Sp6-Promotoren sowie das Neomycin-Resistenzgen	Invitrogen
pUHD10-3	3,15	Amp	enthält einen tTA-abhängigen CMV-Minimal-Promotor	H. Bujard (ZMBH, Heidelberg)
IL-6P.wt-Luc	6,04	Amp	enthält humanen Wildtyp IL-6 Promotor, gekoppelt an das <i>Firefly</i> -Luciferase Reporter Gen aus <i>Photinus pyralis</i>	p1168hIL6P-Luc+ (BCCM/LMBP Plasmid Bibliothek: 4495)
IL-6P.NF-κB-Luc	5,63	Amp	enthält humanen IL-6 Promotor mit mutiertem NF-κB-Bindungsmotiv, gekoppelt an das <i>Firefly</i> -Luciferase Reporter Gen aus <i>Photinus pyralis</i>	p1168hIL6mNFκB-luc+ (BCCM/LMBP Plasmid Bibliothek: 4496)
(NF-κB) ₄ -Luc	5,0	Amp	enthält das <i>Firefly</i> -Luciferase Gen aus <i>Photinus pyralis</i> sowie 4 Kopien des NF-κB-Bindungsmotivs, gekoppelt an eine TATA Promotor Region des Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Promotors	pNFκB-Luc (Clontech)
pRL-null	3,32	Amp	Co-Reporter zur internen Kontrolle, enthält <i>Renilla</i> -Luciferase Gen aus <i>Renilla reniformis</i> , ohne Promotor	Promega
p3M/LMX1B	6,79	Amp	Volllängen-LMX1B kloniert in den Vektor p3M; p3M steht für den pcDNA3-Vektor, der zusätzlich eine für das c-Myc-Epitop kodierende Sequenz enthält	Daniel Heudobler

pUHD10-3/myc-LMX1B (C95F)	4,36	Amp	Austausch von Cystein gegen Phenylalanin an Position 95 in LMX1B im Vektor pUHD10-3/ Myc-LMX1B mittels Mutagenese	Jürgen Kastner
p3M/LMX1B-C95F	6,79	Amp	Austausch von Cystein gegen Phenylalanin an Position 95 in LMX1B im Vektor p3M/LMX1B mittels Mutagenese	diese Arbeit
p3M/LMX1B-A213P	6,79	Amp	Austausch von Alanin gegen Prolin an Position 213 in LMX1B im Vektor p3M/LMX1B mittels Mutagenese	diese Arbeit
p3M/LMX1B-H54L	6,79	Amp	Austausch von Histidin gegen Leucin an Position 54 in LMX1B im Vektor p3M/LMX1B mittels Mutagenese	diese Arbeit
p3M/LMX1B-H54L-C95F	6,79	Amp	Austausch von Histidin gegen Leucin an Position 54 in LMX1B im Vektor p3M/LMX1B-C95F mittels Mutagenese	diese Arbeit
IL-6P.FLAT-Luc	5,63	Amp	Mutagenese des FLAT Elements an Position -146 (relativ zum Transkriptionsstart) durch Insertion einer <i>Xho</i> I-Schnittstelle im Vektor IL-6P.wt-Luc mittels Mutagenese	diese Arbeit
IL-6P.FLAT.NF-κB-Luc	5,63	Amp	Mutagenese des FLAT Elements an Position -146 (relativ zum Transkriptionsstart) durch Insertion einer <i>Xho</i> I-Schnittstelle im Vektor IL-6P.NF-κB-Luc mittels Mutagenese	diese Arbeit
ΔIL-6P-Luc	4,83	Amp	der vollständige humane IL-6 Promotor wurde mittels der <i>Hind</i> III-Schnittstelle aus dem Vektor IL-6P.wt-Luc herausgeschnitten	diese Arbeit

2.1.10 Zellen

A Bakterienstämme

Name	Referenz
DH5 α	Stratagene
DH10B TM	Invitrogen
XL1-Blue	Stratagene

B Säuger-Zelllinien

Name	Beschreibung	Quelle/Referenz
HtTA-1	HeLa-Zellen mit konstitutiver Synthese des Tetrazyklin-Transaktivators (tTA) [Gossen und Bujard, 1992]	H.Bujard (ZMBH Heidelberg)
HtTA-1/myc-LMX1B-Wildtyp	HeLa-Zellen, die unter Verwendung des Tet-off-Systems (s. 2.2.4 A) induzierbar das LMX1B Protein synthetisieren	Claudia Rohr (Universitätsklinikum Innere Medizin III, Heidelberg)
HtTA-1/myc-LMX1B-C95F	HeLa-Zellen, die unter Verwendung des Tet-off-Systems (s. 2.2.4 A) induzierbar die LMX1B-C95F Mutante synthetisieren	Jürgen Kastner (Dissertation, 2009)
HtTA-1Ferritin	HeLa-Zellen, die unter Verwendung des Tet-off-Systems (s. 2.2.4 A) induzierbar die H-Kette des humanen Ferritins synthetisieren	Paolo Santambrogio (San Raffaele Scientific Institute, Abteilung für biologische und technologische Forschung, Italien)

2.1.11 Medien, Lösungen, Puffer

A DNA-Klonierung

Medien, Lösungen, Puffer	Zusammensetzung
Alkali-SDS-Lösung	0,2 M NaOH/1% SDS
GTE-Puffer	50 mM Glucose 25 mM Tris pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0
Kaliumazetat-Lösung	5 M Kaliumazetat mit 5 M Essigsäure auf pH 4,8 einstellen.
L-Broth (LB)-Medium (Ausubel et al., 2007)	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl Mit H ₂ O auf 1 l auffüllen, autoklavieren. Für die Anfertigung von LB _{Amp} -Agarplatten wurden zusätzlich 15 g Bacto-Agar vor dem Autoklavieren zugegeben. Ampicillin, mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml, wurde erst nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50°C hinzugefügt.
5x Stopp-Puffer (DNA Agarose-Gel)	0,125% Bromphenolblau 15% Ficoll 400

	50 mM EDTA pH 8,0
	0,5% SDS
50x TAE-Puffer	2 M Tris
	0,1 M EDTA
	Mit Essigsäure auf pH 8,0 einstellen.
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,4
	1 mM EDTA pH 8,0
TSS-Puffer	10% PEG
	5% DMSO
	25 mM MgSO ₄
	Mit LB-Medium zum Endvolumen auffüllen und steril filtrieren.

B Protein-Isolierung

Medien, Lösungen, Puffer	Zusammensetzung
Brij [®] -Lysepuffer	10 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 2 mM EDTA pH 8,0 0,875% Brij [®] 97 0,125% Nonidet P40 Protease-Inhibitoren vor Gebrauch frisch zugeben: 10 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Leupeptin 0,5 mM PMSF
Coomassie-Lösung	Zuerst 100 mg Coomassie Brillant Blau G 250 in 50 ml Ethanol (95%) lösen, dann 100 ml Phosphorsäure (85%) zugeben und mit H ₂ O auf 1 l auffüllen.
PLB-Puffer	Lyse-Puffer von der Firma Promega
Puffer A (für zytosolische Extrakte)	10 mM Hepes pH 7,9 10 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂ 0,625% Nonidet P40 frisch zu Puffer A zugeben Protease-Inhibitoren vor Gebrauch frisch zugeben: 1 mM DTT 10 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Leupeptin 0,5 mM PMSF
Puffer C (für Kernextrakte)	20 mM Hepes pH 7,9 10% Glyzerin 0,4 M KCl

0,4% Triton X-100
5 mM EDTA pH 8,5

C SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Medien, Lösungen, Puffer	Zusammensetzung
10x Laufpuffer	0,25 M Tris 1,9 M Glyzin 1% SDS
4x Lower Tris	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4% SDS
4x Upper Tris	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% SDS
5x SDS-Probenpuffer	625 mM Tris pH 6,7 50% Glyzerin 12,5% SDS 12,5% β -Mercaptoethanol 0,05% Bromphenolblau
Trenngel	7 ml 4x Lower Tris 6,5 ml - 18,7 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid mit H ₂ O auf 28 ml auffüllen 16 μ l TEMED 78 μ l 10% APS
Sammelgel	2,5 ml 4x Upper Tris 1,3 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid 6,1 ml H ₂ O 10 μ l TEMED 50 μ l 10% APS

D Western-Blotting

Medien, Lösungen, Puffer	Zusammensetzung
10x PBS	1,4 M NaCl 100 mM K ₂ HPO ₄ Mit 100 mM KH ₂ PO ₄ auf pH 7,5 titrieren.
Transferpuffer	50 mM Tris 384 mM Glyzin 20% Methanol 0,01% SDS

Blocklösung	5% Magermilchpulver 0,5% Tween 20 1x PBS
Waschlösung	0,5% Tween 20 1x PBS

E Immunzytochemie

Medien, Lösungen, Puffer	Zusammensetzung
4% Paraformaldehyd in 1x PBS (pH 7,4)	4% Paraformaldehyd 1x PBS Zuerst 4 g Paraformaldehyd in 90 ml H ₂ O mit 4 Tropfen 1M NaOH unter Rühren und Erhitzen lösen. Dann 10 ml 10x PBS zugeben und abkühlen lassen. Nach Abfiltration mit 1 M HCl auf pH 7,4 einstellen.
Blockierungslösung	2% BSA 1x PBS 0,1% Triton X-100
Eindecklösung	40% Glyzerin 1x PBS Vor Gebrauch sterilfiltrieren.
Hochsalz-PBS	1,6% NaCl 1x PBS

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Bakterien

A Lagerung und Kultivierung von Bakterien

Die Arbeiten mit Bakterien wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Lösungen und Materialien wurden bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Lösungen mit hitzeempfindlichen Komponenten wurden sterilfiltriert.

Durchführung

Zur Anzucht von Bakterien wurde eine Stammkultur in Glyzerin (bei -80°C gelagert) verwendet, die gleichzeitig der Konservierung von Bakterien diente. Diese Stammkultur setzt sich zusammen aus 300 µl 100%igem Glyzerin und 600 µl einer bakteriellen Übernacht-

kultur, wobei diese bei 37°C und 250 rpm inkubiert wurde. Folgende Konzentrationen der entsprechenden Antibiotika für die verwendeten Bakterienstämme enthielt eine angeimpfte Kultur aus der Stammkultur:

Antibiotika	Konzentration
Ampicillin	500 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml
Kanamycin	30 µg/ml
Tetrazyklin	12 µg/ml

B Herstellung kompetenter Zellen

Zur Durchführung einer chemischen Transformation wurden chemisch kompetente Zellen von DH5 α -Bakterien nach dem TSS-Protokoll (Chung et al., 1989) hergestellt.

Durchführung

Ausgehend von einer Übernachtkultur, angeimpft aus einer Stammkultur, wurde dieser Bakterienstamm in frisches LB-Medium überimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei einer optischen Dichte zwischen 0,4 bis 0,5 wurden die Bakterien 15 Minuten auf Eis gestellt und anschließend für 10 Minuten bei 2.500 rpm (Multifuge 3L-R mit Rotor Ch. 2454) und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1/10 des ursprünglichen Kulturvolumen in eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert. Die so erhaltenen Zellen wurden entweder direkt in eine Transformation (2.2.1 E) eingesetzt oder als 200 µl-Aliquots bei -80°C weggefroren.

Zur Durchführung einer Transformation durch Elektroporation wurden elektrokompetente Zellen von DH10B-Bakterien hergestellt.

Durchführung

Ausgehend von einer Übernachtkultur, angeimpft aus einer Stammkultur, wurde dieser Bakterienstamm in 500 ml frischem LB-Medium ohne Antibiotikum zu einer Anfangs-OD von 0,1 angeimpft. Danach wurden die Bakterien bei 30°C und 250 rpm inkubiert, bis eine OD von 0,6 erreicht wurde. Anschließend wurden 50 ml-Aliquots der Bakteriensuspension für 30 Minuten auf Eis gestellt, woraufhin ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 4.000 rpm (Multifuge 3L-R mit Rotor Ch. 2454) und 4°C folgte. Die Pellets wurden in je 50 ml eiskaltem H₂O resuspendiert, 15 Minuten auf Eis gestellt und erneut unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Dies wurde noch zwei weitere Male durchgeführt, wobei die Pellets zuerst in 20 ml und schließlich in 10 ml eiskaltem H₂O resuspendiert wurden. Es erfolgte ein letzter

Inkubationsschritt für 15 Minuten auf Eis mit anschließendem 10-minütigem Zentrifugationsschritt bei 4.000 rpm (Multifuge 3L-R mit Rotor Ch. 2454) und 4°C. Nachdem die Bakterien in 1 ml eiskaltem H₂O resuspendiert wurden, wurden sie in 100 µl-Aliquots aufgeteilt und entweder direkt in eine Elektroporation (2.2.1. C) eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

C Transformation von Bakterien

TSS-Protokoll (Chung et al., 1989; Hanahan et al., 1983)

Durchführung

Ein bis 2 µl einer Plasmid-DNA oder 5 bis 10 µl eines Ligationsansatzes wurden zu 200 µl kompetenten DH5 α Zellen gegeben und 30 Minuten auf Eis gestellt. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden und eine weitere Inkubation auf Eis für 2 Minuten. Dann wurde die Bakteriensuspension mit 800 µl LB-Medium vermischt und zur Regenerierung 45 Minuten lang im Inkubator bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurde die Suspension für 5 Sekunden bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge Biofuge pico mit Rotor Sorvall 3329) abzentrifugiert, 700 µl des Überstands verworfen und das Pellet im Restmedium resuspendiert. Die Bakterien-Suspension wurde schließlich auf einer Agarplatte, die das geeignete Antibiotikum zur Selektion enthielt, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Elektroporation

Durchführung

10 µl eines Ligationansatzes wurden bei RT für 45 Minuten gegen H₂O dialysiert (Membranfilter von Millipore, Porengröße: 0,025 µm). Dann wurden 5 µl der dialysierten DNA zu 100 µl kompetenten DH10B Zellen gegeben und in vorgekühlte 0,1 cm-Küvetten (Bio-Rad) überführt. Die Elektroporation fand bei RT und 2.500 V (Kapazität wird durch das Gerät festgelegt) statt. Dann wurde die Bakterien-Suspension mit 1 ml LB-Medium vermischt und zur Regenerierung 60 Minuten lang im Inkubator bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurde die Suspension für 5 Sekunden bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge „Biofuge pico“ mit Rotor Sorvall 3329) abzentrifugiert, 700 µl des Überstands verworfen und das Pellet im Restmedium resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde schließlich auf einer Agarplatte, die das geeignete Antibiotikum zur Selektion enthielt, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Arbeiten mit DNA

A Plasmid-DNA-Minipräparation aus *E. coli*

Für die Plasmid-DNA-Minipräparation wurden die Bakterien in 5 ml LB-Medium, mit entsprechender Ampicillin-Konzentration, über Nacht bei 37°C und 250 rpm angezogen. Zur Plasmid-Isolierung wurde der GeneJET™Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas verwendet.

Durchführung

Die 5 ml Übernachtkultur wurde 10 Minuten lang bei 4.000 rpm (Multifuge 3 L-R mit Rotor Ch. 2454) und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 250 µl Resuspendierungspuffer vollständig aufgenommen. Daraufhin wurden 250 µl Lysepuffer zugegeben, die Probe vorsichtig durch Schwenken gemischt, anschließend mit 350 µl Neutralisationslösung versetzt und erneut durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154) und 4°C wurde der Überstand abgenommen und auf eine mitgelieferte Säule überführt. Diese wurde unter gleichen Bedingungen wie zuvor für 1 Minute zentrifugiert und dann der Säulendurchfluss verworfen. Es folgten zwei Waschschritte mit Waschlösung bei RT. Um den restlichen Ethanol zu entfernen, wurde erneut für 1 Minute bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge „Biofuge pico“ mit Rotor Sorvall 3329) und RT zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 50 µl Elutionspuffer beladen und 2 Minuten lang bei RT inkubiert. Die DNA-Elution erfolgte schließlich durch einen 2-minütigen Zentrifugationsschritt bei RT. Nachfolgend wurde photometrisch Konzentration und Reinheit der DNA bestimmt (2.2.2 C).

B Plasmid-DNA-Midipräparation aus *E. coli*

Für die Plasmid-DNA-Midipräparation wurden die Bakterien in 100 ml LB-Medium, mit entsprechender Ampicillin-Konzentration, über Nacht bei 37°C und 250 rpm angezogen. Zur Plasmid-Isolierung wurde der CompactPrep Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen verwendet.

Durchführung

Die 100 ml Übernachtkultur wurde 15 Minuten lang bei 4.000 rpm (Multifuge 3 L-R mit Rotor Ch. 2454) und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde zunächst in 2 ml Resuspendierungspuffer vollständig aufgenommen, dann 2 ml des Lysepuffers zugegeben, beides durch vorsichtiges Schwenken vermischt und für 3 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml eines Neutralisationspuffers und vorsichtigem Vermischen der Probe wurde das Lysat nach einer 3-minütigen Inkubation filtriert, anschließend mit 2 ml eines

Bindepuffers versetzt und erneut vorsichtig vermischt. Diese Lösung wurde dann in ein mitgeliefertes Reaktionsgefäß überführt, das auf eine an ein Vakuumgestell montierte Säule gesteckt wurde, welche wiederum an eine Wasserstrahlpumpe gekoppelt war. Nachdem die DNA-haltige Lösung durch Aufdrehen des Vakuums durchgelaufen war, wurde die Säule in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß gesteckt und durch Zugabe von 0,7 ml einer Waschlösung und 1-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge „Biofuge pico“ mit Rotor Sorvall 3329) und RT gewaschen. Um den restlichen Waschpuffer zu entfernen, wurde der Durchfluss verworfen und erneut 1 Minute bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge „Biofuge pico“ mit Rotor Sorvall 3329) und RT zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA enthaltende Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 100 µl H₂O beladen und für 1 Minute bei RT inkubiert. Die DNA-Elution erfolgte schließlich durch einen 1-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge „Biofuge pico“ mit Rotor Sorvall 3329) und RT. Nachfolgend wurde photometrisch Konzentration und Reinheit der DNA bestimmt (2.2.2 C).

C Konzentrationsbestimmung von DNA

Vor der photometrischen Bestimmung wurde die DNA-Lösung mit H₂O 1:20 (v:v) verdünnt. Die Konzentration der gelösten DNA wurde dann in einem Spektralphotometer bei 260 nm gegen H₂O als Referenz gemessen. Eine OD von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm und einem Strahlengang von 10 mm entspricht dabei einer Konzentration von 0,05 µg/µl doppelsträngiger DNA. Die Konzentration der DNA in Lösung konnte daher folgendermaßen bestimmt werden:

$$c[\text{DNA}] = \text{OD}_{260} \times 20 \times 0,05 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Um die Reinheit der präparierten DNA zu überprüfen, wurde zusätzlich die OD bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Dies gibt Aufschluss über eine Verunreinigung der DNA mit Proteinen. Bei reiner DNA sollte der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

D Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Aufgrund ihres phosphathaltigen Rückgrats besitzen DNA-Moleküle eine negative Gesamtladung und erfahren deshalb in einem elektrischen Feld eine gerichtete Bewegung. Dieser Tatsache bedient man sich, um DNA-Fragmente in einem Agarose-Gel der Größe nach aufzutrennen. Es wurden Gele mit einem Agarosegehalt von 1% (w/v) verwendet.

Durchführung

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen (Heizplatte mit Magnetrührer) gelöst. Nach kurzzeitigem Abkühlen wurde Ethidiumbromid in einer End-

konzentration von 0,4 µg/ml zugegeben, die Lösung durch Schwenken vermischt und anschließend luftblasenfrei in die Gel-Apparatur gegossen. Nach Aushärtung des Gels wurden die Proben aufgetragen, die Elektrophorese erfolgte bei 150 V. Durch die Zugabe des interkalierenden Agens Ethidiumbromid konnten die Nukleinsäuren auf einem UV-Leuchtschirm sichtbar gemacht und photographiert werden. Im Vergleich mit Markerfragmenten bekannter Größe konnte dann die Größe der geladenen DNA bestimmt werden.

E Ortsspezifische Mutagenese

Zur gezielten Veränderung bestimmter DNA-Sequenzen innerhalb eines Gens wurde die Methode der ortsspezifischen Mutagenese verwendet. Dies erfolgte nach dem Protokoll des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene. Dabei wurde mit Hilfe der *Pfu*-DNA Polymerase das gesamte Matrizenplasmid vermehrt und gleichzeitig mittels zweier komplementärer Oligonukleotide (2.1.8), die die gewünschte Mutation enthielten, die veränderte Sequenz eingebaut. Die verwendeten Oligonukleotide waren hierbei so entworfen, dass eine erfolgreiche Mutagenese durch Restriktionsanalyse identifizierbar war.

Durchführung

Es wurden zunächst 50 ng des Ausgangsplasmids, 125 ng jedes Primers, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1 µl *Pfu*-DNA Polymerase (2,5 U/µl) und H₂O bis zum Endvolumen von 50 µl auf Eis zusammenpipettiert. Die Reaktion erfolgte nach folgenden Zyklusbedingungen:

Tab. 7: Reaktionsbedingungen der ortsspezifischen Mutagenese.

Anzahl der Zyklen	Zeit	Temperatur	Reaktionsschritt
1	30 Sekunden	95 °C	Denaturierung
16	30 Sekunden	95 °C	Denaturierung
	1 Minute	55 °C	Anlagerung der Primer
	12 Minuten	68 °C	Synthese
1	∞	4 °C	Lagerung

Im Anschluss an die Mutagenese wurde der Amplifikationsansatz mit 1 µl des Restriktionsenzyms *Dpn* I (20 U/µl) versetzt und 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Hierbei wurde das methylierte Ausgangsplasmid durch das methylierungsabhängige *Dpn* I abgebaut, während das mutierte, unmethylierte Syntheseprodukt erhalten blieb. 40 µl chemisch

kompetente DH10B Zellen wurden dann mit 10 µl der verdauten Reaktion transformiert (2.2.1 E). Nach Plasmid-DNA-Präparation (2.2.2 A/B) wurde der Erfolg der Mutagenese durch Restriktionsverdau (2.2.2 F) und anschließender Sequenzierung (2.2.2 G) überprüft.

F Restriktionsverdau von DNA

In der vorliegenden Arbeit wurde der Erfolg einer Mutagenese durch einen Restriktionsverdau überprüft. Um z.B. Punktmutationen in Plasmid-DNA einzubringen, wurde die Methode der ortsspezifischen Mutagenese (2.2.2. E) durchgeführt. Dabei enthielt die gewünschte Mutation zusätzlich entweder eine Sequenz, die im Gegensatz zur ursprünglichen nicht mehr von einer Restriktionsendonuklease erkannt und geschnitten werden kann, oder es wurde eine Erkennungsschnittstelle eingebracht, die in der Ursprungssequenz nicht vorhanden war.

Durchführung

Die Restriktionsendonukleasen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers in den mitgelieferten Puffern eingesetzt. Ein Reaktionsansatz enthielt 1/10 des Endvolumens an 10x Reaktionspuffer und 2 U des entsprechenden Enzyms pro µg in H₂O gelöster Plasmid-DNA. Dabei überschritt die eingesetzte Enzymmenge nie 10% des Endvolumens, so dass auch die Glyzerin-Endkonzentration nicht mehr als 5% war, um somit eine mögliche Staraktivität zu verhindern. Wenn vom Hersteller empfohlen, wurden Zusätze wie BSA noch hinzugefügt und letztendlich mit H₂O zum gewünschten Endvolumen aufgefüllt. Der Verdauansatz wurde dann bei einer für das Enzym optimalen Temperatur für zwei bis mehrere Stunden inkubiert. Anschließend wurde zur Kontrolle des Restriktionsverdaus eine Gelelektrophorese durchgeführt.

G DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung ist die Bestimmung der Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül und wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt. Hierfür wurden 50-100 ng/µl einer durch eine DNA-Midipräparation gereinigten Plasmid-DNA in einem Mindestvolumen von 15 µl (in H₂O) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß verschickt. Wurde ein Sequenzier-Primer mitgeschickt, musste dieser in einer Konzentration von 2 pmol/µl in einem Mindestvolumen von 15 µl (in H₂O) vorliegen.

2.2.3 Arbeiten mit Proteinen

A Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Konzentrationsbestimmung von Protein in den hergestellten Zelllysaten (2.2.4 E) wurde das Protokoll nach Bradford (1976) verwendet, bei der es sich um eine colorimetrische Proteinbestimmung handelt. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva) bildet mit Proteinen einen Komplex, der eine photometrisch quantifizierbare Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm zur Folge hat. Da diese Verschiebung in einem bestimmten Bereich direkt proportional zur Proteinkonzentration ist, kann über eine Eichgerade aus dem Extinktionswert die Konzentration bestimmt werden.

Durchführung

2 µl eines zu vermessenden Lysats wurden mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt und in einer Küvette mit 1 ml Coomassie-Lösung gemischt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden ebenso jeweils 0 µg, 1 µg, 2,5 µg, 5 µg, 15 µg und 50 µg BSA in 10 µl Wasser mit 1 ml Coomassie-Lösung in einer Küvette gemischt. Daraufhin wurden die Proben für 5 Minuten bei RT inkubiert und anschließend die Lysat-Proben genauso wie die Standard-Proben in einem Spektralphotometer bei 450 nm und 590 nm gegen Wasser gemessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde von allen Proben der Quotient der Absorption bei 450 nm und 590 nm ermittelt und jeweils der bei 0 µg BSA ermittelte Quotient, der die Negativkontrolle darstellt, von diesem Wert abgezogen. Der so erhaltene korrigierte Quotient wurde dividiert mit den jeweils eingesetzten BSA-Mengen und von den dadurch resultierenden Quotienten wurde anschließend der Mittelwert gebildet. Dieser aus den BSA-Lösungen entstandene Mittelwert wurde mit den korrigierten Quotienten der Lysat-Proben multipliziert. Die Proteinkonzentration in µg/µl konnte schließlich berechnet werden, indem diese Werte durch das eingesetzte Volumen an Lysat-Lösung dividiert wurden.

B SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine unterschiedlicher molekularer Masse im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Proteine werden durch Aufkochen bei 100°C mit SDS-haltigem Probenpuffer denaturiert. Durch die Behandlung mit diesem negativ geladenen Detergens, das sich an hydrophobe Bezirke der Moleküle anlagert, entfalten sich die Proteine und erhalten eine stark negative Ladung. Werden sie anschließend auf einem Polyacrylamidgel der Elektrophorese unterzogen, werden die Proteine deshalb nur nach ihrem Molekulargewicht im Maschenwerk des Gels aufgetrennt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, um im Anschluss Proteine auf eine Membran zu transferieren (2.2.3 B) und sie letztendlich über

eine Immundetektion visualisieren zu können.

Durchführung

In dieser Arbeit wurde das vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System Mini Protean® II Electrophoresis Cell der Firma Biorad verwendet. Dafür wurden 10%ige Polyacrylamid-Gele, bestehend aus Sammel- und Trenngel (2.1.10 C) eingesetzt, wobei sich dies auf die Konzentration des Acrylamids im Trenngel bezieht und von dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine abhängt.

Zunächst wurde das Trenngel in die dafür mitgelieferte Apparatur gegossen und mit H₂O überschichtet, um eine möglichst gleichmäßig glatte Oberfläche des Trengels zu erzielen. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Wasser wieder abgenommen und das kurz zuvor zusammengemischte Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Im Anschluss wurde ein Kamm in das Sammelgel eingesetzt und erneut gewartet, bis dieses polymerisiert war. Das Gel wurde schließlich in die Gelkammer überführt, die dann mit Laupuffer befüllt wurde und somit die Proben geladen werden konnten. Es wurde stets je 20 - 40 µg Gesamtprotein auf das Gel geladen, wobei die Proteinproben dafür zuvor mit entsprechendem Volumen an 5x SDS-Probenpuffer versetzt werden mussten und 5 Minuten bei 100°C im Heizblock gekocht wurden. Um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können, wurde zusätzlich ein vorgefärbter Marker mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte dann bei RT und 150 V, woraufhin das Trenngel für den Transfer abgetrennt wurde.

C Western-Blotting

Um Proteine anhand einer Immundetektion identifizieren zu können, müssen die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine (2.2.3 B) beim Western-Blot mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Membran transferiert und immobilisiert werden. Dies erfolgte in der vorliegenden Arbeit ausschließlich über das Semidry-Verfahren, bei der Gele der Größe 8 cm x 4 cm x 0,75 mm geblottet wurden.

Durchführung

Eine auf Gelgröße zugeschnittene PVDF-Membran (0,45 µm Porengröße Immobilon-P Transfermembran) wurde zunächst 5 Minuten mit Methanol benetzt und anschließend genauso wie 6 ebenso große Lagen Whatman-3MM-Papiere in Transferpuffer geschwenkt. Dann wurde auf die Anoden-Platte der Semidry-Blotting-Apparatur drei der Whatman-Papiere, die PVDF-Membran und das Trenngel, das kurz zuvor in Transferpuffer äquilibriert wurde, gelegt. Die restlichen drei Whatman-Papiere wurden luftblasenfrei geschichtet und schließlich mit der Kathoden-Platte bedeckt. Der Proteintransfer erfolgte bei 22 V für eine

Stunde bei RT. Die Membran wurde nach dem Blotten kurz in Ponceau-Färbelösung geschwenkt und anschließend mit Wasser gewaschen, um überschüssige Farbe zu entfernen, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Nachdem die Banden des Größenstandards mit Bleistift nachgezeichnet wurden, wurde die Membran in Blocklösung überführt und 1 Stunde bei RT darin geschwenkt, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Membran zu verhindern. Dies erfolgte ebenso wie alle weiteren Schritte auf einem Schüttler. Danach wurde die Membran 1 Stunde bei RT mit dem in Blocklösung verdünnten Primärantikörper inkubiert. Nach 2 x 5 Minuten und 3 x 10 Minuten Waschen der Membran mit Waschlösung folgte eine einstündige Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper in Blocklösung. Anschließend wurde die Membran erneut 2 x 5 Minuten und 3 x 10 Minuten in Waschlösung und 1 x 10 Minuten in H₂O gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Western Lightning Chemoluminescence Reagent von Perkin Elmer, wobei dazu das Luminol- und Oxidations-Reagenz kurz zuvor 1 : 1 gemischt werden mussten. Die Membran wurde dann 1 Minute in dem von der Größe des Gels abhängigem Volumen dieses Gemischs inkubiert, danach auf einem Kosmetik-Tuch abgetropft, luftblasenfrei in eine Klarsichtfolie gelegt und schließlich in eine Filmkassette überführt. Auflegen und Entwickeln des Films erfolgte in der Dunkelkammer, wobei je nach verwendetem Primärantikörper und eingesetzter Proteinmenge zwischen 10 Sekunden und ü.N. exponiert wurde. Nach der Exposition des Röntgenfilms wurde dieser solange in Eukobrom-Entwickler inkubiert, bis die gewünschte Signalstärke zu sehen war. Dann wurde der Film kurz in Wasser gewaschen, 15 Minuten mit Acido Fixierer fixiert und schließlich zum Trocknen bei RT aufgehängt. Indem der Röntgenfilm auf die entsprechende Membran gelegt wurde, konnten so die Banden des Proteinmarkers auf den Film übertragen werden.

D Dual-Luciferase Reporter Assay

Bei einem Reportergen Assay können Untersuchungen zur Expression von Genen und deren Regulation durchgeführt werden. Dazu kloniert man den zu untersuchenden Promotor vor ein sogenanntes "Reportergen", dessen Proteinaktivität leicht nachzuweisen ist. Dabei ist die Aktivität des Proteins proportional zur Aktivität des Promotors. Durch Transfektion werden die Reportergen-Konstrukte zuerst in die Zellen gebracht.

In dieser Arbeit wurde dafür das Dual-Luciferase®Reporter Assay System von Promega verwendet. Der Begriff "Dual-Reporter" bezieht sich auf die gleichzeitige Expression und Messung zweier voneinander unabhängiger Reporterenzyme in einem einzigen Versuchsansatz. Einer der beiden Reporter korreliert dabei mit dem Effekt der spezifischen experimentellen Bedingungen, während die Aktivität des zweiten ko-transfizierten Reporters eine interne Kontrolle darstellt, welche die Basalaktivität repräsentiert und zur Normalisierung

herangezogen wird. Dadurch können experimentelle Schwankungen, wie Unterschiede in der Transfektionseffizienz, normalisiert werden.

Als Reporter wurden die beiden Luciferasegene *P/luc* und *R/luc* verwendet, wobei es sich bei *P/luc* um das Luciferasegen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* handelt, welcher als experimenteller Reporter benutzt wurde. In dieser Arbeit bestehen die experimentellen Reporter aus dem humanen Wildtyp *IL-6* Promotor, bzw dessen mutagenisierten Varianten (2.1.9), gekoppelt an *P/luc*. *R/luc* wurde als Kontroll-Reporter benutzt, wobei es sich um das Luciferasegen der Weichkoralle *Renilla reniformis* handelt. Der in dieser Arbeit verwendete ko-transfizierte Kontroll-Reporter pRL-null exprimiert *R/luc* in Abwesenheit eines Promotors.

Durchführung

Transfektion von HtTA-1-Zellen mit den Reporter-Plasmiden

1×10^5 HtTA-1-Zellen wurden in einer 24-Loch-Platte in Kulturmedium mit Doxyzyklin (100 ng/ml) ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion (2.2.4 C) unter Verwendung des Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 von Invitrogen, wobei alle Transfektionen in Duplikaten durchgeführt wurden. Eingesetzt wurden dabei je 0,4 µl Lipofectamine™ 2000, 0,2 µg *Firefly*-Luciferase Reporter, 15 ng *Renilla*-Luciferase Reporter und entweder 0,1 µg LMX1B-Expressionsplasmid oder, um auf die gleiche DNA-Gesamtmenge zu kommen, 0,1 µg leerer pcDNA3 Vektor. Bei der Analyse der generierten LMX1B-Mutanten wurden die gleichen Mengen an Reporter eingesetzt, nur die LMX1B-Mutanten variierten an eingesetzter DNA-Menge von 0,1- 0,75 µg. 24 Stunden später wurden die Zellen mit TNF-α (20 ng/ml) für 8 Stunden zur Aktivierung des NF-κB-Signalweges inkubiert oder direkt ohne Stimulierung geerntet, wobei Ernte und Lyse (je 100 µl PLB-Puffer) der Zellen nach Herstellerangaben des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems von Promega erfolgte (2.2.4 B). Die Lysate konnten dann zur Konzentrationsbestimmung nach Bradford (2.2.3 A) herangezogen und schließlich mit Hilfe eines Luminometers analysiert oder bei -80 °C gelagert werden.

Messung der Luciferaseaktivität

Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte unter Verwendung des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems von Promega im Centro XS³ LB 960 Mikroplatten Luminometer von Berthold Technologies.

Durchführung

Je 10 µl der Lysat-Proben wurden in die 96-Loch-Platte des Luminometers überführt. Die Messung erfolgte dann automatisch in zwei Schritten. Beim ersten Schritt wurde die Aktivität der *Firefly*-Luciferase bestimmt, indem je 40 µl Luciferase Assay Reagent II (Promega)

injiziert wurden und nach einem kurzen Intervall von 2 Sekunden die Messung der Lichtemission über 10 Sekunden erfolgte. Im zweiten Schritt wurde durch Injektion von 40 µl Stop & Glo® Reagent (Promega) die Aktivität der *Firefly*-Luciferase gehemmt und die *Renilla*-Luciferase aktiviert. Die Messung der Lichtemission der *Renilla*-Luciferase erfolgte dann nach 2 Sekunden Verzögerung für 10 Sekunden. Alle Proben wurden zweimal gemessen. Die vom Luminometer ermittelten Werte für die Aktivität der *Firefly*-Luciferase sowie die Aktivität der *Renilla*-Luciferase wurden mit der MikroWin 2000 Software von Berthold wiedergegeben. Die *Firefly*-Luciferaseaktivität in den einzelnen Zelllysaten wurde anschließend gegen die entsprechende Aktivität der *Renilla*-Luciferase normalisiert. Davon wurden dann die als Basalaktivität angesehenen Werte des IL-6-Promotor-losen Konstrukts (ΔIL-6P-Luc) noch abgezogen. Die so erhaltenen, korrigierten Werte wurden dann in Relation zu der Promotoraktivität der unstimulierten mit dem leeren pcDNA3 Vektor transfizierten Zellen (=1) gesetzt und als Diagramm dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder, die mittels Microsoft Excel berechnet wurden.

2.2.4 Arbeiten mit Säuger-Zelllinien

A Kultivierung von HeLa-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich HeLa-Zellen (humane epitheliale Zervixkarzinomzellen) verwendet, wobei alle Arbeiten mit dieser Säugerzelllinie unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturarbeitsbank durchgeführt wurden. Alle Verbrauchsmaterialien waren entweder steril verpackte Einmalartikel oder wurden vor der Benutzung in einem Autoklaven bei 121°C mit Wasserdampf sterilisiert, um eine Kontamination mit Bakterien, Viren oder Pilzen zu verhindern. Die Kultur der verwendeten Zelllinien erfolgte in Gewebekulturflaschen oder -schalen in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂, wobei je nach verwendeter Zelllinie das jeweilige Kulturmedium und die jeweiligen Zusätze wie folgt war:

Tab. 8: Verwendete Zelllinien mit jeweiligem Kulturmedium und Zusätzen.

Zelllinie	Kulturmedium	Zusätze
HtTA-1	DMEM	10% FCS 200 µg/ml Geneticin 100 ng/ml Dozyzyklin
HtTA-1/myc-LMX1B (Klon #34)	DMEM	10% FCS 200 µg/ml Geneticin 100 ng/ml Dozyzyklin 300 µg/ml Hygromycin

HtTA-1/myc-LMX1B (C95F) (LMX1B-Mutante, Klon #351)	DMEM	10% FCS 200 µg/ml Geneticin 100 ng/ml Dozyzyklin 500 ng/ml Puromycin
HtTA-1hFer (produzieren H-Kette des humanen Ferritins)	DMEM	10% FCS 200 µg/ml Geneticin 100 ng/ml Dozyzyklin 300 µg/ml Hygromycin

Passagieren der Zellen

Durch sogenanntes „Passagieren“ werden Zellen, in der vorliegenden Arbeit durch Trypsinierung, aufgeteilt, wodurch sie sich jeweils in neuen Gewebekulturflaschen oder -schalen vermehren können und somit über einen langen Zeitraum zur Durchführung von zellbiologischen Experimenten zur Verfügung stehen.

Durchführung

Sobald die adhären wachsenden HeLa- (HtTA-1) Zellen die je nach Versuchsaufbau geforderte Konfluenz erreicht hatten, wurde das Kulturmedium aus der Gewebekulturflasche oder -schale abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und kurz mit Trypsin/EDTA inkubiert. Dabei sollte die Trypsinlösung nicht länger als 10 Minuten auf den Zellen sein, da sie zellschädigend wirken kann. Nach Ablösung der Zellen durch leichtes Klopfen gegen den Kulturflaschen- oder Kulturschalenboden wurden sie von der Gewebekulturflasche oder -schale mit dem mindestens dreifachen Volumen an FCS-haltigen Medium abgespült, um das Trypsin zu inhibieren. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren konnten noch anheftende Zellen abgelöst und vereinzelt werden. Anschließend wurden dann je nach Bedarf unterschiedlich große Aliquots dieser Zellsuspension auf eine gewünschte Anzahl Gewebekulturflaschen oder -schalen verteilt und mit neuem Kulturmedium und den entsprechenden Zusätzen aufgefüllt. Um Zellen in einer definierten Dichte auszusäen, wurde die Zellzahl der abgelösten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zelldichte durch Zugabe von Medium eingestellt.

Zählen von Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl sowie zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurden diese mit Trypanblau versetzt. Während vitale Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen und im Lichtmikroskop hell erscheinen, dringt Trypanblau in tote Zellen ein, wodurch diese tiefblau gefärbt sind und daher im Lichtmikroskop dunkel erscheinen.

Durchführung

100 µl einer Zellsuspension wurden mit 100 µl Trypanblau gemischt und davon ein Aliquot in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Dabei wurden mindestens vier Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl pro ml berechnet sich dann unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (Trypanblaufärbung), der Anzahl der ausgezählten Großquadrate der Kammer und des Volumens über einem mittelgroßen Quadrat von 1×10^{-4} ml.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Konservierung von Zellen erfolgte durch Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Dafür wurde nach Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung die konfluent gewachsenen Zellen einer Gewebekulturflasche abgelöst, in FCS-haltigem Medium aufgenommen und durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 800 rpm (Multifuge 3 L-R mit Rotor Ch. 2545) in einem 15 ml-Röhrchen pelletiert. In einem der Zellzahl entsprechendem Volumen von 90% FCS/10% DMSO wurde das Pellet resuspendiert, die so erhaltene Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt, sofort bei -80°C eingefroren und 1-2 Tage später zur längeren Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Um eine Kultur einer Zelllinie anlegen zu können, wurde ein Kryoröhrchen dem flüssigen Stickstoff entnommen und in handwarmen Wasser geschwenkt. Die Zellsuspension wurde anschließend in einem 15 ml-Röhrchen mit 10 ml FCS-haltigem Kulturmedium vermischt, für 5 Minuten bei 750 rpm (Multifuge 3 L-R mit Rotor Ch. 2545) abzentrifugiert und das Pellet in 5 ml Kulturmedium mit entsprechenden Zusätzen resuspendiert. Die Suspension wurde dann in eine 25 cm² Gewebekulturflasche überführt, welche bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurde.

Induktion von HtTA-1-Zellen

Um eine kontrollierte Regulation der Proteinsynthese von LMX1B oder der Mutante LMX1B-C95F zu ermöglichen, wurde das von Gossen und Bujard 1992 entwickelte transkriptionelle Regulationssystem angewendet. Das Prinzip beruht auf der Regulation des Tetrazyklin-Resistenz-Operons, das auf dem Tn10-Transposon in *E. coli* liegt.

Es wurde ein Fusionsprotein aus dem Tet-Repressor (tetR) aus *E. coli* und der transkriptionellen Aktivierungsdomäne VP16 aus dem Herpes simplex Virus zusammengesetzt, welches den Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator (tTA) bildet. Durch ein in die Zielzellen transfiziertes Plasmid wird dieser konstitutiv produziert. In einen anderen Vektor wurde die gewünschte Ziel-DNA einkloniert, der wiederum den dazu passenden tTA-Promotor enthält, welcher aus einem Minimalpromotor des menschlichen Cytomegalovirus (CMV)-Promotors, kombiniert mit der Tetrazyklin-Operator-Sequenz (tetO) aus *E. coli*,

besteht. Durch Zugabe von Tetrazyklin wird eine Konformationsänderung des tTA hervorgerufen, wodurch der tTA nicht mehr an den Operator binden kann und die transkriptionelle Aktivierung unterbleibt. Ist Tetrazyklin jedoch nicht vorhanden, kann der tTA an den Operator binden und somit den Minimalpromotor aktivieren, was zu einer Initiation der Transkription der gewünschten Ziel-DNA führt. Dieses System wird als Tet-off-System bezeichnet.

Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie, die sich dieses System zu Nutze machte, wurde als HtTA-1 bezeichnet und bezeichnet den tTA synthetisierenden Zellklon, der von Gossen und Bujard in HeLa-Zellen konstruiert wurde (HeLa-Zellen mit Tetrazyklin-Transaktivator). Dabei wurde statt Tetrazyklin das Derivat Doxzyklin verwendet, da es eine höhere Affinität zum Repressor aufwies.

Durchführung

Die Kultivierung der HtTA-1-Zellen erfolgte in Medium mit Doxzyklin und den anderen nötigen Zusätzen (Tab. 8). War eine Induktion der Proteinexpression von LMX1B oder LMX1B-C95F gewollt, mussten die Zellen ohne Doxzyklin kultiviert werden, wobei durch Trypsin abgelöste Zellen mit doxzyklinfreiem Medium versetzt und ausgesät wurden. Waren die Zellen angehaftet, wurde zweimal mit 1x PBS gewaschen und dann doxzyklinfreies Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend für 4 Tage ohne Doxzyklin im Medium inkubiert, wobei nach 2 Tagen das Medium gewechselt wurde, und geerntet. In diesem Zeitraum fand eine optimale Synthese von LMX1B statt (s. 3.1).

