

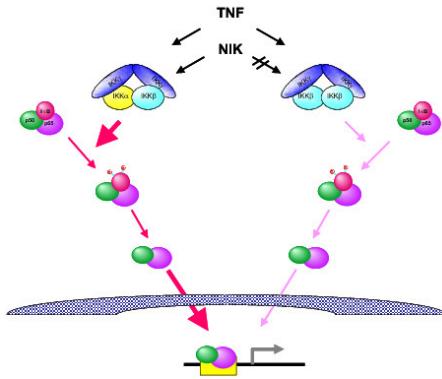


Martina Quirling (Autor)

TNF-vermittelte Signalübertragung - Rolle von IKK-subkomplexen und Charakterisierung der TNF-Toleranz

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

Martina Quirling



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2744>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

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

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

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