TNF- α -Stimulierung von HeLa-Zellen

Die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges erfolgte in dieser Arbeit durch Stimulierung der Zellen mit Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Dazu wurde TNF- α in einer Endkonzentration von 20 ng/ml in das Medium gegeben. Für eine Expressionsstudie auf mRNA Ebene mittels Echtzeit-qPCR wurden die Zellen 1 Stunde, für eine Promotorstudie mittels Luciferase Reporter Assay 8 Stunden mit TNF- α inkubiert, bevor geerntet wurde.

B Herstellung von Zelllysaten

Zur Isolierung und Analyse von Proteinen wurden HeLa-Zellen in DMEM-Medium mit entsprechenden Zusätzen je nach Versuchsaufbau in 6- oder 24-Loch-Gewebeplatten oder P10-Gewebeschalen für die gewünschte Zeitdauer kultiviert, wobei am Tag der Ernte die Zellen möglichst konfluent vorliegen sollten. Wurde die hergestellten Lysate nicht direkt verarbeitet, wurden sie bei -80 °C gelagert.

Ganzzelllysate

Zur Detektion von Proteinen mittels Western-Blot wurden Ganzzelllysate hergestellt. Dazu wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit einer geringen Menge von 1x PBS mit einem Zellschaber abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 1 Minute bei 3.000 rpm (Tischzentrifuge „Biofuge pico“ mit Rotor Sorvall 3329) zentrifugiert. Die so erhaltenen Zellpellets wurden je nach Größe in einem entsprechendem Volumen an Brij-Puffer (50 µl bis 100 µl) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten und ein Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154). Schließlich wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Als nächstes wurde stets eine Bestimmung der Proteinkonzentration (2.2.3 A) und zur Identifikation der Proteine eine SDS-PAGE (2.2.3 B) und Western-Blot (2.2.3 C) durchgeführt. Dabei wurde stets 20-40 µg Gesamtprotein mit dem entsprechendem Volumen an 5x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 100°C im Heizblock gekocht und schließlich auf ein SDS-Gel geladen (s. 2.2.3 B).

Zelllysate für den Luciferase Reporter Assay

Um die Transkriptionsaktivität von Proteinen zu untersuchen, wurde das Dual-Luciferase®Reporter Assay System der Firma Promega verwendet. Dazu wurden die Zellen nach Angaben des Protokolls des Kits geerntet. Dementsprechend wurde zunächst das Kulturmedium von den Zellen abgesaugt, die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und direkt in den 24-Loch-Gewebekulturplatten lysiert. Dazu wurden die Zellen mit 100 µl PLB-Puffer, der in dem Dual-Luciferase®Reporter Assay System von Promega enthalten ist, überschichtet und für 15 Minuten bei RT und leichtem Schütteln inkubiert. Dann wurden die Zelllysate jeweils in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, woraufhin eine Bestimmung der Proteinkonzentration (2.2.3 A) erfolgte. Wurden die unterschiedlichen LMX1B-Mutanten in die Zellen transfiziert (2.2.3 D), wurde deren Expression stets vor der Durchführung des Luciferase Assays mittels SDS-PAGE (2.2.3 B) und anschließender Western-Blot-Analyse (2.2.3 C) überprüft. Dazu wurden je 20 µg Gesamtprotein mit dem entsprechendem Volumen an 5x SDS Probenpuffer auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Analyse mittels Luminometers (2.2.3 D) erfolgte mit je 10 µl des Zelllysates.

Zelllysate für Lokalisationsstudien

Um den Wirkungsort der Proteine in den Zellen lokalisieren zu können, wurden zytosolische und Kernextrakte hergestellt. Dafür wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend in Anwesenheit einer geringen Menge von 1x PBS mit einem Zellschaber abgelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 Minuten

bei 1.000 rpm (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154) und 4°C wurde das Pellet in Puffer A resuspendiert und anschließend für 10 Minuten auf Eis gestellt. Durch Zugabe von 0,625% NP-40 und Zentrifugation für 1 Minute bei 14.000 rpm (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154) und 4°C konnte dann der aus den zytosolischen Bestandteilen bestehende Überstand abgenommen werden. Das verbleibende Pellet wurde erneut mit Puffer A gewaschen, anschließend in Puffer C aufgenommen und für 1 Stunde bei 4°C kräftig geschüttelt. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch einen 15-minütigen Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm (Sigma 3K20 mit Rotor Nr. 12154) und 4°C pelletiert, wodurch die gewünschte Kernfraktion im Überstand geerntet werden konnte. Von den auf diese Weise generierten zytosolischen und Kernextrakten wurde entweder direkt die Konzentration bestimmt und anschließend eine Western-Blot-Analyse durchgeführt oder sie wurden bei -80°C gelagert. Um die Qualität der Reinheit der hergestellten zytosolischen und Kernextrakte verifizieren zu können, wurde bei der Western-Blot-Analyse zur Kontrolle ein Antikörper gegen das nukleäre Protein HDAC1 verwendet.

C Transfektion von HeLa-Zellen

Das hier verwendete Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) beruht auf dem Prinzip der Lipofektion. Die in den Reagenzien enthaltenen Lipide komplexieren aufgrund ihrer positiven Ladung sehr effektiv mit DNA. Diese Komplexe fusionieren mit der Zellmembran und bringen somit die DNA in das Zellinnere. Anschließend findet die Expression der eingeschleusten Plasmide statt.

Plasmid-DNA Transfektion

2x 10⁵ der zu transfizierenden HeLa-Zellen wurden in einer 6-Loch-Platte mit Zellkulturmöglichkeit mit oder ohne Doxyzyklin ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium von den Zellen abgenommen und mit 1 ml Kulturmedium (ohne FCS und ohne Antibiotika) versetzt. Für die Transfektion wurde 1 µg Plasmid-DNA in 250 µl Kulturmedium (ohne FCS und ohne Antibiotika) dazu gegeben. Parallel dazu wurden 2 µl Lipofectamine™ 2000 ebenfalls in 250 µl Kulturmedium (ohne FCS und ohne Antibiotika) verdünnt und nach einer 5-minütigen Inkubation mit der DNA-Lösung vorsichtig vermischt. Zur Komplexbildung wurde für 20 Minuten inkubiert, danach wurden die Transfektionsansätze auf die mit 1 ml Kulturmedium (ohne FCS und ohne Antibiotika) inkubierten Zellen gegeben. Anschließend wurde die 6-Loch-Platte leicht geschwenkt und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach 4 Stunden wurde 1 ml Kulturmedium mit den für 2,5 ml Endvolumen entsprechenden Mengen an Antibiotika und FCS versetzt und zu den Zellen hinzugegeben. Ein Tag nach der Transfektion wurden die Zellen entweder noch mit TNF-α (20 ng/ml) stimuliert oder ohne Stimulierung direkt für anschließende Analysen geerntet.

Die Transfektion von HtTA-1-Zellen mit Reporter-Plasmiden zur Durchführung eines anschließenden Dual-Luciferase Assays wurde bereits unter 2.2.3 D beschrieben.

siRNA Transfektion

2 x 105 der zu transfizierenden HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurden in einer 6-Loch-Platte mit Zellkulturmedium mit oder ohne Dozyzyklin ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium von den Zellen abgenommen und mit 1 ml Kulturmedium (ohne FCS und ohne Antibiotika) versetzt. Für die Transfektion wurden den Herstellerangaben entsprechend 5 nM siRNA in 250 µl Kulturmedium (ohne FCS und ohne Antibiotika) gegeben. Parallel dazu wurden 2 µl Lipofectamine™ 2000 in 250 µl verdünnt und nach einer 5-minütigen Inkubation zu der hergestellten siRNA-Lösung hinzugegeben und vorsichtig vermischt. Zur Komplexbildung wurde für 20 Minuten inkubiert, danach wurden die Transfektionsansätze auf die mit 1 ml Kulturmedium (ohne FCS und ohne Antibiotika) inkubierten Zellen gegeben. Anschließend wurde die 6-Loch-Platte leicht geschwenkt und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach 4 Stunden wurde 1 ml Kulturmedium mit den für 2,5 ml Endvolumen entsprechenden Mengen an Antibiotika und FCS versetzt und zu den Zellen hinzugegeben. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen entweder noch 1 Stunde mit TNF-α (20 ng/ml) stimuliert oder ohne Stimulierung direkt für anschließende RNA- und Protein-Analysen geerntet.

D Immunzytochemie

Die Lokalisation von Proteinen in den verschiedenen Zellkompartimenten kann auch durch eine immunzytochemische Untersuchung erfolgen.

Durchführung

Je nach Versuchsaufbau wurden auf unbeschichteten 12 mm-Deckgläschchen die Zellen 1-4 Tage in Medium ohne oder mit Dozyzyklin (100 ng/ml) kultiviert und am Tag der Ernte mit TNF-α für 1 Stunde inkubiert, um den NF-κB-Sinalweg zu aktivieren, oder ohne Stimulierung direkt geerntet. Am Versuchstag wurden die Deckgläschchen jeweils in eine Vertiefung einer 24-Loch-Platte überführt und zweimal mit Medium ohne Zusätze gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 500 µl 4% Paraformaldehyd (PFA) in 1x PBS für 20 Minuten bei RT fixiert und anschließend dreimal 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Nach einer einstündigen Inkubation in 500 µl Blockierungslösung (2% BSA/0,1% Triton X-100 in 1x PBS) bei RT wurden die Zellen nochmal für 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Es folgte für 2 Stunden bei RT eine Inkubation der Zellen mit dem in 300 µl Blockierungslösung ohne Triton X-100 gelösten Primärantikörper. Nach viermaligem Waschen für je 2 Minuten in Hochsalz-PBS (1,6% NaCl in 1x PBS) und einmal für 1 Minute mit 1x PBS wurde mit dem Sekundärantikörper, der erneut in 300 µl Blockierlösung ohne Triton X-100 gelöst war, für 1

Stunde im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut viermal für je 2 Minuten in Hochsalz-PBS und einmal für 2 Minuten in 1x PBS gewaschen und schließlich mit Eindeckmittel (40% Glyzerin in 1x PBS) und Deckgläschen auf Objektträgern eingebettet. Zur Analyse des Versuchs wurden die Zellen später am Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss) betrachtet, digitale Fotos mit einer Digitalkamera (DMC2, Polaroid) davon erstellt und mittels einem daran angeschlossenem Computer mit entsprechender Software ausgewertet.

E siRNA-Synthese

Um die Expression von Genen zu inhibieren, wurde die siRNA-Technik verwendet. Dabei bringt man kurze, doppelsträngige RNAs mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden, sogenannte siRNAs ("small interfering RNAs"), in die Zellen durch Transfektion (2.2.4 C) ein. Da dort die siRNAs als Leitmotiv für eine Nuklease fungieren, führt dies zum Abbau der komplementären mRNA-Sequenz des Zielgens, so dass die Proteintranslation unterbleibt.

Durchführung

Zur siRNA-Herstellung wurde der Silencer™ siRNA Construction Kit von Ambion sowie die unter 2.1.8 Tab. 5 genannten Oligonukleotide eingesetzt.

In separaten Ansätzen erfolgte durch Zugabe des T7-Promotor-Primers in einem ersten Schritt dessen Hybridisierung mit jeweils einem entsprechendem Sense- oder Antisense-Oligonukleotid, wobei diese in einer Konzentration von 100 µM vorlagen. Nach Auflösung möglicher unerwünschter Sekundärstrukturen bei 70°C für 5 Minuten erfolgte die Hybridisierung der Oligonukleotide bei RT für 10 Minuten. Die 3'-Überhänge wurden anschließend bei 37°C für 30 Minuten mit der Klenow-DNA-Polymerase aufgefüllt, wodurch doppelsträngige DNA entstand, aus denen in einer zweistündigen Inkubation bei 37°C die T7 RNA Polymerase RNA-Transkripte synthetisieren konnte. Die RNA-Transkripte wurden schließlich zur Hybridisierung vereint und über Nacht bei 37°C weiter inkubiert. Durch Zugabe einer DNase und einer speziellen Einzelstrang-Ribonuklease konnten die DNA Matrizen sowie 5'-Überhänge der dsRNA in einer zweistündigen Inkubation bei 37°C entfernt werden. Die weitere Aufreinigung als auch die Elution in 100 µl nukleasefreiem Wasser erfolgte über eine Säule. Schließlich wurde die Konzentration der siRNA am Photometer bei 260 nm gemessen. Gelagert wurde die siRNA bei -20°C, bis sie schließlich in einer Transfektion eingesetzt wurde (2.2.4 C).

2.2.5 Arbeiten mit RNA

A Kultivierung und Ernten von Zellen für die Gesamt-RNA-Isolierung

Um Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen zu isolieren, wurden die Zellen stets in 6 cm-Gewebekulturschalen oder in 6-Loch-Gewebekulturplatten für je nach Versuchsaufbau unterschiedliche Zeiten und mit verschiedenen Mediumzusätzen kultiviert.

Dann wurden die Zellen geerntet, indem sie zunächst wie bereits unter 2.2.4 A beschrieben von dem Kulturgefäßboden durch Trypsin/EDTA abgelöst wurden. Die Wirkung des Trypsin/EDTA wurde durch die Zugabe des vierfachen Volumens an FCS-haltigem Medium inhibiert, durch anschließendes Auf- und Abpipettieren konnten die restlichen noch anhaftenden Zellen abgelöst und vereinzelt werden. Die so gewonnene Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt, aufgefüllt auf 40 ml mit eiskaltem 1x PBS und für 5 Minuten bei 100 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem 1x PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und für 1 Minute bei 3.000 rpm (Tischzentrifuge „Biofuge pico“ mit Rotor Sorvall 3329) erneut zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde das Zellpellet in dem geschlossenen Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

B Isolierung von Gesamt-RNA

In der vorliegenden Arbeit fand die Isolierung von Gesamt-RNA nach dem Protokoll des NucleoSpin RNA II Kits von Macherey-Nagel statt. Dabei wurden alle Schritte bei RT durchgeführt und es wurden nur RNase-freie Pipettenspitzen mit Filtereinsatz und RNase-freie Reaktionsgefäße verwendet. Zur Herstellung des 70%igen Ethanols wurde autoklaviertes Wasser benutzt.

Durchführung

Zunächst wurde pro Pellet eine Mischung aus 350 µl Puffer RA1 und 3,5 µl β-Mercaptoethanol hergestellt, durch die die Lyse der Zellen und die gleichzeitige Inaktivierung von RNasen in Gang gesetzt wird. Dies wurde auf das noch gefrorene Zellpellet gegeben und ca. 10x auf- und abpipettiert, bis eine klare, visköse Lösung entstand. Durch einen Zentrifugationsschritt für 1 Minute bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge „Biofuge pico“ mit Rotor Sorvall 3329) wurde das Lysat über eine mitgelieferte Filtereinheit gereinigt und die Viskosität verringert. Das Filtrat wurde mit 350 µl 70%igem Ethanol versetzt, 10x auf- und abpipettiert und anschließend auf eine mitgelieferte Säule aufgetragen. Während einer 30-sekündigen Zentrifugation bei 10.000 rpm (Tischzentrifuge „Biofuge pico“ mit Rotor Sorvall 3329) erfolgte die Bindung der RNA an die Säule. Um Salzverunreinigungen zu entfernen,

wurden 350 µl MDB-Puffer zugegeben und für 1 Minute bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge „Biofuge pico“ mit Rotor Sorvall 3329) zentrifugiert. Um in der Probe enthaltene DNA zu entfernen, wurden als nächstes 95 µl einer frisch angesetzten Lösung aus 90 µl DNase-Reaktionspuffer und 5 µl DNase I direkt auf die Säule gegeben. Nach 15 Minuten bei RT wurden 200 µl Puffer RA2 zupipettiert und die Säule für 30 Sekunden bei 10.000 rpm (Tischzentrifuge „Biofuge pico“ mit Rotor Sorvall 3329) zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschritte mit Puffer RA3, wobei beim ersten Waschschritt 600 µl des Puffers für 30 Sekunden mit 10.000 rpm (Tischzentrifuge „Biofuge pico“ mit Rotor Sorvall 3329) und beim zweiten 250 µl für 2 Minuten bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge „Biofuge pico“ mit Rotor Sorvall 3329) durch die Säule zentrifugiert wurden, um die Membran vollständig zu trocknen. Die Elution der RNA erfolgte durch Zugabe von 60 µl RNase-freiem Wasser auf die Membran und 1-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge „Biofuge pico“ mit Rotor Sorvall 3329). Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde das Eluat ein weiteres Mal auf die Membran gegeben und erneut zentrifugiert. Bis zur Verwendung wurde die RNA-Lösung bei -80 °C gelagert.

C Konzentrationsbestimmung von RNA

Vor der photometrischen Bestimmung wurde die RNA-Lösung mit RNase-freiem Wasser 1:25 (v:v) verdünnt. Die Konzentration der gelösten RNA wurde dann in einem Spektralphotometer bei 260 nm gegen H₂O als Referenz gemessen. Eine OD von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm und einem Strahlengang von 10 mm entspricht dabei einer Konzentration von 0,04 µg/µl. Die Konzentration der RNA in Lösung konnte daher folgendermaßen bestimmt werden:

$$c[\text{RNA}] = \text{OD}_{260} \times 25 \times 0,04 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

D Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Um die Qualität der isolierten RNA zu überprüfen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, wobei die RNA entsprechend ihrem Molekulargewicht im Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt wird. Es wurden Gele mit einem Agarosegehalt von 1% (w/v) verwendet.

Durchführung

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde analog der DNA-Gelelektrophorese (2.2.2 D) durchgeführt. Es wurden jedoch spezielle Vorkehrungen getroffen, um ein Einbringen von RNasen aus der Umgebung und somit einen Abbau der RNA zu verhindern. So erfolgte die

Herstellung des 1x TAE-Puffers durch Verdünnen des 50x TAE-Puffers mit autoklaviertem Wasser, alle Glasgefäße wurden autoklaviert und alle Teile der Gelkammer sowie der Kamm wurden vor Benutzung mit einem RNase-Dekontaminationsspray behandelt. Wie für DNA wird durch Zugabe von Ethidiumbromid in das Gel die RNA angefärbt und kann anschließend durch UV-Licht sichtbar gemacht werden. Bei intakter RNA sollten im Gel deutlich zwei scharfe getrennte Banden zu sehen sein, die den ribosomalen 28S- und 18S-RNAs entsprechen.

E cDNA-Synthese

Die isolierte einzelsträngige Gesamt-RNA (2.2.5. A) wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase aus dem Moloney-Maus Leukämie-Virus (MMLV) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Das Reagenzienystem des dafür verwendeten iScript cDNA Synthesis-Kits von Biorad beinhaltet ein optimiertes Gemisch aus Zufallshexamer- und Oligo (dT)-Primern.

Durchführung

Zunächst wurde auf Eis eine Mischung aus 4 µl 5x iScript Reaktionsmix und 1 µl iScript Reverse Transkriptase hergestellt. Diese wurden zu 1 µg der isolierten Gesamt-RNA, die mit RNase-freiem Wasser in einem 0,2 ml-Reaktionsgefäß auf Eis auf 15 µl aufgefüllt wurde, gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gut vermischt. Für jede Probenreihe wurde auch eine sog. Minus-RT-Probe angefertigt, bei der keine Reverse Transkriptase zur cDNA-Synthese pipettiert wurde. Dies diente der Kontrolle bei der quantitativen Echtzeit-PCR, um dort Verunreinigungen der cDNA-Probe mit chromosomaler DNA detektieren zu können. Die cDNA-Synthese der Proben erfolgte dann im Thermocycler nach folgendem Programm:

5 Minuten	25 °C
30 Minuten	42°C
5 Minuten	85°C

Die fertigen cDNA-Proben wurden bei -20 °C gelagert.

F Echtzeit-PCR

Mit der Methode der Echtzeit-PCR kann der Anteil einer bestimmten mRNA in einer Gesamt-RNA-Probe quantitativ ermittelt werden. Dazu muss die RNA zunächst mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden (2.2.5 E). Die erhaltene cDNA kann

dann als Vorlage in einer anschließenden PCR-Reaktion verwendet werden, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren. Bei der hier verwendeten Form der Echtzeit-PCR wird zum PCR-Ansatz neben den spezifischen Primern der interkalierende Farbstoff SYBR Green zugegeben. Dieser Farbstoff emittiert Fluoreszenz nur, wenn er an doppelsträngige DNA bindet, im ungebundenen Zustand zeigt er keine Fluoreszenz [Bustin, 2000]. Mit steigender Zahl der Amplifikationszyklen und der daraus resultierenden steigenden Anzahl an PCR-Produkten erhöht sich auch die gemessene Fluoreszenz der Probe. Bei dem Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz steigt, wird der CT-Wert („cycle-threshold“) definiert. Dieser tritt immer am Anfang der exponentiellen Phase auf und ist proportional zu der in der Probe enthaltenen Kopienzahl der untersuchten mRNA [Gibson et al., 1996].

In dieser Arbeit wurde eine relative Quantifizierung der erhaltenen PCR-Resultate durchgeführt, wobei die Expression eines Zielgens auf ein nicht reguliertes Haushaltsgen, das zur internen Normalisierung herangezogen wird, bezogen wird [Heid et al., 1996].

Durchführung

Bei der Echtzeit-PCR handelt es sich um eine äußerst sensitive und somit eine für Kontaminationen anfällige Methode. Daher mussten bestimmte Vorkehrungen getroffen werden, um Verunreinigungen zu verhindern. So wurde an einem gesonderten Arbeitsplatz mit einem separaten Pipettensatz gearbeitet, des Weiteren wurden ausschließlich sterile Pipettenspitzen mit Filtereinsatz sowie autoklavierte Reaktionsgefäße und autoklaviertes Wasser verwendet.

Als erster Schritt zur Durchführung der Echtzeit-PCR wurden die benötigten Mengen aller Reagenzien berechnet, wobei für jede Reaktion ein Duplikat mit eingeplant wurde. Eine zweifach konzentrierte Stammlösung aus PCR-Puffer, dNTPs und Magnesiumchlorid, die bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert werden konnte, wurde hergestellt und folgende Mengen pro PCR-Reaktion zu einem Endvolumen von 9,67 µl gemischt:

Tab. 9: 2x Stammlösung für die Echtzeit-PCR.

	Volumen	Endkonzentration (20 µl Reaktionsansatz)
10x PCR-Puffer	2 µl	1x
25 mM MgCl ₂	0,8 µl	2,5 mM
25 mM dNTPs	0,16 µl	0,2 mM
H ₂ O	6,71 µl	

Unmittelbar vor Gebrauch wurden die folgenden Volumina an Hotstart-Taq-DNA-Polymerase und SYBR Green zu dieser Mischung bis zu einem Endvolumen von 10 µl pro Reaktion gegeben:

Tab. 10: Hotstart-Taq-DNA-Polymerase- und SYBR Green-Volumina zur 2x Stammlösung.

	Volumen	Endkonzentration (20 µl Reaktionsansatz)
2x Stammlösung	9,67 µl	1x
5U/µl Hotstart-Taq-DNA-Polymerase	0,08 µl	0,4 U/Reaktion
1:500.000 SYBR Green	0,25 µl	1:40.000.000

Als nächstes wurde für jede zu untersuchende cDNA-Probe in einem Reaktionsgefäß der Reaktionsansatz aus 2x Stammlösung, Wasser und cDNA bis zu einem Endvolumen von 15 µl pro Reaktion gemischt.

Tab. 11: Reaktionsansatz für die Echtzeit-PCR.

	Volumen	Endkonzentration (20 µl Reaktionsansatz)
2x Stammlösung (inkl. Polymerase und SYBR Green)	10 µl	1x
H ₂ O	4,8 µl	
1 µg RNA/20 µl äquivalente cDNA	0,2 µl	10 ng/Reaktion

Dieser Reaktionsansatz wurde auf Eis in 0,1 ml- oder 0,2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Pro Reaktion wurden 5 µl einer Mischung aus 1,6 µM Vorwärts-Primer und 1,6 µM Rückwärts-Primer hinzugegeben, wobei nun das Endvolumen 20 µl betrug. Die Gefäße wurden schließlich verschlossen und in den Rotor des Echtzeit-Thermocyclers überführt, wobei folgendes PCR-Programm gestartet wurde:

Tab. 12: PCR-Programm für die Echtzeit-PCR.

	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit	Fluoreszenzmessung
Aktivierung der Hotstart-Taq-DNA-Polymerase	1	95°C	15 Minuten	nein
Amplifikation	40	95°C 60°C	15 Sekunden 1 Minute	nein ja

Schmelzkurve	1	60-95 °C (0,5 °C-Schritte)	je 5 Sekunden	Ja
--------------	---	-------------------------------	------------------	----

Die vom Echtzeit-Thermocycler erhaltenen Daten wurden dann mit der zugehörigen Rotor-Gene-Software analysiert. Die so für jede Reaktion bestimmten CT-Werte wurden zur weiteren Auswertung in ein Tabellenkalkulationsprogramm überführt und der relative Gehalt der untersuchten mRNA mit folgender Formel berechnet:

$$2^{(CTn-CTx)} \cdot 10.000$$

„CTn“ steht dabei für den CT-Wert der Reaktion, bei der die cDNA-Probe zur Normalisierung mit einem Primerpaar für das interne Haushaltsgen amplifiziert wurde, „CTx“ für den CT-Wert der Reaktion, bei der die Probe mit einem Primerpaar für das Zielgen amplifiziert wurde. Die Zahl „2“ steht für die im Idealfall sich ereignende Verdoppelung der amplifizierten cDNA Moleküle pro Zyklus. Da alle in dieser Arbeit verwendeten Primer vor dem eigentlichen Einsatz auf ihre Qualität hin getestet wurden, konnte auch von diesem Idealfall ausgegangen werden und mit der Zahl „2“ in der Formel gerechnet werden. Um den berechneten relativen mRNA-Gehalt in Werten möglichst größer als 1 darzustellen, wird der willkürlich gewählte Multiplikationsfaktor „10.000“ mit in die Formel einbezogen. Schließlich wurden der Mittelwert und die Standardabweichung von den analysierten Doppelwerten bestimmt und die daraus sich ergebenden Daten in einem Diagramm graphisch dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Bisheriger Forschungsstand

Alle nachfolgenden Experimente mitsamt ihren Fragestellungen basieren zum größten Teil auf den vorangegangenen Forschungsergebnissen im Rahmen einer Dissertation von Tanja Neumann. Die transkriptionsregulatorische Funktion von LMX1B im HeLa-Zellsystem und die Identifikation von Zielgenen von LMX1B standen dabei im Fokus dieser Arbeit [Neumann, 2009; Rascle et al., 2009a]. Eine kurze Zusammenfassung dieser Ergebnisse soll im folgenden näher darüber Aufschluss geben.

Da bis zum jetzigen Zeitpunkt nur einige wenige mutmaßliche Zielgene von LMX1B bekannt sind und auch deren Charakterisierung *in vivo* weitgehend ungenügend ist, liegt nach wie vor eines der Hauptziele unserer Arbeitsgruppe in der Identifikation der Zielgene von LMX1B. Aus diesem Grund wurde ein spezielles Zellsystem entwickelt, das die regulierte Synthese von humanem LMX1B unter Kontrolle des sogenannten Tet-off-Systems (s. 2.2.4) [Gossen et al., 1992] in HeLa-Zellen ermöglicht (s. Abb. 3). Diese Zelllinie wird im folgenden als HtTA-1/myc-LMX1B, bzw. deren Mutante als HtTA-1/myc-LMX1B (C95F) bezeichnet (HeLa-Zellen mit Tetrazyklin-Transaktivator). Bei der in dieser Arbeit als HtTA-1 bezeichneten Zelllinie handelt es sich um eine Zelllinie, welche den Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator konstitutiv produziert.

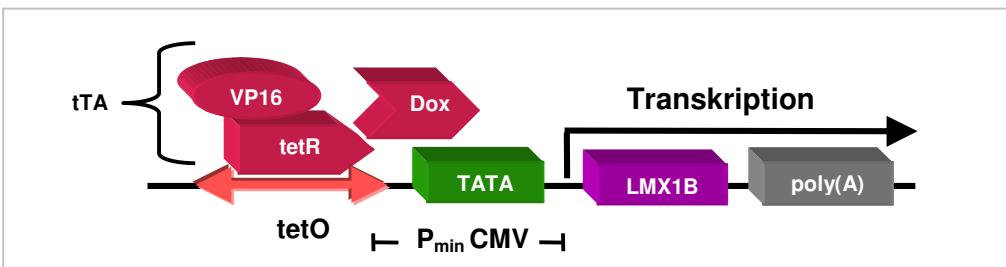


Abb. 3: Funktionsweise des Tet-off-Systems: VP16: virales Protein 16 vom Herpes Simplex Virus; tetO: Tetrazyklin-Operator; tetR: Tetrazyklin-Repressor; TATA: TATA-Box; P_{min}CMV: Minimalpromotor des Cytomegalovirus; poly(A): Polyadenylierungssignal; tTA: Fusionsprotein zwischen tetR und VP16. Durch Zugabe von Doxyzyklin (Dox) wird eine Konformationsänderung des tTA hervorgerufen, wodurch der tTA nicht mehr an den Operator binden kann und die transkriptionelle Aktivierung reprimiert wird. Ist Doxyzyklin jedoch nicht vorhanden, kann der tTA an den Operator binden und somit den Minimalpromotor aktivieren, was zu einer Initiation der Transkription der gewünschten Ziel-cDNA führt. Dieses System wird als Tet-off-System bezeichnet.

Bei Verwendung dieses Tet-off-Systems wird in Abwesenheit des Antibiotikums Dozyzyklin die LMX1B-mRNA nach 1-2 (s. Abb. 4, LMX1B) sowie nach ungefähr 3 Tagen das Protein (s. Abb. 5, LMX1B-WT) in HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen detektiert.

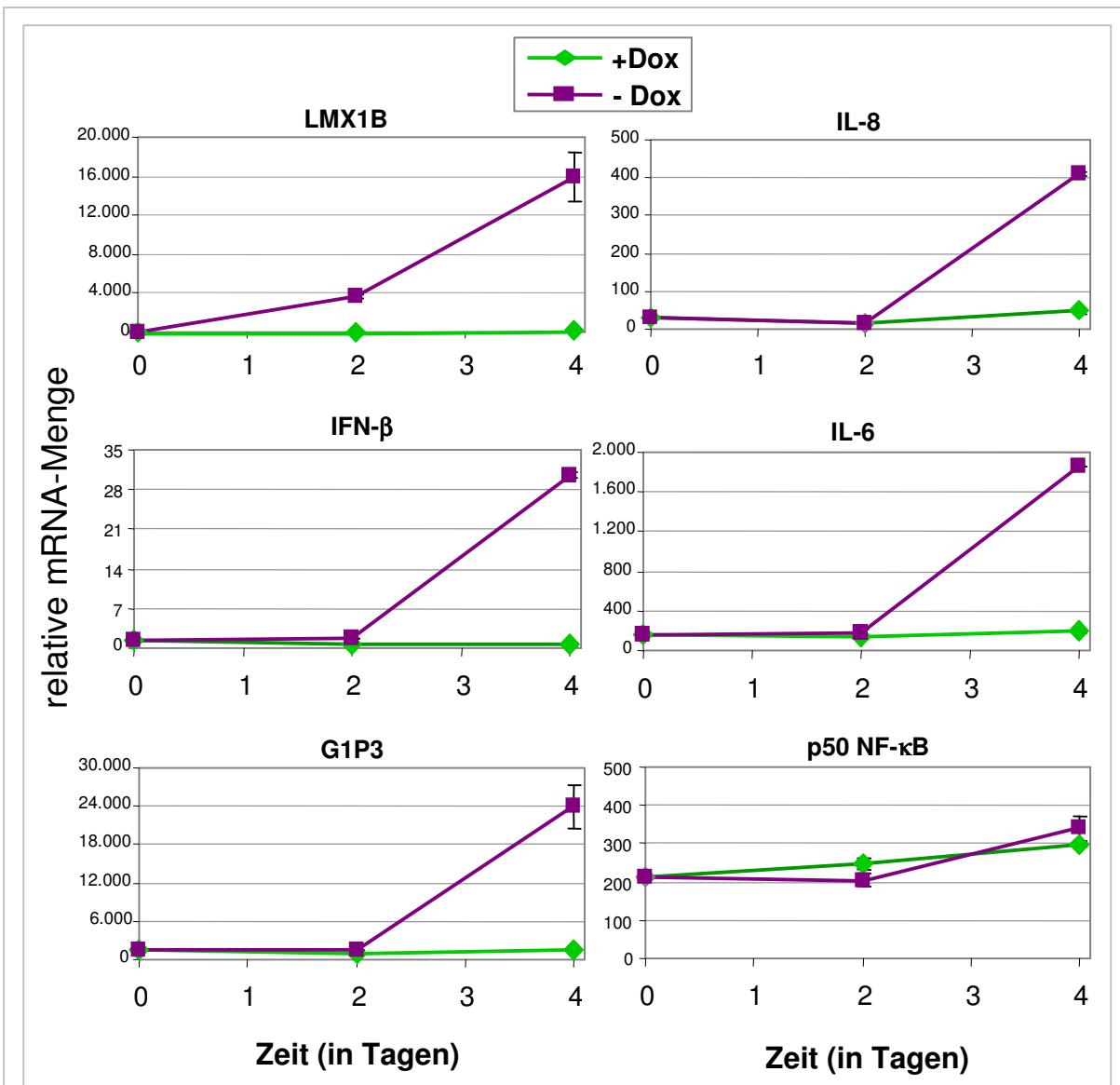


Abb. 4: RT-qPCR-Analyse der Expression von Interferon stimulierten Genen (ISGs) und NF-κB-Zielgenen bei LMX1B synthetisierenden HtTA-1-Zellen. Aus HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen, die 0, 2 und 4 Tage in Medium mit oder ohne Dozyzyklin, um so die LMX1B-Synthese zu induzieren (-Dox) oder zu inhibieren (+Dox), kultiviert wurden, wurde Gesamt-RNA isoliert und aus dieser cDNA synthetisiert. Eine 10 ng RNA äquivalente Menge cDNA wurde pro Reaktion in einer Echtzeit-PCR mit den Primerpaaren hLMX1B F8/R8, hIL-8 F1/R1, hIFN-β F1/R1, hIL-6 F1/R1, hG1P3 F1/R1, hp50 NF-κB F1/R1 oder hLamA/C F/R (zur Normalisierung) amplifiziert. In HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen induziert LMX1B die Expression von Interferon-stimulierten Genen (z.B. G1P3) sowie von NF-κB-Zielgenen (z.B. IL6, IL8, IFNB1). Andere NF-κB-Zielgene wie z.B. NF-KB-p50 werden nicht durch LMX1B induziert [Neumann, 2009; Rascle et al., 2009a].

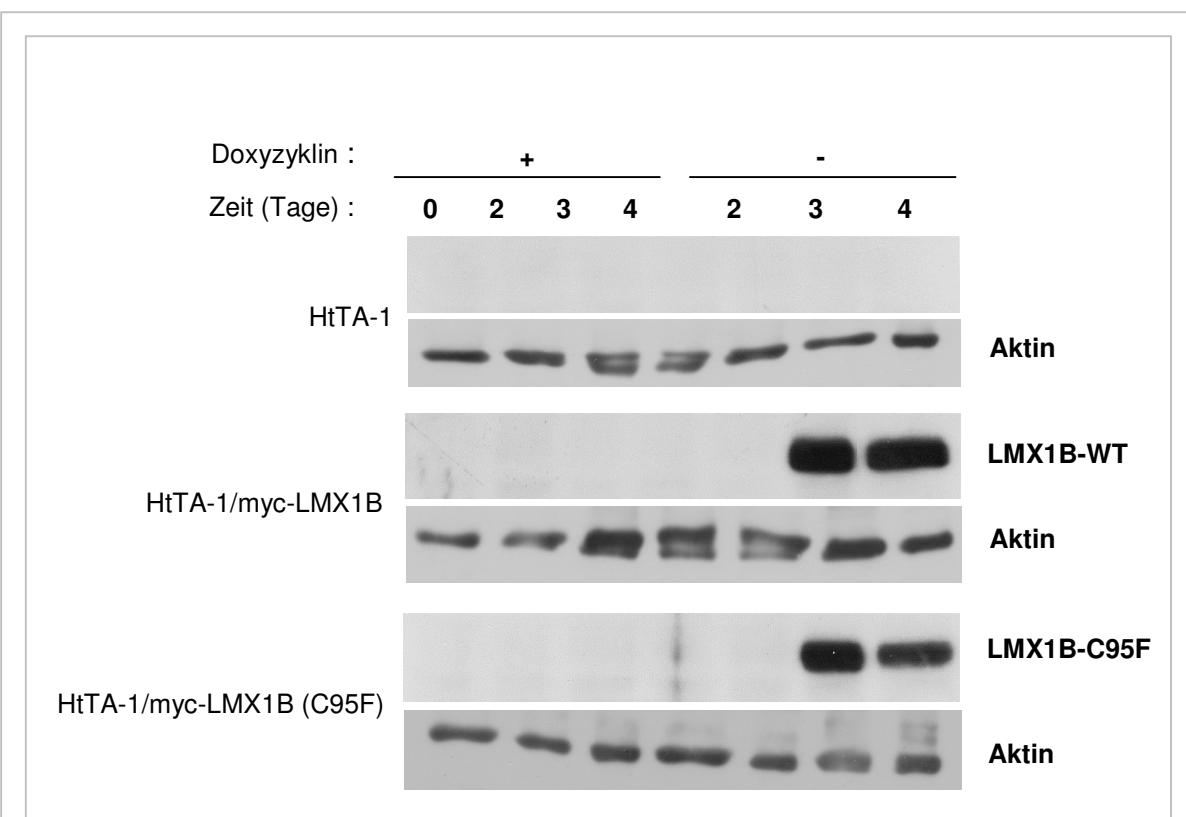


Abb. 5: Western-Blot-Analyse der induzierbaren Synthese von LMX1B-Wildtyp (WT)- und LMX1B-C95F-Protein in stabil transfizierten HtTA-1 Zellen. HtTA-1-, HtTA-1/myc-LMX1B- und HtTA-1/myc-LMX1B (C95F)-Zellen wurden für die angegebene Zeit in Medium mit bzw. ohne Doxzyklin kultiviert. An den entsprechenden Tagen wurden die Zellen geerntet, Proteinlysate hergestellt und je 40 µg Gesamt-Protein über ein Gel aufgetrennt. Bei der anschließenden Western-Blot-Analyse wurde das LMX1B-Protein mit dem monoklonalen anti-LMX1B-Antikörper 193-67 und einem HRP-gekoppelten anti-Maus IgG-Sekundärantikörper nachgewiesen, wobei sich die errechnete Bande bei 45 kDa zeigte. Als interne Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen α -Aktin. Der Röntgenfilm wurde auf der Membran für 2 Stunden exponiert. **In Doxzyklin-freiem Medium werden das LMX1B-Wildtyp- und das LMX1B-C95F-Protein in vergleichbarer Menge nach etwa 3 Tagen synthetisiert.** (Versuch in Zusammenarbeit mit Tanja Neumann durchgeführt; s. Dissertation Tanja Neumann, 2009)

Bei einer früheren Genexpressionsanalyse bei LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen fiel eine Gruppe an Genen auf, die in diesen Zellen induziert werden. Dabei handelt es sich um Interferon-stimulierte Gene (ISGs) wie z.B. *ISG15* und *G1P3*, *IRF1* und *IRF7* (s. Abb. 4, G1P3) [Prestel, 2003; Neumann, 2009].

Im Rahmen einer Habilitation und einer Dissertation konnte eine weitere Gruppe an Genen identifiziert werden, deren Expression ebenfalls nach 48 h aktiviert wird. Hierbei handelt es sich um Zielgene des Transkriptionsfaktors NF- κ B, wie z.B. *IL8*, *IL6*, *IL1B* und *IFNB*, die für

IL-8, IL-6, IL-1 β und IFN- β kodieren (s. Abb. 4, IL-8, IFN- β , IL-6) [Rasclle, 2009b; Neumann, 2009; Rasclle et al., 2009a].

Weitere Genexpressions-Analysen mittels RT-qPCR konnten zeigen, dass sich nicht alle NF- κ B-Zielgene, wie z.B. *NF-KB-p50* (s. Abb. 4, NF- κ B p50), sondern nur eine gewisse Anzahl an Genen durch LMX1B induzieren lassen (s. Abb. 4) [Rasclle, 2009b; Neumann, 2009; Rasclle et al., 2009a]. Aus diesem Grund stellt auch bei folgenden Genexpressions-Analysen NF- κ B p50 die Negativkontrolle dar.

Tanja Neumann konnte im Rahmen ihrer Dissertation zeigen, dass dies daraus resultiert, dass die Expression der NF- κ B-Zielgene durch LMX1B sich in einer Primärantwort ereignet. In einem zweiten Schritt ist das NF- κ B-Zielgen *IFNB1* für die Regulierung der Interferon-stimulierten Gene verantwortlich, wobei sich IFN- β selbst über einen Rückkoppelungsmechanismus reguliert, wie es in nachfolgendem Modell zusammenfassend schematisch dargestellt ist (Abbildung 6) [Neumann, 2009; Rasclle et al., 2009a].

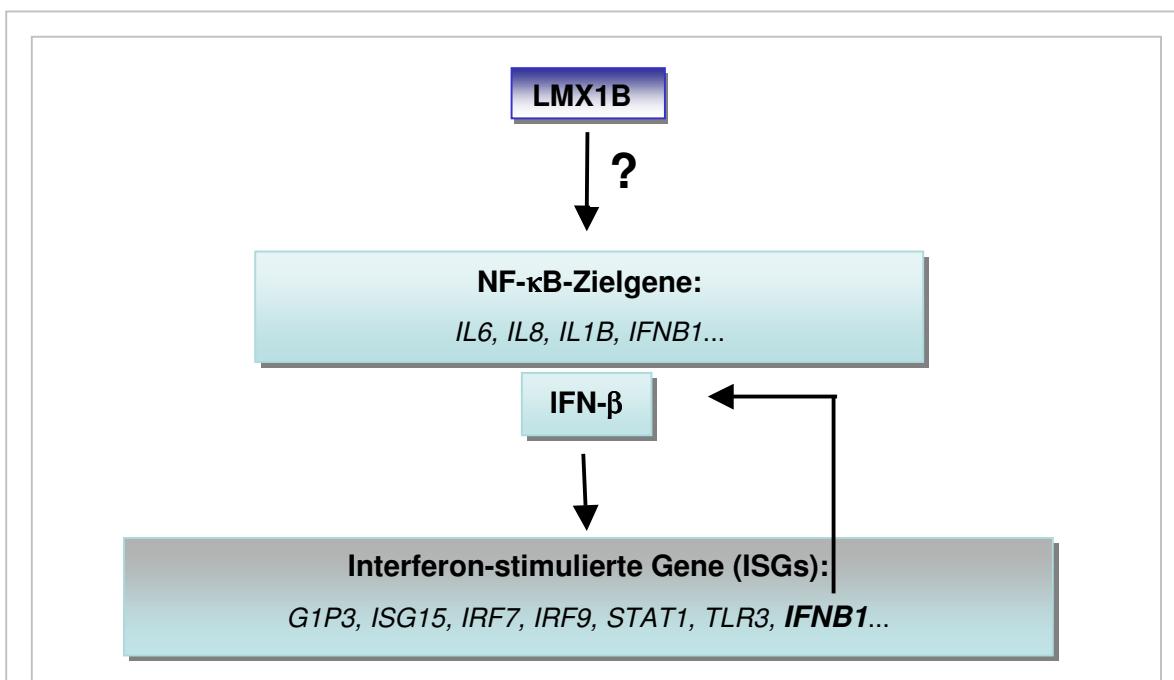


Abb. 6: Die durch LMX1B aktivierte Genexpression in HeLa-Zellen (Modell). LMX1B induziert die Expression von einigen NF- κ B-Zielgenen, darunter *IFNB1*. Das IFN- β -Protein wird sezerniert und induziert dadurch die Expression der ISGs. Da es sich bei IFN- β selbst auch um ein ISG handelt, erfolgt die Synthese von IFN über einen positiven Rückkoppelungsmechanismus [Neumann, 2009].

Ungeklärt blieben jedoch die zugrunde liegenden Mechanismen dieses Befundes, zum Beispiel, ob es sich um eine direkte Aktivierung oder um eine indirekte Aktivierung von den

betroffenen NF-κB-Zielgenen durch LMX1B handelt. Das Erforschen dieser molekularen Mechanismen der durch LMX1B stattfindenden Induktion der NF-κB-Zielgene stand im Fokus der vorliegenden Arbeit und liegt den folgenden Experimenten als Zielsetzung zu Grunde.

3.2 Induktion der Genexpression durch LMX1B ist spezifisch und benötigt eine funktionelle LIM2-Domäne

Wie bereits in Kapitel 3.1 näher beschrieben, knüpfen die Experimente dieser Arbeit an den von Tanja Neumann in ihrer Dissertation erbrachten zentralen Befund einer erhöhten Expression von Interferon-stimulierten Genen (ISGs) und NF-κB-Zielgenen in LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen, an. Im Folgenden sind Versuche geschildert, die die Spezifität dieses Effekts, ausgelöst durch LMX1B, eindeutig demonstrieren sollen. LMX1B wird in HeLa-Zellen bei dem hier verwendeten Tet-off-System durch die Wegnahme von Dozyzyklin aus dem Kulturmedium induziert (s. Abb. 3). Dass die durch LMX1B induzierte Expression der betroffenen Gene nicht durch einen unspezifischen Effekt von Dozyzyklin verursacht wird, sollte durch einen Vergleich der Expressions-Analysen in der Ausgangszelllinie HtTA-1 mit der HtTA-1/myc-LMX1B-Zelllinie verifiziert werden. Die Verwendung der HtTA-1hFer-Zellen, bei denen die Ferritin-Expression ebenfalls über das Tet-off-System reguliert wird, sollte Aufschluss darüber geben, ob der Effekt das Resultat einer Proteinüberexpression ist. Zusätzlich sollte mit Hilfe einer LMX1B-Mutante [HtTA-1/myc-LMX1B (C95F)] geklärt werden, ob es sich um einen für das LMX1B-Protein spezifischen Effekt handelt.

In Zusammenarbeit mit Tanja Neumann wurden HtTA-1-Zellen, HtTA-1/myc-LMX1B-Wildtyp-Zellen und HtTA-1/myc-LMX1B (C95F)-Zellen parallel für 4 Tage in Medium mit bzw. ohne Dozyzyklin kultiviert. An den angegebenen Tagen wurden Zellen für eine Proteinisolierung geerntet, um die LMX1B-Produktion der drei Zelllinien zu überprüfen. Die dafür vorgesehenen Zellen wurden lysiert, dann eine Gelelektrophorese und schließlich zur Visualisierung der LMX1B-Produktion eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Die Verwendung des Antikörpers gegen α-Aktin diente hierbei der Bestätigung, dass äquivalente Proteink Mengen aufgetragen wurden (s. Abb. 5). Zusätzlich wurden auch an Tag 4 Zellen zur RNA-Isolierung für eine Genexpressions-Analyse der drei Zelllinien mittels RT-qPCR geerntet. Die RNA wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und in der anschließenden Echtzeit-PCR-Reaktion eingesetzt. Die Ergebnisse der Genexpressions-Analysen des NF-κB-Zielgens *IL8* und des Interferon-stimulierten Gens *G1P3*, sowie die der Kontrollen *LMX1B* und *NF-KB-p50* sind dabei in Abbildung 7 zu sehen.

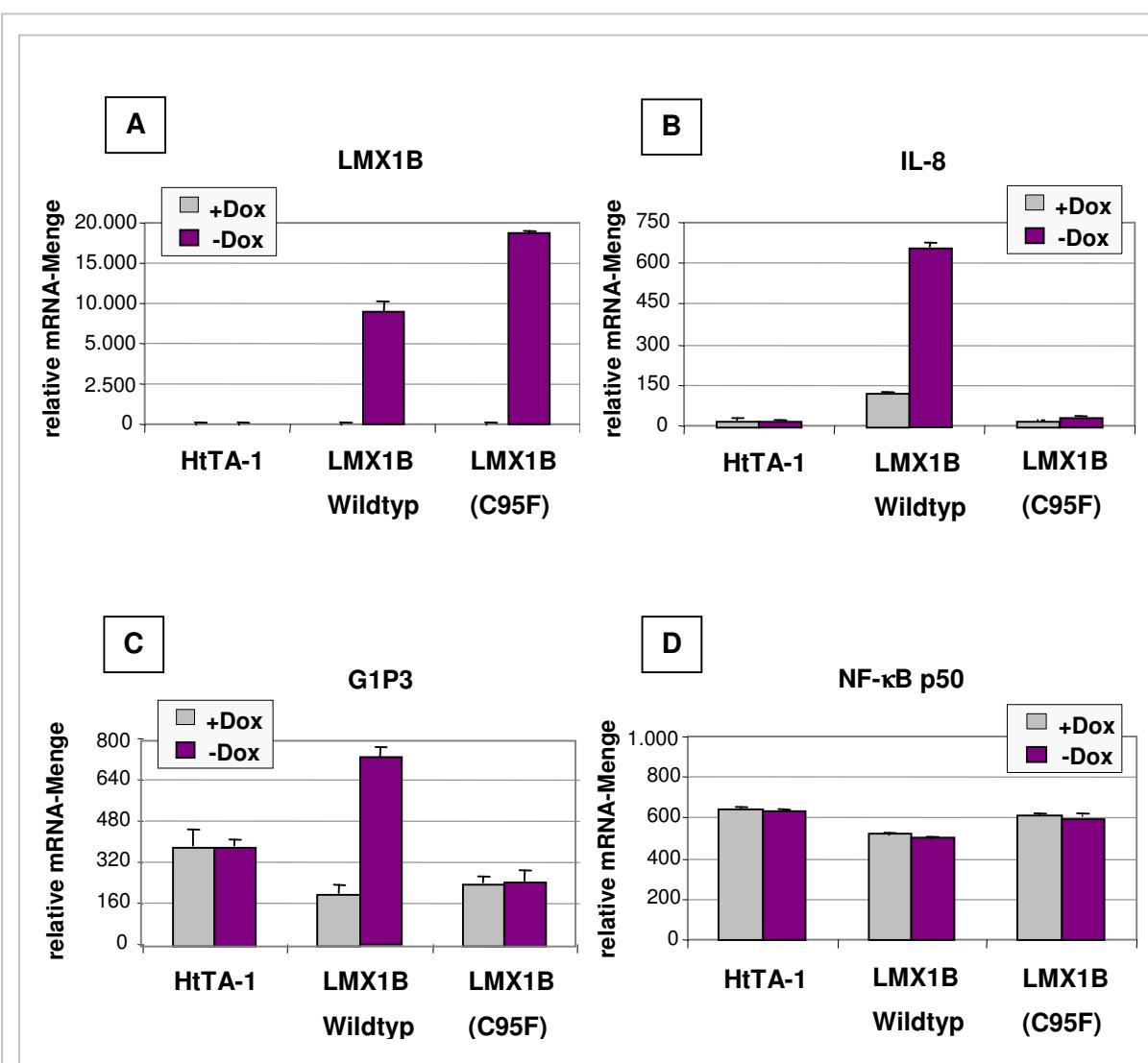


Abb. 7: RT-qPCR-Analyse der Genexpression von HtTA-1- und das LMX1B-Wildtyp- bzw. LMX1B (C95F)-Protein synthetisierenden Zellen. HtTA-1-, HtTA-1/myc-LMX1B- und HtTA-1/myc-LMX1B (C95F)-Zellen wurden für 4 Tage in Medium mit bzw. ohne Doxycyclin kultiviert. Die jeweilige Gesamt-RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine 10 ng RNA entsprechende Menge an cDNA wurde zusammen mit einem der Primerpaare hLMX1B F8/R8 (A), hIL8 F1/R1 (B), hG1P3 F1/R1 (C), hNF-κB p50 F1/R1 (D) oder hLamA/C F/R (zur Normalisierung) in jede Echtzeit-PCR-Reaktion eingesetzt. **Nur die das Wildtyp-LMX1B produzierenden Zellen zeigten eine erhöhte Synthese der IL8- und G1P3-mRNA.** (Versuch in Zusammenarbeit mit Tanja Neumann durchgeführt; s. Dissertation Tanja Neumann, 2009)

Die Induktion der ISGs und der NF-κB-Zielgene durch LMX1B in HtTA-1/myc-LMX1B-Wildtyp-Zellen ist kein unspezifischer Effekt der Dozyzyklin-Konzentration im Medium

Dass es sich bei der durch LMX1B erhöhten Induktion der betroffenen Gene in HeLa-Zellen nicht um einen unspezifischen Effekt handelt, der durch die Wegnahme des Dozyzyklins aus dem Kulturmedium ausgelöst wird, sollte als erstes getestet werden. Um dies zu überprüfen, wurde die Genexpression der HtTA-1-Zelllinie mit derjenigen der HtTA-1/myc-LMX1B-Zelllinie miteinander verglichen (s. Abb. 7, HtTA-1 und LMX1B WT bei LMX1B, IL8, G1P3 und NF-κB p50).

Wie die Abbildungen 5 und 7 zeigen, ist LMX1B sowohl auf Protein-Ebene (s. Abb. 5, HtTA-1 und HtTA-1/myc-LMX1B, -Dox, Tag 3 und 4) als auch auf mRNA-Ebene (s. Abb. 7, A: HtTA-1 und LMX1B WT, -Dox) nur bei den in Dozyzyklin-freiem Medium kultivierten HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen zu detektieren. Im Falle der Negativkontrolle NF-κB p50 sind die relativen mRNA-Mengen bei HtTA-1- und HtTA-1/myc-LMX1B-Wildtyp-Zellen annähernd gleich hoch. Dies zeigt an, dass keine Beeinflussung der Expression von NF-κB p50 in beiden Klonen stattfindet (s. Abb. 7, D: HtTA-1 und LMX1B WT, +/-Dox).

Betrachtet man nun die mRNA-Spiegel des NF-κB-Zielgens *IL8* und des ISGs *G1P3*, ist erwartungsgemäß durch die Wegnahme von Dozyzyklin aus dem Kulturmedium bei den LMX1B-Wildtyp produzierenden Zellen eine gesteigerte Expression von *IL8* sowie von *G1P3* zu beobachten (s. Abb. 7, B und C: LMX1B WT, -Dox). Beim HtTA-1-Klon hingegen war die erhöhte Expression von *IL8* oder *G1P3* nicht festzustellen, wenn die kultivierten Zellen kein Dozyzyklin im Medium hatten (s. Abb. 7, B und C: HtTA-1, -Dox). Folglich kann die Induktion in den Wildtyp-LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen kein unspezifischer Effekt ausgelöst durch die Wegnahme des Dozyzyklins aus dem Kulturmedium sein.

Die Induktion der ISGs und der NF-κB-Zielgene in HtTA-1/myc-LMX1B-Wildtyp-Zellen ist spezifisch für LMX1B

Als nächstes sollte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der durch LMX1B erhöhten Induktion der ISGs und NF-κB-Zielgene nicht um einen unspezifischen, durch die Überexpression von LMX1B ausgelösten Befund handelt.

Daher wurden zusätzlich zu den HeLa-Zellen, die das LMX1B-Wildtyp-Protein produzieren, auch HeLa-Zellen, die das LMX1B-C95F-Protein induzierbar synthetisieren, auf die Expression dieser Gene getestet. Diese als HtTA-1/myc-LMX1B (C95F) bezeichnete Zelllinie wurde von Jürgen Kastner im Rahmen einer Diplomarbeit generiert [Kastner, 2004]. Hierbei handelt es sich um stabil transfizierte HeLa-Zellen, die LMX1B mit einer Punktmutation in der

LIM2-Domäne synthetisieren. Diese Punktmutation wurde von Vollrath et al. 1998 in der LIM2-Domäne von LMX1B bei Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom identifiziert. Es liegt hierbei an der Position 95 ein Austausch der Aminosäure Cystein gegen die Aminosäure Phenylalanin vor. Da das Cystein Bestandteil des stabilisierenden Zinkfinger-Motivs in dieser Domäne ist, wird deren Struktur durch den Aminosäureaustausch zerstört, wodurch sehr wahrscheinlich die Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Proteinen verloren geht [Bongers et al., 2002].

Die Western-Blot-Analyse (Abbildung 5) sowie die qPCR-Analyse (Abbildung 7) zeigen erwartungsgemäß bei HtTA-1-Zellen kein LMX1B (s. Abb. 5, HtTA-1 und Abb. 7, A: HtTA-1). Hingegen kann bei den ohne Dozyzyklin kultivierten HtTA-1/myc-LMX1B- und HtTA-1/myc-LMX1B (C95F)-Zellen LMX1B sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene detektiert werden. Dabei konnte jeweils nur ein geringer Unterschied zwischen beiden Klonen an den Tagen 3 und Tag 4 festgestellt werden [s. Abb. 5 HtTA-1/myc-LMX1B und HtTA-1/myc-LMX1B (C95F), -Dox, Tag 3 und 4 und Abb. 7, A: LMX1B WT und LMX1B (C95F), -Dox]. Wie schon für HtTA-1- und HtTA-1/myc-LMX1B-Wildtyp-Zellen gezeigt wurde, zeigt sich auch in HtTA-1/myc-LMX1B (C95F)-Zellen keine Änderung im Expressionsverhalten der Negativkontrolle NF-κB p50 [s. Abb. 7, D: HtTA-1, LMX1B WT und LMX1B (C95F), +/-Dox].

Wurde LMX1B in den LMX1B-Wildtyp-produzierenden Zellen induziert, ist die zu erwartende gesteigerte Expression von *IL8* sowie von *G1P3* zu beobachten (s. Abb. 7, B und C: LMX1B WT, -Dox). Diese Erhöhung der Expression von *IL8* und *G1P3* war jedoch beim LMX1B (C95F)-Klon nicht festzustellen, wenn kein Dozyzyklin im Medium war. Die mRNA-Menge ist in diesem Fall genauso hoch wie bei den mit Dozyzyklin behandelten HtTA-1/myc-LMX1B (C95F)-Zellen (s. Abb. 7, B und C: LMX1B (C95F), +/-Dox). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei der erhöhten Induktion der ISGs und NF-κB-Zielgene um einen für LMX1B-spezifischen Effekt handelt, der nicht auf eine Überexpression eines beliebigen Proteins zurückzuführen ist.

Zusätzlich ist ein weiterer wichtiger Befund bei der Verwendung der LMX1B (C95F)-Mutante zu beobachten. Bei Zellen des LMX1B (C95F)-Klons, die das LMX1B-Protein ohne eine funktionelle LIM2-Domäne synthetisieren, konnte für *IL8* und *G1P3* keine erhöhte Synthese festgestellt werden (s. Abb. 7 B und C). Dies zeigt, dass die LIM2-Domäne von LMX1B essentiell für die erhöhte Induktion der ISGs und NF-κB-Zielgene durch LMX1B sein muss.

Um die Richtigkeit der Hypothese, dass die Induktion der ISGs und NF-κB-Zielgene ein LMX1B-spezifischer Effekt ist, untermauern zu können, wurden zusätzlich HeLa-Zellen, die

die H-Kette des humanen Ferritins produzieren (HtTA-1hFer-Zellen), auch auf die Expression der betroffenen Gene getestet. Wie bei den LMX1B synthetisierenden HtTA-1-Zellen wurde bei diesen Zellen ein wachstumsinhibierender Effekt, induziert durch die Synthese von Ferritin, festgestellt [Cozzi et al., 2000]. Die für diesen Versuch verwendeten HtTA-1hFer-Zellen wurden freundlicherweise von Paolo Santambrogio (San Raffaele Scientific Institute, Abteilung für biologische und technologische Forschung, Italien) zur Verfügung gestellt [Cozzi et al., 2000]. Da nach schriftlicher Mitteilung von Paolo Santambrogio 6 Tage nach Doxyzyklin-Wegnahme die Ferritin-Synthese am höchsten ist, wurden diese Zellen in Medium mit bzw. ohne Doxyzyklin für 6 Tage kultiviert. Parallel dazu wurden für 4 Tage HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen kultiviert. Am Beginn der Versuchsserie sowie an den Tagen 2 und 4 wurden LMX1B-produzierende HeLa- und Ferritin-produzierende HeLa-Zellen (letztere zusätzlich noch an Tag 6) sowohl für die RNA-Extraktion als auch für die Protein-Extraktion geerntet.

Für die Analyse der Genexpression aus den jeweiligen geernteten Zellproben wurde die Gesamt-RNA isoliert und diese als Vorlage für die Echtzeit-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Ergebnisse der an Tag 4 und Tag 6 geernteten HtTA-1hFer- und HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen sind in der folgenden Abbildung 8 graphisch dargestellt.

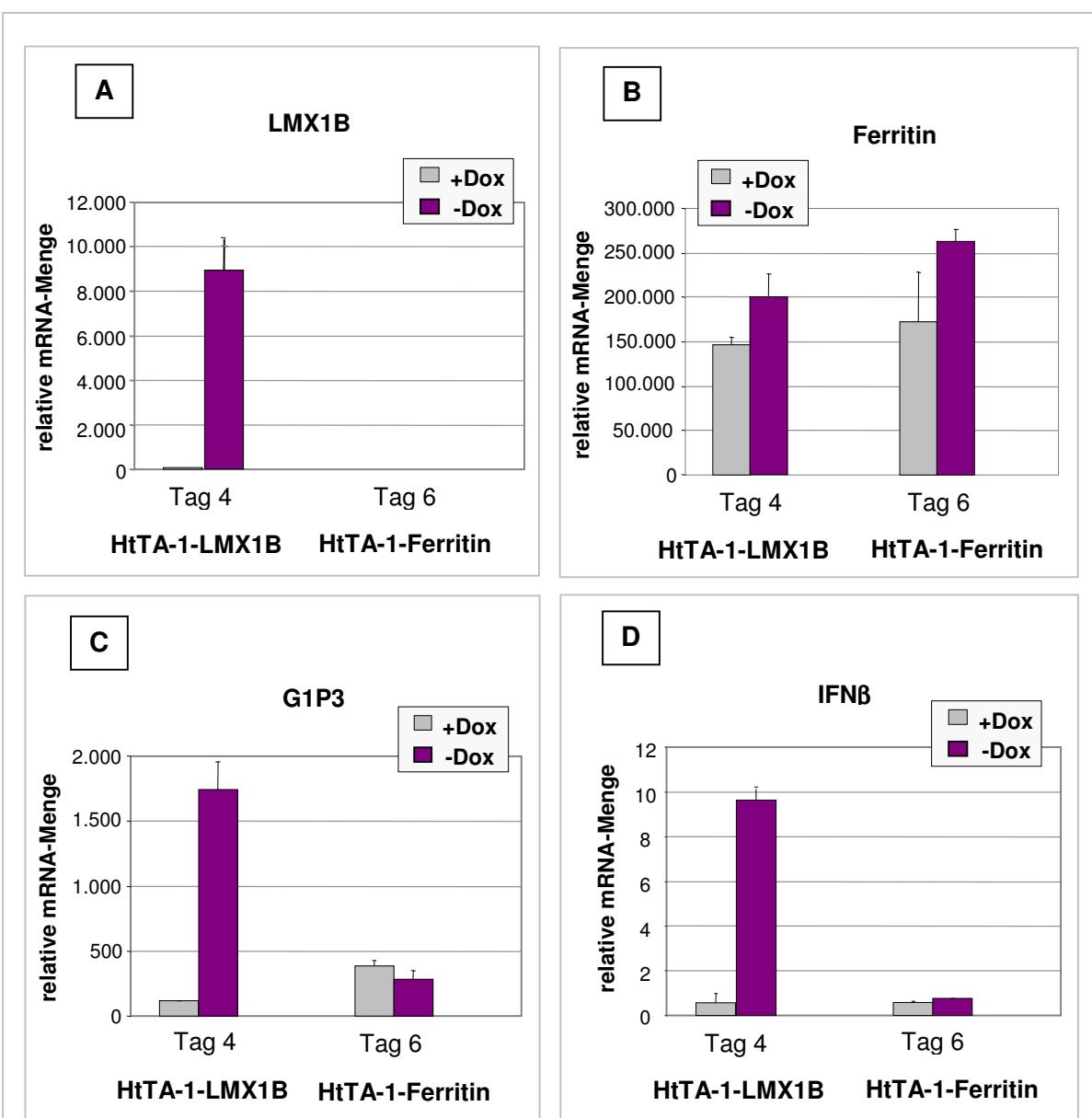


Abb. 8: RT-qPCR-Analyse von Ferritin-produzierenden- und LMX1B-produzierenden-HtTA-1-Zellen.
 HtTA-1hFer- und HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurden für 4 bzw. 6 Tage in Medium mit bzw. ohne Dozyzyklin kultiviert und an den jeweils angegebenen Tagen zur RNA-Extraktion geerntet. Aus je 1 µg der isolierten Gesamt-RNA wurde cDNA synthetisiert und eine 10 ng RNA entsprechende cDNA-Menge anschließend in jede PCR-Reaktion eingesetzt. Zur Amplifikation wurden die Primerpaare hLMX1B F8/R8 (A), hFer F2/R2 (B), hG1P3 F1/R1 (C), hIFNβ F1/R1 (D) und LamA/C F/R verwendet. **Ferritin-produzierende HtTA-1-Zellen zeigen keine erhöhte Genexpression bei dem ISG G1P3 und dem NF-κB-Zielgen IFNB1.**

Erwartungsgemäß wurde bei den HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen nach 4 Tagen Induktion eine große Menge an LMX1B-mRNA und in HtTA-1hFer-Zellen nach 6 Tagen keine LMX1B-mRNA detektiert (s. Abb. 8, A). Nicht zu erwarten waren die sehr hohen endogenen H-

Ferritin-mRNA-Mengen (s. Abb. 8, B). Zusätzlich kann auch keine drastische Erhöhung an synthetisierter Ferritin-mRNA nach Auswaschen von Dozyzyklin detektiert werden (s. Abb. 8, B). Paolo Santambrogio und dessen Arbeitsgruppe, von denen wir diesen Klon erhielten, teilten uns mit, dass sie zur Kontrolle die Ferritin-Synthese nur auf Proteinebene überprüfen und nie auf mRNA-Ebene. Freundlicherweise bestimmten sie für uns mit Hilfe der ELISA Methode die Proteinspiegel von Ferritin in induzierten und nicht induzierten HtTA-1hFer-Zellen (Abbildung 9).

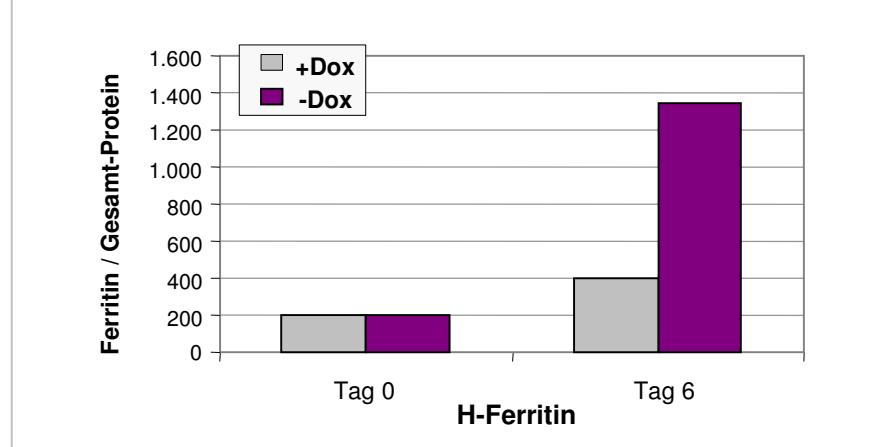


Abb. 9: ELISA-Analyse der Proteinspiegel von Ferritin-produzierenden HtTA-1-Zellen. Induzierte und nicht induzierte HtTA-1hFer-Zellen wurden am Versuchstag 0 und nach 6 Tagen geerntet, wobei es sich hierbei um die selben Zellproben der in Abbildung 5 dargestellten Ergebnisse handelt. Diese wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Santambrogio per ELISA auf Ferritin getestet. Dargestellt ist die Menge an Ferritin normalisiert gegen Gesamt-Protein. **In induzierten HtTA-1hFer-Zellen liegt an Tag 6 3,3 mal höhere Ferritinspiegel vor als in nicht induzierten Zellen.** (Daten freundlicherweise von Paolo Santambrogio generiert und zur Verfügung gestellt; San Raffaele Scientific Institute, Abteilung für biologische und technologische Forschung, Italien)

Wie in Abbildung 9 zu sehen, ist auf Proteinebene ein deutlicher Unterschied zwischen mit und ohne Dozyzyklin behandelten HtTA-1hFer-Zellen festzustellen. An Tag 6 liegt eine um den Faktor 3,3 höhere Ferritin-Expression in den induzierten als in den nicht induzierten Zellen vor. Auch dass die erhaltenen ELISA-Werte in dem Bereich waren, die die Arbeitsgruppe von Paolo Santambrogio immer ermittelt, bestätigte die Funktionsfähigkeit des hier verwendeten Zellklons.

Sollte es sich bei der durch LMX1B erhöhten Induktion der Gene um einen LMX1B-spezifischen Effekt handeln, so dürften in der Genexpressions-Analyse die Ferritin-produzierenden HeLa-Zellen keine Hochregulierung der ISGs und der NF-κB-Zielgene aufweisen. Erwartungsgemäß ist bei dem untersuchten ISG *G1P3* und bei dem NF-κB-

Zielgen *IFNB1* eine deutlich erhöhte Expression in LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen festzustellen (s. Abb. 8, C und D: HtTA-1-LMX1B, -Dox). Hingegen können keine bzw. nur geringe mRNA-Mengen dieser Gene in den Ferritin-produzierenden HeLa-Zellen detektiert werden (s. Abb. 8, C und D: HtTA-1hFer, -Dox).

So konnte unter Verwendung der HtTA-1hFer-Zellen gezeigt werden, dass es sich bei der erhöhten Expression von Interferon-stimulierten Genen und NF-κB-Zielgenen in LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen nicht um einen unspezifischen Effekt, ausgelöst durch die Überexpression des LMX1B-Proteins, handeln kann. Dieser Befund bestätigte die vorangegangenen, mit den HtTA-1/myc-LMX1B (C95F)-Zellen erhaltenen Ergebnisse.

3.3 LMX1B aktiviert nicht den NF-κB-Signalweg im Zytosol

Mittels cDNA-Array und RT-qPCR gefundene NF-κB-Zielgene in LMX1B-produzierenden Zellen, wie z.B. *IL6* oder *IL8*, weisen darauf hin, dass es sich bei den induzierten Genen eher um Zielgene des klassischen p50/p65-abhängigen NF-κB-Signalwegs als um Zielgene des alternativen p52/RelB NF-κB-Signalwegs handelt [Bonizzi und Karin, 2004]. Aus diesem Grund liegt der Fokus dieser Arbeit auf der Charakterisierung des klassischen NF-κB-Signalweges.

Bei der durch LMX1B ausgelösten Induktion dieser NF-κB-Zielgene könnte es sich um eine indirekt im Zytosol stattfindende Aktivierung von NF-κB handeln. So könnte LMX1B zum Beispiel durch Beeinflussung einer zytosolischen Komponente des klassischen NF-κB-Signalweges die Translokation von p50/p65 in den Kern bewirken und somit indirekt Einfluss auf die Regulierung dieser Gene nehmen. Wäre dies der Fall, wäre eine erhöhte Translokation von NF-κB p50/p65 vom Zytoplasma in den Kern zu erwarten.

Um dies zu überprüfen, wurde als nächstes die Translokation von NF-κB p50/p65 in den Zellkern immunzytochemisch und durch Western-Blot-Analyse nukleärer und zytosolischer Lysate untersucht. Über den Vergleich von Zellen mit an- und abgeschalteter LMX1B-Synthese kann so eine Beeinflussung der Translokation von NF-κB p50/p65 durch LMX1B analysiert werden.

Für die Durchführung dieser Experimente war es jedoch erforderlich, eine Positivkontrolle zu finden, die in HeLa-Zellen die Aktivierung des NF-κB-Signalweges und die damit verbundene Translokation von im Zytoplasma gebundenem NF-κB p50/p65 in den Zellkern bewirkt, was dort die Aktivierung seiner Zielgene auslösen kann. So wurde der als typischer Aktivator des

klassischen NF-κB-Signalweges geltende Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) getestet, da gezeigt werden konnte, dass bei Stimulierung von HeLa-Zellen mit TNF-α die Gene *IL6* und *IL8* induziert werden [Tian et al., 2005].

Da die TNF-α-Stimulierung ein zeitabhängiger Effekt ist, wurde zunächst getestet, welche Stimulierungsdauer am effizientesten ist, um in HeLa-Zellen eine optimale Aktivierung des NF-κB-Signalweges zu erreichen. Dazu wurde TNF-α in einer Endkonzentration von 20 ng/ml [Tian et al., 2005] in das Medium von HeLa-Zellen gegeben und für unterschiedliche Inkubationszeiten stimuliert. Die Zellen wurden anschließend geerntet, um nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese eine Echtzeit-PCR durchzuführen (siehe Kapitel 2.2.5). Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse für das NF-κB-Zielgen *IL6*.

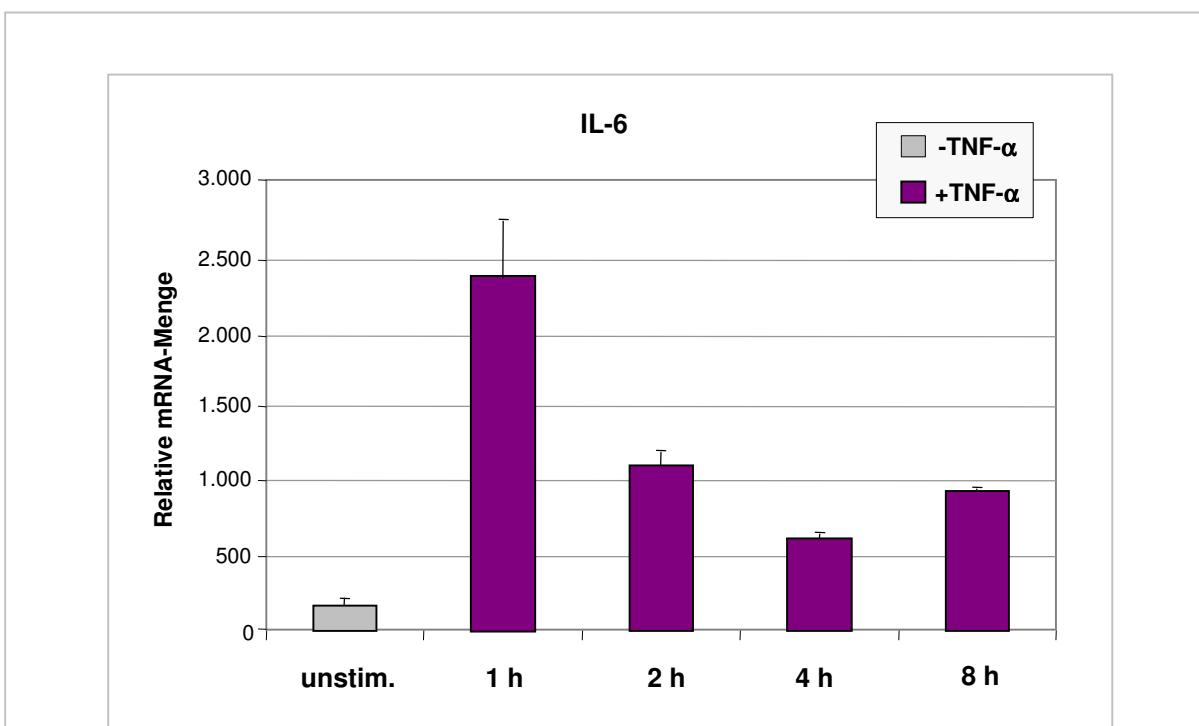


Abb. 10: RT-qPCR-Analyse der IL-6-mRNA Synthese von HeLa-Zellen. Die Zellen wurden nicht (unstim.), bzw. für die angegebene Zeit in Stunden (h) mit TNF-α (Endkonzentration von 20 ng/ml) inkubiert, bevor sie zur RNA-Extraktion geerntet wurden. Aus je 1 µg der isolierten Gesamt-RNA wurde cDNA synthetisiert und eine 10 ng RNA entsprechende cDNA-Menge anschließend in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Zur Amplifikation wurden die Primerpaare hIL-6 F1/R1 und LamA/C F/R (zur Normalisierung) verwendet. **Die Aktivierung des NF-κB-Signalweges ist in HeLa-Zellen bei einer TNF-α-Stimulierung für eine Stunde am effizientesten.**

Bei unstimulierten HeLa-Zellen wird erwartungsgemäß nur eine sehr geringe Menge an IL-6-mRNA detektiert. Dieser Befund spiegelt die Basalaktivität von NF-κB wieder. Hingegen wird bei einer TNF-α-Stimulierung der Zellen für 1-8 Stunden IL-6 im Vergleich dazu mindestens mehr als zehn mal so hoch produziert, wobei bei einer Stimulierungsdauer von 1 Stunde mit TNF-α am meisten IL-6-mRNA detektiert wird.

Somit konnte festgestellt werden, dass eine TNF-α-Stimulierungszeit von einer Stunde die optimale Dauer für die Aktivierung des NF-κB-Signalweges in HeLa-Zellen ist, da zu diesem Zeitpunkt eine maximale Induktion des NF-κB-Zielgens *IL6* zu beobachten ist.

Nachdem somit eine Positivkontrolle der Aktivierung des NF-κB-Signalweges in Form der einstündigen TNF-α-Stimulierung zur Verfügung stand, konnte als nächstes der Einfluss von LMX1B auf den NF-κB-Signalweg untersucht werden. HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurden in Medium mit bzw. ohne Dozyzyklin für 4 Tage kultiviert und dann für eine Stunde mit TNF-α stimuliert, um die Aktivierung des NF-κB-Signalweges zu kontrollieren. Von den geernteten Zellen wurden, wie unter 2.2.4 B beschrieben, zytosolische Extrakte und Kernextrakte hergestellt, welche daraufhin einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper für LMX1B oder NF-κB p65 unterzogen wurden. Als Kontrolle wurde zusätzlich ein Antikörper gegen das nukleäre Protein HDAC1 verwendet, um die Qualität der zytosolischen Extrakte und der Kernextrakte verifizieren zu können [Yang et al., 2002]. Nachfolgende Abbildung zeigt das Ergebnis dieser Analyse (s. Abb. 11).

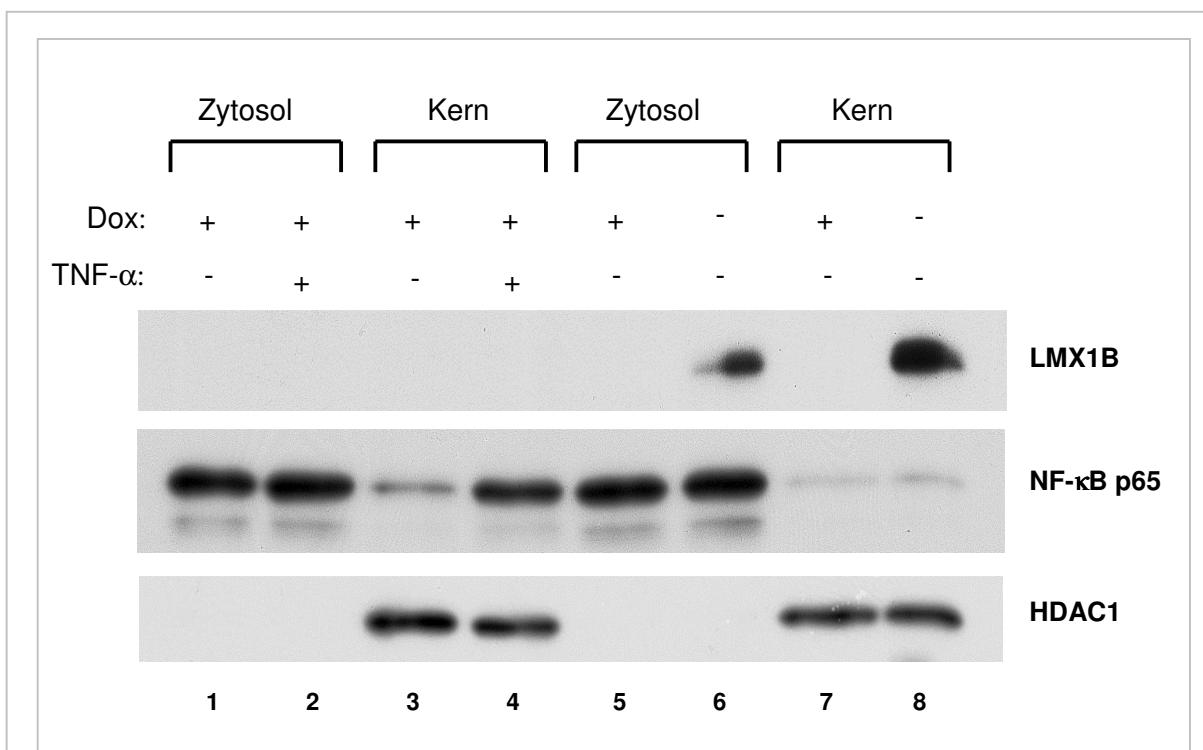


Abb. 11: Western-Blot-Analyse der NF-κB p65-Translokation in den Kern. HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurden für 4 Tage in Medium mit bzw. ohne Doxyzyklin kultiviert und für eine Stunde mit TNF-α stimuliert. Nukleäre und zytosolische Lysate wurden unter Verwendung der spezifischen Antikörper für LMX1B, NF-κB p65 und HDAC1 in einer Western-Blot-Analyse untersucht. Das nukleäre HDAC1-Protein diente der Kontrolle der Reinheit der hergestellten nukleären und zytosolischen Lysate. **LMX1B hat keinen Einfluss auf die Translokation von NF-κB p65 in den Zellkern.**

Das nukleäre HDAC1-Protein wird ausschließlich in den Kernextrakten detektiert (Abb. 11, Banden 3, 4, 7 und 8). Somit kann von sauberen zytosolischen und Kernextrakten ausgegangen werden. Erwartungsgemäß kann bei Zellen mit angeschalteter LMX1B-Synthese (aufgrund des Fehlens von Dozyzyklin im Medium) das LMX1B-Protein nachgewiesen werden (s. Abb. 11, Bande 6 und 8). Nicht zu erwarten war, dass LMX1B nicht nur im Kern, sondern auch im Zytosol detektiert wird (s. Abb. 11, Bande 6 und 8). Dies könnte mit der durch das Tet-off-System bedingten erhöhten Produktion von LMX1B in den Zellen erklärt werden.

Wurden HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen, die kein LMX1B produzieren, mit TNF- α stimuliert, konnte wesentlich mehr nukleäres NF- κ B p65 detektiert werden als bei den gleichen Zellen, die nicht mit TNF- α stimuliert wurden (s. Abb. 11, zu sehen im Vergleich von Bande 4 mit 3). Dies ist das Resultat der bereits beschriebenen Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch TNF- α , die die Translokation von NF- κ B p50/p65 in den Zellkern bewirkt. In LMX1B-

produzierenden HeLa-Zellen hingegen konnte keine Zunahme an nukleärem NF-κB p65-Protein festgestellt werden (s. Abb. 11, Vergleich der Banden 8 zu 7). Auch an früheren Zeitpunkten (Tage 1-3), an denen LMX1B produziert wird, wurde dieser Befund überprüft. Da die Western-Blot-Analyse dieser Zeitpunkte die gleichen Resultate wie an Tag 4 erbrachte, wurde auf eine Darstellung des Röntgenfilms für die Tage 1-3 verzichtet. Somit konnte anhand dieses Experimentes gezeigt werden, dass LMX1B keinen Einfluss auf die Translokation von NF-κB p50/p65 ausübt.

Da die Überprüfung der Lokalisation von Proteinen in den verschiedenen Zellkompartimenten auch durch eine immunzytochemische Untersuchung erfolgen kann, war dies das nächste Experiment, um die vorangegangen Ergebnisse der Western-Blot-Analyse bestätigen zu können. Zusätzlich ermöglicht diese Methode auch im Gegensatz zur Western-Blot-Analyse eine Visualisierung des Effekts durch LMX1B innerhalb einer einzelnen Zelle. Dadurch können Effekte, die möglicherweise bei Betrachtung der Gesamt-Zellpopulation bei der Western-Blot-Analyse maskiert sind, zum Vorschein treten.

Dafür wurden HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen auf unbeschichteten 12 mm-Deckgläschchen in Medium mit bzw. ohne Dozyzyklin für 4 Tage kultiviert oder dann für eine Stunde mit TNF-α stimuliert, um die Aktivierung des NF-κB-Signalweges zu kontrollieren. Wie bereits unter 2.2.4. D beschrieben, wurden die Zellen danach mit PFA fixiert und mit 0,1% Triton permeabilisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem entsprechendem primären Antikörper für LMX1B oder NF-κB p65 und die Detektion über den jeweiligen Sekundärantikörper (Abb. 12).

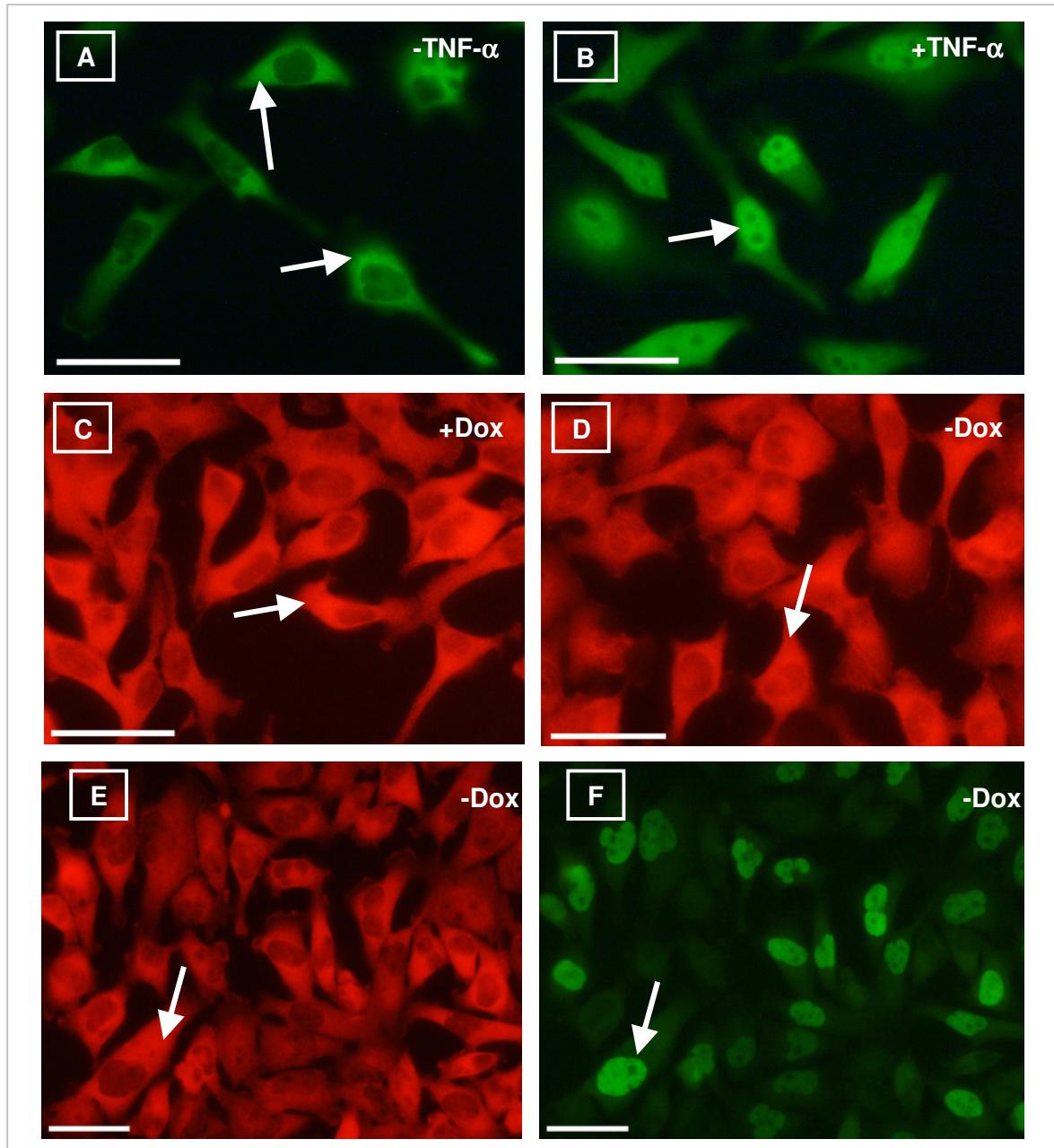


Abb. 12: Untersuchung der NF-κB p65-Translokation in den Kern mittels Immunfluoreszenz. HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurden für 4 Tage in Medium mit bzw. ohne Dozyzyklin kultiviert oder für eine Stunde mit TNF- α stimuliert. Dann wurden die Zellen mit PFA fixiert und mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert. Es folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper und anschließend die Detektion mit dem Sekundärantikörper. In (A), (B) und (C) sind Zellen mit abgeschalteter LMX1B-Synthese zu sehen, in (D), (E) und (F) mit angeschalteter LMX1B-Synthese. In (A), (C), (D), (E) und (F) wurden die HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen nicht mit TNF- α stimuliert, in (B) wurden sie für eine Stunde mit TNF- α stimuliert. Bei den Bildern (A), (B), (C) und (D) war der Primärantikörper spezifisch gegen NF-κB p65 gerichtet. Die Bilder (E) und (F) sind das Ergebnis einer Doppelfärbung für NF-κB p65 (E) und LMX1B (F), wobei beide Primärantikörper und Sekundärantikörper zusammen inkubiert wurden. (E) zeigt die NF-κB p65-Lokalisation und (F) die LMX1B-Lokalisation. Die weißen Pfeile deuten auf die Lokalisation des jeweiligen Proteins hin, der Maßbalken entspricht 50 μ m. **LMX1B hat keinen Einfluss auf die Translokation von NF-κB p65 in den Zellkern.**

Im Bild (A) ist festzustellen, dass bei HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen, bei denen kein LMX1B synthetisiert wurde und die nicht mit TNF- α stimuliert wurden, NF- κ B p65 ausschließlich im Zytoplasma detektiert wird. Im Bild (B) sind diese Zellen zusätzlich noch für eine Stunde mit TNF- α stimuliert worden. In diesem Ansatz wird NF- κ B p65 nahezu ausschließlich im Kern detektiert. Dies bestätigt die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch TNF- α , woraufhin das im Normalfall im Zytosol lokalisierte NF- κ B p50/p65 in den Zellkern transloziert. Somit konnte dieser bereits in der Western-Blot-Analyse gemachte Befund der Translokation von NF- κ B p65 (s. Abb. 11, NF- κ B p65, Banden 4 und 3) auch mit Immunfluoreszenz in HtTA-1-Zellen nachgewiesen werden. Ebenfalls erwartungsgemäß ist bei LMX1B-produzierenden Zellen LMX1B im Zellkern zu detektieren (F).

Bei HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen mit abgeschalteter LMX1B-Synthese (C) ist NF- κ B im Zytosol lokalisiert. In LMX1B-produzierenden HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen, wie sie in (D) zu sehen sind, wird NF- κ B ebenfalls nur im Zytosol detektiert. Diese Beobachtung wird auch durch die Ergebnisse der Bilder (E) und (F) bestätigt, bei denen von induzierten Zellen eine Doppelfärbung für NF- κ B und LMX1B durchgeführt wurde. Hier ist ebenfalls festzustellen, dass in der gleichen Zelle NF- κ B p65 im Zytoplasma lokalisiert ist (E). Dieser Befund spiegelt die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse wider (s. Abb. 11, NF- κ B p65, Banden 8 und 7) und demonstriert erneut, dass LMX1B keinen Einfluss auf die Translokation von NF- κ B p50/p65 aus dem Zytosol in den Zellkern nimmt.

Zusammenfassend konnten die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse als auch die der Immunfluoreszenz-Untersuchung zeigen, dass es sich bei der erhöhten Expression der NF- κ B-Zielgene in LMX1B-produzierenden Zellen nicht um eine indirekt im Zytosol stattfindende positive Einwirkung auf den NF- κ B-Signalweg durch LMX1B handeln kann. Die Befunde sprechen eher für eine Aktivierung auf nukleärer Ebene.

3.4 NF- κ B ist an der Induktion der NF- κ B Zielgene durch LMX1B beteiligt

Die zuvor gemachte Beobachtung deutet darauf hin, dass die Aktivierung des NF- κ B-Komplexes durch LMX1B aufgrund einer positiven Regulierung der transkriptionellen Aktivität NF- κ Bs im Zellkern erfolgt.

Wie bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben, befindet sich das NF- κ B-Protein in seiner inaktiven Form im Zytoplasma einer Zelle. Mit der aminoterminalen Domäne, die auch für die Bindung an DNA verantwortlich ist, ist NF- κ B dort an eines der Mitglieder der I κ B-Familie von

Inhibitoren gebunden. Beim klassischen Weg der NF-κB-Aktivierung, der das p50/RelA-Dimer verwendet, wird in Folge eines entsprechenden Stimulus das IκB-Molekül durch den IκB-Kinase (IKK)-Komplex phosphoryliert. Phosphoryliertes IκB kann nun von der Ubiquitin-Ligase-Maschinerie erkannt werden, woraufhin es polyubiquityliert und schließlich degradiert wird. Das folglich nun ungebundene NF-κB wandert in den Zellkern und interagiert dort mit DNA-Sequenzen im Promotor oder Enhancer seiner Zielgene [Bonizzi und Karin, 2004]. Hier gibt es mehrere Möglichkeiten, über welche die Aktivität NF-κBs im Zellkern aktiviert werden und an denen LMX1B positiv eingreifen kann. Eine Aktivierung NF-κBs im Zellkern kann zum Beispiel durch eine erhöhte Acetylierung oder verminderte Deacetylierung NF-κBs zustande kommen [Übersicht in Chen und Greene, 2003]. LMX1B könnte den Phosphorylierungszustand von NF-κB und damit dessen Aktivität im Zellkern regulieren [Übersicht bei Chen und Greene, 2004]. Eine andere Möglichkeit wäre eine direkte oder indirekte (über einen Kofaktor vermittelte) Protein-Protein-Interaktion zwischen LMX1B und NF-κB.

Es besteht zudem die Möglichkeit, dass sich die in HeLa-Zellen erhöhte Expression der NF-κB-Zielgene unabhängig von NF-κB ereignet. Daher wurde als nächstes überprüft, ob NF-κB selbst an dieser Induktion beteiligt ist. Zu diesem Zweck sollte die Aktivität von NF-κB inhibiert und anschließend überprüft werden, ob damit die erhöhte Genexpression in LMX1B-synthetisierenden Zellen abgeschwächt wird. In diesem Zusammenhang soll zunächst erwähnt werden, dass Tanja Neumann im Rahmen ihrer Dissertation dies bereits durch den Einsatz von Prostaglandin A₁ (PGA₁), welches die IκB-Kinase (IKK) hemmt [Li und Verma, 2002], versuchte. Allerdings handelt es sich hierbei um einen relativ unspezifischen Inhibitor des NF-κB-Signalweges und so waren auch die Ergebnisse dieses Experiments sehr variabel [Neumann, 2009].

Aufgrund dessen wurde im Rahmen dieser Arbeit mit spezifischeren Inhibitoren versucht, die Aktivität NF-κBs zu inhibieren. Dabei wurde stets zunächst die Wirkung des jeweiligen Inhibitors bei mit TNF-α stimulierten HeLa-Zellen getestet. Erst dann sollte die Auswirkung einer NF-κB-Inhibierung bei LMX1B-exprimierenden HeLa-Zellen untersucht werden. So wurde zunächst der Einsatz von verschiedenen Pharmazeutika wie Oridonin, welches die DNA-Bindeaktivität von NF-κB hemmt [Ikezoe et al., 2005], und JSH-23, das zusätzlich dazu die Translokation in den Zellkern blockiert [Shin et al., 2004], getestet. Für diese beiden Inhibitoren konnte jedoch keine ausreichende Hemmung der Aktivität von NF-κB in HeLa-Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt; s. Tab. 13). Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe sogenannter Köder-Oligonukleotide versucht, NF-κB zu

inhibieren. Hierbei handelt es sich um doppelsträngige Oligonukleotide, welche eine Bindungsstelle mit hoher Affinität für NF-κB enthalten. Sie werden von freien NF-κB-Molekülen erkannt, wodurch deren Interaktion mit den Promotoren der Zielgene verhindert wird [Tomita et al., 2003]. Verschiedene Gruppen konnten mit dieser Methode auch in HeLa-Zellen eine erfolgreiche Inhibierung von NF-κB nachweisen [Tomita et al., 1998]. Bei Verwendung der Köder-Oligonukleotide zeigte sich, dass sie scheinbar nicht in den Zellkern gelangten und es somit zu keiner Hemmung von NF-κB kommen konnte (Daten nicht gezeigt; s. Tab. 13). In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Hehlgans (Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Regensburg) wurde auch die Verwendung eines IκB α Superrepressors (IκB α SR) getestet. Beim IκB α SR sind die beiden Serinreste 32 und 36 durch Alanine ausgetauscht, so dass keine Phosphorylierung des Proteins mehr stattfinden kann, wodurch NF-κB inaktiv im Zytosol an IκB gebunden bleibt und der Signalweg nicht aktiviert wird [Imuro et al., 1998]. Jedoch konnte auch hier keine zufriedenstellende Inhibierung von NF-κB nach Transfektion des IκB α SR in die Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt; s. Tab.13).

Eine andere Möglichkeit zur Hemmung von NF-κB besteht darin, die Expression des Gens für die p65- oder p50-Untereinheit von NF-κB mittels RNA-Interferenz zu hemmen [Lee et al., 2007; Guo et al., 2004; Chan et al., 2006] (s. Tab. 13). Neben der hohen Spezifität dieser Methode ist der andere Vorteil, dass direkt die Beteiligung einer der Untereinheiten von NF-κB untersucht werden kann. Bei dieser Technik bringt man kurze, doppelsträngige RNAs mit einer Länge von 21 Nukleotiden, sogenannte siRNAs ("small interfering RNAs"), durch Transfektion in die Zellen ein (s. 2.2.4 C). Da die siRNAs als Leitmotiv für eine Nuklease fungieren, führt dies zum Abbau der komplementären mRNA-Sequenz des Zielgens, so dass die Translation zu Protein nicht stattfindet.

Tab. 13: Getestete NF-κB-Inhibitoren in HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen.

Name des NF-κB-Inhibitors (Referenz)	Resultat	Referenz
PGA ₁ (Li und Verma, 2002)	Unspezifischer Effekt	Dissertation Tanja Neumann, 2009
JSH-23 (Shin et al., 2004)	Keine NF-κB-Inhibierung	Vorliegende Arbeit
Oridonin (Ikezoe et al., 2005)	Keine NF-κB-Inhibierung	Vorliegende Arbeit
ODNs (Tomita et al., 1998)	Keine NF-κB-Inhibierung	Vorliegende Arbeit
IκB α SR (Imuro et al., 1998)	Keine NF-κB-Inhibierung	Vorliegende Arbeit
p65-siRNA (Lee et al., 2007; Guo et al., 2004)	NF-κB-Knockdown	Vorliegende Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei spezifisch gegen die NF-κB p65-mRNA gerichtete siRNAs (p65-1-siRNA und p65-2-siRNA) hergestellt. Die dafür verwendeten Oligonukleotide sind unter 2.1.8 in Tab. 5 zu finden. Die p65-1-siRNA die Sequenz wurde von Lee et al. (2007) beschrieben und erfolgreich eingesetzt. Dies konnte von Lee et al. anhand einer verringerten Expression der NF-κB-Zielgene *IL6* und *IL8* bei Fibroblasten-Zellen, die mit TNF-α stimuliert wurden, aufgezeigt werden. Die p65-2-siRNA hat die von Guo et al. (2004) beschriebene Sequenz, mit der NF-κB erfolgreich in Dickdarm-Krebszellen inhibiert wurde. Neben diesen spezifischen p65-siRNAs wurde bei den im folgenden geschilderten siRNA-Experimenten stets eine Negativkontrolle, eine "Scrambled-siRNA" (Scl-siRNA) verwendet. Mit Hilfe dieser Scl-siRNA sollen unspezifische Effekte, sog. *off-target effects*, abgegrenzt werden [Jackson et al., 2003]. Die Sequenz dieser unspezifischen siRNA wurde in der vorliegenden Arbeit dabei so gewählt wie unter Rascle et al. bereits beschrieben ist [Rascle et al., 2003].

Da Sledz et al. (2003) zeigten, dass das Transfizieren von siRNAs in Zellen eine unspezifische, durch Interferon ausgelöste Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs bewirken kann, sollte als erstes ausgeschlossen werden, dass die hier verwendeten p65-siRNAs nicht auch diesen unerwünschten Effekt zeigen. Wie bereits beschrieben, erhöht LMX1B neben der Expression von NF-κB-Zielgenen auch die von Interferon-stimulierten Genen. Somit wäre eine gesicherte Interpretation der siRNA-Experimente bei einer durch die siRNA ausgelösten unspezifischen Aktivierung des IFN-β-Signalweges nicht mehr möglich.

So wurde zunächst neben der Effizienz der Inhibierung NF-κBs durch die verwendeten NF-κB p65-siRNAs (p65-1-siRNA und p65-2-siRNA) auch deren Einfluss auf die ISGs mittels RT-qPCR getestet. Dazu wurden ausschließlich HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen mit abgeschalteter LMX1B-Produktion verwendet, denn erst nach positiver Analyse des Versuches sollte die Wirkung der siRNAs in Anwesenheit von LMX1B untersucht werden. So wurden diese, wie unter 2.2.4 C beschrieben, mit der p65-1-, p65-2- oder der Scl-siRNA (jeweils 5 nM) oder zur Kontrolle ohne siRNA transfiziert. Die am nächsten Tag aus ihnen isolierte Gesamt-RNA wurde für die Echtzeit-PCR in cDNA umgeschrieben (Abbildung 13).

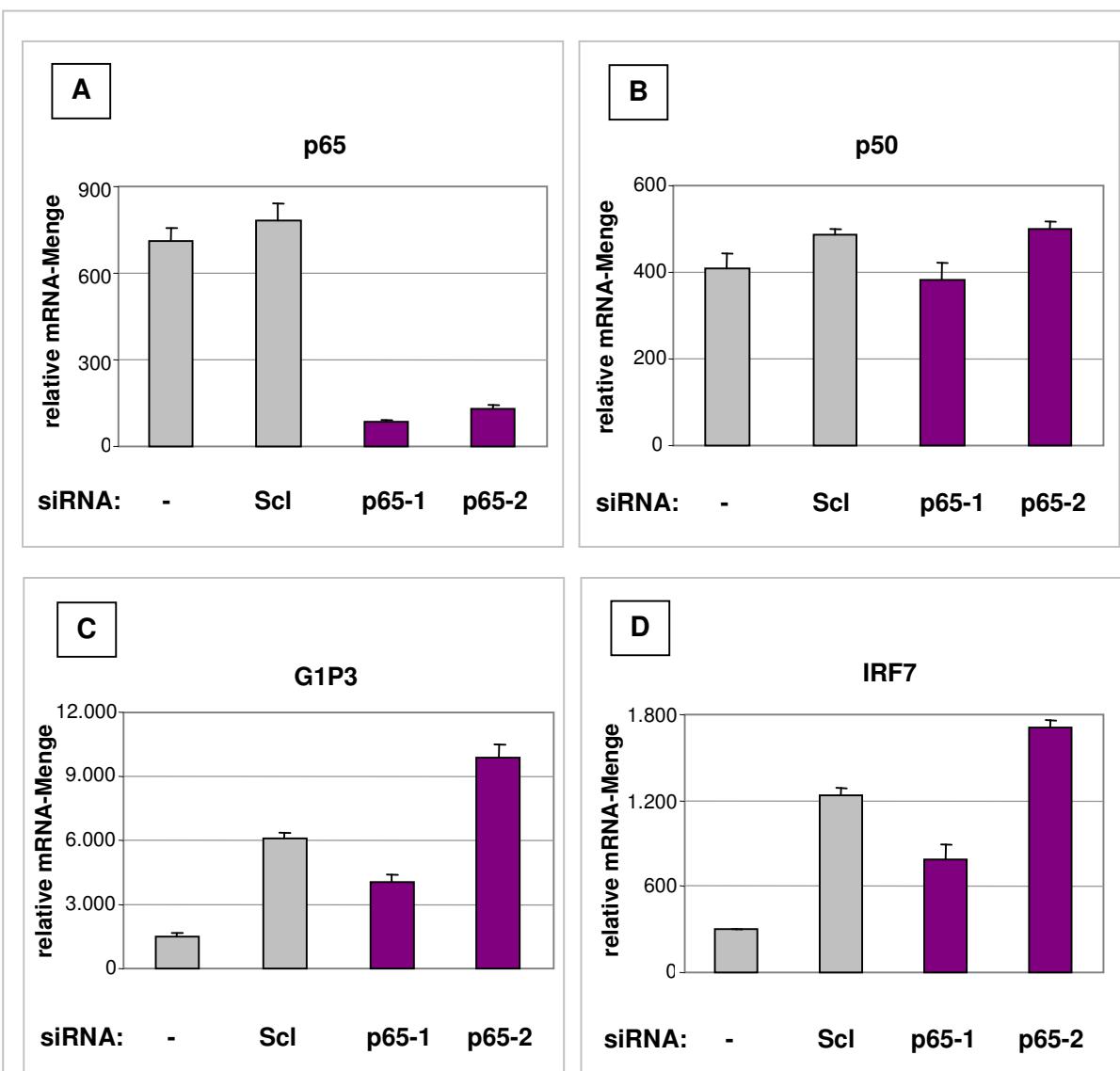


Abb. 13: RT-qPCR-Analyse der NF-κB p65, G1P3 und IRF7 mRNAs. Es wurden zwei für die p65 Untereinheit NF-κBs (p65-1- und p65-2-siRNA) spezifische siRNAs, eine unspezifische siRNA (Scl-siRNA) oder keine siRNA (-) in HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen, die kein LMX1B synthetisierten, transfiziert. Dann wurde die jeweilige Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine 10 ng RNA entsprechende Menge an cDNA zusammen mit einem der Primerpaare hNF-κB p65 F1/R1 (A), hNF-κB p50 F1/R1 (B), hG1P3 F1/R1 (C), hIRF7 F1/R1 (D) oder hLamA/C F/R (zur Normalisierung) in eine Echtzeit-PCR-Reaktion eingesetzt. **Die p65-1-siRNA inhibiert NF-κB p65 auf mRNA Ebene um ~88% und stimuliert den IFN-β-Signalweg nur schwach.**

Bei HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen mit abgeschalteter LMX1B-Produktion wird im Vergleich zu Zellen, bei denen die Scl-siRNA oder keine siRNA eingebracht wurde, mit der p65-1-siRNA etwa 88% weniger und mit der p65-2-siRNA etwa 82% weniger NF-κB p65-mRNA detektiert (s. Abb. 13, A).

Dies lässt eindeutig darauf schließen, dass beide verwendeten siRNAs die Expression des

Gens für die p65-Untereinheit NF-κBs in diesen Zellen hemmen. Bei Betrachtung der mRNA für NF-κB p50 wird bestätigt, dass es sich um einen spezifischen Effekt beider siRNAs gegen NF-κB p65 handelt. Hier sind die gebildeten NF-κB p50-mRNA Mengen bei den Zellen, die ohne siRNA (-) transfiziert wurden, genauso hoch wie bei denen, die mit der unspezifischen oder mit den p65-siRNAs transfiziert wurden (s. Abb. 13, B).

Bei allen drei verwendeten siRNAs ist eine leichte Induktion der ISGs *G1P3* und *IRF7* in HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen festzustellen (s. Abb. 13, C und D: Scl, p65-1 und p65-2). So resultierte die Transfektion der unspezifischen Scl-siRNA in einer ~4-fachen Induktion, die der p65-1-siRNA in einer ~2,6-fachen Induktion und die der p65-2-siRNA in einer ~6-fachen Induktion der ISGs *G1P3* und *IRF7* im Vergleich zu Zellen, die nicht mit einer siRNA transfiziert wurden [s. Abb. 11, C und D: Vergleich von Scl, p65-1- und p65-2-siRNA mit (-)]. Diese unspezifische Aktivierung des INF-β-Signalweges ist jedoch vernachlässigbar im Vergleich zu einer bis zu ca. 250-fachen Induktion von ISGs, die in einer Podozyten-Zelllinie beobachtet wurde (PD Dr. Anne Raschle, persönliche Mitteilung). Der Effekt, den die Scl-siRNA und die p65-1-siRNA auf die Expression von *G1P3* und *IRF7* auslösen, ist vergleichbar (s. Abb. 13, C und D: Vergleich von Scl mit p65-1). Dieser Befund und die Tatsache, dass die p65-1-siRNA die Synthese von NF-κB p65 effizienter hemmt (s. Abb. 13, A), führten zu der Entscheidung, ausschließlich mit der p65-1-siRNA weiter zu arbeiten. Diese wird im Folgenden als p65-siRNA bezeichnet.

Als nächstes wurde der Erfolg des Knockdowns von NF-κB mittels RNA-Interferenz auf Protein-Ebene überprüft. Daher wurden neben den Zellen, die für die gerade beschriebene RT-qPCR-Analyse verwendet wurden, HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen mit abgeschalteter LMX1B-Synthese für die Protein-Extraktion kultiviert und 24 Stunden, 48 Stunden oder 72 Stunden nach der Transfektion geerntet (s. Abb. 14). Die daraus gewonnenen Ganzzelllysate wurden für eine Western-Blot-Analyse eingesetzt. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 14 zu sehen.

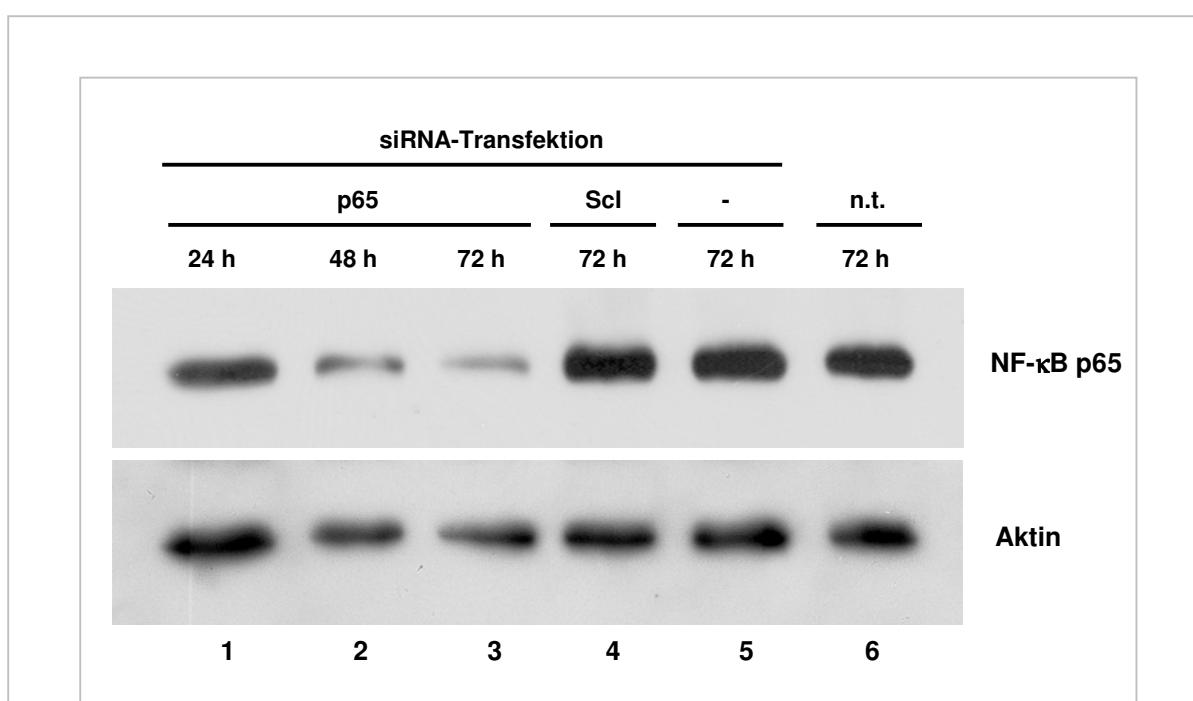


Abb. 14: Western-Blot-Analyse des Knockdowns von NF-κB p65 mittels RNA-Interferenz bei HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen mit abgeschalteter LMX1B-Produktion. HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurden bis zu 4 Tage in Medium mit Doxzyklin kultiviert. Einen Tag nach Aussaat wurden sie mit der NF-κB p65-siRNA (p65) transfiziert und nach 24 Stunden (h), 48 h oder 72 h zur Proteinisolierung geerntet. Ebenfalls einen Tag nach der Aussaat wurden zur Kontrolle parallel dazu Zellen entweder mit der unspezifischen Scl-siRNA (Scl) oder ohne siRNA (-) transfiziert. Aus den hergestellten Proteinlysaten wurde mit je 20 µg Gesamt-Protein eine Western-Blot-Analyse auf das NF-κB p65-Protein durchgeführt. Als interne Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen α -Aktin. Der Röntgenfilm für NF-κB p65 wurde für 5 Minuten exponiert. **Die Proteinexpression von NF-κB p65 wird 72 Stunden nach Transfektion der p65-siRNA in HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen am effizientesten inhibiert.**

Das NF-κB p65-Protein wird erwartungsgemäß in HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen detektiert, wobei kein Unterschied an gebildeten Proteinmengen zwischen mit der unspezifischen Scl-siRNA, ohne siRNA oder nicht transfizierten Zellen beobachtet werden konnte (s. Abb. 14, NF-κB p65: Bände 4, 5 und 6).

Des Weiteren kann festgestellt werden, dass mit der Dauer des Verbleibs der p65-siRNA nach der Transfektion immer weniger NF-κB p65-Protein detektiert wird (s. Abb. 14, NF-κB p65: Bände 1, 2 und 3). Der maximale Knockdown der Proteinspiegel in diesen Zellen mittels RNA Interferenz kann 72 Stunden nach Transfektion der siRNA festgestellt werden (s. Abb. 13, Vergleich von Bande 3 mit 1 und 2). Somit konnte ermittelt werden, dass bei den folgenden siRNA-Experimenten mit LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen der Effekt der p65-siRNA 72 Stunden nach deren Transfektion untersucht werden sollte.

Folgende schematisch dargestellte Versuchsdurchführung lag daher den Experimenten, bei denen eine Beteiligung von NF-κB an der Hochregulierung der LMX1B-Zielgene überprüft werden sollte, zugrunde (Abbildung 15).

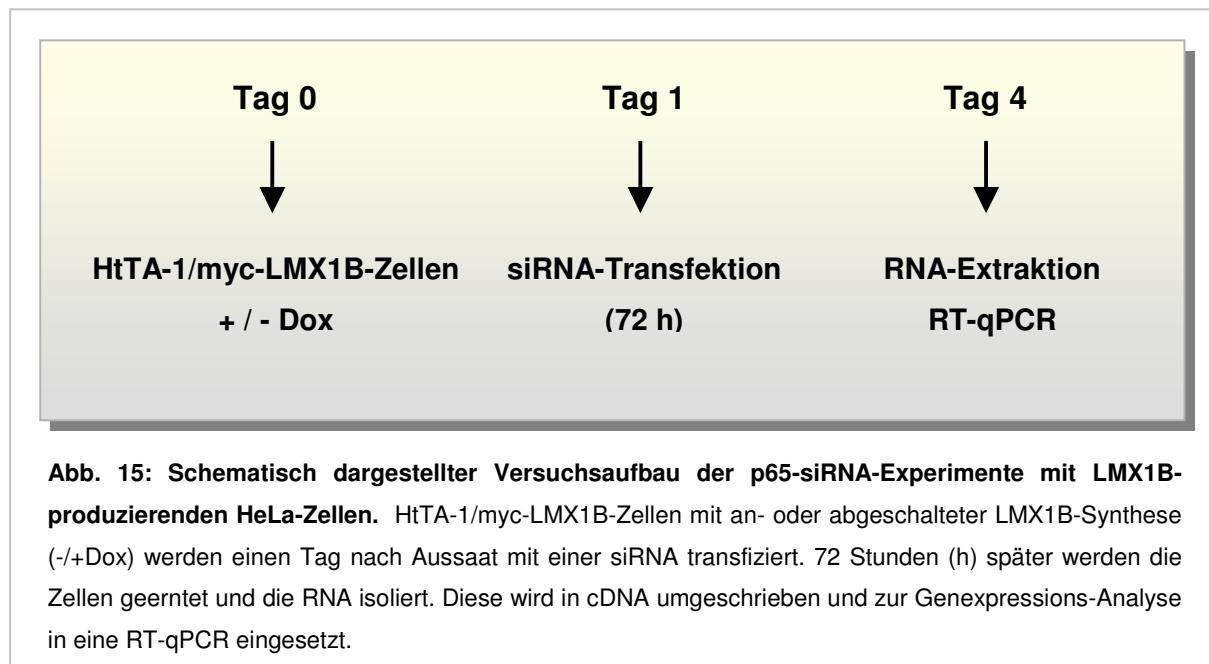
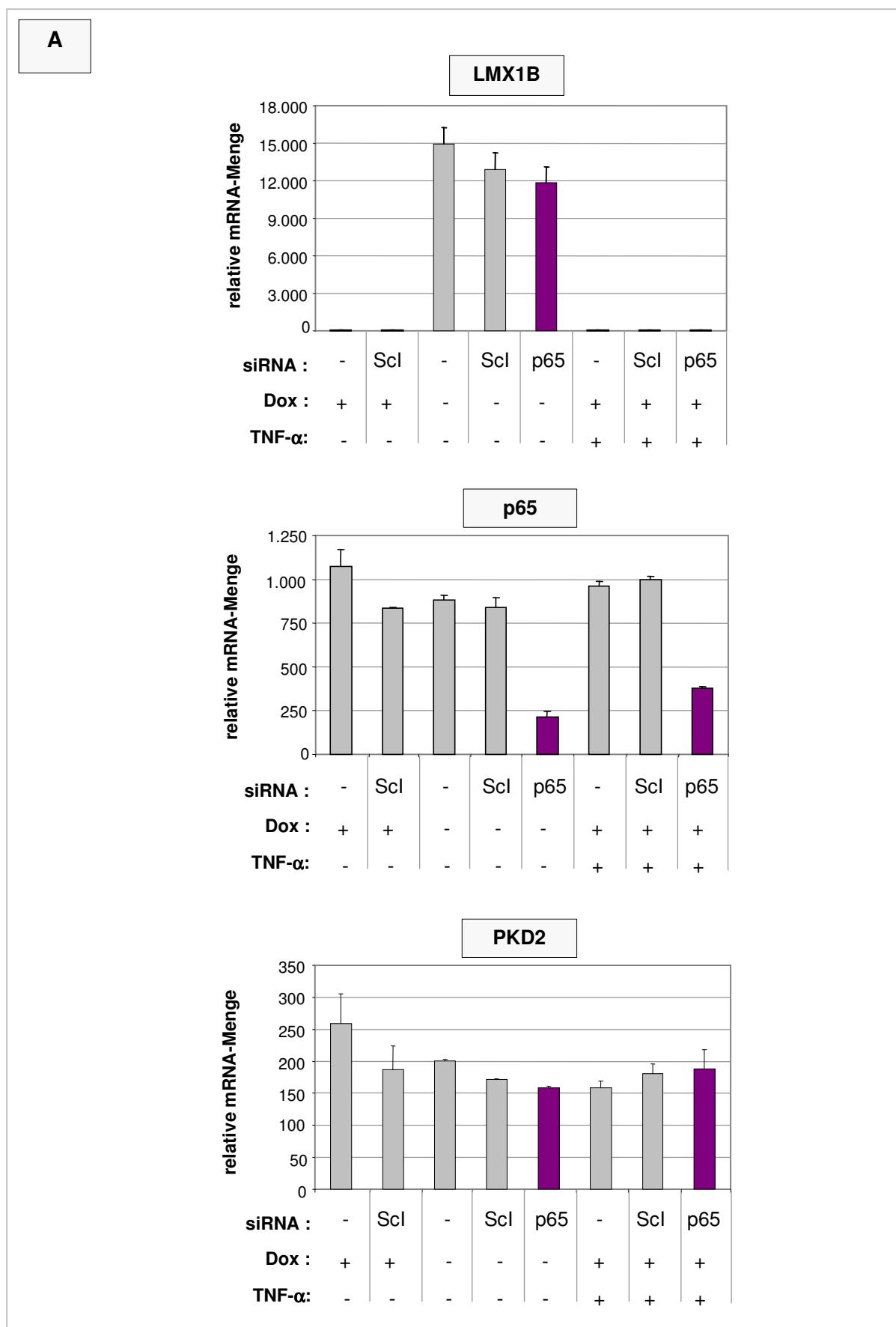


Abb. 15: Schematisch dargestellter Versuchsaufbau der p65-siRNA-Experimente mit LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen. HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen mit an- oder abgeschalteter LMX1B-Synthese (-/+Dox) werden einen Tag nach Aussaat mit einer siRNA transfiziert. 72 Stunden (h) später werden die Zellen geerntet und die RNA isoliert. Diese wird in cDNA umgeschrieben und zur Genexpressions-Analyse in eine RT-qPCR eingesetzt.

HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen mit oder ohne Doxyzyklin im Medium wurden ausgesät und am nächsten Tag, wie unter 2.2.4 C beschrieben, mit der NF-κB p65- oder zur Kontrolle mit der Scl-siRNA (p65 oder Scl) transfiziert. Auch hier wurden Zellen als zusätzliche Kontrolle parallel ohne siRNA transfiziert (-). Nach 72 Stunden, was einer optimalen Induktionszeit für LMX1B von insgesamt 4 Tagen entspricht (s. 3. 1), wurden HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen zur RNA-Isolierung geerntet (s. Abb. 15). Als positive Kontrolle wurden die Zellen, die kein LMX1B produzierten (+Dox), zusätzlich mit TNF-α für eine Stunde stimuliert (+TNF-α), um den NF-κB-Signalweg zu aktivieren. Aus den geernteten Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert, welche dann in die komplementäre cDNA umgeschrieben und in die anschließende Echtzeit-PCR-Reaktion für eine Genexpressions-Analyse eingesetzt wurde (Abbildung 16, A und B).



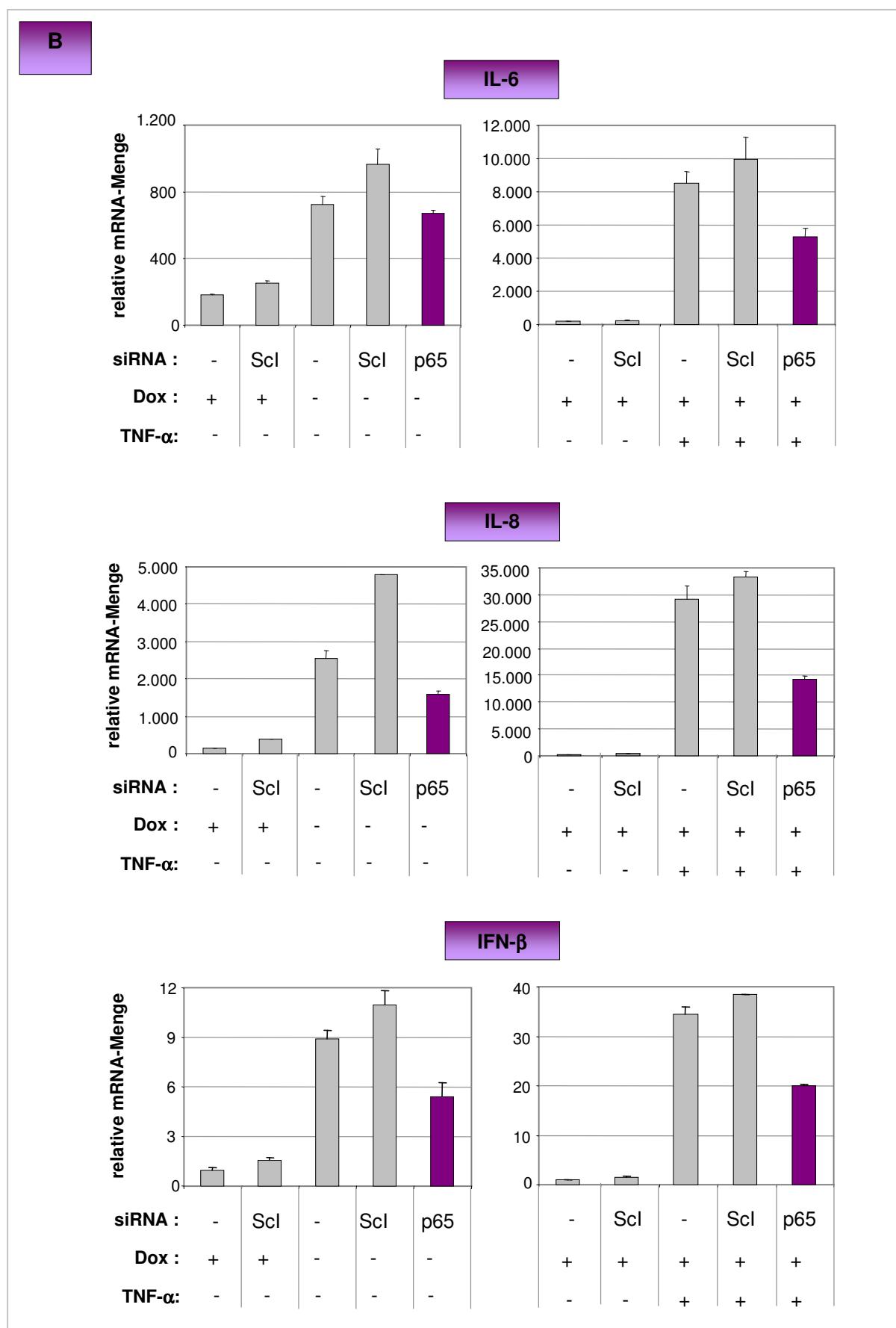


Abb. 16: RT-qPCR-Analyse von NF-κB p65 und NF-κB Zielgenen in HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen. HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen mit (+) oder ohne (-) Dozyzyklin (Dox) im Medium wurden ausgesät und am nächsten Tag mit einer siRNA gegen die p65 Untereinheit NF-κBs (p65-siRNA) oder zur Kontrolle mit einer unspezifischen siRNA (Scl-siRNA) transfiziert. Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen parallel dazu ohne siRNA transfiziert (-). An Tag 4 wurden Zellen, die kein LMX1B produzierten (+Dox), eine Stunde mit TNF-α stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine 10 ng RNA entsprechende Menge an cDNA zusammen mit einem der Primerpaare hLMX1B F1/R1, hNF-κB p65 F1/R1, hPKD2 F1/R1, hIL-6 F1/R, hIL-8 F1/R1, hIFN-β F1/R oder hLamA/C F/R (zur Normalisierung) in jeder Echtzeit-PCR-Reaktion eingesetzt. A, Expressions-Analyse für LMX1B, NF-κB p50 und PKD2; B, Expressions-Analyse der NF-κB-Zielgene *IL6*, *IL8* und *IFNB1*. **Für die Regulierung der NF-κB-Zielgene durch LMX1B wird ein funktioneller p65 NF-κB Transkriptionsfaktor benötigt.**

Betrachtet man zunächst die Ergebnisse der Genexpressions-Analyse der Zellen, die zur Kontrolle ohne siRNA (-) transfiziert wurden, ist festzustellen, dass die detektierten mRNA-Mengen in etwa denen entsprechen, die bei mit der unspezifischen Scl-siRNA transfizierten Zellen erhalten wurden. Dies gilt jeweils im Vergleich bei gleich durchgeföhrten Versuchsbedingungen zwischen Scl-siRNA und ohne siRNA transfizierten Zellen für alle Gene. Daraus lässt sich schließen, dass die erhaltenen mRNA-Mengen von Zellen, die mit der p65-siRNA transfiziert wurden, keine unspezifischen Resultate darstellen.

Wie schon in Abbildung 13 auf mRNA-Ebene und in Abbildung 14 auf Proteinebene gezeigt werden konnte, wurde auch bei diesem Experiment NF-κB p65 auf mRNA Ebene erfolgreich inhibiert. So wird in etwa 70% weniger p65-mRNA in HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen, welche kein LMX1B produzieren, detektiert (s. Abb. 16 A, p65: +Dox, +TNF-α). Zur Überprüfung, dass es sich hierbei um einen spezifischen Effekt handelt und nicht um den sog. *off-target effect*, wurde eine Expressions-Analyse des Gens *PKD2* gewählt. Dieses kodiert für ein membrangebundenes Protein, welches nicht am LMX1B-Signalweg beteiligt ist [Tsiokas et al, 2007]. Durch eine Inhibierung von NF-κB durch die transfizierte p65-siRNA in die HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen (+Dox) kann im Vergleich zu Zellen, bei denen NF-κB nicht inhibiert wird, kein Unterschied an PKD2-mRNA-Menge detektiert werden (s. Abb. 16 A, PKD2). Diese Beobachtung konnte durch eine Genexpressions-Analyse für p50 zusätzlich bestätigt werden (Daten nicht gezeigt; s. Abb. 13), wodurch die Spezifität der verwendeten p65-siRNA demonstriert werden konnte.

Wie zu erwarten, kann man eine Induktion der mRNA von IL-6, IL-8 und IFN-β in LMX1B-produzierenden HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen feststellen (-Dox, -TNF-α), genauso wie bei mit TNF-α stimulierten Zellen (+TNF-α, +Dox) mit abgeschalteter LMX1B-Produktion (s. Abb. 16 B, IL-6, IL-8 und IFN-β). Wurde die p65-siRNA in TNF-α-stimulierte HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen (+TNF-α, +Dox) transfiziert, wird in etwa 50% (48%, 58% und 50% für das jeweilige

Gen) weniger mRNA sowohl bei IL-6, IL-8 als auch bei IFN- β detektiert (s. Abb. 16 B, IL-6, IL-8 und IFN- β : rechtes Diagramm, lila Balken). Dies entspricht dem zu erwartenden Resultat des NF- κ B-Knockdowns, der durch die eingebrachte p65-siRNA erzielt wird.

Bei Transfektion der p65-siRNA in HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen, welche LMX1B induzieren, sind ebenfalls diese verminderten mRNA-Spiegel sowohl für IL-6, IFN- β als auch von IL-8 zu beobachten (s. Abb. 16 B, IL-6, IL-8 und IFN- β : linkes Diagramm, lila Balken). Für alle drei Gene ist im Vergleich zu Zellen, in die keine siRNA oder die Scl-siRNA transfiziert wurde, wieder in etwa 50% (41%, 73% und 59% für das jeweilige Gen) weniger mRNA zu detektieren.

Aus diesen Daten lässt sich somit schlussfolgern, dass an der durch LMX1B induzierten Hochregulierung der NF- κ B-Zielgene zumindest die p65-Untereinheit von NF- κ B beteiligt ist und zwar sehr wahrscheinlich das Heterodimer NF- κ B p50/p65.

3.5 Kooperation zwischen LMX1B und NF- κ B auf Transkriptionsebene

Im Rahmen einer Diplomarbeit [Heining, 2007] wurde untersucht, wie sich eine zusätzliche NF- κ B-Stimulierung auf die durch LMX1B induzierte Hochregulierung der NF- κ B-Zielgene auswirkt. Daher wurden HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen für 4 Tage mit oder ohne Doxyzyklin im Medium inkubiert, um dadurch die LMX1B-Proteinsynthese zu unterdrücken oder zu induzieren. Ein Teil der Zellen wurde vor der Zellernte mit TNF- α für eine Stunde stimuliert, um eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges in den Zellen zu erreichen. Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer stärkeren Expression bei den durch LMX1B regulierten NF- κ B-Zielgenen kommt, wenn zusätzlich zur LMX1B-Produktion die Zellen mit TNF- α stimuliert wurden [Heining, 2007]. Die festgestellte Expression wurde dabei stärker induziert (s. Abb. 17, IL-8: -Dox, +TNF- α), als bei einem additiven Effekt von LMX1B und NF- κ B erwartet wurde (s. Abb. 17, IL-8: mRNA-Expression -Dox, -TNF- α addiert mit mRNA-Expression +TNF- α , -Dox). Dies lässt sich durch einen kooperativen Effekt, den beide Transkriptionsfaktoren auf Transkriptionsebene auf die Expression der NF- κ B-Zielgene ausüben, erklären. Dadurch konnte auch erneut demonstriert werden, dass zu einer durch LMX1B bewirkten Induktion der NF- κ B-Zielgene ein funktionelles NF- κ B p65 unerlässlich ist.

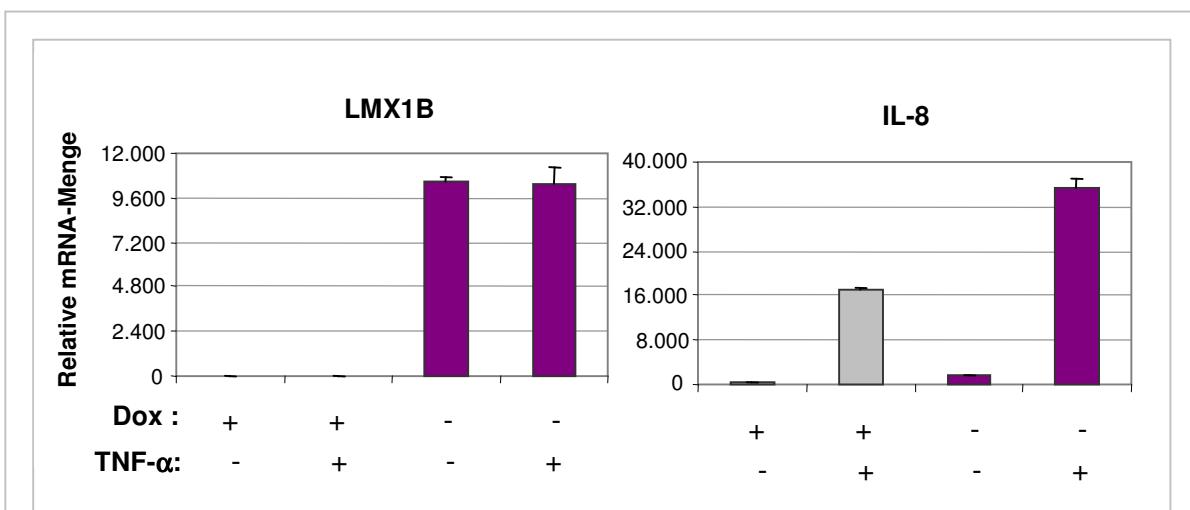


Abb. 17: Analyse der Expression des NF- κ B Zielgens *IL8*, sowie zur Kontrolle die von *LMX1B* in HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen. HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen wurden für 4 Tage mit oder ohne Doxyzyklin (+/- Dox) im Medium inkubiert, um die LMX1B-Expression zu unterdrücken oder zu induzieren. Bevor die Zellen geerntet wurden, wurde ein Teil von ihnen mit TNF- α für 1 h stimuliert (+/-TNF- α). Aus 1 μ g der aus den geernteten Zellen isolierten Gesamt-RNA wurde cDNA synthetisiert. Eine 10 ng RNA äquivalente Menge cDNA wurde dann pro Reaktion in die Echtzeit-PCR eingesetzt. Für die Amplifikation wurden die Primerpaare hIL-8 F1/R1 und hLamA/C F/R verwendet, letzteres diente der Normalisierung. Ein kooperativer Effekt zwischen LMX1B und NF- κ B p50/p65 auf Transkriptionsebene ist zu sehen [Heining, 2007].

Um detaillierter beschreiben zu können, wie diese Kooperation zwischen LMX1B und NF- κ B zustande kommt, sollte des Weiteren die physikalische Interaktion der beiden Proteine untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden von Eva Heining im Rahmen ihrer Diplomarbeit zahlreiche, unter verschiedenen Bedingungen stattfindende Co-Immunpräzipitations-Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass LMX1B und NF- κ B p65 in Lösung nicht direkt miteinander wechselwirken [Heining, 2007].

3.6 LMX1B bindet *in vivo* an die Promotoren von *IL6* und *IL8*

Nachdem festgestellt werden konnte, dass LMX1B und NF- κ B p65 bei der Transkriptionsaktivierung spezifischer NF- κ B-Zielgene zusammenwirken und keine direkte Interaktion in Lösung detektiert werden konnte, wies dies darauf hin, dass das Zusammenspiel von LMX1B und NF- κ B auf Chromatin-Ebene am Promotor des jeweiligen Gens erfolgen könnte. Dies sollte parallel zu der vorliegenden Doktorarbeit von Astrid Neumann anhand von Chromatin-Immunpräzipitations-(ChIP)-Experimenten [Kuo und Allis, 1999], durchgeführt mit HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen mit ab-, bzw. angeschalteter LMX1B-

Produktion, überprüft werden. Mit Hilfe dieser Methode können *in vivo* gebildete Protein-DNA-Komplexe mit einem Antikörper gegen LMX1B immunpräzipitiert und die aufgereinigten Bruchstücke genomicscher DNA anhand einer Echtzeit-PCR auf ihren Anteil an NF-κB-Zielgen-DNA untersucht werden. So konnte festgestellt werden, dass LMX1B in der Nachbarschaft des gut charakterisierten, konservierten NF-κB-Bindungsmotivs innerhalb der Promotoren der NF-κB-Zielgene *IL6* und *IL8* *in vivo* bindet. Dabei bestätigten Promotor-Sequenz-Analysen das Vorhandensein eines, bzw. mehrerer konservierter FLAT-Elemente innerhalb der *hIL6* und *hIL8* Promotoren (Astrid Neumann, persönliche Mitteilung) [Rascle et al., 2009a]. Bei diesen spezifischen DNA-Sequenzen handelt es sich um mutmaßliche LMX1B-Bindungsmotive [German et al., 1992; Dreyer et al., 1998].

3.7 Untersuchung der Transkriptionsaktivierung durch LMX1B

Als nächstes sollte nun geklärt werden, ob die Bindung LMX1Bs an die Promotoren von *IL6* und *IL8* mit der transkriptionellen Aktivierung dieser NF-κB-Zielgene korreliert und ob die LMX1B-Bindung über die durch die Promotor-Sequenz-Analysen identifizierten FLAT-Elemente erfolgt. Für diese Promotor-Studien wurde ein Reporteren-Assay, der Dual-Luciferase Reporter Assay der Firma Promega verwendet, wobei die Promotoraktivität von *hIL6* damit näher analysiert werden sollte. Hierfür war zunächst die Etablierung der Transfektion der verwendeten *IL6* Promotor-Konstrukte in die HeLa-Zelllinie sowie die Etablierung sämtlicher Parameter des Reporteren-Assays erforderlich, worauf im folgenden Kapitel eingegangen wird.

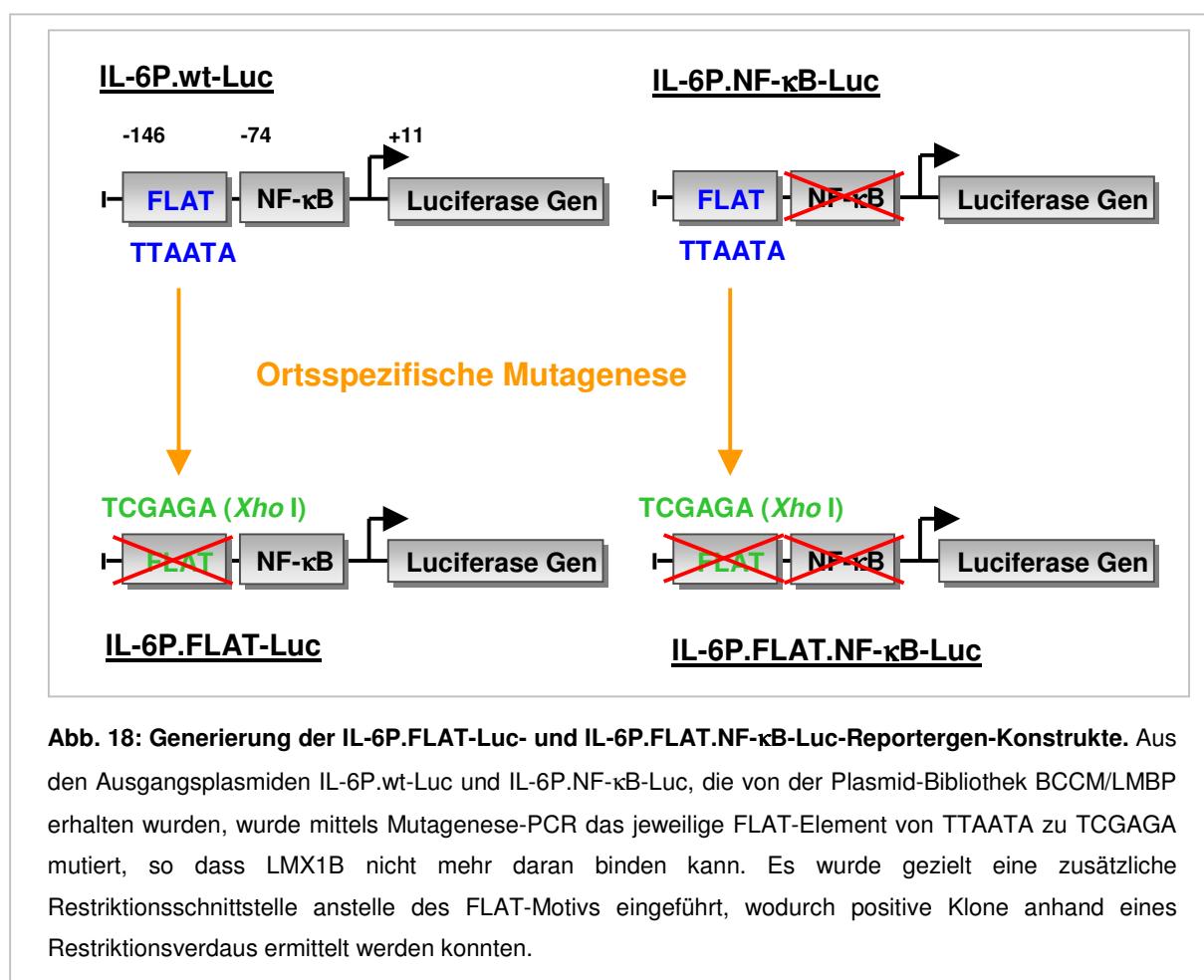
3.8 Etablierung des Dual-Luciferase Assays

3.8.1 Herstellung der Promotorkonstrukte

Um in den Dual-Luciferase Reporter Assays eine mögliche, durch LMX1B induzierte Aktivität des humanen *IL6* Promotors in HeLa-Zellen messen zu können, wurden wie bereits unter 2.2.3 D geschildert, bestimmte Reporteren-Konstrukte benötigt.

Die in der vorliegenden Arbeit als IL-6P.wt-Luc und IL-6P.NF-κB-Luc bezeichneten Konstrukte [Van den Berghe et al., 1998] enthalten den humanen Wildtyp *IL6* Promotor (-1168/+11) bzw. den humanen *IL6* Promotor mit mutiertem NF-κB-Bindungsmotiv; beide sind an das *Firefly*-Luciferase Reporter Gen gekoppelt (s. Kapitel 2.9). Van den Berghe et al. (1998) konnten zeigen, dass das IL-6P.wt-Luc-Konstrukt durch TNF-α aktiviert werden konnte. Bei Verwendung des IL-6P.NF-κB-Luc-Konstruktes war aufgrund der mutierten

Bindestelle für NF-κB keine Aktivierung mehr zu beobachten [Van den Berghe et al., 1998]. Die Reporter-Konstrukte IL-6P.wt-Luc und IL-6P.NF-κB-Luc dienten daraufhin als Ausgangs-Plasmide, um die IL-6P.FLAT-Luc- und IL-6P.FLAT.NF-κB-Luc- Reporter-Konstrukte generieren zu können, bei denen das FLAT-Motiv in mutierter Form vorliegt. So kann untersucht werden, ob es sich bei dem FLAT-Element um das Bindungsmotiv für LMX1B handelt. Dies erfolgte nach dem Protokoll des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene (2.2.2 E). Das an Position -146 gelegene FLAT-Element wurde so verändert, dass eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle für *Xho* I entstand (s. schematische Abb. 18: von TTAATA zu TCGAGA), womit der Erfolg der Mutagenese durch einen Restriktionsverdau überprüft werden konnte.



Neben diesen Reporter-Konstrukten, mittels derer die vermutete transkriptionelle Regulierung des *IL6* Promotors durch den Transkriptionsfaktor LMX1B näher charakterisiert werden sollte, wurden auch Kontroll-Reporter-Konstrukte für die Durchführung der Dual-Luciferase Reporter Assays hergestellt.

Bei dem selbst generierten und als Δ IL-6P-Luc bezeichneten Kontroll-Reporter wurde der vollständige *IL6* Promotor mittels der *Hind* III-Schnittstelle aus dem Vektor IL-6P.wt-Luc

herausgeschnitten. Dieses Konstrukt dient der Überprüfung einer möglichen unspezifischen Aktivierung durch LMX1B. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle der NF-κB-Aktivierung ein Konstrukt der Firma Clontech verwendet, welches das *Firefly*-Luciferase Gen, 4 Kopien des NF-κB-Bindungsmotivs und die TATA-Box des Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Promotors enthält [im folgenden (NF-κB)₄-Luc genannt]. Der der internen Kontrolle dienende Reporter pRL-null der Firma Promega enthält das *Renilla*-Luciferase Gen und exprimiert Rluc in Abwesenheit eines Promotors (s. Kapitel 2.1.9).

Alle in dieser Arbeit verwendeten Promotorkonstrukte wurden mittels Sequenzierung verifiziert. Zur Veranschaulichung sind in der nachfolgenden vereinfachten schematischen Abbildung nochmals alle in den Dual-Luciferase Reporter Assays verwendeten *Firefly*-Luciferase Reporter-Konstrukte dargestellt (Abbildung 19).

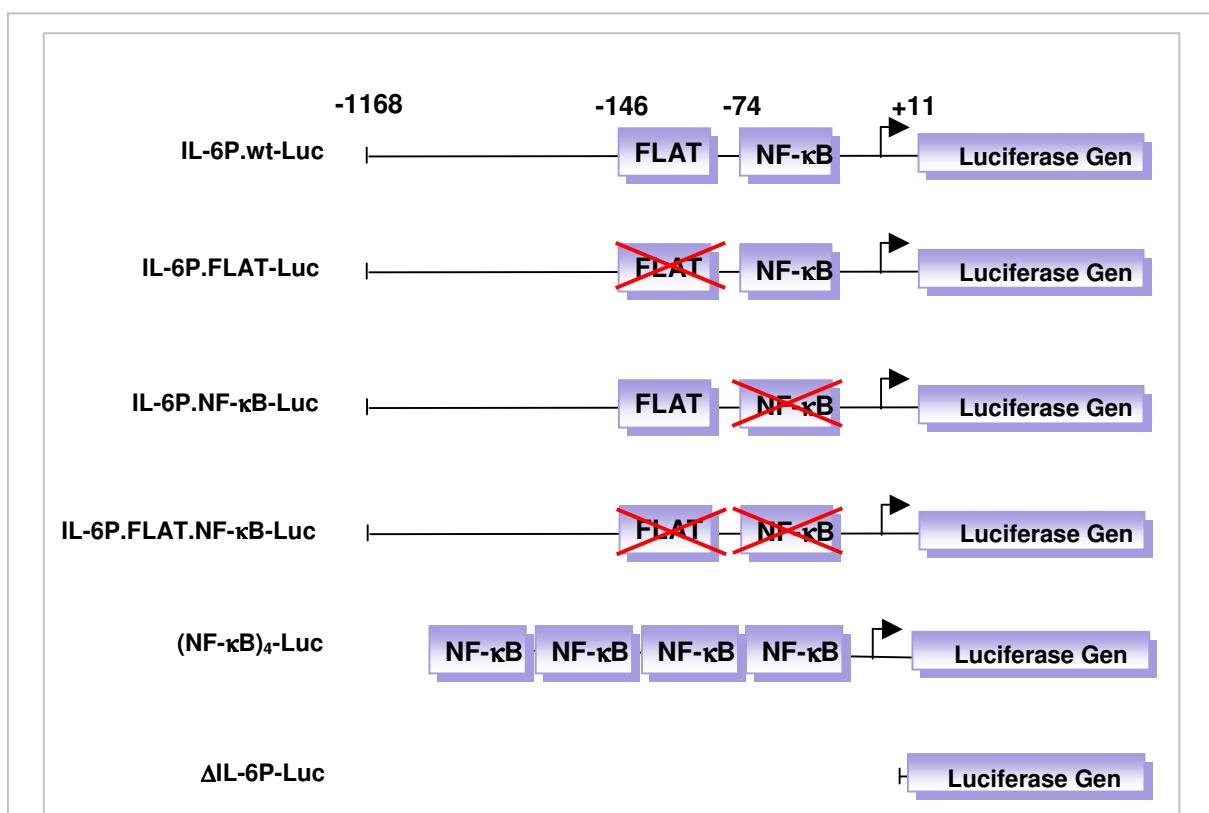


Abb. 19: Schematische Darstellung der verwendeten Reporter-Konstrukte in den Dual-Luciferase Reporterger Assays. Innerhalb des humanen *IL6* Promotors (-1168/+11), der gekoppelt an das *Firefly*-Luciferase Gen ist, wurde entweder das AT-reiche LMX1B-Bindungsmotiv (FLAT) oder das NF-κB-Bindungsmotiv (NF-κB) einzeln oder zusammen mutiert, um die Aktivität des Promotors näher analysieren zu können. Zur Kontrolle dienten zum einen das *Firefly*-Luciferase Konstrukt, bei dem 4 NF-κB-Bindungsmotive an einen Minimal-Promotor gekoppelt sind [(NF-κB)₄-Luc] und zum anderen jenes, bei dem der vollständige IL-6 Promotor entfernt wurde (ΔIL-6P-Luc).

3.8.2 Etablierung der Zelltransfektion

Um mittels Dual-Luciferase Reporter Assays zu testen, ob LMX1B tatsächlich die Aktivität des *IL6* Promotors in HtTA-1-Zellen auf Transkriptionsebene reguliert, mussten zunächst die optimalen Bedingungen für die Transfektion dieser Zellen mit den beschriebenen Promotor-Konstrukten ermittelt werden. Der in der Literatur von verschiedenen Gruppen am häufigsten beschriebene Zeitpunkt der TNF- α -Stimulierung vor der Durchführung des Luciferase Assays liegt bei 24 Stunden nach Transfektion der Reporter-Konstrukte [Yeruva et al., 2007; Higai et al., 2006]. Dieser Ansatzpunkt wurde bei der Etablierung übernommen und darauf die restlichen Versuchsbedingungen aufgebaut. Darunter zählt unter anderem die Stimulierungsdauer der Zellen mit TNF- α , bevor der Luciferase Assay durchgeführt wird. Andere kritische Parameter sind die Zellzahl, der Zeitpunkt der Transfektion des LMX1B-Expressionsplasmides, sowie die gesamte DNA-Menge, die transfiziert wird. Alle die in Tabelle 15 angeführten Parameter wurden variiert, wobei es sich bei den hervorgehobenen um die Parameter handelt, die bei weiteren Transfektionen verwendet wurden.

Tab. 14: Getestete Parameter für die Transfektion der Luciferase-Reportergen-Konstrukte in HtTA-1-Zellen. Fett hervorgehoben sind die Parameter, die im folgenden für Transfektionen verwendet wurden.

TNF- α :	1 h; 4 h; 6 h; 8 h ; 24 h
Transfektionsdauer:	24 h + TNF- α Stimulierung (24 h; 28 h; 30 h; 32 h ; 48 h)
Zellzahl (HtTA-1-Zellen/Vertiefung; 24 Loch-Platte):	1x 10⁵ ; 1,5x 10 ⁵
Transfektionsreagenz:	FuGENE6; Lipofectamine™ 2000
Zeitpunkt der Transfektion des LMX1B-Expressionsplasmids:	24 h , 48 h
DNA-Gesamt-Menge (μ g):	0,315 μg (0,158 μ g - 0,63 μ g)
Firefly-Luciferase Reporter Konstrukt:	0,1 μ g; 0,2 μg ; 0,3 μ g; 0,4 μ g; 0,8 μ g
Renilla-Luciferase Reporter Konstrukt:	15 ng ; 30 ng; 80 ng; 160 ng
LMX1B-Expressions-Plasmid:	0,1 μg ; 0,2 μ g; 0,3 μ g; 0,4 μ g; 0,8 μ g

Im Folgenden soll nun näher auf die Etablierung der einzelnen Parameter für die Transfektion eingegangen werden.

Dauer der TNF- α -Stimulierung für die Aktivierung von NF- κ B und Gesamt-Transfektionszeit:

Da neben LMX1B auch NF- κ B näher charakterisiert werden sollte, war es notwendig, die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs erneut dafür zu etablieren. Auf mRNA-Ebene ist eine Stimulierung mit TNF- α für eine Stunde optimal, um den NF- κ B-Signalweg zu aktivieren, was anhand der Expressions-Analyse von NF- κ B-Zielgenen mittels RT-qPCR verifiziert werden konnte (s. Kapitel 3.3, Abb. 10). Für den Luciferase Assay konnte davon ausgegangen werden, dass diese Dauer der Stimulierung für eine Expression des Luciferase-Gens nicht ausreicht. Daher wurde als erstes die Stimulierungsdauer der HtTA-1-Zellen mit TNF- α getestet. Für diesen ersten Test wurde nach dem Transfektionsprotokoll für HeLa-Zellen unter Verwendung des Transfektionsreagenzes LipofectamineTM 2000 (Invitrogen) vorgegangen, da dieses bereits am Lehrstuhl etabliert vorlag (s. 2.2.4 C).

Dementsprechend wurden je 1×10^5 HtTA-1-Zellen in einer 24-Loch-Platte in Dozyzyklin-haltigem Medium ausgesät, so dass 24 Stunden später, am Tag der Transfektion, die Zellen zu 50% konfluent vorlagen. In die HtTA-1-Zellen wurden 0,4 μ g des *Firefly*-Luciferase Konstruktes (NF- κ B)₄-Luc sowie in einem parallelen Ansatz 0,4 μ g des *Firefly*-Luciferase Konstruktes IL-6P.wt-Luc transfiziert. Zusätzlich zu den beiden *Firefly*-Luciferase Reportern wurde jeweils 0,08 μ g des *Renilla*-Luciferase Reporters pRL-null ko-transfiziert, dessen Luciferaseaktivität bei der Auswertung für die Normalisierung verwendet wurde. Wie bereits erwähnt, wird am häufigsten in der Literatur beschrieben, dass die TNF- α -Stimulierung optimalerweise 24 Stunden nach Transfektion der Reporter-Konstrukte in Zellen erfolgt [Yeruva et al., 2007; Higai et al., 2006]. Daher wurden die unterschiedlich langen Inkubationszeiten mit TNF- α , die von einer Stunde bis zu 24 Stunden reichten (s. Abb. 20 und Daten nicht gezeigt), in diesem ersten Versuch 24 Stunden nach der Transfektion der verschiedenen Reporter-Konstrukte in die HtTA-1-Zellen getestet. Die erhaltene *Firefly*-Luciferaseaktivität in den einzelnen Zelllysaten wurde gegen die entsprechende Aktivität der *Renilla*-Luciferase normalisiert und in Relation zu der Promotoraktivität der unstimulierten (0 h TNF- α) HtTA-1-Zellen (=1) gesetzt. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse dieses Reporter-Assays graphisch dargestellt:

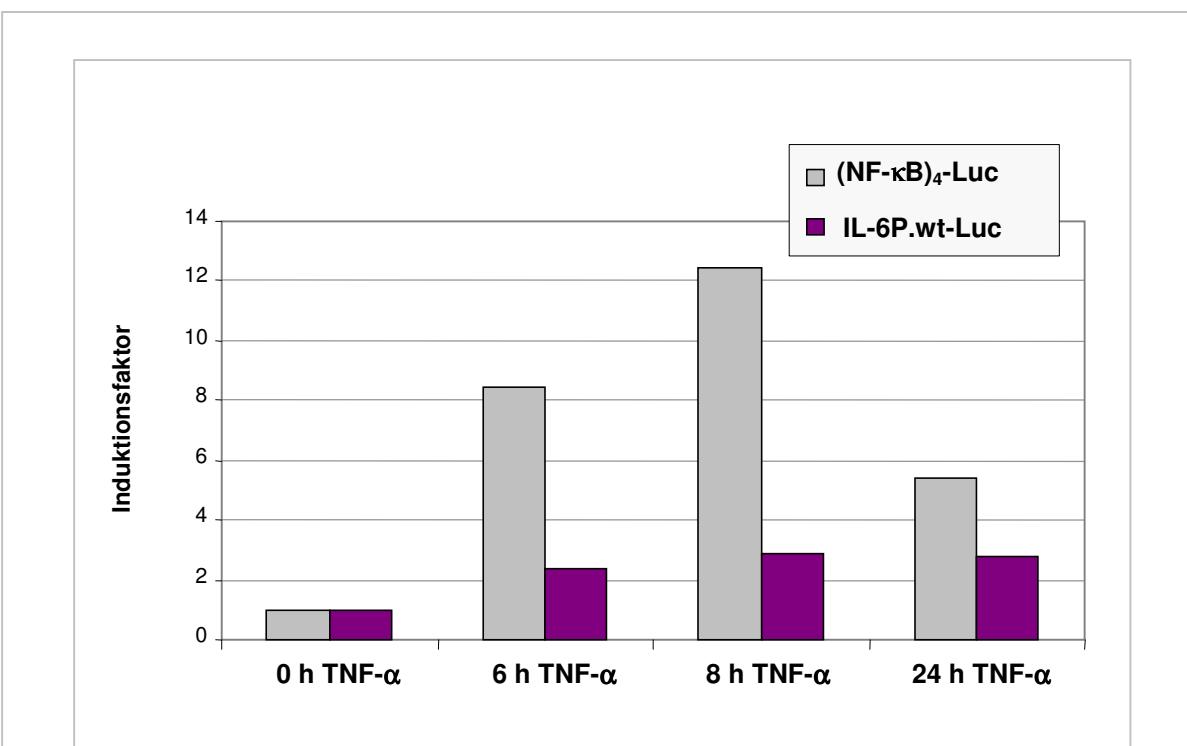


Abb. 20: Etablierung der TNF- α -Stimulierungszeit von HtTA-1-Zellen zur NF- κ B-Aktivierung für den Dual-Luciferase Assay. Je 1×10^5 HtTA-1-Zellen wurden in einer 24-Loch-Platte ausgesät, 24 Stunden später wurden entweder 0,4 μ g des *Firefly*-Luciferase Konstrukt (NF- κ B)4-Luc oder 0,4 μ g des *Firefly*-Luciferase Konstrukt IL-6P.wt-Luc mit 80 ng *Renilla*-Luciferase Reporter pRL-null zur Normalisierung ko-transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen mit TNF- α (20 ng/ml) unterschiedlich lang (0 h, 6 h, 8 h oder 24 h) inkubiert, um NF- κ B zu aktivieren. Nach Zelllyse und Proteinbestimmung wurden die Luciferaseaktivitäten der Lysate mittels Luminometer gemessen, normalisiert und relativ zu der Promotoraktivität der unstimulierten HtTA-1-Zellen (=1) graphisch dargestellt (Induktionsfaktor). **Eine Stimulierung mit TNF- α für 8 Stunden bewirkt die höchste Induktion der Reporter-Konstrukte.** Im Gegensatz zu den folgenden Luciferase Experimenten wurde dieser Luciferase Assay nur einmal durchgeführt, weshalb auch keine Fehlerbalken zu sehen sind.

Das Kontroll-Konstrukt (NF- κ B)₄-Luc zeigt die höchste Induktion bei einer TNF- α -Stimulierung von 8 Stunden (Induktionsfaktor von etwa 12). Eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch TNF- α resultiert auch in einer Aktivierung des *IL6* Promotors des IL-6P.wt-Luc-Konstrukt. Die maximal 3-fache Induktion des Konstrukt liegt ebenfalls bei einer Stimulierung der Zellen mit TNF- α für 8 Stunden (s. Abb. 20, lila Balken bei 8 h). Dieses Ausmaß der Induktion stimmt mit den Befunden überein, die Van den Berghe et al. (1998) mit diesem Konstrukt erhalten haben.

Somit waren die Dauer der TNF- α -Stimulierung (8 h) und die Gesamt-Transfektionszeit (32 h) als erste Versuchsbedingungen des Luciferase Assays etabliert (s. Tab. 14).

Zelldichte:

Da auch die Zelldichte die Transfektionseffizienz beeinflussen kann, wurde der Luciferase Assay ein weiteres Mal unter den gerade beschriebenen Bedingungen durchgeführt, wobei parallel zu den je 1×10^5 ausgesäten HtTA-1-Zellen auch je $1,5 \times 10^5$ Zellen in einer 24-Loch-Platte ausgesät wurden. Mit der niedrigeren HtTA-1-Zellzahl wurden mit beiden *Firefly*-Luciferase Konstrukten die Ergebnisse erhalten, die bereits in Abbildung 20 graphisch dargestellt wurden. Wurden hingegen je $1,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät, wurden beide Konstrukte weniger stark durch aktiviertes NF-κB induziert (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden für alle folgenden Versuche je 1×10^5 HtTA-1-Zellen in einer 24-Loch-Platte einen Tag vor Transfektion ausgesät (s. Tab. 14, Zellzahl: 1×10^5).

Transfektionsreagenz:

Parallel zu dem bis dato verwendeten Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 wurde ein anderes Transfektionsreagenz (FuGENE 6, Roche) auf dessen Effizienz getestet. Im darauf folgenden Luciferase Assay konnte erneut die 12-fache Induktion mit Lipofectamine™ 2000 festgestellt werden, im Gegensatz zu einer 8-fachen Induktion, wenn das FuGENE6-Reagenz zur Transfektion verwendet wurde (Daten nicht gezeigt). Daher erfolgte bei allen nachfolgenden Luciferase Assays die Transfektion der Reporter-Konstrukte in die HtTA-1-Zellen unter Verwendung des Lipofectamine™ 2000-Reagenz (s. Tab. 14, Transfektionsreagenz: Lipofectamine™ 2000).

Zeitpunkt der Transfektion mit dem LMX1B-Expressionsplasmid:

Nachdem die Aktivierung NF-κBs etabliert wurde, musste als nächstes die Expression von LMX1B optimiert werden. Zum einen bestand die Möglichkeit, LMX1B stabil über das Tet-off-System in den HtTA-1-Zellen zu synthetisieren (s. 2.2.4 A), zum anderen könnte LMX1B durch transiente Transfektion eines Expressionsplasmids in den Zellen produziert werden. Da bereits in vorherigen Experimenten etabliert werden konnte, dass NF-κB am besten 24 Stunden nach Transfektion der Reporter-Konstrukte durch TNF-α aktiviert wird, wurde überprüft, ob LMX1B auch 24 Stunden nach Transfektion eines LMX1B-Expressionsplasmids in HtTA-1-Zellen synthetisiert wird. Dadurch wäre eine Vereinfachung des Versuchaufbaus möglich, denn so könnte das LMX1B-Expressionsplasmid mit den *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase Reportern ko-transfiziert werden.

Aus diesem Grund wurden HtTA-1-Zellen in Dozyzyklin-haltigem Medium ausgesät und am nächsten Tag mit dem LMX1B-Expressionsplasmid p3M/LMX1B (s. 2.1.9, Tab. 7) transfiziert. 24 Stunden bzw. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Wie dem zugehörigen Röntgenfilm in Abbildung 21 zu entnehmen ist, wird LMX1B in HtTA-1-Zellen sowohl 24 Stunden als auch 48 Stunden nach Transfektion des Expressionsplasmids

p3M/LMX1B detektiert, wobei die LMX1B-Expression nach 24 Stunden effektiver ist. Somit kann bei der Transfektion für den Luciferase Assay das LMX1B-Expressionsplasmid zusammen mit dem *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase Reporter in die HtTA-1-Zellen transfiziert werden, denn zum Zeitpunkt der Ernte der Zellen wird nicht nur LMX1B exprimiert, sondern ist auch NF-κB aktiv (s. Tab. 14, Zeitpunkt der Transfektion des LMX1B-Expressionsplasmids: 24 h).

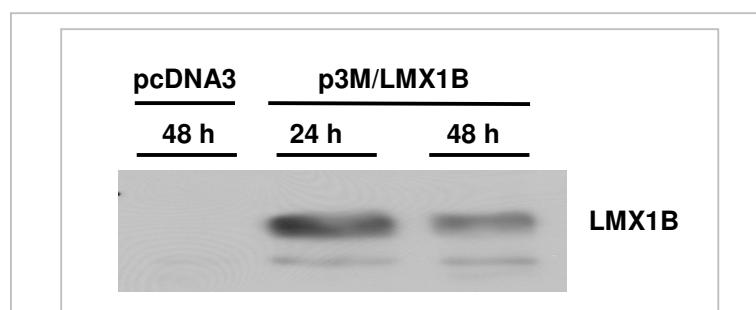


Abb. 21: LMX1B-Expression nach Transfektion des p3M/LMX1B-Plasmids in HtTA-1-Zellen. 24 bzw 48 Stunden nach Transfektion von HtTA-1-Zellen mit je 1 µg des Expressionsplasmids p3M/LMX1B, bzw. des entsprechenden Wildtyp-Vektors pcDNA3, wurden Proteinlysate hergestellt und mit je 20 µg Gesamt-Protein ein Proteingel durchgeführt. Bei der anschließenden Western-Blot-Analyse wurde das LMX1B-Protein mit dem monoklonalen anti-LMX1B-Antikörper 193-67 und einem HRP-gekoppelten anti-Maus IgG-Sekundärantikörper nachgewiesen. **24 Stunden nach Transfektion des Expressionsplasmids wird LMX1B in HtTA-1-Zellen am effizientesten synthetisiert.**

DNA-Menge der einzelnen Plasmide:

Das Verhältnis des Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 zu eingesetzter DNA ist ein weiteres wichtiges Kriterium für die Effizienz einer Transfektion, da sich zum Beispiel ein ungünstiges Verhältnis toxisch auf die Zellen auswirken kann. Daher wurden, wie in der Tabelle 14 für die einzelnen Plasmide aufgezeigt [s. Tab. 14, DNA-Gesamt-Menge (µg)], unterschiedliche Mengen an *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase Reporter sowie des p3M/LMX1B-Expressionsplasmids in der Transfektion eingesetzt und ihre Wirkung auf die HtTA-1-Zellen anhand der gemessenen Luciferaseaktivitäten analysiert. Zunächst wurden dabei die vom Hersteller (Invitrogen) empfohlenen Konditionen in der Transfektion getestet. So wurden für den der internen Kontrolle dienenden *Renilla*-Reporter sehr unterschiedliche Luciferaseaktivitäten erhalten. Um dies zu vermeiden, wurde die in die Transfektion eingesetzte Gesamt-DNA-Menge variiert. Letztendlich stellte sich heraus, dass ein Verhältnis von einer Gesamt-DNA-Menge von 0,315 µg zu 0,4 µl Lipofectamine™ 2000-Reagenz optimal für die Transfektion ist, wobei sich die DNA-Menge aus 0,2 µg des *Firefly*-Luciferase Reporters, 15 ng des *Renilla*-Luciferase Reporters und 0,1 µg des Expressionsplasmids zusammensetzt (s. Tab. 14, DNA-Gesamt-Menge: 0,315 µg).

Somit waren alle nötigen Parameter für die in dieser Arbeit durchzuführenden Dual-

Luciferase Assays etabliert. Sie sind in nachfolgender vereinfachten schematischen Darstellung zusammengefasst:

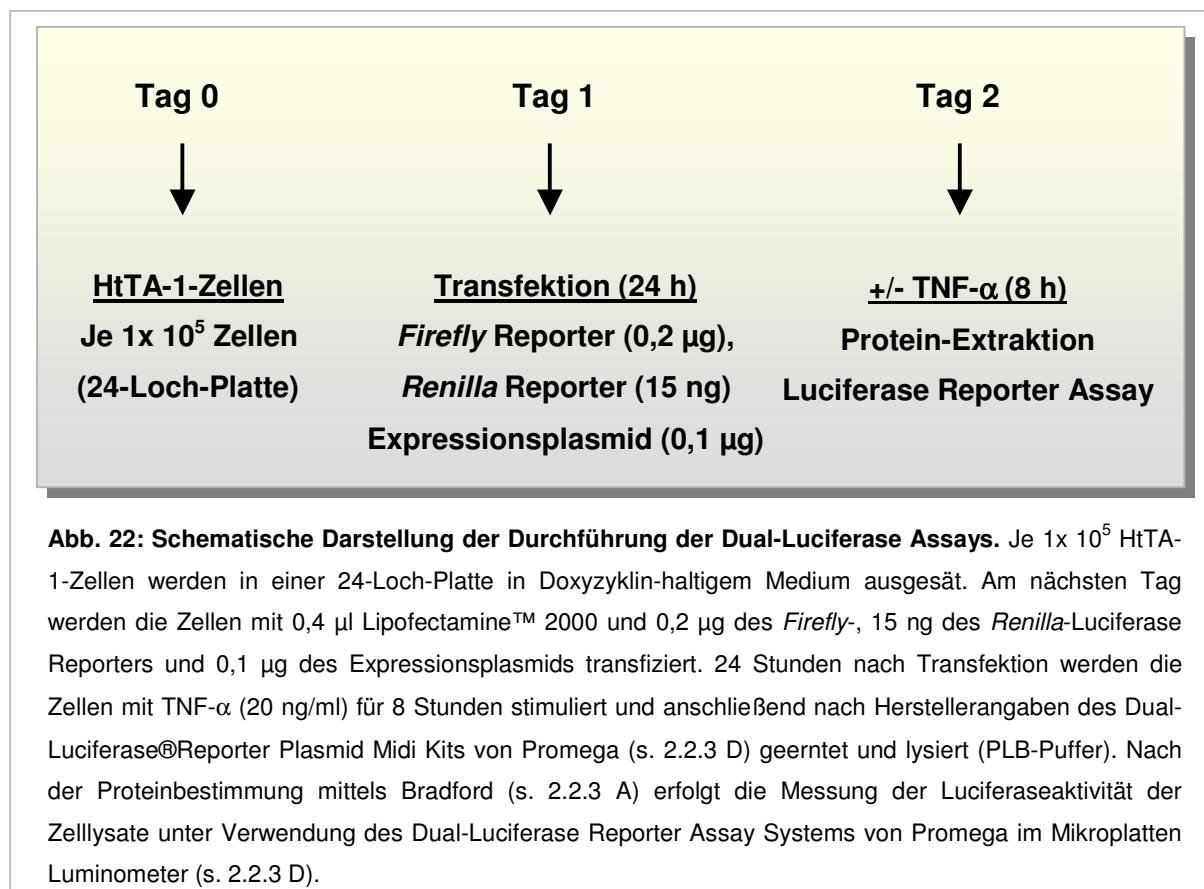


Abb. 22: Schematische Darstellung der Durchführung der Dual-Luciferase Assays. Je 1×10^5 HtTA-1-Zellen werden in einer 24-Loch-Platte in Doxzyklin-haltigem Medium ausgesät. Am nächsten Tag werden die Zellen mit 0,4 µl Lipofectamine™ 2000 und 0,2 µg des *Firefly*-, 15 ng des *Renilla*-Luciferase Reporters und 0,1 µg des Expressionsplasmids transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion werden die Zellen mit TNF-α (20 ng/ml) für 8 Stunden stimuliert und anschließend nach Herstellerangaben des Dual-Luciferase® Reporter Plasmid Midi Kits von Promega (s. 2.2.3 D) geerntet und lysiert (PLB-Puffer). Nach der Proteinbestimmung mittels Bradford (s. 2.2.3 A) erfolgt die Messung der Luciferaseaktivität der Zelllysate unter Verwendung des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems von Promega im Mikroplatten Luminometer (s. 2.2.3 D).

3.9 Einfluss von LMX1B und NF-κB auf die *IL6* Promotoraktivität

Wie unter 3.6 beschrieben, konnte parallel zu dieser Arbeit von Astrid Neumann im Rahmen einer Dissertation gezeigt werden, dass LMX1B an die Promotoren der NF-κB-Zielgene *IL6* und *IL8* *in vivo* binden kann. Innerhalb dieser Promotoren wurden in der Nähe des NF-κB-Bindungsmotivs spezifische AT-reiche DNA-Sequenzen (FLAT-Elemente) identifiziert, wobei es sich dabei um mutmaßliche LMX1B-Bindungsmotive handelt [German et al., 1992; Dreyer et al., 1998].

Anhand funktioneller Analysen sollte nun überprüft werden, ob die Bindung von LMX1B an den *IL6* Promotor mit der Transkriptionsaktivität korreliert. Die andere Frage, die es in diesem Zusammenhang zu klären galt, war, ob bei der Aktivierung des *IL6* Promotors durch LMX1B das FLAT-Element involviert ist. Bereits die durchgeführten ChIP-Experimente von Astrid Neumann (s. Kapitel 3.6) wiesen stark darauf hin, dass die Bindung von LMX1B an den Promotor über das FLAT-Element erfolgt. Dies konnte nun mittels Luciferase Assay (2.2.3 D)

unter Verwendung der verschiedenen Reporter-Konstrukte (s. Abb. 19) überprüft werden.

Um die Spezifität des Luciferase Assays gewährleisten zu können, sollten zunächst Kontrollversuche für LMX1B und für NF- κ B durchgeführt werden. Mit dem *Firefly*-Reporter Konstrukt Δ IL-6P-Luc (Abb. 19, Δ IL-6P-Luc) sollte überprüft werden, ob LMX1B möglicherweise unspezifisch den *IL6* Promotor aktiviert. Als Positivkontrolle der NF- κ B-Aktivierung durch TNF- α wurde das *Firefly*-Reporter Konstrukt (NF- κ B)₄-Luc (Abb. 19, (NF- κ B)₄-Luc) verwendet. Dies dient zugleich als Negativkontrolle für LMX1B, da dieses Konstrukt kein FLAT-Element besitzt, an das LMX1B binden könnte.

Nachfolgend ist die graphische Darstellung der Luciferasedaten zu sehen. Dabei handelt es sich, wie auch für alle nachfolgend gezeigten Luciferase Assays, um einen Mittelwert der Daten von drei voneinander unabhängig durchgeföhrten Luciferase Experimenten, die jeweils doppelt vermessen wurden.

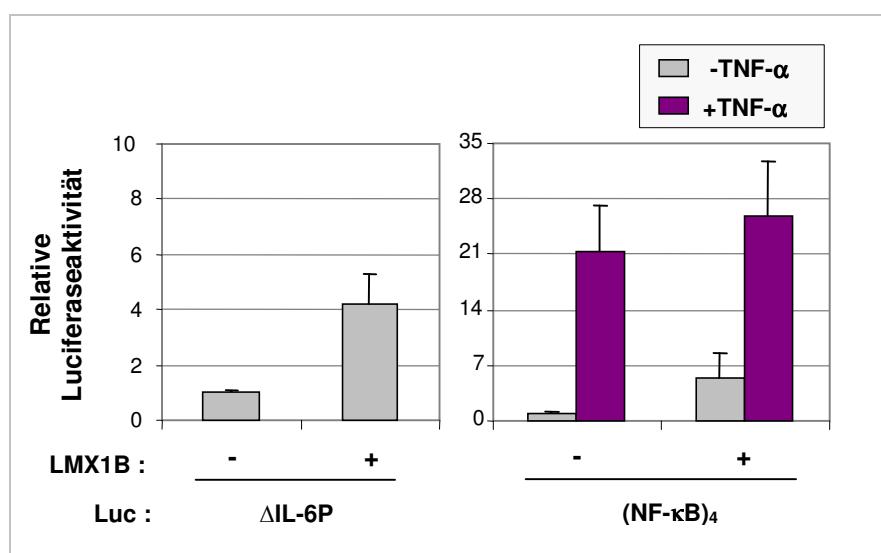


Abb. 23: Luciferase Assays mit den Konstrukten Δ IL-6P-Luc und (NF- κ B)₄-Luc. HtTA-1-Zellen wurden mit dem angegebenen *Firefly*-Luciferase Reporter (Luc) und mit einem LMX1B-Expressionsplasmid (+LMX1B) oder dem entsprechenden Wildtyp-Vektor (-LMX1B) transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen mit TNF- α für 8 Stunden stimuliert (lila Balken) oder blieben unstimuliert (graue Balken). Die Luciferase Aktivitäten wurden wie unter 2.2.3 D gemessen, der jeweils erhaltene Wert für die *Firefly*-Aktivität wurde mit dem der entsprechenden *Renilla*-Aktivität normalisiert. Die Werte sind in Relation zur basalen Promotoraktivität der unstimulierten, mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen dargestellt. Die Diagramme stellen den Mittelwert von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten dar, wobei jedes doppelt durchgeführt wurde. **LMX1B aktiviert Δ IL-6P-Luc und (NF- κ B)₄-Luc.**

Unerwarteterweise resultierte eine Ko-Transfektion des LMX1B-Expressionsplasmides in einer 4-fachen Induktion der Reporter-Konstrukte Δ IL-6P-Luc und $(\text{NF-}\kappa\text{B})_4$ -Luc. Das lässt die Vermutung zu, dass die durch LMX1B bewirkte Induktion der Reporter-Konstrukte durch andere im Vektor vorhandene FLAT-Elemente vermittelt wird. In der Tat konnten durch Sequenz-Analysen des Konstruktes Δ IL-6P-Luc 5 FLAT-Elemente identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Da das Konstrukt Δ IL-6P-Luc einen identischen Vektor-Anteil wie das $(\text{NF-}\kappa\text{B})_4$ -Luc Konstrukt aufweist, kann die Aktivierung beider Reporter-Konstrukte durch diese FLAT-Elemente erklärt werden. Daher wurde bei allen nachfolgenden Auswertungen von den Werten, die nach der Normalisierung erhalten wurden, noch stets diese Hintergrund-Aktivität des Δ IL-6P-Luc Konstruktes abgezogen.

Das Endergebnis aller funktionellen Analysen, mittels derer die Transkriptionsaktivität von LMX1B untersucht werden sollte, ist in nachfolgender Abbildung 24 dargestellt. Sie beinhaltet auch die gerade beschriebene Korrektur mit der Hintergrund-Aktivität, die das Δ IL-6P-Luc Konstrukt aufweist.

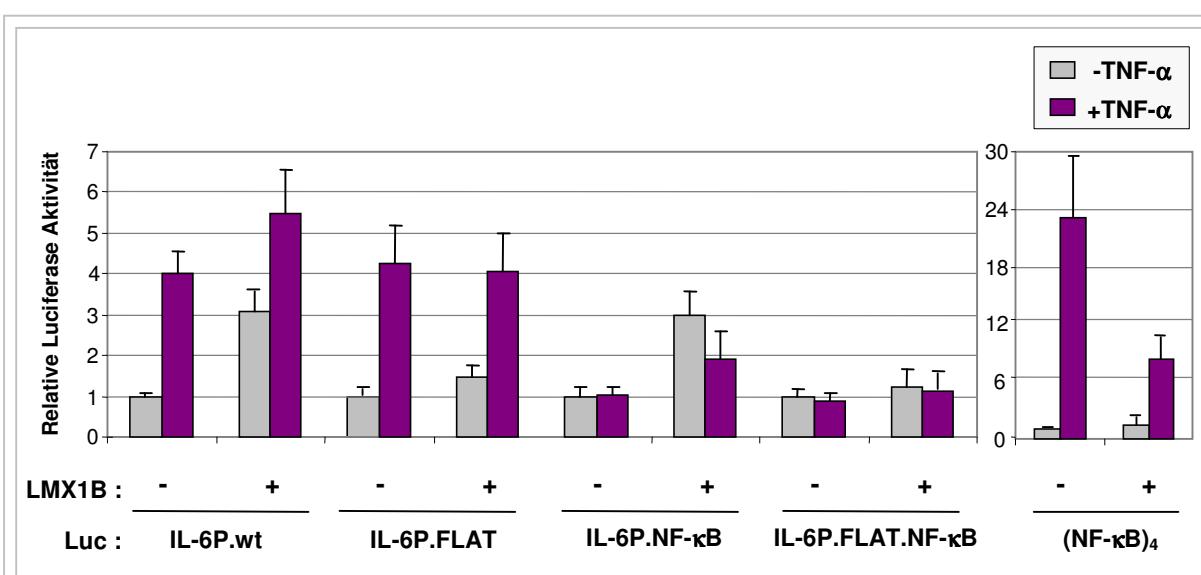


Abb. 24: Graphische Darstellung aller Dual-Luciferase Reporter Assays zur Überprüfung der Regulation durch LMX1B und NF- κ B des *IL6* Promotors. HtTA-1-Zellen wurden mit den angegebenen *Firefly*-Luciferase Reporter-Konstrukten (Luc) und dem LMX1B-Expressionsplasmid (oder der gleichen Menge des entsprechenden Wildtyp-Vektors) ko-transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen für 8 Stunden mit TNF- α stimuliert (lila Balken) oder blieben unstimuliert (graue Balken). Die *Firefly*-Luciferase Werte wurden mit den jeweils entsprechenden Werten der *Renilla*-Luciferase normalisiert. Davon wurden noch die als Basalaktivität angesehenen Werte des Promotor-losen Konstruktes Δ IL-6P-Luc abgezogen und die dann erhaltenen Werte schließlich in Relation zu der basalen Promotoraktivität (=1) gesetzt. Die Diagramme stellen den Mittelwert von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten dar, wobei jedes doppelt durchgeführt wurde. **In der durch LMX1B regulierten Transkription des humanen *IL6* Promotors sind sowohl das FLAT- als auch das NF- κ B-Bindungsmotiv involviert.**

Auf die Ergebnisse, die dieser Abbildung entnommen werden können, soll nun im einzelnen näher eingegangen werden:

LMX1B aktiviert durch das FLAT-Element die Transkription des *IL6* Promotors

Wie zu erwarten bewirkt eine Stimulierung der HtTA-1-Zellen mit TNF- α in Abwesenheit von LMX1B eine 4-fache Aktivierung des Wildtyp-*IL6* Promotors (s. Abb. 24, IL-6P.wt, -LMX1B, lila Balken). Dieser Befund wurde bereits von Van den Berghe et al. (1998) veröffentlicht und konnte auch in dieser Arbeit im Rahmen eines Vorversuches bestätigt werden (s. Abb. 20, lila Balken). Dahingegen zeigt das Reporter Konstrukt mit dem mutierten NF- κ B-Bindungsmotiv keine Aktivierung durch TNF- α (s. Abb. 24, IL-6P.NF- κ B und IL-6P.FLAT.NF- κ B, -LMX1B, lila Balken). Diese Feststellung ist in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten [Van den Berghe et al., 1998].

Um LMX1B auf seine Fähigkeit der transkriptionellen Regulierung des *IL6* Promotors zu überprüfen, wurde zu den jeweiligen *Firefly*-Reporter Konstrukten ein LMX1B-Expressionsplasmid ko-transfiziert. Dies resultiert in einer 3-fachen Aktivierung des Wildtyp-*IL6* Promotors (s. Abb. 24, IL-6P.wt, +LMX1B, grauer Balken). So konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass in der Tat LMX1B die Transkription des *IL6* Promotors aktivieren kann. Bei dem Reporter-Konstrukt IL-6P.FLAT-Luc, welches innerhalb des *IL6* Promotors ein mutiertes FLAT-Element besitzt, kann nach Ko-Transfektion des LMX1B-Expressionsplasmides nur noch eine stark verminderte transkriptionelle Aktivierung des *IL6* Promotors festgestellt werden (s. Abb. 24, IL-6P.FLAT, +LMX1B, grauer Balken). Auch das Kontroll-Konstrukt (NF- κ B)₄-Luc, welches 4 NF- κ B-Bindungssequenzen, jedoch kein FLAT-Element besitzt, kann nicht durch LMX1B aktiviert werden [s. Abb. 24, (NF- κ B)₄, +LMX1B, grauer Balken]. Aus diesen beiden Beobachtungen lässt sich schließen, dass die durch LMX1B induzierte Aktivierung des *IL6* Promotors vom FLAT-Element abhängt.

Bei einer Stimulierung der HtTA-1-Zellen mit TNF- α ist die Induktion des Reporter-Konstrukttes IL-6P.FLAT-Luc genauso hoch wie die des Wildtyp-*IL6* Promotors (s. Abb. 24, IL-6P.FLAT, -LMX1B, lila Balken). Folglich wird das FLAT-Element bei der durch NF- κ B induzierten Aktivierung der Transkription des *IL6* Promotors nicht benötigt. Die durch LMX1B ausgelöste Transkription des *IL6* Promotors wird nicht durch eine mutierte NF- κ B-Bindesequenz innerhalb des Promotors beeinträchtigt (s. Abb. 24, IL-6P.NF- κ B, +LMX1B, grauer Balken). So ist also bei der durch LMX1B induzierten transkriptionellen Aktivierung des *IL6* Promotors das NF- κ B-Bindungsmotiv nicht essentiell. Bestätigt werden diese beiden Ergebnisse durch die Feststellung, dass nach Mutation sowohl des FLAT-Elements als auch des NF- κ B-Bindungsmotivs der *IL6* Promotor weder eine transkriptionelle Aktivierung durch LMX1B noch durch NF- κ B zeigt (s. Abb. 24, IL-6P.FLAT.NF- κ B, +LMX1B, grauer Balken und

-LMX1B, lila Balken).

Zusammenfassend konnte also festgestellt werden, dass LMX1B die Transkription des *IL6* Promotors induzieren kann und hierfür ein FLAT Element benötigt. Dabei spielt das NF-κB-Bindungsmotiv eine weniger bedeutende Rolle.

Der kooperative Effekt, der zwischen LMX1B und NF-κB bei der Transkriptionsaktivierung beobachtet wurde, kann mit Reporter-Konstrukten nicht reproduziert werden

Wurde sowohl LMX1B synthetisiert als auch NF-κB aktiviert, so führt dies lediglich zu einem additiven Effekt (additives Ergebnis der einzelnen Effekte: LMX1B-Effekt + TNF-α-Effekt) im Bezug auf die Aktivierung des Wildtyp-*IL6* Promotors im Luciferase Assay (s. Abb. 24, Vergleich von IL-6P.wt, +LMX1B, lila Balken mit IL-6P.wt, -LMX1B, lila Balken). Die *IL6* Promotoraktivität des Kontraktes IL-6P.FLAT-Luc ist bei einer TNF-α Stimulierung in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von LMX1B gleich hoch und wird nicht verstärkt durch die gleichzeitige Anwesenheit von NF-κB und LMX1B (s. Abb. 24, Vergleich von IL-6P.FLAT, +LMX1B, lila Balken mit IL-6P.FLAT, -LMX1B, lila Balken). Diese Feststellung bestätigt den beobachteten additiven Effekt, den beide Proteine auf die Aktivierung des *IL6* Promotors ausüben.

Dass es sich hierbei jedoch nicht um den festgestellten stärkeren kooperativen Effekt zwischen LMX1B und NF-κB auf Transkriptionsebene handelt (s. Kapitel 3.5, Abb. 17), mag daran liegen, dass jene regulatorischen Komponenten, die *in vivo* zu der Kooperation zwischen LMX1B und NF-κB beitragen, wie z.B. Chromatinkomponenten, bei der Durchführung des Dual-Luciferase Assays nicht vorhanden sind.

LMX1B und NF-κB benötigen einen gemeinsamen Koaktivator für die Transkriptionsaktivität

Bei Betrachtung der Reporteraktivität des Kontraktes IL-6P.NF-κB-Luc ist erwartungsgemäß kein Effekt durch TNF-α zu beobachten (s. Abb. 24, IL-6P.NF-κB, -LMX1B, lila Balken). Jedoch ist mit diesem IL-6P.NF-κB-Luc-Konstrukt mit TNF-α in Gegenwart von LMX1B eine verminderte Aktivierung zu sehen (s. Abb. 24, IL-6P.NF-κB, +LMX1B, lila Balken). Bei der Analyse des Kontraktes (NF-κB)₄-Luc, welches kein FLAT-Element in seinem Promotor besitzt, ist in Gegenwart von TNF-α eine verringerte Transkription festzustellen [s. Abb. 24, (NF-κB)₄, +LMX1B, lila Balken]. Somit verhalten sich die beiden letzten genannten Ergebnisse genau reziprok. Eine Erklärung hierfür könnte ein gemeinsamer Kofaktor sein, den LMX1B und NF-κB für ihre Fähigkeit, die Transkription des *IL6* Promotors zu aktivieren, benötigen. Durch TNF-α aktiviertes NF-κB liegt in hoher

Konzentration im Kern vor, kann jedoch aufgrund der mutierten NF-κB-Bindungssequenz nicht an den Promotor des IL-6P.NF-κB-Luc-Konstruktes binden. Der mutmaßliche Kofaktor, den LMX1B zu seiner Transkriptionsfähigkeit benötigt, wird so durch NF-κB gehindert, mit LMX1B interagieren zu können. Dies spiegelt sich dann in einer verringerten Transkription des Promotors durch LMX1B in Anwesenheit von TNF-α wider (s. Abb. 24, IL-6P.NF-κB, +LMX1B, lila Balken). Beim (NF-κB)₄-Luc-Konstrukt kann LMX1B nicht an ein FLAT-Element binden und liegt somit im Überschuss vor. Der Theorie des mutmaßlichen Kofaktors folgend, wird dieser dadurch gehindert, mit NF-κB bei der Aktivierung des *IL6* Promotors zu interagieren. Dies resultiert in der verringerten durch NF-κB vermittelten Transkription des Reporters (NF-κB)₄-Luc in Gegenwart von LMX1B [s. Abb. 24, (NF-κB)₄, +LMX1B, lila Balken].

Zusammenfassend konnten diese Luciferase Assays folgende Ergebnisse liefern:

- (1) LMX1B kann die Transkription des *IL6* Promotors aktivieren (s. Kapitel 3.7.2, Abb. 24).
- (2) LMX1B bindet den *IL6* Promotor in dem Bereich, wo auch ein FLAT-Element identifiziert wurde (Astrid Neumann, persönliche Mitteilung und s. Kapitel 3.6) [Rascle et al., 2009a]. Die Luciferase Assays konnten zeigen, dass für die Aktivierung des *IL6* Promotors durch LMX1B das FLAT-Element unerlässlich ist (s. Kapitel 3.7.2, Abb. 24) [Rascle et al., 2009a]. Diese beiden Resultate lassen die Schlussfolgerung zu, dass die transkriptionelle Aktivierung des *IL6* Promotors durch LMX1B sehr wahrscheinlich durch Bindung von LMX1B an das FLAT-Element vermittelt wird [Rascle et al., 2009a].
- (3) Im Luciferase Assay löst TNF-α in Gegenwart von LMX1B lediglich einen additiven Effekt auf die Transkriptionsaktivierung des *IL6* Promotors aus (s. Kapitel 3.7.2, Abb. 24) [Rascle et al., 2009a].
- (4) LMX1B und NF-κB benötigen vermutlich einen gemeinsamen Kofaktor für ihre Fähigkeit der Transkriptionsaktivierung (s. Kapitel 3.7.2, Abb. 22) [Rascle et al., 2009a].

3.10 Die LIM Domänen und die Homöodomäne sind essentiell für die transkriptionelle Aktivierung durch LMX1B

Anhand von Punktmutationen in den funktionellen LMX1B-Domänen, welche in NPS-Patienten identifiziert wurden, sollte als nächstes versucht werden, den Mechanismus, durch

den LMX1B die Transkription der NF-κB-Zielgene aktiviert, detaillierter zu charakterisieren. Diese sollen dann in Luciferase Assays auf ihre Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung des *IL6* Promotors getestet werden.

Wie bereits in der Einleitung ausführlich geschildert, handelt es sich bei LMX1B um ein Mitglied der LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren, welches aminoterminal zwei LIM Domänen (LIM1 aus 51 Aminosäuren und LIM2 aus 54 Aminosäuren), nachfolgend eine Homöodomäne (63 Aminosäuren) und eine am Karboxyterminus gelegene glutamin- und serinreiche mutmaßliche transkriptionelle Aktivatordomäne besitzt [McIntosh et al, 2005].

Bei den LIM Domänen handelt es sich um Protein-Protein-Interaktionsdomänen, wodurch LMX1B mit anderen transkriptionellen Aktivatoren oder Repressoren wechselwirken kann. Im Rahmen dieser Dissertation und in Zusammenarbeit mit Tanja Neumann [Neumann, 2009] konnte gezeigt werden, dass für die durch LMX1B bewirkte Aktivierung der Genexpression mancher NF-κB-Zielgene in HeLa-Zellen eine funktionelle LIM2-Domäne in LMX1B benötigt wird (s. Kapitel 3.2) [Neumann, 2009; Raschle et al., 2009a]. Auch dass die LIM2-Domäne, aber nicht die LIM1-Domäne, essentiell ist für das verminderte Zellwachstum, welches durch LMX1B induziert wird, konnte zusätzlich von Tanja Neumann demonstriert werden [Neumann, 2009]. Welche der beiden Domänen für die Transaktivierung der NF-κB-Zielgene, im speziellen für *IL6*, verantwortlich ist, sollte nun anhand von Punktmutationen in den LIM Domänen von LMX1B analysiert werden.

Die Homöodomäne (HD) von LMX1B vermittelt die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen innerhalb von Zielgenen. Mittels ChIP-Experimenten konnte Astrid Neumann *in vivo* eine Bindung von LMX1B an die Promotoren von *IL6* und *IL8* zeigen (persönliche Mitteilung Astrid Neumann) [Raschle et al., 2009a]. In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass für die Aktivierung des *IL6* Promotors das FLAT-Element benötigt wird. Diese beiden Erkenntnisse lassen die Vermutung zu, dass LMX1B an das FLAT-Element von *IL6* bei dessen transkriptioneller Aktivierung bindet. Eine LMX1B Mutante, die eine Punktmutation in der Homöodomäne besitzt, sollte folglich inaktiv sein und keine Aktivierung des *IL6* Promotors zeigen. Somit könnte LMX1B in seiner Funktion als ein DNA-bindender Transkriptionsfaktor bestätigt werden. Die LMX1B Mutanten, die in den Luciferase Assays verwendet werden und nachfolgend als LMX1B-H54L (LIM1), LMX1B-C95F (LIM2) und LMX1B-A213P (HD) bezeichnet werden, wurden in NPS Patienten identifiziert (s. Abb. 25) [Bongers et al., 2002; Vollrath et al., 1998; McIntosh et al., 1998]. Bei der Mutante LMX1B-H54L liegt eine Punktmutation in der LIM1-Domäne vor, bei der ein Histidin gegen Leucin an Position 54 in LMX1B ausgetauscht wurde. Bei der Mutante LMX1B-C95F handelt es sich

um eine Punktmutation in der LIM2-Domäne von LMX1B an Position 95, wobei die Aminosäure Cystein gegen die Aminosäure Phenylalanin ausgetauscht wurde (s. Abb. 25, LMX1B-H54L und LMX1B-C95F). Bei beiden LMX1B Mutanten wird durch diese Punktmutationen die Struktur des Zinkfinger-Motivs in der jeweiligen LIM Domäne zerstört, wodurch wahrscheinlich die Fähigkeit LMX1Bs zur Interaktion mit anderen Proteinen verloren geht [Bongers et al., 2002; Vollrath et al., 1998]. Außerdem wurde auch die Doppel-Mutante LMX1B-H54L-C95F hergestellt, damit LMX1B sowohl über die LIM1- als auch die LIM2-Domäne nicht mehr mit möglichen Kofaktoren wechselwirken kann (s. Abb. 25). Bei der als LMX1B-A213P bezeichneten Mutante liegt eine Punktmutation in der DNA-bindenden Homöodomäne an Position 213 in LMX1B vor, wobei die Aminosäure Alanin gegen die Aminosäure Prolin ausgetauscht wurde. Dies bewirkt vermutlich, dass LMX1B nicht mehr an die DNA seiner Zielgene binden kann (s. Abb. 25) [McIntosh et al., 1998].

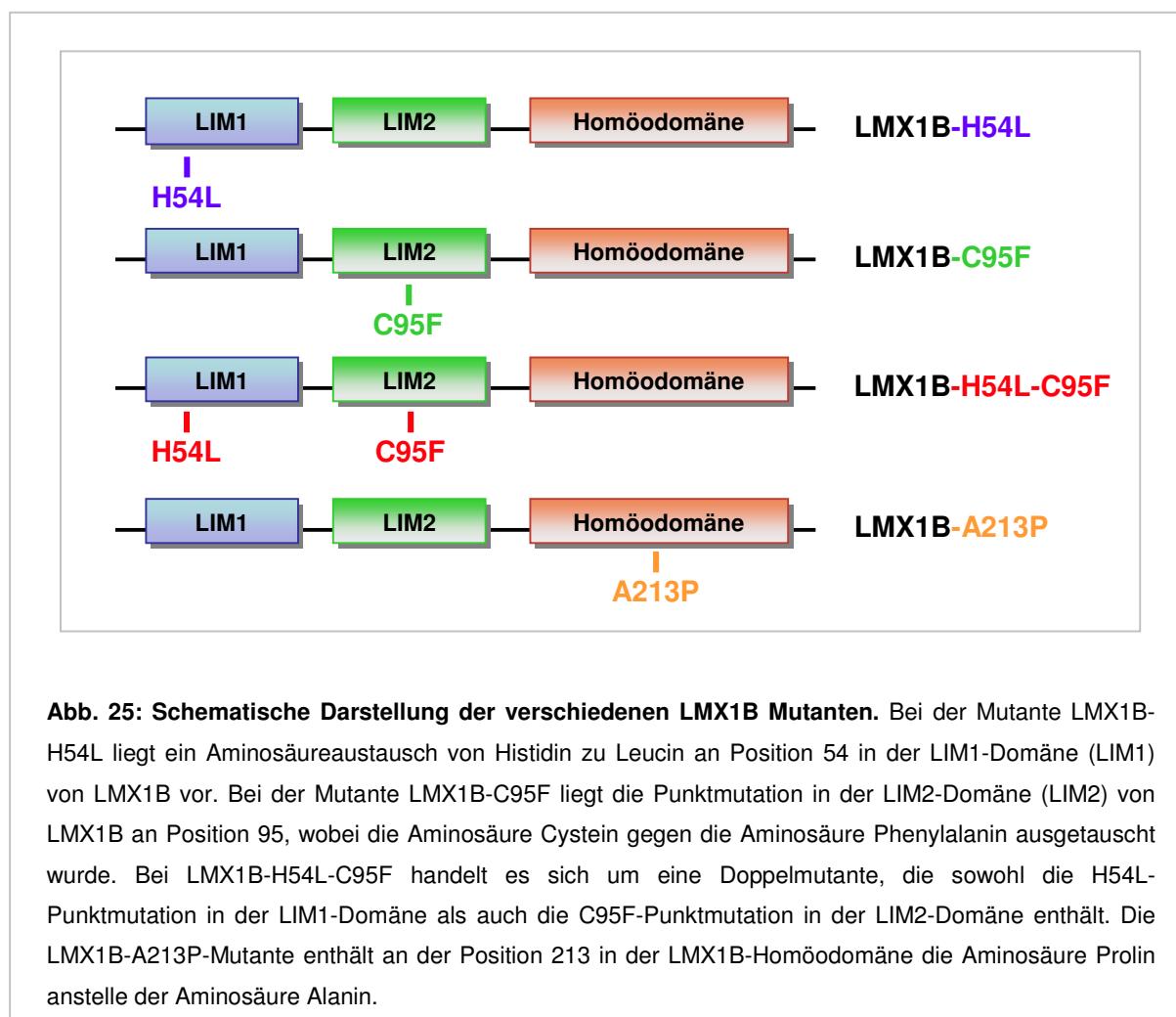


Abb. 25: Schematische Darstellung der verschiedenen LMX1B Mutanten. Bei der Mutante LMX1B-H54L liegt ein Aminosäureaustausch von Histidin zu Leucin an Position 54 in der LIM1-Domäne (LIM1) von LMX1B vor. Bei der Mutante LMX1B-C95F liegt die Punktmutation in der LIM2-Domäne (LIM2) von LMX1B an Position 95, wobei die Aminosäure Cystein gegen die Aminosäure Phenylalanin ausgetauscht wurde. Bei LMX1B-H54L-C95F handelt es sich um eine Doppelmutante, die sowohl die H54L-Punktmutation in der LIM1-Domäne als auch die C95F-Punktmutation in der LIM2-Domäne enthält. Die LMX1B-A213P-Mutante enthält an der Position 213 in der LMX1B-Homöodomäne die Aminosäure Prolin anstelle der Aminosäure Alanin.

Für die Herstellung der in Abbildung 25 vereinfacht dargestellten LMX1B Mutanten wurde nach dem Protokoll des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene

vorgegangen wurde (s. 2.2.2 E). Dabei sollten diese Mutationen in das LMX1B-Expressionsplasmid eingebracht werden, um für den Luciferase Assay die LMX1B Mutanten in HtTA-1-Zellen produzieren zu können. Für die Herstellung der LMX1B Mutanten LMX1B-H54L, LMX1B-C95F und LMX1B-A213P wurde das LMX1B-Expressionsplasmid p3M/LMX1B als Ausgangsplasmid und für die der LMX1B-Doppelmutante LMX1B-H54L-C95F das LMX1B-C95F Konstrukt verwendet. Mit den jeweils entsprechenden Oligonukleotiden (s. 2.1.8, Tab. 4) wurde die gewünschte Punktmutation eingeführt, wobei der Erfolg der Mutagenese durch einen Restriktionsverdau überprüft wurde. Dabei wurde entweder eine zusätzliche Schnittstelle eingeführt oder eine bereits bestehende entfernt. Dies ist in nachfolgender Abbildung dargestellt:

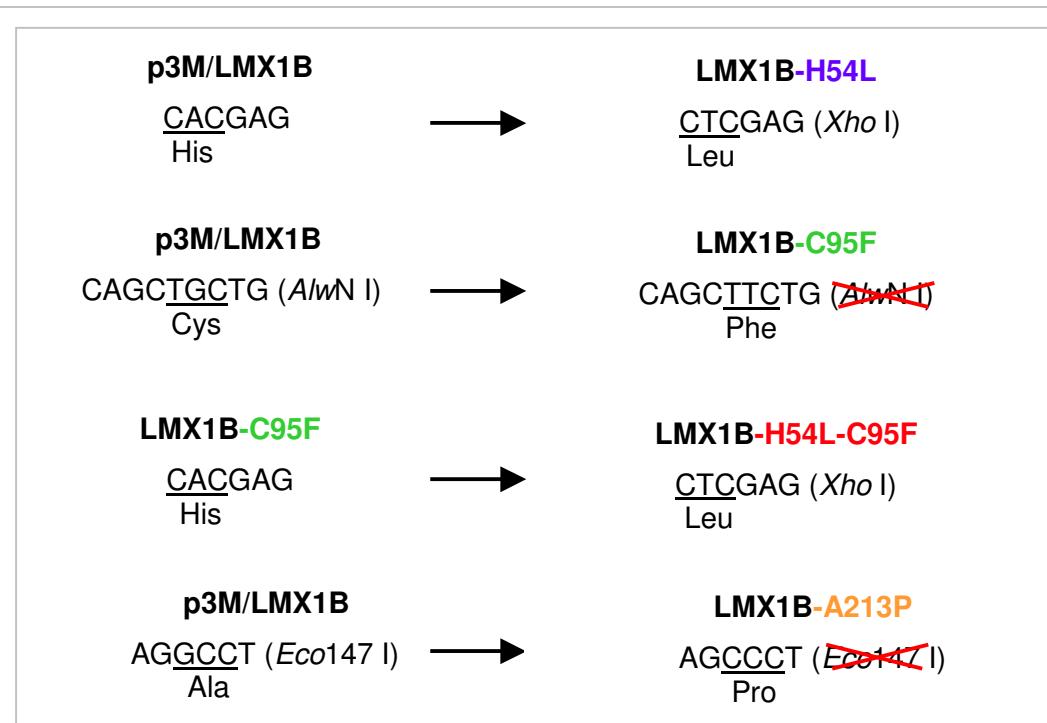


Abb. 26: Schematisch dargestellte Generierung der LMX1B Mutanten und der entstandenen, bzw. verloren gegangenen Restriktionsschnittstellen. Durch die Methode der ortsspezifischen Mutagenese (s. 2.2.2 E) entstanden aus dem Ausgangsplasmid p3M/LMX1B jeweils die LMX1B Mutanten LMX1B-H54L, LMX1B-C95F und LMX1B-A213P. Die Doppel-Mutante LMX1B-H54L-C95F entstand anschließend aus der LMX1B-C95F Mutante (s. 2.1.9, Tab. 6). Dazu wurden die unter 2.1.8 angeführten Oligonukleotide (Tab. 4) verwendet. Bei der LMX1B-H54L Mutante wurde die Aminosäure Histidin (CAC) zur Aminosäure Leucin (CTC) verändert, wodurch eine zusätzliche *Xho* I Restriktionsschnittstelle (*Xho* I: 5' CTCGAG 3') entstand. Bei der LMX1B-C95F Mutante wurde die Aminosäure Cystein (TGC) zur Aminosäure Phenylalanin (TTC) verändert, wodurch eine im p3M/LMX1B Plasmid vorhandene *A/wN* I Restriktionsschnittstelle (*A/wN* I: 5' CAGCTGCTG 3') verloren ging (*A/wN* I durchgestrichen). Da zur Herstellung der Doppel-Mutante LMX1B-H54L-C95F noch die Aminosäure Histidin (CAC) zu Leucin (CTC) mutiert werden musste, entstand auch hier eine zusätzliche *Xho* I Restriktionsschnittstelle (*Xho* I). Bei LMX1B-A213P ging durch die Mutation der Aminosäure Alanin (GCC) in die Aminosäure Prolin (CCC) eine *Eco147* I (5' AGGCCT 3') Restriktionsschnittstelle verloren (*Eco147* I durchgestrichen).

Nachdem durch entsprechende Restriktionsverdau (s. Abb. 26) der Erfolg der ortsspezifischen Mutagenese überprüft wurde, wurde dies noch durch eine anschließende Sequenzierung verifiziert. Um die so generierten LMX1B Mutanten auf ihre Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung zu testen, wurden erneut *IL6* Promotorstudien mittels Dual-Luciferase Assays durchgeführt, wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben (s. Abb. 22). Um gewährleisten zu können, dass hierbei LMX1B trotz der jeweiligen Punktmutationen in den HtTA-1-Zellen noch vollständig und in vergleichbarer Menge synthetisiert wird, wurde dies vor jedem Dual-Luciferase Assay (s. 2.2.3.D) mittels Western-Blot-Analyse (s. 2.2.3 C) überprüft. Hierfür mussten zunächst die jeweiligen DNA-Mengen der verwendeten LMX1B-exprimierenden Plasmide bei der Transfektion etabliert werden, um mit ihnen bei der Western-Blot-Analyse gleiche Proteinspiegel zu erhalten. Es stellte sich heraus, dass die eingesetzte Plasmid-Menge von 0,1 µg des LMX1B-Expressionsplasmids p3M/LMX1B und die eingesetzte Plasmid-Menge der Mutanten von je 0,75 µg bei der Transfektion optimal ist. Mit je 20 µg der Proteinlysate wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Exemplarisch ist in nachfolgender Abbildung das Ergebnis einer solchen Analyse zu sehen:

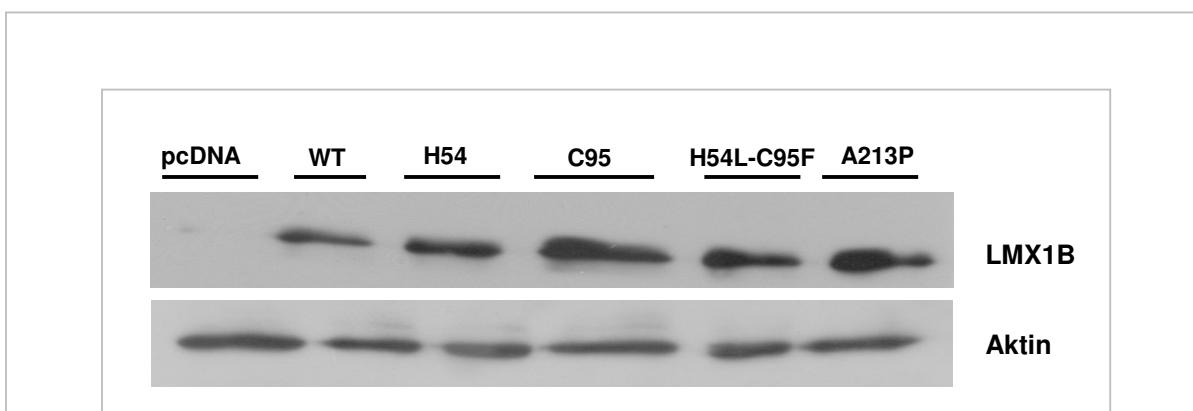


Abb. 27: Western-Blot-Analyse der Expression der LMX1B Mutanten. Je 1×10^5 HtTA-1-Zellen wurden in eine 24-Loch-Platte ausgesät und am nächsten Tag mit dem *Firefly*-Luciferase Reporter IL-6P.wt-Luc (0,2 µg), mit dem *Renilla*-Luciferase Reporter (15 ng) und entweder mit 0,1 µg des Wildtyp-LMX1B-Expressionsplasmids (p3M/LMX1B-WT), 0,75 µg der Mutante LMX1B-H54L (p3M/LMX1B-H54L), 0,75 µg der Mutante LMX1B-C95F (p3M/LMX1B-C95F), 0,75 µg der Doppel-Mutante LMX1B-H54L-C95F (p3M/LMX1B-H54L-C95F), 0,75 µg der Mutante LMX1B-A213P (p3M/LMX1B-A213P) oder 0,1 µg des Wildtyp-Vektors pcDNA3 transfiziert. Die Zellen wurden am nächsten Tag geerntet und lysiert (PLB-Puffer). Mit je 20 µg Gesamt-Protein wurde eine Western-Blot-Analyse mit dem monoklonalen anti-LMX1B-Antikörper 193-67 und einem HRP-gekoppelten anti-Maus IgG-Sekundärantikörper durchgeführt. Als interne Ladekontrolle diente ein Antikörper gegen α-Aktin. **Das LMX1B-Wildtyp-Protein und die LMX1B Mutanten werden in vergleichbarer Menge synthetisiert.**

Sowohl das LMX1B-Wildtyp-Protein als auch die Mutanten LMX1B-H54L, LMX1B-C95F, LMX1B-H54L-C95F und LMX1B-A213P werden 24 Stunden nach der Transfektion in

vergleichbaren Mengen produziert, was eine wichtige Voraussetzung für die Analyse der Ergebnisse der Transkriptionsfähigkeit der LMX1B Mutanten bei den Luciferase Assays ist. Die Ladekontrolle Aktin wurde verwendet, um überprüfen zu können, dass äquivalente Proteinmengen aufgetragen wurden, was in der Tat auf dem Röntgenfilm bestätigt werden kann. Nachdem die Synthese der LMX1B Mutanten in den Lysaten erfolgreich überprüft wurde, erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität unter Verwendung des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems von Promega (s. 2.2.3.D). Nachfolgend ist das Ergebnis aller Dual-Luciferase Assays zusammengefasst:

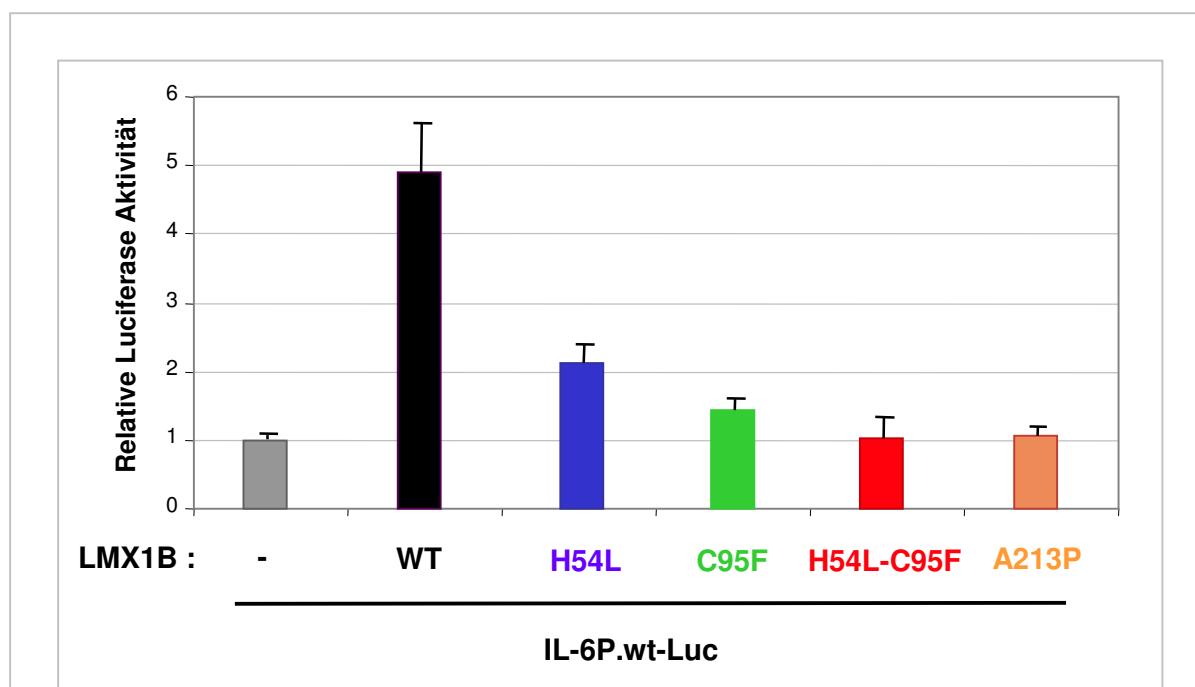


Abb. 28: Aktivierung des *IL6* Promotors durch die LMX1B-Mutanten. Je 1×10^5 HtTA-1-Zellen wurden in einer 24-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden sie jeweils mit dem *Firefly*-Luciferase Reporter Konstrukt IL-6P.wt-Luc (0,2 µg), dem *Renilla*-Luciferase Reporter (15 ng), 0,1 µg des Wildtyp-LMX1B-Expressionsvektors (LMX1B-WT), 0,75 µg der entsprechenden Expressionsvektoren der LMX1B-Mutanten (LMX1B-H54L, LMX1B-C95F, LMX1B-H54L-C95F oder LMX1B-A213P) oder 0,1 µg des Wildtyp-Vektors pcDNA3 (-) ko-transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen nach Herstellerangaben geerntet und lysiert (s. 2.2.4 B), wobei zunächst die jeweilige LMX1B-Expression in den Lysaten mittels Western-Blot-Analyse überprüft wurde, wie in Abb. 23 gezeigt. Anschließend wurden die Luciferaseaktivitäten der Lysate wie unter 2.2.3 D gemessen und die *Firefly*-Luciferase Werte mit den jeweils entsprechenden erhaltenen Werten der *Renilla*-Luciferase normalisiert. Davon wurde noch die als Basalaktivität angesehenen Werte des Promotor-losen Konstruktes Δ IL-6P-Luc abgezogen und die daraus erhaltenen Werte schließlich in Relation zur basalen Promotoraktivität (=1) der mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen dargestellt. Die Diagramme stellen den Mittelwert von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten dar, wobei jedes doppelt durchgeführt wurde. **Um den *IL6* Promotor aktivieren zu können, sind sowohl die LIM1- als auch die LIM2-Domäne von LMX1B unerlässlich.**

Wie bereits demonstriert werden konnte (s. Abb. 24), ist das Wildtyp-LMX1B-Protein in der Lage, in HtTA-1-Zellen die Transkription des *IL6* Promotors zu aktivieren (s. Abb. 26, LMX1B-WT). Bei Betrachtung der Mutante LMX1B-A213P, die eine Punktmutation in der DNA-bindenden Homöodomäne (HD) aufweist, ist festzustellen, dass diese LMX1B Mutante nicht mehr in der Lage ist, den *IL6* Promotor zu aktivieren (s. Abb. 28, LMX1B-A213P). Dadurch wird die Notwendigkeit einer funktionellen Homöodomäne von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren, wie es LMX1B ist, zur Transkriptionsaktivierung demonstriert. Zusätzlich spiegelt dieses Ergebnis auch bereits beschriebene Daten wieder. So zeigten die Ergebnisse der ChIP-Experimente, dass LMX1B den *IL6* Promotor binden kann, wobei in dieser Region sich auch mutmaßliche LMX1B-Bindungsmotive, sog. FLAT-Elemente befinden (Astrid Neumann, persönliche Mitteilung; s. Kapitel 3.6) [Rascle et al., 2009a]. Die Luciferase Assays konnten daraufhin zeigen, dass das FLAT-Element im *IL6* Promotor unerlässlich für dessen Aktivierung durch LMX1B ist (s. Kapitel 3.6) [Rascle et al., 2009a]. Diese beiden Ergebnisse sprechen dafür, dass die transkriptionelle Aktivierung des *IL6* Promotors durch LMX1B sehr wahrscheinlich über das FLAT-Element erfolgt [Rascle et al., 2009a].

Die Mutante LMX1B-H54L (LIM1) ist nur noch eingeschränkt fähig, den *IL-6* Promotor zu aktivieren. Eine etwa doppelt so hohe Aktivierung des Promotors, induziert durch diese Mutante, ist jedoch noch festzustellen (s. Abb. 28, LMX1B-H54L). Bei der LMX1B-C95F Mutante, bei der die LIM2-Domäne mutiert ist, scheint jedoch die Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung des *IL6* Promotors annähernd vollständig verloren gegangen zu sein. Hier ist noch etwa eine 1,5-fache Aktivierung zu sehen (s. Abb. 28, LMX1B-C95F). Aus diesen beiden Beobachtungen lässt sich schließen, dass beide LIM Domänen bei der transkriptionellen Aktivierung des *IL6* Promotors involviert sind, wobei die LIM2-Domäne eine wichtigere Rolle zu spielen scheint. Dies wird bestätigt durch die LMX1B Doppelmutante LMX1B-H54L-C95F, da diese überhaupt nicht mehr in der Lage ist, die Transkription des *IL6* Promotors aktivieren zu können (s. Abb. 28, LMX1B-H54L-C95F). Die Ergebnisse der LMX1B-LIM Domänen Mutanten stehen wiederum im Einklang mit dem Resultat der RT-qPCR-Analyse der Genexpression von HeLa-Zellen. Hier konnte gezeigt werden, dass für die durch LMX1B bewirkte Aktivierung der Expression von NF-κB-Zielgenen eine funktionelle LIM2-Domäne von LMX1B benötigt wird (s. Kapitel 3.2). Dass die LIM Domänen essentiell für die Funktion von LMX1B sind, wurde des Weiteren auch schon bei der durch LMX1B induzierten festgestellten Wachstumsinhibition bei HeLa-Zellen demonstriert. Hier wurde gezeigt, dass die LIM2-Domäne im Gegensatz zur LIM1-Domäne essentiell für den wachstumsinhibierenden Effekt von LMX1B ist [Neumann, 2009].

Zusammenfassend konnten die Luciferase Assays also zeigen, dass LMX1B durch Bindung an das FLAT-Element in der Lage ist, die Transkription von NF-κB-Zielgenen zu aktivieren. Dabei findet eine Kooperation zwischen LMX1B und dem Transkriptionsfaktor NF-κB statt, wobei LMX1B wahrscheinlich einen gemeinsamen Kofaktor rekrutieren muss, damit es zur Aktivierung der Transkription kommen kann. Dieser mutmaßliche Kofaktor könnte dann mit LMX1B über dessen LIM Domänen interagieren, wobei die LIM2-Domäne eine wichtigere Rolle zu spielen scheint.

Die im Ergebnisteil dargestellten Daten wurden mittlerweile zusammen mit weiteren Daten der Arbeitsgruppe veröffentlicht [Rascle et al., 2009a; siehe Kapitel 7 (Veröffentlichungen)].

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass LMX1B direkt die Transkription einer Anzahl von NF-κB-Zielgenen (z.B. *IL6* und *IL8*) reguliert und dass an diesem Effekt die NF-κB-Untereinheit p65 beteiligt ist. Dies stellt die erste Charakterisierung von *bona fide* LMX1B-Zielgenen dar, außerdem konnte zum ersten Mal eine Interaktion zwischen dem LMX1B- und NF-κB-Signalweg demonstriert werden. Die Signifikanz der Resultate und ein daraus resultierendes Modell der Regulierungsweise wird im folgenden diskutiert.

4.1 NF-κB ist direkt an der Geninduktion beteiligt

Zunächst wurde untersucht, ob an der durch LMX1B induzierten Genexpression der NF-κB-Zielgene der NF-κB-Signalweg involviert ist. Aus diesem Grund wurden spezifische Inhibitoren für NF-κB getestet, um die NF-κB-Aktivität zu hemmen. Neben einer Überprüfung einer NF-κB-Beteiligung an der Geninduktion durch LMX1B könnten dadurch zusätzlich Hinweise erhalten werden, an welcher Stelle LMX1B im NF-κB-Signaltransduktionsweg regulierend eingreift.

Mit den Pharmazeutika Oridonin, das die DNA-Bindeaktivität von NF-κB inhibiert [Ikezoe et al., 2005], und JSH-23, das zusätzlich dazu die Translokation in den Zellkern blockiert [Shin et al., 2004], wurde versucht, NF-κB zu hemmen. Mit Oridonin und JSH-23 konnte bereits erfolgreich eine Hemmung der NF-κB Aktivität demonstriert werden [Leung et al., 2005; Ikezoe et al., 2005; Shin et al., 2004], was bei den in dieser Arbeit verwendeten, nicht-induzierten, mit TNF-α stimulierten HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen nicht bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt die Effekte beider Inhibitoren auf die NF-κB-Aktivität auch noch nicht in HeLa-Zellen untersucht. Neben Zellspezifität ist ein anderes generelles Problem von vielen NF-κB-Inhibitoren, dass sie Stimulus-abhängig sein können [Epinant und Gilmore, 1999]. So wurde die Inhibierung der NF-κB-Aktivität durch JSH-23 bei mit LPS-stimulierten Zellen beobachtet [Shin et al., 2004], was auch erklären könnte, warum hier bei mit TNF-α-stimulierten Zellen keine Inhibierung von NF-κB festgestellt wird.

Ein anderes Prinzip, den Transkriptionsfaktor NF-κB zu hemmen, ist die Verwendung sogenannter Köder-Oligonukleotide. Diese doppelsträngigen Oligonukleotide enthalten eine Bindungsstelle, die mit hoher Affinität von NF-κB erkannt wird. Indem sie freie NF-κB-Moleküle binden, verhindern Köder-Oligonukleotide so deren Interaktion mit den Promotoren

der Zielgene [Tomita et al., 2003]. Verschiedene Gruppen konnten diese Methode bereits erfolgreich in HeLa-Zellen anwenden [Tomita et al., 1998]. Nach Transfektion der Köder-Oligonukleotide in HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen mit abgeschalteter LMX1B-Produktion konnten sie durch Fluoreszenzmikroskopie nicht eindeutig im Zellkern lokalisiert und bei der Genexpressions-Analyse konnte keine verringerte Expression der NF-κB-Zielgene detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte daran liegen, dass die Köder-Oligonukleotide in Vesikeln zurückgehalten werden, dadurch nicht durch die Kernporen in den Zellkern gelangen und deswegen nicht ihren inhibierenden Effekt ausüben. Eine korrekte subzelluläre Lokalisation der Oligonukleotide ist allerdings der limitierende Faktor ihrer Wirkweise, wie es für den Transkriptionsfaktor AP-1 demonstriert wurde [Bene et al., 2004]. Dies erklärt wahrscheinlich den negativen Befund bei den nicht-induzierten HtTA-1/myc-LMX1B-Zellen.

Mit der Verwendung des IκB α Superrepressors wurde ebenfalls versucht, die Aktivität von NF-κB zu hemmen. Der IκB α Superrepressor verhindert eine Aktivierung des NF-κB-Signalweges, da zwei Serinreste durch Alanine ausgetauscht sind, wodurch die Phosphorylierung des Proteins nicht mehr stattfinden kann. Folglich bleibt NF-κB inaktiv im Zytosol gebunden [Imuro et al., 1998]. Bei HeLa-Zellen, die kein LMX1B produzieren, zeigte die Genexpressions-Analyse jedoch keine zufriedenstellende Inhibition der NF-κB-Zielgene und folglich auch nicht der NF-κB-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Nachdem IκB α nicht gut an NF-κB-Dimere bindet, welche RelB beinhalten und überwiegend den alternativen NF-κB-Signalweg aktivieren, zählt der IκB α Superrepressor zu den Inhibitoren, die spezifisch den klassischen NF-κB-Signalweg hemmen [Gilmore und Herscovitch, 2006]. Bei den analysierten Genen, wie *IL6* und *IL8*, handelt es sich aber ebenfalls um Zielgene des klassischen NF-κB-Signalweges [Bonizzi und Karin, 2004], weshalb deren Expression eigentlich durch den IκB α Superrepressor inhibiert werden sollte. Möglicherweise ist eine zu niedrige Transfektionsrate und damit ein zu niedriger Spiegel des Superrepressors in der Zelle, ein Grund.

Eine andere Methode, mit der NF-κB inhibiert werden kann, ist die der RNA-Interferenz. Dabei werden kurze, doppelsträngige RNAs, sogenannte siRNAs ("small interfering RNAs") durch Transfektion in Zellen eingebracht. Dort fungieren diese als Leitmotiv für eine Nuklease, wodurch es zum Abbau von Zielgen kodierten mRNA kommt. Mehrere Gruppen konnten bereits erfolgreich mit dieser Technik die Expression des Gens für die p65-oder p50-Untereinheit von NF-κB hemmen [Lee et al., 2007; Guo et al., 2004; Chan et al., 2006]. Mit einer spezifisch gegen die p65-Untereinheit von NF-κB gerichteten siRNA konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl auf mRNA-Ebene (~80%) als auch auf Proteinebene ein NF-κB

p65-Knockdown in HeLa-Zellen, die kein LMX1B synthetisieren, erzielt werden. Somit war es möglich, eine NF-κB p65-Beteiligung in LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen zu untersuchen. Nachdem in diesen Zellen durch den p65-Knockdown eine signifikant verminderte Expression der NF-κB-Zielgene um ~50% festgestellt wurde, konnten wir demonstrieren, dass zumindest NF-κB p65 an der durch LMX1B induzierten Expression der NF-κB-Zielgene im Zellkern beteiligt ist. Andernfalls hätte der NF-κB-Knockdown in diesen Zellen keine Auswirkung auf die Expression dieser Gene. Dies ist zugleich in Übereinstimmung mit dem Befund, dass es sich um keine generelle Aktivierung des NF-κB-Signalweges handelt, sondern dass nur spezifische NF-κB-Zielgene durch LMX1B reguliert werden.

Eine weitere wichtige Beobachtung dieser Experimente war, dass in LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen die Expression der gleichen NF-κB-Zielgene durch den NF-κB-Knockdown inhibiert wurde, wie bei HeLa-Zellen mit abgeschalteter LMX1B-Synthese, die mit TNF-α stimuliert wurden. Nachdem TNF-α zu den Stimuli des klassischen p50/p65-abhängigen NF-κB-Signalweges zählt [Hayden und Gosh, 2004], führte dies zusätzlich zu der Annahme, dass es sich daher auch um das Heterodimer p50/p65 handelt, welches bei der LMX1B induzierten Genexpression der NF-κB-Zielgene beteiligt ist. Diese Behauptung lässt sich auch im Einklang mit der Tatsache bringen, dass es sich bei diesem Heterodimer um das in den meisten Zelltypen am häufigsten vorkommende NF-κB-Dimer handelt [Hoffmann et al., 2006]. Genauso wie in der vorliegenden Arbeit eine NF-κB p65-Beteiligung gezeigt werden konnte, könnte mit einer spezifisch gegen die NF-κB p50-Untereinheit gerichteten siRNA eine NF-κB p50-Beteiligung untersucht werden. Dass in dieser Arbeit der Fokus auf der Untersuchung der Beteiligung des klassischen p50/p65 NF-κB-Signalweges lag und nicht auf der des alternativen p52/RelB NF-κB-Signalweges, begründete sich in einem weiteren Befund.

Bei den Proteinen, die durch LMX1B induziert werden, handelt es sich hauptsächlich um proentzündliche Zytokine und Chemokine wie IL-6 und IL-8 und diese gelten als typische Zielgene des klassischen p50/p65-abhängigen NF-κB-Signalwegs [Bonizzi und Karin, 2004]. Einige Stimuli des klassischen NF-κB-Signalwegs können aber auch durch Aktivierung der NF-κB-induzierenden Kinase NIK und IKK α den alternativen NF-κB-Signalweg induzieren [Senftleben et al., 2001]. Bei diesem Signalweg, der wahrscheinlich in sekundären lymphatischen Organen eine Rolle spielt, wird NFκB2/p100 durch den IKK α -Komplex phosphoryliert, wodurch p100 zu p52 prozessiert werden kann. Das NF-κB-Dimer, das sich bei diesem Signalweg meist aus p52 und RelB zusammensetzt, kann in den Zellkern wandern und die Transkription seiner Zielgene steuern [Bonizzi und Karin, 2004]. So führt zum Beispiel eine Stimulierung des Lymphotoxin-β-Rezeptors in murinen embryonalen

Fibroblasten zur Aktivierung des klassischen und des alternativen NF-κB-Signalweges [Dejardin et al., 2002]. Generell wird davon ausgegangen, dass einige Stimuli immer zwei Wellen an aktivierte NF-κB-Komplexe generieren, hervorgerufen durch die sequentielle Aktivierung des klassischen NF-κB-Signalwegs und einer darauf folgenden Aktivierung des alternativen NF-κB-Signalwegs [Dejardin, 2006]. Somit wäre auch vorstellbar, dass NF-κB p65 als Homodimer oder als Heterodimer auch mit einem der anderen Mitglieder der NF-κB/Rel-Familie, RelB, c-Rel oder p52 in den HeLa-Zellen vorliegt. Folgendes Ergebnis der siRNA-Experimente könnte sich daraus begründen. In HeLa-Zellen, die kein LMX1B produzieren, konnte ein p65-Knockdown von etwa 70% detektiert werden. Sowohl bei mit TNF-α-stimulierten HeLa-Zellen mit abgeschalteter LMX1B-Synthese als auch bei LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen, die nicht mit TNF-α stimuliert wurden, wurde jedoch ein Knockdown der NF-κB-Zielgene von nur etwa 50% festgestellt. Eigentlich würde man jedoch einen höheren Knockdown der NF-κB-Zielgene erwarten. Möglicherweise bildet NF-κB p65 bei der Geninduktion der NF-κB-Zielgene durch LMX1B nicht nur mit p50, sondern mit anderen NF-κB-Untereinheiten wie zum Beispiel mit p52 ein Dimer. Es könnten also neben p50 auch andere NF-κB-Untereinheiten an der Regulierung der NF-κB-Zielgene durch LMX1B beteiligt sein. Um dies zu überprüfen, sind bei HeLa-Zellen mit ab- bzw. angeschalteter LMX1B-Produktion Chromatin-Immunpräzipitations-Experimente (ChIP) [Kuo und Allis, 1999] geplant (Anne Raschle und Astrid Neumann, in Bearbeitung). Bei dieser Methode kann mit der Verwendung eines spezifischen Antikörpers eine Bindung von NF-κB p50 (oder von anderen Untereinheiten, wie z.B. NF-κB p52) an die NF-κB-Zielgen-DNA verifiziert werden.

Der Befund, dass eine Inhibierung der NF-κB-Aktivität zugleich in einer Inhibierung der durch LMX1B induzierten Expression der NF-κB-Zielgene resultiert, könnte bedeuten, dass eine funktionelle Interaktion zwischen beiden Transkriptionsfaktoren im Zellkern stattfindet. In der Tat konnten wir eine funktionelle Kooperation auf Transkriptionsebene zwischen LMX1B und NF-κB feststellen. Ein funktionelles Zusammenspiel zwischen LMX1B und NF-κB bei der Transkriptionsaktivierung von NF-κB-Zielgenen ist sehr gut vorstellbar. Sowohl für LMX1B als auch für NF-κB sind funktionelle Kooperationen mit anderen Interaktionspartnern gezeigt worden. Die Interaktion des Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktors E47/Pan1 mit der LIM2-Domäne von LMX1B aktiviert zum Beispiel einen Teil des Ratten-Insulinpromotors. LMX1B bindet dabei an FLAT-Sequenzen des Insulinpromotors und tritt durch die LIM2-Domäne mit E47/Pan1 in Kontakt, welches an benachbarte Sequenzen (FLAT-Sequenzen) des Promotors bindet [Johnson 1997; German 1992]. Für NF-κB p50 als auch für NF-κB p65 konnte wiederum *in vitro* eine funktionelle Kooperation mit dem Homöodomäne-

Transkriptionsfaktor HOXB7 bei dessen Transkriptionsaktivierung in einem Luciferase Assay nachgewiesen werden [Chariot et al., 1999]. Ein weiteres Beispiel ist die Aktivierung der HIV-1 Transkription *in vitro*, die durch das funktionelle Zusammenspiel zwischen NF-κB p65 und dem Transkriptionsfaktor Sp1 stärker stimuliert wird als durch NF-κB p65 allein [Pazin et al., 1995].

Nachdem eine Beteiligung von NF-κB demonstriert werden konnte und es sich dabei sehr wahrscheinlich um einen nukleären Effekt von LMX1B auf die NF-κB-Aktivität handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies durch posttranskriptionale Modifikationen von NF-κB durch LMX1B hervorgerufen wird. Die transkriptionelle Aktivität von NF-κB im Zellkern kann zum Beispiel durch Phosphorylierungen oder Acetylierungen reguliert werden, wobei vor allem Modifikationen der p65-Untereinheit von NF-κB bekannt sind [Perkins und Gilmore, 2006]. So konnte gezeigt werden, dass die p65-Untereinheit von NF-κB von einer Vielzahl von Kinasen, wie zum Beispiel durch die MSK1-Kinase (*mitogen- and stress-activated protein kinase*) im Zellkern phosphoryliert wird, wodurch die Fähigkeit der Transkriptionsaktivierung von NF-κB gesteigert wird [Übersicht bei Chen und Green, 2004]. Die nukleäre Aktivität von NF-κB kann auch durch erhöhte Acetylierung oder verminderte Deacetylierung von NF-κB positiv beeinflusst werden [Übersicht in Chen und Greene, 2003]. Hierbei steht ebenfalls die p65-Untereinheit von NF-κB im Fokus dieser regulierenden Modifikationen. So wird p65 zum Beispiel durch die Koaktivatoren p300 und CBP acetyliert, wodurch die NF-κB-Aktivität im Kern gesteigert wird, während die durch HDAC3 vermittelte Deacetylierung der p65-Untereinheit die Aktivität von NF-κB verringert [Übersicht bei Chen und Green, 2004]. LMX1B könnte positiven Einfluss auf einen dieser Regulationsmechanismen nehmen und somit die Transkriptionsaktivität von NF-κB steigern. Dieser Regulationsmechanismus wurde in der vorliegenden Arbeit zwar nicht untersucht, jedoch könnte sich daraus resultierend die beobachtete gesteigerte NF-κB p65-Bindung an die Zielgen-DNA begründen (Astrid Neumann, persönliche Mitteilung; Raschle et al., 2009a).

4.2 LMX1B ist direkt an der Geninduktion beteiligt

Mit Hilfe des induzierbaren Tet-off-Expressionssystems [Gossen et al., 1992] konnte demonstriert werden, dass eine LMX1B-Expression zur Induktion von NF-κB-Zielgenen führt. Bevor die diesen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen untersucht wurden, ist die Spezifität dieses Effekts überprüft worden. Wir zeigten, dass die Induktion der NF-κB-Zielgene weder das Resultat der Dozyzyklin-Behandlung noch einer Protein-Überexpression ist. Die Verwendung einer LMX1B-Mutante konnte bestätigen, dass der Effekt spezifisch für

LMX1B ist, da eine Punktmutation in der LIM2-Domäne ausreicht, um die Genaktivierung der NF-κB-Zielgene zu verhindern.

LMX1B übt keinen Einfluss auf die Translokation von NF-κB p65 in den Zellkern aus, was darauf hinwies, dass die Aktivierung der NF-κB-Zielgene durch LMX1B im Zellkern erfolgt. Es stellte sich die Frage, ob LMX1B möglicherweise direkt durch Bindung an die Zielgen-DNA deren Expression induziert. Bei diesem Modell bindet LMX1B in seiner Funktion als LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor mit seiner Homöodomäne an regulatorische Sequenzen der NF-κB-Zielgene und aktiviert damit deren Expression. Bei den regulatorischen Sequenzen müsste es sich um adenin- und thyminreiche FLAT-Elemente innerhalb des Promotors des NF-κB-Zielgens handeln, da bereits in EMSAs („electrophoretic mobility shift assays“) eine Bindung von LMX1B über die Homöodomäne an diese FLAT-Elemente (FLAT-E: TAATTA; FLAT-F: TTAATA) demonstriert werden konnte [German et al., 1992; Dreyer et al., 1998].

Mit der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) [Kuo und Allis, 1999] von HeLa-Zellen mit ab- bzw. angeschalteter LMX1B-Produktion wurde eine Bindung von LMX1B an NF-κB-Zielgen-DNA überprüft (Astrid Neumann, persönliche Mitteilung; Rasclé et al., 2009a). In der Tat konnten diese Experimente eine Bindung von LMX1B in der Nachbarschaft des gut charakterisierten, konservierten NF-κB-Bindungsmotivs innerhalb der humanen Promotoren der NF-κB-Zielgene *IL6* und *IL8* *in vivo* zeigen. Da Promotor-Sequenz-Analysen die Existenz eines, bzw. mehrerer FLAT-Elemente unmittelbar in der Nähe des NF-κB-Bindungsmotivs identifizierten (Astrid Neumann, persönliche Mitteilung; Rasclé et al., 2009a), wurde zugleich die vorangegangene Vermutung bestätigt, dass die LMX1B-Bindung an die NF-κB-Zielgen-DNA über diese FLAT-Elemente innerhalb des Promotors erfolgen könnte. Darüber hinaus wurde, wie bereits erwähnt, festgestellt, dass eine LMX1B-Bindung an den Promotor zugleich mit einer Zunahme an Bindung von NF-κB p65 an das in direkter Nähe befindliche NF-κB-Bindungsmotiv korreliert (Astrid Neumann, persönliche Mitteilung; Rasclé et al., 2009a). Diese Beobachtung untermauerte erneut, dass NF-κB p65 bei der durch LMX1B induzierten Genexpression benötigt wird und, dass hierbei eine funktionelle Kooperation zwischen beiden Transkriptionsfaktoren auf Chromatinebene stattfindet.

Zwei Fragen ergaben sich aus der LMX1B-Bindung *in vivo* an die Promotoren von *IL6* und *IL8*. Erstens, korreliert die LMX1B-Bindung an die Promotoren der betroffenen NF-κB-Zielgene auch mit transkriptioneller Aktivierung dieser Gene durch LMX1B? Dies ist eine durchaus berechtigte Frage, denn so ist zwar eine Bindung eines Transkriptionsfaktors an die Zielgen-DNA Voraussetzung, aber nicht zwingend ausreichend für eine Genaktivierung.

So kann die Aktivität des Promotors von Interaktionen mit spezifischen Kofaktoren abhängig sein. Dies konnte am Beispiel des Glukokortikoidrezeptors gezeigt werden, der seinen inhibitorischen Effekt auf bestimmte inflammatorische Gene durch Interaktionen mit RelA-Dimeren und IRF-3 ausübt [Ogawa et al., 2005; De Bosscher et al., 2006]. Die zweite Frage die gestellt werden musste war, ob tatsächlich über die FLAT-Elemente, die durch die Promotor-Sequenz-Analysen identifiziert wurden, die LMX1B-Bindung erfolgt.

Mit Hilfe von Reporter-Analysen konnte festgestellt werden, dass LMX1B in der Tat die Transkription des humanen *IL6* Promotors aktivieren kann. Es wurde zwar bereits gezeigt, dass LMX1B die Transkription von Genen aktivieren kann, allerdings handelte es sich stets um Aktivierungen von Luciferase-Reporter-Konstrukten, bei denen mehrere Kopien des FLAT-Elements an einen Minimal-Promotor gekoppelt waren [Miner et al., 2002; German et al., 1992; Morello et al., 2001]. Für LMX1B wurde jedoch in dieser Arbeit zum ersten Mal die Aktivierung der Transkription von einem nativen Promotor, dem humanen *IL6* Promotor, demonstriert. Bei dieser Transkriptionsaktivierung von *IL6* spielt das FLAT-Element innerhalb des Promotors eine essentielle Rolle, da bei der Analyse des Reporter-Konstruktes, bei dem das FLAT-Element innerhalb des Promotors mutiert ist, nur noch eine stark verminderte transkriptionelle Aktivierung des *IL6* Promotors festgestellt wird. Somit konnten die Luciferase-Assays, zusätzlich zu den Chromatin-Immunpräzipitations-(ChIP)-Experimenten, einen weiteren Beweis liefern, dass die Transkriptionsaktivierung von *IL6* durch LMX1B über die Bindung von LMX1B an das FLAT-Element innerhalb des *IL6* Promotors erfolgt. Dies steht im Einklang mit der Vermutung, dass die Regulierung der Expression der mutmaßlichen LMX1B-Zielgene COL4A3, COL4A4, NPHS2 sowie CD2AP ebenfalls durch die Bindung von LMX1B an FLAT-Elemente im Promotor oder Enhancer dieser Gene erfolgt [Morello et al., 2001; Miner et al., 2002; Rohr et al., 2002].

Um detaillierter den Mechanismus charakterisieren zu können, durch den LMX1B die Transkription der NF-κB-Zielgene aktiviert, wurden zusätzlich verschiedene LMX1B-Mutanten im Luciferase Assay auf ihre Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung des *IL6* Promotors getestet. Diese Punktmutationen in den funktionellen Domänen von LMX1B wurden alle bei Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom identifiziert und führen sehr wahrscheinlich zum Funktionsverlust der entsprechenden Domäne [McIntosh et al., 1998; Bongers et al., 2002; Vollrath et al., 1998].

Die verwendete LMX1B-A213P-Mutante, welche eine Punktmutation in der DNA-bindenden Homöodomäne aufweist, ist nicht in der Lage, die Transkription des *IL6* Promotors zu aktivieren. Dies liegt daran, dass LMX1B aufgrund dieser Mutation nicht mehr fähig ist, über

die Homöodomäne an den Promotor von *IL6* zu binden, wodurch die Transkriptionsaktivierung von *IL6* ausbleibt. Dies bestätigt LMX1B in seiner Funktion als DNA-bindenden LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor [Gehring et al., 1994] und reflektiert zugleich die *in vivo* gezeigte Bindung von LMX1B an den *IL6* Promotor bei den ChIP-Experimenten (Astrid Neumann, persönliche Mitteilung; Raschle et al., 2009a). Sowohl die ChIP-Experimente als auch die Luciferase Assays deuten darauf hin, dass die Homöodomäne von LMX1B an den *IL6* Promotor dabei an das durch die Promotor-Sequenz-Analysen identifizierte FLAT-Element innerhalb des *IL6* Promotors bindet.

Bei den LIM Domänen handelt es sich um Protein-Protein-Interaktionsdomänen [Dawid et al., 1995], über die LMX1B mit anderen transkriptionellen Aktivatoren oder Repressoren wechselwirken kann. Die LMX1B-Mutanten, bei denen entweder eine Punktmutation in der LIM1-Domäne oder in der LIM2-Domäne vorliegt, aktivierten die Transkription des *IL6* Promotors nur noch vermindert im Vergleich zum Wildtyp-LMX1B. Somit konnten wir demonstrieren, dass sowohl die LIM1- als auch die LIM2-Domäne essentiell für LMX1B bei der Aktivierung der Transkription sind. Dies bestätigt die in der Literatur beschriebene Wichtigkeit der Funktionalität der LIM Domänen bei Transkriptionsfaktoren [Bach et al., 2000]. Dabei scheint die LIM2-Domäne eine wichtigere Rolle als die LIM1-Domäne zu spielen, da LMX1B mit einer Mutation in der LIM2-Domäne annähernd vollständig die Fähigkeit verloren hat, die Transkription des *IL6* Promotors zu aktivieren. Die Mutation zerstört die Zinkfinger-Struktur in der LIM2 Domäne, wodurch LMX1B sehr wahrscheinlich die Fähigkeit mit anderen Proteinen wechselwirken zu können, verloren hat [Bongers et al., 2002]. Das heißt zugleich, dass eine Interaktion von LMX1B mit anderen Proteinen unabdingbar für die *IL6*-Transkriptionsaktivierung ist. Die größere funktionelle Signifikanz der LIM2-Domäne steht im Einklang mit von Johnson et al (1997) gemachten Befunden. Im Hefe-Zwei-Hybrid-System konnte gezeigt werden, dass vor allem die LIM2-Domäne sowohl bei Lmx1.1 als auch bei Lmx1.2 für die Interaktion mit E47/Pan-1 verantwortlich ist. Der zweite Befund besteht darin, dass es die LIM2-Domäne von Lmx1.1 ist, die eine transkriptionelle Synergie mit E47/Pan-1 bei der Aktivierung eines an dem Insulin-Minienhancer gekoppelten Reportergens vermittelt.

Unsere Feststellung, dass für die Induktion von NF-κB-Zielgenen die LIM2-Domäne von LMX1B essentiell ist, spiegelt sich ebenfalls in diesen Beobachtungen wieder. Auch bei der durch LMX1B bewirkten Wachstumsinhibition von HeLa-Zellen [Prestel, 2003] konnte die Bedeutung der LIM Domänen demonstriert werden. Bei diesem durch LMX1B ausgelösten Effekt ist allerdings ausschließlich die LIM2-Domäne von LMX1B essentiell [Neumann, 2009]. Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion für das IFN-β kodierende NF-κB-Zielgen *IFNB1* wiederum eine verstärkte Expression von Interferon-stimulierten Genen zur

Folge hat [Neumann, 2009]. Nachdem Interferon-stimulierten Genen proliferationshemmende Eigenschaften zugesprochen werden [Paucker et al., 1962], wurde vermutet, dass die Induktion von IFN β durch LMX1B eine der Komponenten des Mechanismus ist, der zur Wachstumsinhibition in HeLa-Zellen führt [Neumann, 2009]. In der vorliegenden Arbeit konnte exemplarisch für das NF- κ B-Zielgen *IL6* gezeigt werden, dass für dessen Transkriptionsaktivierung, sowohl die LIM1- als auch die LIM2-Domäne von LMX1B essentiell sind. Da *IFNB1*, neben *IL6*, eines der NF- κ B-Zielgene ist, dessen Expression in HeLa-Zellen durch LMX1B induziert wird, ist davon auszugehen, dass *IFNB1* durch die gleichen molekularen Mechanismen reguliert wird wie *IL6*. Folglich müssten bei der Regulierung von *IFNB1* sowohl die LIM1-Domäne als auch die LIM2-Domäne von LMX1B beteiligt sein. Daher scheint es eher unwahrscheinlich zu sein, dass diejenigen NF- κ B-Zielgene und ISGs, deren Expression durch LMX1B induziert wird, am wachstumshemmenden Mechanismus von LMX1B beteiligt sind. Also hemmt LMX1B das Wachstum unabhängig von der Induktion der NF- κ B-Zielgene und ISGs. Dass es nicht doch eine Verbindung bei den jeweiligen Regulationsmechanismen, möglicherweise an anderer Stelle gibt, kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden. Zunächst müsste auch überprüft werden, ob in der Tat die gleichen Regulationsmechanismen von *IL6*, an denen beide LIM Domänen von LMX1B involviert sind, tatsächlich auch auf *IFNB1* zutreffen.

4.3 An der Regulierung der Geninduktion durch LMX1B ist ein gemeinsamer Kofaktor von LMX1B und NF- κ B beteiligt

Folgende zwei Befunde der funktionellen Promotor-Analysen lieferten eine weitere wichtige Erkenntnis zur Aufklärung der molekularen Mechanismen, die zur Transkriptionsaktivierung von *IL6* durch LMX1B in HeLa-Zellen führen. Erstens, in Gegenwart eines NF- κ B-Überschusses im Zellkern kann LMX1B nur noch vermindert die Transkription des *IL6* Promoters aktivieren, wenn dieser ein mutiertes NF- κ B-Bindungsmotiv besitzt. Zweitens, in Gegenwart eines LMX1B-Überschusses im Zellkern kann wiederum NF- κ B die Transkription des *IL6* Promoters nur noch stark verringert aktivieren, wenn dieser kein FLAT-Element enthält.

Eine Hypothese für diesen reziproken Effekt ist, dass es für die Transkriptionsaktivierung des *IL6* Promoters zu einer direkten Interaktion zwischen LMX1B und NF- κ B kommen muss. Dieses Modell wäre durchaus denkbar, da bereits für viele andere Proteine auch eine direkte Bindung an NF- κ B im Zellkern nachgewiesen werden konnte. Ein Beispiel hierfür ist die Bindung von nTRIP6 an die NF- κ B-Untereinheit p65, wobei nTRIP6 als Koaktivator für NF-

κ B zu agieren scheint [Kassel et al., 2004]. Bei nTRIP6 handelt es sich um eine nukleäre Isoform des LIM-Proteins TRIP6, welches der Zyxin-Familie angehört und als solches C-terminal drei LIM-Domänen besitzt [Yi und Beckerle, 1998]. Es konnte gezeigt werden, dass in HeLa-Zellen die Interaktion von nTRIP6 an p65 sowohl über die erste als auch über die zweite der drei LIM-Domänen oder auch über eine Kombination der beiden erfolgen kann. Diese Art und Weise der nukleären Interaktion ist auch auf diejenige von LMX1B und NF- κ B übertragbar. LMX1B könnte über eine oder beide seiner proteinbindenden LIM Domänen an p65 im Zellkern binden und dadurch die NF- κ B-Aktivität positiv regulieren.

Die andere Hypothese, die die beobachtete reziproke Inhibierung bei den Luciferase Assays erklären kann, ist, dass LMX1B und NF- κ B für die Aktivierung der Transkription des *IL6* Promotors einen gemeinsamen Koaktivator benötigen. Dieser Koaktivator wird durch die Interaktion mit dem im Überschuss vorhandenem Protein im Zellkern abgefangen und kann somit nicht mit dem jeweiligen anderen Protein am Promotor interagieren. Dies resultiert in der beobachteten verminderten Transkriptionsaktivierung von *IL6*. Nachdem gezeigt wurde, dass intakte DNA-Bindesequenzen für eine Transkriptionsaktivierung durch LMX1B notwendig sind, ist die Theorie eines gemeinsamen Kofaktors wohl die wahrscheinlichere. So könnte der NF- κ B-Repressor RAI (RelA-assoziierter Inhibitor), auch als iASPP oder Nkip1 bekannt, zum Beispiel als Kofaktor fungieren. Hierbei handelt es sich um ein nukleäres Protein, welches stark in Plazenta, Herz und Prostata und gering in der Niere exprimiert wird. RAI bindet *in vitro* und *in vivo* an die p65-Untereinheit von NF- κ B, und nach Ko-Transfektion von RAI und p65 in HEK293-Zellen konnte eine Inhibierung der DNA-Bindeaktivität von p65 festgestellt werden [Yang et al., 1999]. Nachdem im Hefe-Zwei-Hybrid-System RAI als möglicher Interaktionspartner von LMX1B identifiziert wurde [Rohr, Dissertation in Vorbereitung], wäre es sehr gut vorstellbar, dass RAI als Adaptorprotein zwischen LMX1B und NF- κ B agiert. LMX1B würde in LMX1B produzierenden HeLa-Zellen über die LIM Domänen an RAI binden, welches als Adaptorprotein mit NF- κ B einen Komplex bilden kann. Dieser Komplex aktiviert dann die Transkription der NF- κ B-Zielgene. Auch nTRIP6 könnte möglicherweise als Adaptorprotein zwischen LMX1B und NF- κ B wirken. Zusätzlich zu der demonstrierten nukleären Interaktion von nTRIP6 an NF- κ B p65 wird von Kassel et al (2004) vermutet, dass nTRIP6 als Adaptor oder Koaktivator eine molekulare Plattform für andere nukleäre Transkriptionsfaktoren darstellt. Sie zeigten, dass nTRIP6 über seine LIM-Domänen den reprimierenden Glukokortikoidrezeptor zu dem am Promotor gebundenen nTRIP6/NF- κ B p65-Komplex rekrutiert und dadurch der Glukokortikoidrezeptor seinen repressorischen Effekt ausübt. Kassel et al (2004) glauben des Weiteren, dass in HeLa-Zellen konstitutiv ein Komplex aus nTRIP6 und NF- κ B p65 im Zellkern vorliegt. Vielleicht interagiert LMX1B über

seine LIM Domänen mit nTRIP6, welches an NF-κB p65 im Zellkern gebunden vorliegt. Somit würde sich aus diesen drei Proteinen ein Komplex am Promotor des NF-κB-Zielgens bilden, nachdem LMX1B und NF-κB an ihr jeweiliges Bindungsmotiv dort gebunden haben. Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde sowohl die potentielle Interaktion zwischen LMX1B und NF-κB als auch die mögliche Interaktion beider Proteine mit RAI als Adaptorprotein durch Ko-Immunpräzipitation getestet. Es konnte jedoch keine direkte Wechselwirkung zwischen LMX1B und NF-κB in Lösung detektiert werden, außerdem scheint RAI als möglicher Kofaktor auszuscheiden, da auch kein Komplex aus allen drei Proteinen in Lösung detektiert werden konnte [Heining, 2007]. Zusätzlich führte dieser Befund zusammen mit den Ergebnissen der ChIP-Experimente zu der Annahme, dass sich das Zusammenspiel zwischen LMX1B und NF-κB bei der Transkriptionsaktivierung der NF-κB-Zielgene auf Chromatin-Ebene ereignet. Dies wäre auch mit der Tatsache zu vereinbaren, dass spezifische NF-κB-Zielgene reguliert werden und es sich nicht um eine generelle Aktivierung des NF-κB-Signalweges handelt. Die in dieser Arbeit aufgestellte Mutmaßung eines gemeinsamen Kofaktors von LMX1B und NF-κB, der für die Aktivierung der Transkription des *IL6* Promotors benötigt wird, könnte zugleich den Komplex aus LMX1B und NF-κB an Chromatin stabilisieren. Ein Komplex höherer Ordnung würde auch erklären, dass bei den ChIP-Experimenten eine LMX1B-Bindung mit einer Zunahme an gebundenem NF-κB p65 an die DNA korreliert (Astrid Neumann, persönliche Mitteilung; Rascle et al., 2009a). Die gesteigerte NF-κB p65-Bindung an den *IL6* Promotor ist wiederum zusammen mit LMX1B verantwortlich für die erhöhte Transkription des NF-κB-Zielgens [Bosisio et al., 2006].

Ein gemeinsamer Kofaktor von LMX1B und NF-κB scheint jedoch nicht die einzige Komponente zu sein, die an der Kooperation beteiligt ist. Mit den Reporter Konstrukten konnte der im Kontext von Chromatin festgestellte synergistische Effekt nicht reproduziert werden. Es wurde lediglich ein additiver Effekt zwischen LMX1B und NF-κB auf die Aktivierung des *IL6* Promotors beobachtet. Dies kann daran liegen, dass bei dem Luciferase Assay Chromatin-Komponenten bzw. generell die Chromatin-Organisation fehlt, die LMX1B und NF-κB für den stärkeren, kooperativen Effekt benötigen. Zum Beispiel unterstützt das Chromatin-Strukturprotein HMG die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA, wodurch die Kooperation von Transkriptionsfaktoren gewährleistet wird [Panne et al., 2004]. Chromatin-modifizierende Enzyme wie die Histonacetyltransferasen induzieren eine Acetylierung der Lysinreste in Histonen und bewirken somit eine nukleosomale Umstrukturierung [Sterner und Berger 2000]. Dies bewirkt, dass Chromatin besser zugänglich für alle benötigten Komponenten wie die generellen Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase II ist. Für die p65-Untereinheit von NF-κB konnte *in vitro* an Chromatin-

Templates gezeigt werden, dass sie in Kooperation mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 die Transkription von HIV-1 aktivieren kann. Dass der synergistische Effekt nur im Kontext von Chromatin festgestellt wird, wird darauf zurückgeführt, dass Sp1 und NF-κB eine Änderung in der Chromatinstruktur am Promotor für den integrierten Provirus HIV-1 induzieren, indem sie die Position der Nukleosomen verändern und daraufhin NF-κB p65 die basale Transkriptionsmaschinerie an das Chromatin rekrutiert [Pazin et al., 1995]. Eine Umstrukturierung des Chromatins, induziert durch die gesteigerte Bindung von NF-κB an den Promotor, könnte somit den kooperativen Effekt zwischen LMX1B und NF-κB in HeLa-Zellen erklären. Zugleich könnte es der Grund für die fehlende Kooperation bei den Luciferase Assays sein. Unterschiede in der Chromatinstruktur am Promotor des jeweiligen Gens könnten generell auch die Tatsache begründen, dass nicht alle, sondern nur ein Teil der NF-κB-Zielgene durch LMX1B reguliert werden.

4.4 Modell der Regulierung der Geninduktion durch LMX1B

Somit lässt sich anhand der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse folgendes Modell der Regulation von NF-κB-Zielgenen durch LMX1B in HeLa-Zellen aufstellen (s. Abb. 29). LMX1B bindet an das FLAT-Element innerhalb des Promoters von NF-κB-Zielgenen, wie zum Beispiel *IL6*. Dies führt zugleich zu einer gesteigerten Bindung von NF-κB p65 an das NF-κB-Bindungsmotiv, welches sich in unmittelbarer Nähe zum FLAT-Element befindet. Die Ursache dafür ist die Bildung eines stabilisierenden Protein-Chromatin-Komplexes, der durch die Rekrutierung eines gemeinsamen Koaktivators entsteht. Daher bewirkt in LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen eine Aktivierung von NF-κB durch TNF-α eine gesteigerte Transkription des NF-κB-Zielgens *IL6*. Wird hingegen die Bindung von LMX1B oder die von NF-κB durch ein nicht vorhandenes oder mutiertes Bindungsmotiv an die DNA verhindert, führt dies zu einer verringerten Aktivierung der Transkription des NF-κB-Zielgens *IL6* bei mit TNF-α stimulierten HeLa-Zellen. Dies liegt daran, dass der Koaktivator an das im Kern im Überschuss vorhandene LMX1B oder NF-κB bindet, und dieser somit daran gehindert wird, mit dem jeweils anderen Protein an der DNA wechselwirken zu können. Zusätzlich zu dem gemeinsamen Kofaktor von LMX1B und NF-κB sind sehr wahrscheinlich Chromatin-Komponenten an dem kooperativen Effekt, den beide Transkriptionsfaktoren ausüben, beteiligt.

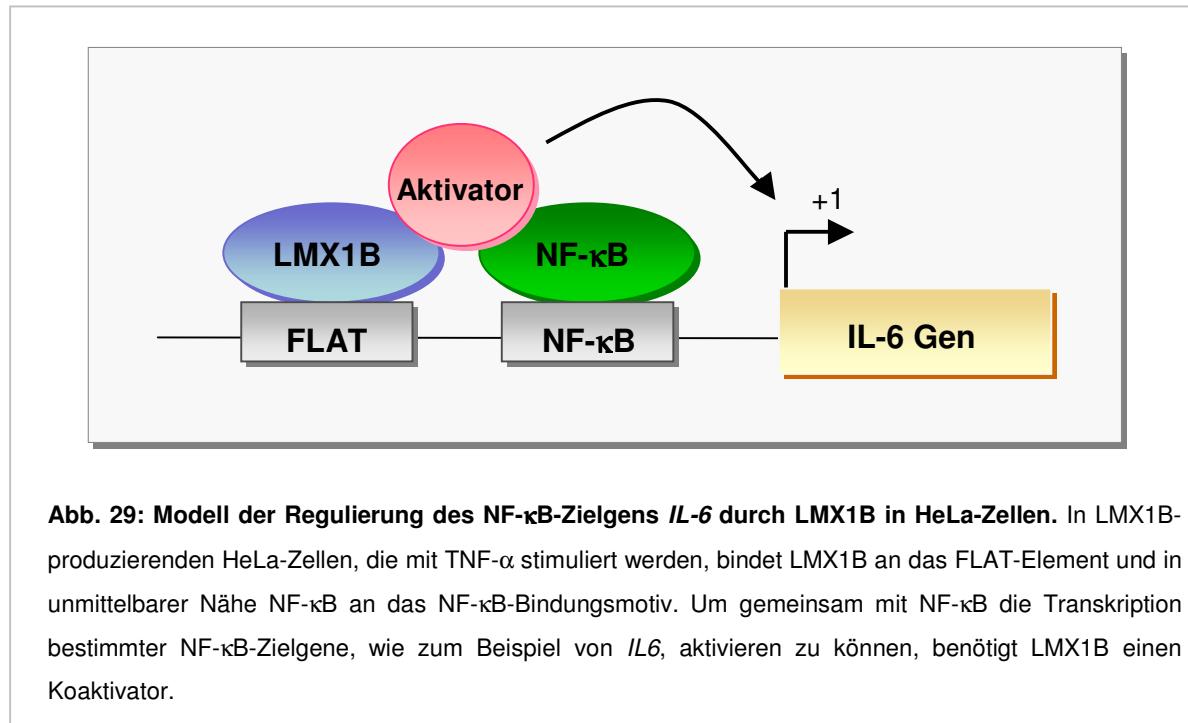


Abb. 29: Modell der Regulierung des NF-κB-Zielgens *IL-6* durch LMX1B in HeLa-Zellen. In LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen, die mit TNF- α stimuliert werden, bindet LMX1B an das FLAT-Element und in unmittelbarer Nähe NF-κB an das NF-κB-Bindungsmotiv. Um gemeinsam mit NF-κB die Transkription bestimmter NF-κB-Zielgene, wie zum Beispiel von *IL6*, aktivieren zu können, benötigt LMX1B einen Koaktivator.

Zusätzliche Befunde deuten darauf hin, dass es sich bei der Regulierung der NF-κB-Zielgene durch LMX1B um ein zellspezifisches, bzw. Gewebe-spezifisches Geschehen handelt, an dem zellspezifische Faktoren beteiligt sind. Die Feststellung, dass in Nieren von *Lmx1b*-Knockout-Mäusen für die gleichen Gene wie bei den HeLa-Zellen eine Hochregulierung ihrer Expression festgestellt wurde [Raschle et al., 2009a], weist LMX1B in der Niere somit eher eine repressorische Funktion als Transkriptionsfaktor zu. Dies mag zunächst im Gegensatz zu der gezeigten aktivierenden Funktion von LMX1B in HeLa-Zellen erscheinen. Doch genau durch das gerade beschriebene Modell der Regulierung von NF-κB-Zielgenen in HeLa-Zellen lässt sich hierfür eine These aufstellen: In der Niere existiert anstelle des Koaktivators ein Korepressor, wodurch die Genexpression von NF-κB-Zielgenen gehemmt wird. In der Schweinenieren-Zelllinie LLC-PK₁, bei der LMX1B ebenfalls über das Tet-off-System induzierbar synthetisiert wird, konnte keine Regulierung von NF-κB-Zielgenen und von ISGs durch LMX1B festgestellt werden. So wäre in diesem Fall weder der bei den HeLa-Zellen vermutete Koaktivator noch der in der Niere vermutete Korepressor vorhanden [Raschle et al., 2009a]. Dass eine positive oder negative Regulierung durch LMX1B stattfinden kann, wird zusätzlich durch die Tatsache unterstützt, dass es bereits bekannt ist, dass LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren sowohl aktivierend als auch repressorisch wirken können [Bach, 2000]. Es bleibt zu zeigen, ob NF-κB auch bei der repressorischen Funktion von LMX1B in der Maus-Niere involviert ist und ob der NF-κB-Signalweg in der

Schweinenieren-Zelllinie LLC-PK₁ überhaupt eine Rolle spielt.

Eine andere, bzw. zusätzliche Erklärung neben der zellspezifischen Regulierung, könnte ein durch LMX1B induzierter Unterschied in der Organisation der Chromatinstruktur sein, so wie auch NF-κB eine Umstrukturierung bewirken kann [Pazin et al., 1995]. Mögliche Unterschiede zwischen HeLa- und LLC-PK₁-Zellen bei der Chromatinstruktur am *IL6* Promotor werden von Anne Rascle und Astrid Neumann zur Zeit mit Hilfe der CHART-PCR (Chromatin Accessibility by real-time PCR) [Rascle et al., 2003; Rascle und Lees, 2003] überprüft und könnten neue Hinweise für die unterschiedliche Regulierung liefern. Neue Erkenntnisse sowie eine Bestätigung, dass es sich um eine zellspezifische Regulierung handelt, könnte auch die Verwendung einer Maus-Nieren-Podozyten-Zelllinie liefern. Die zellspezifischen Faktoren, durch die LMX1B in HeLa-Zellen aktivierend, in der Niere von *Lmx1b*-Knockout-Mäusen repressorisch und in Schweinenieren-Zellen nicht regulatorisch auf die Expression von NF-κB-Zielgenen agiert, konnten noch nicht identifiziert werden. Als ein gut charakterisierter Kofaktor von LMX1B, ist das in vielen Geweben vorkommende Protein LDB1 („LIM-domain-binding protein 1.“) [Agulnick et al., 1996] beschrieben. Als Homodimer kann LDB1 LIM-Domänen von LIM-Homöobox-Proteinen [Agulnick et al., 1996; Matthews und Visvader, 2003; Suleiman et al., 2006] binden und dadurch als Adaptorprotein mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren. Allerdings sind bis dato keine zellspezifischen Kofaktoren von LMX1B bekannt. Die HeLa- und LLC-PK₁-tet-off-Zelllinie sowie natives Nierengewebe stellen gute experimentelle Systeme dar, mit denen nach LMX1B-spezifischen Faktoren mittels biochemischer Methoden gesucht werden könnte. Für NF-κB wurden bereits zellspezifische Kofaktoren identifiziert. So konnte in B-Zellen zum Beispiel für die TFIID-Untereinheit TAF_{II}150 eine direkte Interaktion mit der Transaktivierungsdome von NF-κB p65 gezeigt werden, wodurch nur eine bestimmte Anzahl antiapoptotischer Gene aktiviert wird [Yamit-Hezi et al., 2000; Owen et al., 2005]. Auch in HeLa-Zellen handelt es sich nicht um eine generelle Aktivierung des NF-κB-Signalweges, sondern es werden nur spezifische NF-κB-Zielgene durch LMX1B induziert [Neumann, 2009]. So sollte überprüft werden, ob das Modell der Transkriptionsregulierung von *IL6* durch LMX1B in HeLa-Zellen auch auf die anderen, durch LMX1B induzierten NF-κB-Zielgene in HeLa-Zellen, wie zum Beispiel auf *IL8*, übertragen werden kann. Es könnte sich nämlich durchaus um eine Promotor-spezifische Regulierung durch LMX1B handeln, an der daher je nach Zielgen auch unterschiedliche NF-κB-Komplexe sowie unterschiedliche Kofaktoren beteiligt sind [Yamit-Hezi et al., 2000]. Dabei könnte es sich um eine spezifische Genaktivierung handeln, wie es für den *IFNB1*-Promotor beschrieben wurde. Für die Transkription von *IFNB1* ist die Bildung eines höheren Multi-Protein-Komplexes an der Promotor-DNA, das sogenannte *IFNB1*-Enhancersom, Voraussetzung. Dieser Komplex setzt sich aus den Promotor-spezifischen

Transkriptionsfaktoren NF-κB, IRF7, ATF-2, IRF3 und c-Jun zusammen [Panne et al., 2004]. Mit der Hilfe von Strukturproteinen binden diese kooperativ an den Promotor und rekrutieren zusätzliche Chromatin-modifizierende Kofaktoren, die gewährleisten, dass der Promotor für die basale Transkriptionsmaschinerie zugänglich ist [Maniatis et al., 1998]. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden könnte daher untersucht werden, ob bei der Transkriptionsaktivierung von *IL8* zum Beispiel andere NF-κB-Untereinheiten involviert sind.

4.5 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass LMX1B die Transkription von spezifischen NF-κB-Zielgenen in HeLa-Zellen reguliert. Bei den dafür verantwortlichen molekularen Mechanismen kommt es zu einer Interaktion zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren LMX1B und NF-κB, an denen ein gemeinsamer Kofaktor beteiligt ist, den es noch zu identifizieren gilt. Somit konnte anhand dieser Resultate die erste molekulare Charakterisierung von direkten LMX1B-Zielgenen repräsentiert werden und zum ersten Mal eine Interaktion zwischen dem LMX1B- und NF-κB-Signalweg demonstriert werden.

Welche Relevanz die Regulation von NF-κB-Zielgenen durch LMX1B *in vivo* hat, kann auch durch die Verwendung der *Lmx1b*-Knockout-Maus weiter charakterisiert werden. Bis dato sind noch keine klinischen Studien bekannt, bei denen NPS-Patienten mit Immunkrankheiten in Verbindung gebracht werden. Das Hauptziel sollte daher sein, den hier gezeigten Mechanismus der zellspezifischen Regulierung der NF-κB-Zielgene auf Patienten mit Nagel-Patella-Syndrom zu übertragen, um dann dadurch neue therapeutische Ansätze für NPS zu entwickeln und zu erforschen.

5. Zusammenfassung

Der LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor LMX1B spielt eine wichtige Rolle sowohl bei der Entwicklung als auch bei der Aufrechterhaltung von zahlreichen Geweben. So führen Mutationen im *LMX1B*-Gen zum Erscheinungsbild des Nagel-Patella-Syndroms, einer autosomal dominant vererbten Erkrankung, zu dessen typischen Charakteristika unter anderem fehlgebildete Fingernägel, fehlende Patellen sowie eine Nephropathie zählen. LMX1B-Knockout-Maus Studien konnten zwar mutmaßliche Zielgene von LMX1B identifizieren, jedoch ohne eine molekulare Charakterisierung bleibt es fraglich, ob es sich hierbei in der Tat um direkte Zielgene von LMX1B handelt. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist wenig über den Mechanismus der Transkriptionsaktivierung von LMX1B sowie über die Signalwege, die LMX1B reguliert, bekannt. Am Lehrstuhl von Prof. Dr. Ralph Witzgall wurde erstmals gezeigt, dass LMX1B die Geninduktion von bestimmten NF-κB-Zielgenen wie z.B. *IL6* oder *IL8* in HeLa-Zellen aktiviert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekulare Wirkungsweise von LMX1B bei der Regulierung dieser NF-κB-Zielgene näher zu charakterisieren. Dafür wurde hauptsächlich ein spezielles zelluläres Expressionssystem verwendet, welches eine regulierbare Synthese von LMX1B unter Anwendung des Tet-off-Systems in HeLa-Zellen ermöglicht. Mit diesen LMX1B-produzierenden HeLa-Zellen wurden zunächst Lokalisationsstudien durchgeführt, um zu untersuchen, ob LMX1B möglicherweise indirekt im Zytosol regulierend auf die NF-κB Aktivität eingreift. Nachdem festgestellt wurde, dass LMX1B die Translokation von NF-κB in den Zellkern nicht erhöht, war von einer Aktivierung der Geninduktion auf nuklearer Ebene auszugehen. Dass NF-κB direkt daran beteiligt ist, konnten siRNA-Experimente demonstrieren, bei der spezifisch eine Untereinheit von NF-κB gehemmt wurde. Dieser Befund, zusammen mit weiteren Daten der Arbeitsgruppe zeigten schließlich, dass LMX1B und NF-κB nach jeweiliger Bindung an DNA funktionell kooperieren.

Um die molekularen Mechanismen, durch welche LMX1B und NF-κB die Transkription von NF-κB-Zielgenen aktivieren, näher charakterisieren zu können, wurden Luciferase Reporter-Gen-Assays durchgeführt, wobei *IL6* als exemplarisches NF-κB-Zielgen verwendet wurde. So konnte zum ersten Mal an einem nativen Promotor gezeigt werden, dass LMX1B die Transkription eines NF-κB-Zielgens durch Bindung an das sogenannte FLAT-Element, welches bereits anderweitig als LMX1B-Bindungsmotiv vermutet wurde, aktivieren kann. Diese Assays führten zugleich zu der Annahme, dass ein gemeinsamer Kofaktor an der Transaktivierung beteiligt ist. Durch die Verwendung verschiedener LMX1B-Mutanten, die

ebenfalls in Reportergen-Assays auf ihre Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung des *IL6* Promotors getestet wurden, stellte sich heraus, dass sowohl die DNA-bindende Homöodomäne als auch die LIM-Domänen, im speziellen die LIM2-Domäne, von LMX1B hierbei essentiell sind. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit schließlich ein Modell der Regulierung von NF-κB-Zielgenen durch LMX1B in HeLa-Zellen aufgestellt werden. Bei diesem Modell kooperieren LMX1B und NF-κB auf Chromatinebene bei der Transaktivierung der NF-κB-Zielgene, wobei für eine maximale Transkriptionsaktivierung beide Transkriptionsfaktoren sehr wahrscheinlich einen gemeinsamen Kofaktor benötigen, den es jedoch noch zu identifizieren gilt.

Somit konnte mit denen aus dieser Arbeit und den von der Arbeitsgruppe gewonnenen Daten, die mittlerweile veröffentlicht wurden, erstmalig für LMX1B eine direkte Beteiligung an der Regulierung der Expression von NF-κB-Zielgenen in HeLa-Zellen demonstriert werden. Des Weiteren wurde die wichtige Erkenntnis gewonnen, dass eine funktionelle Interaktion zwischen dem LMX1B-Signalweg und dem NF-κB-Signalweg existiert. Jetzt kann in zukünftigen, auf dieser Arbeit aufbauenden Forschungen der Zusammenhang zwischen den hier gewonnenen Daten über LMX1B im HeLa-Zellsystem und dem Nagel-Patella-Syndrom beim Menschen gezeigt werden. Möglicherweise lassen sich diese neuen Einsichten über die molekulare Wirkungsweise von LMX1B zusammen mit NF-κB auch auf den Menschen übertragen.

6. Literaturverzeichnis

Agulnick A.D., Taira M., Breen J.J., Tanaka T., Dawid I.B. and Westphal, H. (1996). Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature* **384** (6606), 270-272

Asbreuk C.H., Vogelhaar C.F., Hellemons A., Smidt M.P. and Burbach P.H. (2002). CNS expression pattern of Lmx1b and coexpression with ptx genes suggest functional cooperativity in the development of forebrain motor control systems. *Mol. Cell. Neurosci.* **21**, 410-420

Bach I., Carrière C., Ostendorff H.P., Andersen B. and Rosenfeld M.G. (1997). A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes Dev.* **11**, 1370-1380

Bach I., Rodriguez-Esteban C., Carrière C., Bhushan A., Krones A., Rose D.W., Glass C.K., Andersen B., Belmonte J.C.I. and Rosenfeld M.G. (1999). RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex. *Nature Genet.* **22**, 394-399

Ben-Bassat M., Cohen L. and Rosenfeld J. (1971). The glomerular basement membrane in the nail patella syndrome. *Arch. Pathol.* **92**, 350-355

Bene A., Kurten R.C. and Chambers T.C. (2004). Subcellular localization as a limiting factor for utilization of decoy oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* **19**, e142

Bongers E.M.H.F., Gubler M.-C. and Knoers N.V.A.M. (2002). Nail-patella syndrome. Overview on clinical and molecular findings. *Pediatr. Nephrol.* **17**, 703-712

Bonizzi G. and Karin M. (2004). The two NF-κB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**, 280-288

Bosisio D., Marazzi I., Agresti A., Shimizu N., Bianchi M.E. and Natoli G. (2006). A hyper-dynamic equilibrium between promoter-bound and nucleoplasmic dimers controls NF-κB-dependent gene activity. *EMBO Journal* **25**, 798-810

Chan R., Gilbert M., Thompson K.M., Marsh H.N., Epstein D.M. and Pendergrast P.S. (2006). Co-expression of anti-NF κ B RNA aptamers and siRNA leads to maximal suppression of NF κ B activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* **34**, e36

Chariot A., Princen F., Gielen J., Merville M. P., Franzoso G., Brown K., Siebenlist U. and Bours V. (1999). IkappaB-alpha enhances transactivation by the HOXB7 homeo-domain-containing protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 5318-25

Chen H., Lun Y., Ovchinnikov D., Kokubo H., Oberg K.C., Pepicelli C.V., Gan L., Lee B. and Johnson R.L. (1998). Limb and kidney defects in Lmx1b mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome. *Nat. Genet.* **19**, 51-55

Chen L.F., Mu Y. and Greene W.C. (2002). Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB, *EMBO J.* **21**, 6539-6548

Chen L.F. and Greene W.C. (2003). Regulation of distinct biological activities of the NF-kappa B transcription factor complex by acetylation. *J. Mol. Med.* **81**, 549-557

Chen L.-F. and Greene W.C. (2004). Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 392-401

Cheng L., Chen C.L., Luo P., Tan M., Qiu M., Johnson R. and Ma Q. et al (2003). Lmx1b, Pet-1, and Nkx2.2 coordinately specify serotonergic neurotransmitter phenotype. *J. Neurosci.* **23**, 9961-9967

Clough M.V., Hamlington J.D. and McIntosh I. (1999). Restricted distribution of loss-of-function mutations within the LMX1B genes of nail patella syndrome patients. *Hum. Mutat.* **14**, 459-465

Cozzi A., Corsi B., Levi S., Santambrogio P., Albertini A. and Arosio P. (2000). Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa-cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 25122-25129

Curtiss J. and Heilig J.S. (1998). DeLIMiting development. *Bioessays* **20**, 58-69

Cygan J., Johnson R. and McMahon A. (1997). Novel regulatory interactions revealed by studies of murine limb pattern in Wnt-7a and En-1 mutants. *Development* **124**, 5021-5032

Dawid I.B., Toyama R. and Taira M. (1995). LIM domain proteins. *C. R. Acad. Sci. III* **318**, 295-306

De Bosscher K., Van den Berghe W. and Haegemann G. (2006). Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB. *Oncogene* **25**, 6868-6886

Dechend R., Hirano F., Lehmann K., Heissmeyer V., Ansieau S., Wulczyn F.G., Scheidereit C. and Leut A. (1999). The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF- κ B/Rel and nuclear co-regulators. *Oncogene* **18**, 3316-3323

Dejardin E. (2006). The alternative NF- κ B pathway from biochemistry to biology: Pitfalls and promises for future drug development. *Biochemical Pharmacology* **72**, 1161-1179

Dejardin E., Droin N. M., Delhase M., Haas E., Cao Y., Makris C., Li Z.W., Karin M., Ware C. F. and Green D. R. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* **17**, 525-535

del Pozo E. and Lapp H. (1970). Ultrastructure of the kidney in the nephropathy of the nail patella syndrome. *Am. J. Clin. Pathol.* **54**, 845-851

Desjardins M. and Bendayan M. (1991). Ontogenesis of glomerular basement membrane: Structural and functional properties. *J Cell Biol* **113**, 689-700

Ding Y-Q., Marklund U., Yuan W., Yin J., Wegman L., Ericson J., Deneris E., Johnson R.L. and Chen Z-F. (2003). Lmx1b is essential for the development of serotonergic neurons. *Nature Neurosci.* **6**, 933-938

Dreyer S.D., Zhou G., Baldini A., Winterpacht A., Zabel B., Cole W., Johnson R.L., and Lee B. (1998). Mutations in *LMX1B* cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat. Genet.* **19**, 47-50

Dreyer S.D., Morello R., German M.S., Zabel B., Winterpacht A., Lustrum, G.P., Horton W.A., Ober K.C. and Lee B. (2000). LMX1B transactivation and expression in nail-patella-syndrome. *Hum. Mol. Gent.* **9**, 1067-1074

Dunston J.A., Hamlington J.D., Zaveri J., Sweeney E., Sibbring J., Tran C., Malbroux M., O'Neill J.P., Mountford R. and McIntosh I. (2004). The human LMX1B gene: transcription unit, promoter, and pathogenic mutations. *Genomics* **84**, 565-576

Dunston J.A., Reimschisel T., Ding Y.-Q., Sweeney E., Johnson R.L., Chen Z.-F. and McIntosh I. (2005). A neurological phenotype in nail-patella syndrome (NPS) patients illuminated by studies of murine Lmx1b expression. *Eur. J. Hum. Genet.* **13**, 330-335

Epinat J-C and Gilmore TD. (1999). Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF-kappaB signal transduction pathway. *Oncogene* **18**, 6896-6909

Fichtner-Feigl S., Fuss I.J., Preiss J.C., Strober W. and Kitani A. (2005). Treatment of murine Th1- and Th2-mediated inflammatory bowel disease with NF-κB decoy oligonucleotides. *J. Clin. Invest.* **115**, 3057-3071

Freyd G., Kim S.K. and Horvitz H.R. (1990). Novel cystein-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell-lineage gene *lin-11*. *Nature* **344**, 876-879

Gehring W.J., Affolter M. and Burglin T. (1994). Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 487-526

German M.S., Wang J., Chadwick R.B. and Rutter W.J. (1992). Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev.* **6**, 2165-2176

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

Gibson U.E., Heid C.A. and Williams P.M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6**, 995-1001

Gilmore T.D. and Herscovitch M. (2006). Inhibitors of NF-κB signaling: 785 and counting. *Oncogene* **25**, 6887-6899

Gossen M. and Bujard H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5547-5551

Granata A., Nori G., Ravazzolo R., Marini M., Castellino S., Sicurezza E., Fiore C.E. and Magnani R. (2008). Nail-patella syndrome and renal involvement. Description of three cases and literature review. *Clinical Nephrology* **69**, 377-382

Groffen A.J., Hop F.W., Tryggvason K., Dijkman H., Assmann K.J., Veerkamp J.H., Monnens L.A. and van den Heuvel L.P. (1997). Evidence for the existence of multiple heparan sulfate proteoglycans in the human glomerular basement membrane and mesangial matrix. *Eur. J. Biochem.* **247**, 175-182

Guijarro C. and Egido J. (2001). Transcription factor-κB (NF-κB) and renal disease. *Kidney Int.* **59**, 415-424

Guo J., Verma U.N., Gaynor R.B., Frenkel E.P. and Beccera C.R. (2004). Enhanced Chemosensitivity to Irinotecan by RNA Interference-mediated Down-Regulation of the nuclear Factor κB p65 Subunit. *Clinical Cancer Research* **10**, 3333-3341

Hamlington J.D., Clough M.V., Dunston J.A. and McIntosh I. (2000). Deletion of a branchpoint consensus sequence in the LMX1B gene causes exon skipping in a family with nail patella syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **8**, 311-314

Hansen K. and Abrass C.K. (1999). Role of laminin isoforms in glomerular structure. *Pathobiology* **67**, 84-91

Harrison P.M. and Arosio P. (1996). The Ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 161-203

Hayden M.S. and Gosh S. (2004). Signaling to NF-κB. *Genes & Dev.* **18**, 2195-2224

Hayden M.S. and Gosh S. (2008). Shared Principles in NF-κB Signaling. *Cell* **132**, 344-362

Heid C., Stevens J., Livak K. and Williams P. (1996). Real time quantitative PCR. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* **6**, 986-994.

Heidet L., Bongers E.M.H.F., Sich M., Zhang S.-Y., Loirat C., Meyrier A., Broyer M., Landthaler G., Faller B., Sado Y., Knoers N.V.A.M. and Gubler M.C. (2003). In vivo expression of putative LMX1B targets in nail-patella syndrome kidneys. *Am. J. Pathol.* **163**, 145-155

Heining E. (2007). Die Regulation des LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktors LMX1B durch RAI, ein inhibitorisches Zellkernprotein. *Diplomarbeit zur Erlangung des Grades einer Diplombiologikerin.* Institut für molekulare und zelluläre Anatomie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg

Hiscott J., Alper D., Cohen L., Leblanc J.F., Sportza L., Wong A. and Xanthoudakis S. (1989). Induction of human interferon gene expression is associated with a nuclear factor that interacts with the NF- κ B site of the human immunodeficiency virus enhancer. *J. Virol.* **63**, 2557-2566

Hiscott J., Marois J., Garoufalidis J., D'Addario M., Roulston A., Kwan I., Pepin N., Lacoste, J., Nguyen H., Bensi G. and Fenton M. (1993). Characterization of a functional NF- κ B site in the human interleukin 1 β promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol. Cell Biol.* **13**, 6231-6240

Hoffmann A., Natoli G. and Ghosh G. (2006). Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module. *Oncogene* **25**, 6706-6716

Hoiberg O. and Westphal H. (2000). Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet.* **16**, 75-83

Huber T.B. and Benzing T. (2005). The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **14**, 211-216

Hunter C.S. and Rhodes S.J. (2005). LIM-homeodomain genes in mammalian development and human disease. *Mol. Biol. Rep.* **32**, 67-77

Huxford T., Huang D.B., Malek S. and Gosh G. (1998). The crystal structure of the IkappaBalph/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation. *Cell* **85**, 759-770

Iannotti C.A., Inoue H., Bernal E., Aoki M., Liu L., Donis-Keller H., German M.S. and Permutt M.A. (1997). Identification of a human LMX1 (LMX1.1)-related gene, LMX1.2: tissue-specific expression and linkage mapping on chromosome 9. *Genomics* **46**, 520-524.

Ikezoe T., Yang Y., Bandobashi K., Saito T., Takemoto S., Machida H., Togitani,K., Koeffler H.P. and Taguchi H. (2005). Oridonin, a diterpenoid purified from *Rabdosia rubescens*, inhibits the proliferation of cells from lymphoid malignancies in association with blockade of the NF-kappa B signal pathways. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 578-586

Imuro Y., Nishiura T., Hellerbrand C., Behrns K.E., Schoonhoven R., Grisham J.W. and Brenner D.A. (1998). NfkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J. Clin. Invest.* **101**, 802-811.

Inoue T., Yaoita E., Kurihara H., Shimizu F., Sakai T., Kobayashi T., Ohshiro K., Kawachi H., Okada H., Suzuki H., Kihara I. and Yamamoto T. (2001). FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int.* **59**, 1003-1012

Jeang K.T. (2001). Functional activities of the human T-cell leukemia virus type I Tax oncoprotein: cellular signalling through NF-kappB. *Cytokine Growth Factor* **12**, 207-217

Jeansson M. and Haraldsson B. (2005). Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalix in the glomerular barrier. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **290**, F111-6

Jenuwein T. and Allis C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-80

Johnson J.D., Zhang, W., Rudnick A., Rutter W.J. and German M.S. (1997). Transcriptional synergy between LIM-homeodomain proteins and basic helix-loop-helix proteins: the LIM2 domain determines specificity. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3488-3496

Jurata L.W., Kenny D.A. and Gill G.N. (1996). Nuclear LIM interactor, a rhombotin and LIM homeodomain interacting protein, is expressed early in neuronal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11693-11698

Jurata L.W. and Gill G.N. (1997). Functional analysis of the nuclear LIM domain interactor NLI. *Mol. Cell Biol.* **17**, 5688-5698

Karlsson O., Thor S., Norberg T., Ohsson H. and Edlund T. (1990). Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* **344**, 879-882

Kassel O., Schneider S., Heilbock C., Litfin M., Göttlicher M. and Herrlich P. (2004). A nuclear isoform of the focal adhesion LIM-domain protein Trip6 integrates activating and repressing signals at AP-1- and NF-κB-regulated promoters. *Genes Dev.* **18**, 2518-252

Kastner J. (2004). Charakterisierung des wachstumsinhibitorischen Effekts des LIM-Homöobox-Transkriptionsfaktors 1 Beta (LMX1B). *Diplomarbeit zur Erlangung des Grades eines Diplombiologen.* Institut für molekulare und zelluläre Anatomie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg

Katz A., Fish A.J., Kleppel M.M., Hagen S.G., Michael A.F. and Butkowski R.J. (1991). Renal entactin (nidogen): Isolation, characterization and tissue distribution. *Kidney Int.* **40**, 643-652

Kfouri Y., Nasr R., Hermine O., de The H. and Bazarbachi A. (2005). Proapoptotic regimes for HTLV-I-transformed cells: targeting Tax and the NF-κB pathway. *Cell death Differ.* **12**, 871-877

Kerjaschki D., Sharkey D.J. and Farquhar M.G. (1984). Identification and characterization of podocalyxin-- the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J. Cell Biol.* **98**, 1591-1596

Kestilä M., Lenkkeri U., Männikkö M., Lamerdin J., McCready P., Putaala H., Ruotsalainen V., Morita T., Nissinen M., Herva R., Kashtan C.E., Pelton L., Holmberg C., Olsen A. and Tryggvason K. (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein – nephrin – is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell* **1**, 575-582

Kreidberg J.A. (2003). Podocyte differentiation and glomerulogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 806-814

Kunsch C. and Rosen C.A. (1993). NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6137-6146

Kuo M.H. and Allis C.D. (1999). In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods* **19**, 425-433

Kurihara H., Anderson J.M., Kerjaschki D. and Farquar M.G. (1992). The altered glomerular filtration slits seen in puromycin aminonucleoside nephrosis and protamine sulfate-treated rats contain the tight junction protein ZO-1. *Am. J. Pathol.* **141**, 805-816

Lee U.J., Choung S.-R., Bhanu Prakash K.V., Lee E.-J., Lee M. Y., Kim Y.J., Han C.-W. and Choi Y.-C. (2007). Dual knockdown of p65 and p50 subunits of NF-kappaB by siRNA inhibits the induction of inflammatory cytokines and significantly enhance apoptosis in human primary synoviocytes treated with tumor necrosis factor alpha. *Mol. Biol. Rep.* **35**, 291-298

Leung T.H., Hoffman A. and Baltimore D. (2004). One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimmers. *Cell* **118**, 453-464

Leung C.-H., Grill S.P., Lam W., Han Q.-B., Sun H.-D. and Cheng Y.-C. (2005). Novel Mechanism of Inhibition of Nuclear Factor- κ B DNA-Binding Activity by Diterpenoids Isolated from *Isodon rubescens*. *Mol. Pharmacol.* **68**, 286-297

Li H. and Lin X. (2008). Positive and negative signalling components involved in TNFalpha-induced NF-kappaB activation. *Cytokine* **41**, 1-8

Li D., Wu L.-j., Tashiro S.-i., Onodera S. and Ikejima T. (2007). Oridonin-Induced A431 Cell Apoptosis Partially Through Blockage of the Ras/Raf/ERK Signal Pathway. *J. Pharmacol. Sci.* **103**, 56-66

Li Q. and Verma I.M. (2002). NF- κ B regulation in the immune system. *Nature Rev. Immunol.* **2**, 725-734

Liebermann T.A. and Baltimore, D. (1990). Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol. Cell Biol.* **10**, 2327-233

Lin Y., Zhao J., Chen S., Zeng X., Du Q., Yang Y., Lu F., Pu Y. and Yang Z. (2008). A novel mutation in LMX1B gene causes nail-patella syndrome in a large Chinese family. *Bone* **43**, 591-595

Liu Z.-J., Lu X. and Zhong S. (2005). ASPP - Apoptotic specific regulator of p53. *Biochemica and Biophysica Acta* **1765**, 77-80

Maniatis T., Falvo J.V., Kim T.H., Kim T.K., Lin C.H., Parekh B.S. and Wathelet M.G. (1998). Structure und function of the interferon- β enhanceosome. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **63**, 609-620

Marmorstein R. and Roth S.Y. (2001). Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 155-61

Matthews J.M. and Visvader J.E. (2003). LIM-domain-binding protein 1: a multifunctional cofactor that interacts with diverse proteins. *EMBO reports* **4**, 1132-1137

McGinnis W., Levine M.S., Hafen E., Kuroiwa A. and Gehring W.J. (1984). A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila* antennapedia and bithorax complexes. *Nature* **308**, 428-433

McIntosh I., Clough M.V., Schaffer A.A. Puffenberger E.G., Horton V.K., Perts K., Abbott M.H., Roig C.M., Cutone S., Ozelius L., Kwiatkowski D.J., Pyeritz R.E., Brown L.J., Pauli R.M., McCormick M.K. and Francomano C.A. (1997). Fine mapping of the nail-patella syndrome locus at 9q34. *J. Hum. Genet.* **60**, 133-142

McIntosh I., Dreyer S.D., Clough M.V., Dunston J.A., Eyaid W., Roig C.M., Montgomery T., Ala-Mello S., Kaitila I., Winterpacht A., Zabel B., Frydman M., Cole W.G., Francomano C.A. and Lee, B. (1998). Mutation analysis of LMX1B gene in nail-patella syndrome patients. *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 1651-1658

McIntosh I., Dunston J.A., Liu L., Hoover-Fong J.E. and Sweeney E. (2005). Nail patella syndrome revisited: 50 years after linkage. *Ann. Hum. Genet.* **69**, 349-363

Michelsen J.W., Schmeichel K.L., Beckerle M.C. and Winge D.R. (1993). The LIM motif defines a specific zinc-binding protein domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4404-4408

Miner J.H., Morello R., Andrews K.L., Li C., Antignac C., Shaw A.S. and Lee B. (2002). Transcriptional induction of slit diaphragm genes by Lmx1b is required in podocyte differentiation. *J. Clin. Invest.* **109**, 1065-1072

Morello R., Zhou G., Dreyer S.D., Harvey S.J., Ninomiya Y., Thorner P.S., Miner J.H., Cole W., Winterpacht A., Zabel B., Oberg K.C. and Lee B. (2001). Regulation of glomerular basement membrane collagen expression by LMX1B contributes to renal disease in nail patella syndrome. *Nat. Genet.* **27**, 205-208

Neumann T. (2009). Identifizierung einer Funktion des Transkriptionsfaktors LMX1B bei der Regulation des Interferon-beta-Signalweges. *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. RER. NAT.).* Institut für molekulare und zelluläre Anatomie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg

Ogawa S., Lozach J., Benner C., Pascual G., Tangirala R.K., Westin S., Hoffmann A., Subramaniam S., David M., Rosenfeld M.G. and Glass C.K. (2005). Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell*, **122**, 707–721

Ostendorff H.P., Peirano R.I., Peters M.A., Schlüter A., Bossenz M., Scheffner M. and Bach I. (2002). Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors. *Nature* **416**, 99-103

Owen H.R., Quadroni M., Bienvenut W., Buerki C. and Hottinger M.O. (2005). Identification of Novel and Cell Type Enriched Cofactors of the Transcription Activation Domain of RelA (p65 NF-κB). *Journal of Proteome Research* **4**, 1381-1390

Pahl H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-κB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853-6866

Panne D., Maniatis T. and Harrison S.C. (2004). Crystal structure of ATF-2/c-Jun and IRF-3 bound to the interferon-β enhancer. *EMBO J.* **23**, 4384-4393

Paucker K., Cantell K. and Henle W. (1962). Quantitative studies on viral interference in suspended L cells. III. Effect of interfering viruses and interferon on the growth rate of cells. *Virology* **17**, 324-334

Pavenstädt H., Kriz W. and Kretzer M. (2003). Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol. Rev.* **83**, 253-307

Pazin M.J., Sheridan P.L., Cannon K., Cao Z., Keck J.G., Kadonaga J.T. and Jones K.A. (1995). NF-κB-mediated chromatin reconfiguration and transcriptional activation of the HIV-1 enhancer in vitro. *Genes & Development* **10**, 37-49

Perkins N.D., Felzien L.K., Betts J.C., Leung K., Beach D.H. and Nabel G.J. (1997). Distinct domains of adenovirus E1A interact with specific cellular factors to differentially modulate human immunodeficiency virus transcription. *Science* **275**, 523-527

Perkins N.D. and Gilmore T.D. (2006). Good cop, bad cop: the different faces of NF-κappaB. *Cell Death Differ.* **13**, 759-772

Pogo B.G., Allfrey V.G. and Mirsky A.E. (1966). RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55** (4), 805-812

Pressmann C.L., Chen H. and Johnson R.L. (2000). Lmx1b, a LIM-homeodomain class transcription factor, is necessary for normal development of multiple tissues in the anterior segment of the murine eye. *Genesis* **26**, 15-25

Prestel J. (2003). Charakterisierung des LIM-Homöobox-Transkriptionsfaktors 1 Beta (LMX1) in induzierbaren Zelllinien. *Inauguraldissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades*. Institut für Anatomie und Zellbiologie I der Medizinischen Fakultät Heidelberg der Ruprecht-Karls-Universität

Raschle, A., Neumann, T., Raschta, A.S., Neumann, A., Heinig, E., Kastner, J., Witzgall, R. (2009a). The LIM-homeodomain transcription factor LMX1B regulates expression of NF-κappa B target genes. *Exp. Cell Res.* **315**, 76-96

Raschle A. (2009b). Transcriptional regulation by the signal transducer and activator of transcription STAT5 and by the LIM-Homeodomain protein LMX1B in health and disease. *Kumulative Habilitationsschrift zur Erlangung der Lehrbefähigung im Fach Zellbiologie*. Institut für molekulare und zelluläre Anatomie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg

Reiser J., Kriz W., Kretzler M. and Mundel P. (2000). The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J. Am. Soc. Neohrol.* **11**, 1-8

Rétaux S. and Bachy I. (2002). A short history of LIM-domains (1993-2002): from protein interaction to degradation. *Mol. Neurobiol.* **26**, 269-281

Riddle R.D and Ensini M. (1995). Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* **83**, 631-640.

Rohr C., Prestel, J., Heidet L., Hosser H., Kriz W., Johnson R.L., Antignac C. and Witzgall R. (2002). The LIM-homeodomain transcription factor Lmx1b plays a crucial role in podocytes. *J. Clin. Invest.* **109**, 1073-1082

Roselli S., Gribouval O., Boute N., Sich M., Benessy F., Attie T., Gubler M. C. and Antignac C. (2002). Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am. J. Pathol.* **160**, 131-139

Rossi A., Kapahi P., Natoli G., Takahashi T., Chen Y., Karin M. and Santoro M.G. (2000). Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature* **403**, 103-108

Rostgaard J. and Qvortrup K. (2002). Sieve plugs in fenestrae of glomerular capillaries: Site of the filtration barrier? *Cells Tissues Organs* **170**, 132-138

Ryo A., Suizu F., Yoshida Y., Perrem K., Liou Y.C., Wulf G., Rottapel R., Yamaoka S. and Lu K.P.. (2003). Regulation of NF- κ B signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol. Cell* **12**, 1413-1426

Saccani S., Pantano S. and Natoli G. (2001). Two waves of nuclear factor kappaB recruitment to target promoters. *J. Exp. Med.* **193**, 1351-1359

Saccani S., Marazzi I., Beg A.A. and Natoli G. (2004). Degradation of Promoter-bound p65/RelA Is Essential for the Prompt Termination of the Nuclear Factor kappaB Response. *J. Exp. Med.* **5**, 107-113

Sato U., Kitanaka S., Sekine T., Takahashi S., Ashida A. and Igarashi T. (2005). Functional characterization of LMX1B mutations associated with nail-patella syndrome. *Pediatric Research* **57**, 783-788

Schlöndorff D. und Banas B (2009). The Mesangial Cell Revisited: No Cell Is an Island. *J Am. Soc. Nephrol.* **20**, 1179-1187

Schmitz M.L., Mattioli I., Buss H. and Kracht M. (2004). NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem.* **5**, 1348-58

Schnabel E., Anderson J.M. and Farquar M.G. (1990). The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J. Cell Biol.* **111**, 1255-1263

Seipel K., Georgiev O and Schaffner W. (1992). Different activation domains stimulate transcription from remote ('enhancer') and proximal ('promoter') positions. *The EMBO Journal* **13**, 4961-4968

Sellin L., Huber T. B., Gerke P., Quack I., Pavenstädt H., and Walz G. (2003). NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *Faseb. J.* **17**, 115-117.

Senftleben U., Li Z.W., Baud V. and Karin M. (2001). Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* **293**, 1495-1499

Seri M., Melchionda S., Dreyer S., Marini M., Carella M., Cusano R., Poemontese M.R., Caroli F., Silengo M., Zelante L., Romeo G., Ravazzolo R., Gasparini P. and Lee B. (1999). Identification of LMX1B gene point mutations in Italian patients affected with Nail-Patella syndrome. *Int. J. Mol. Med.* **4**, 285-290

Shih N.Y., Li J., Karpitskii V., Nguyen A., Dustin M.L., Kanagawa O., Miner J.H. and Shaw A.S. (1999). Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* **286**, 312-315.

Shin H.M., Kim M.H., Kim B.H., Jung S.H., Kim Y.S., Park H.J., Hong J.T., Min K.R. and Kim Y. (2004). Inhibitory action of novel aromatic diamine compound on lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of NF-kappaB without affecting IkappaB degradation. *FEBS Lett* **571**, 50-54

Shimizu H., Mitomo K., Watanabe T., Okamoto S. and Yamamoto K. (1990). Involvement of NF-kappa B-like transcription factor in the activation of the interleukin-6 gene by inflammatory lymphokines. *Mol. Cell Biol.* **10**, 561-568

Sledz C.A., Holko M., de Veer M.J., Silverman R.H. and Williams B.R. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* **5**, 834-839

Smidt M.P., Asbreuk C.H.J., Cox J.J., Chen H., Johnson R.L. and Burbach P.H. (2000). A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires Lmx1b. *Nature Neurosci.* **3**, 337-341

Sobotta J. und Welsch U. (2003). Lehrbuch Histologie. *Urban & Fischer Verlag München*, Jena, **1. Auflage**

Sterner D.E. and Berger S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 435-59

Suleiman H., Heudobler D., Raschta A.S., Zhao Y., Zhao Q., Hertting I., Vitzthum H., Moeller M.J., Holzman L.B., Rachel R., Johnson R., Westphal H., Rascle A. and Witzgall R. (2007). The podocyte-specific inactivation of Lmx1b, Ldb1 and E2a yields new insight into a transcriptional network in podocytes. *Dev. Biol.* **304**, 701-712

Sweeney E., Fryer A., Mountford R., Green A. and McIntosh I. (2003). Nail-patella syndrome: a review of the phenotype aided by developmental biology. *J. Med. Genet.* **40**, 153-162

Takaesu G., Surabhi R.M., Park K.J., Ninomiya-Tsuji J., Matsumoto K. and Gaynor R.B. (2003). TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *J. Mol. Biol.* **326**, 105-115

Tian B., Nowak D. and Brasier A. R. (2005). A TNF-induced gene expression program under oscillatory NF-κB control. *BMC Genomics* **6**:137

Tomita N., Morishita R., Tomita S., Yamamoto K., Aoki M., Matsushita H., Hayashi S., Higaki J. and Ogihara T. (1998). Transcription factor decoy for nuclear factor-κB inhibits tumor necrosis factor-α-induced expression of interleukin-6 and intracellular adhesion molecule-1 in endothelial cells. *J. Hypertens.* **16**, 993-1000

Tomita N., Ogihara T. and Morishita R. (2003). Transcription factors as molecular targets: molecular mechanisms of decoy ODN and their design. *Curr. Drug Targets* **4**, 603-608.

Trigiante G. and Lu X. (2006). ASPP and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 217-226

Tsiokas L., Kim S. and Ong E. (2007). Cell biology of polycystin-2. *Cellular Signaling* **19**, 444-453

Van den Berghe W., Plaisance S., Boone E., De Bosscher K., Schmitz M.L., Fiers W., and Haegeman G. (1998). P38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* **273**, 3285-90.

Vermeulen L., De Wilde G., Notebaert S., Van den Berghe W. and Haegeman G. (2002). Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor-kappaB p65 subunit, *Biochem. Pharmacol.* **64**, 963-970

Vermeulen L., De Wilde G., Van Damme P., Van den Berghe W. and Haegeman G. (2003). Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J.* **22**, 1313-1324

Vollrath D., Jamarilla-Babb V.L., Clough M.V., McIntosh I., Scott K.M., Licherter P.R. and Richards J.E. (1998). Loss-of function-mutations in the LIM-homeodomain gene, LMX1B, in nail-patella syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1091-1098

Way J.C. and Chalfie M. (1988). Mec-3, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons. *Cell* **54**, 5-16

Yamit-Hezi A., Nir s., Wolstein O. and Dikstein R. (2000). Interaction of TAF_{II}105 with Selected p65/RelA Dimers Is Associated with Activation of Subset of NF-κB Genes. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 18180-18187

Yang J.-P., Hori M., Sanda T. and Okamoto T. (1999). Identification of a novel inhibitor of nuclear factor-κB, RelA-associated inhibitor. *J. Biol. Chem.* **274**, 15662-15670

Yang W.-M., Tsai S.-C., Wen Y.-D., Fejer G. and Seto E. (2002). Functional Domains of Histone Deacetylase-3. *J. Biol. Biochem.* **277**, 9447-9454

Yi J. and Beckerle M.C. (1998). The human TRIP6 gene encodes a LIM domain protein and maps to chromosome 7q22, a region associated with tumorigenesis. *Genomics* **49**, 314-316

Zhong H., Voll R.E. and Ghosh. S. (1998). Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol. Cell* **1**, 661-71

7. Veröffentlichungen

Rasche A., Neumann T., **Raschta A.S.**, Neumann A., Heining E., Kastner J., Witzgall R. (2009a). **The LIM-homeodomain transcription factor LMX1B regulates expression of NF-kappa B target genes.** *Exp. Cell Res.* **315**, 76-96

Suleiman H., Heudobler D., **Raschta A.S.**, Zhao Y., zhao Q., Hertting I., Vitzthum H., Moeller M.J., Holzmann L.B., Rachel R., Johnson R., Westphal H., Rasche A. and Witzgall R. (2007). **The podocyte-specific inactivation of Lmx1b, Ldb1 and E2a yields new insight into transcriptional network in podocytes.** *Dev. Biol.* **304**, 701-12

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anne-Sarah Raschta
geboren am: 21.04.1979 in Straubing
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1986 - 1990 Grundschule Straubing

1990 - 1998 Ludwigsgymnasium in Straubing (Bayern)
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

Universität Regensburg

1998 - 2005 Studium der Biologie und Diplomarbeit mit dem Thema
„Expression und Aufreinigung der katalytischen Bindungsdomäne
der Byr2 Proteinkinase aus *Schizosaccharomyces pombe*“ unter
der Betreuung von Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer, Lehrstuhl für
Biophysik und physikalische Biochemie

Promotion

Universität Regensburg

Seit Februar 2006 Promotion mit dem Thema
„Molekulare Mechanismen der Regulierung der Expression von
NF-κB-Zielgenen durch den LIM-Homöodomäne Transkriptions-
faktor 1 Beta“ unter der Betreuung von Prof. Dr. R. Witzgall,
Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Anne-Sarah Raschta, geboren am 21.04.1979 in Straubing, an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Molekulare Mechanismen der Regulierung der Expression von NF-κB-Zielgenen durch den LIM-Homöodomäne Transkriptionsfaktor 1 Beta“

von mir selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet wurden.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Regensburg, November 2009

(Anne-Sarah Raschta)

10. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralph Witzgall für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Überlassung dieses Themas bedanken.

Auch Herrn Prof. Dr. Richard Warth gilt mein Dank für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Anne Raschle für die Betreuung, sowohl für ihre fachliche als auch ihre emotionale Unterstützung. Durch konstruktive Kritik und interessante Gespräche hat sie mir in oft schwierigen Situationen weiter geholfen.

Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz möchte ich für die freundliche Bereitstellung des Luminometers seiner Arbeitsgruppe danken.

Bei Carolin Meyer, mit der ich so viel gelacht habe, möchte ich mich ganz herzlich für ihre Freundschaft bedanken, die auch für meine Motivation in kritischen Zeiten äußerst wertvoll war. Jürgen Kastner, Astrid Neumann, Sonja Gürster, Tillmann Burghardt, Helen Hoffmeister, Tanja Neumann, Andreas Klingl und Lissy Besl danke ich sehr für ihre stets aufbauenden Worte, Hilfestellungen und ebenfalls dafür, dass sie immer für positive Stimmung, auch im Labor, gesorgt haben.

Den übrigen Mitgliedern des Lehrstuhls gilt mein Dank für ihr herzliches Interesse an und Hilfe bei meiner Dissertation, was oft nicht nur sehr wichtig, sondern auch moralisch unterstützend war. Trotz allem Arbeitsstress hatte ich dank euch eine schöne Zeit.

Meinen Freunden Julia Albrecht, Nikola Haimerl und Florian Stahl danke ich, dass sie in dieser Zeit mit mir durch dick und dünn gegangen sind und dass sie in jeder Situation Verständnis für mich aufbrachten, auch wenn es manchmal bestimmt nicht einfach war.

Meiner Schwester Carolin, Ihrem Mann Michael und meinem Patenkind Moritz, danke ich sehr für zahlreiche aufbauende Telefonate und das Bewusstsein, dass sie immer für mich da sind.

Bei meinen Eltern möchte ich mich aus tiefen Herzen bedanken, denn ohne deren jahrelange Unterstützung wäre einfach alles nicht möglich gewesen!!