

**Die Toll- / IL-1- Rezeptorfamilie:
Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Signaltransduktion von
Interleukin-1, Interleukin-18 und Lipopolysaccharid**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Dipl.Biochem. Stefan Lienenklaus
geboren am 6. März 1971 in Münster

2002

Referent: Prof. Dr. W. Müller
Korreferent: Prof. Dr. M. Martin
Tag der Promotion: 25.04.2002
Datum der Veröffentlichung: Mai 2002

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	IV
Abstract	V
Vorwort	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Lipopolysaccharide sind starke Immunstimulatoren	1
1.2 Interleukin-1	3
1.3 Interleukin-18.....	4
1.4 Die Toll- / IL-1-Rezeptor Superfamilie	5
1.4.1 Der LPS-Rezeptorkomplex	6
1.4.2 Der IL-1-Rezeptorkomplex.....	7
1.4.3 Der IL-18-Rezeptorkomplex.....	7
1.5 Signaltransduktionswege	8
1.5.1 Aktivierung von NFκB und AP-1	8
1.5.2 Unterschiede zwischen den Signalwegen	10
1.5.3 Weitere Signalwege	11
1.6 Hinführung zur Fragestellung	12
1.7 Fragestellung.....	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Verwendete Geräte.....	14
2.2 Materialien und Reagenzien.....	15
2.3 Puffer und Lösungen.....	15
2.4 Bakterienkultur	17
2.4.1 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation.....	18
2.4.2 Plasmidpräparation	18
2.4.3 Quick-check	18
2.5 Molekularbiologische Methoden	19
2.5.1 RNA-Präparation	19
2.5.2 DNA-Präparation	19
2.5.3 Reverse Transkription (RT)	19
2.5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	20
2.5.4.1 Präparative PCR.....	20
2.5.4.2 Semiquantitative PCR.....	21
2.5.5 Ligation	25
2.5.6 Restriktionsanalyse	25
2.5.7 Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung von DNA-Fragmenten	25
2.5.8 Sequenzierung.....	26
2.6 Zellkultur.....	26

2.6.1	Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	27
2.6.1.1	Transfektion durch Kalziumphosphat-Präzipitation	27
2.6.1.2	Transfektion mit DEAE-Dextran	28
2.6.2	Vitalitätsbestimmung	28
2.7	Immunpräzipitation und Westernblot	29
2.7.1	Verwendete Antikörper.....	29
2.7.2	Immunpräzipitation.....	29
2.7.3	SDS Polyacrylamidgelelektrophorese.....	30
2.7.4	Proteintransfer auf PVDF-Membranen.....	30
2.7.5	Immunfärbung.....	30
2.8	FACS-Analyse	31
2.9	Kinaseassay	31
2.9.1	Akt-Kinaseassay	31
2.9.2	JNK-Kinaseassay	32
2.9.3	IRAK-Kinaseassay.....	32
2.10	Gelretardationsassay (EMSA).....	33
2.10.1	Fraktionierung von cytosolischen und nukleären Proteinen	33
2.10.2	Markierung der Oligonukleotid Sonde	34
2.10.3	Bindereaktion und DNA-PAGE	34
2.11	Reportergenassay	35
2.12	Proteinbestimmung nach Bradford	35
2.13	ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay)	35
2.14	Atlas cDNA Expression Array.....	37
3	Ergebnisse I	38
3.1	Modellsysteme	38
3.1.1	Screening von Zellen auf Existenz von mRNA der Rezeptorkomponenten.....	38
3.1.2	NFκB-Aktivierung im Gelshift.....	39
3.1.3	Reaktionen von Zelllinien auf IL-1, IL-18 und LPS.....	40
3.2	Rekonstitution der Rezeptorkomplexe.....	47
3.2.1	Im transienten Überexpressionsexperiment.....	47
3.2.1.1	Überexpression von IL-18-Rezeptorkomponenten in EL4 6.1	47
3.2.1.2	Überexpression von LPS-Rezeptorkomponenten in EL4 6.1	48
3.2.1.3	Überexpression von LPS-Rezeptorkomponenten in 70Z/3	49
3.2.1.4	Überexpression von IL-18-Rezeptorkomponenten in L929	50
3.2.2	Versuch der Herstellung einer triple-responsiven Zelllinie	50
3.2.2.1	Klonierung von pFLIL-1Rrp+ und pFLAcPL+	51
3.2.2.2	Untersuchung der Klone	51
3.3	Vergleich von Geninduktionsprofilen mit cDNA Arrays	53
3.3.1	Einfluss experimenteller Abweichungen vom Herstellerprotokoll.....	53
3.3.1.1	RNA-Präparation und DNase-Verdau	53

3.3.1.2	Reverse Transkription	54
3.3.2	Überprüfung der Arraydaten durch semiquantitative RT-PCR	54
3.3.3	Geninduktionsprofil von Swiss 3T3	56
3.3.3.1	Überprüfung der Daten in der RT-PCR	58
3.3.3.2	Geninduktionsprofil von Swiss 3T3 nach 22 Stunden Stimulation	60
3.3.3.3	Zusammenfassung	62
3.3.4	Geninduktionsprofil von EL4 6.1 nach 2 Stunden Stimulation	62
4	Ergebnisse II	64
4.1	IRAK ⁻ : Ein zelluläres System ohne IRAK-1	64
4.2	Reaktionen von IRAK ⁻ auf IL-1, IL-18 und LPS	65
4.3	IRAK ⁻ exprimiert eine IRAK-Deletionsmutante	66
4.4	Klonierung der IRAK-Deletionsmutante aus IRAK ⁻	67
4.5	Charakterisierung der IRAK-Deletionsmutante aus IRAK ⁻	70
4.5.1	Enzymatische Aktivität	70
4.5.2	Wechselwirkungen mit anderen Komponenten des Signalweges	70
4.5.2.1	Wechselwirkung mit TRAF6	71
4.5.2.2	Wechselwirkung mit MyD88	72
4.5.2.3	Wechselwirkung mit Tollip	73
4.5.2.4	Dimerisierung der IRAK	74
4.5.3	Einfluss überexprimierter mIRAK ⁻ auf die Signaltransduktion	74
5	Diskussion	77
5.1	Regulationen auf der Rezeptorebene	77
5.1.1	Rezeptorexpression von Zelllinien	77
5.1.2	NFκB-Aktivierung	79
5.1.2.1	Rezeptor-mRNA und Aktivierbarkeit von NFκB	79
5.1.2.2	Kinetische Unterschiede	80
5.1.3	Rekonstitution von Rezeptorkomplexen	81
5.2	Intrazelluläre Signaltransduktion	82
5.2.1	Einzelne Signalkaskadenkomponenten	82
5.2.2	Genexpressionsanalyse	83
5.2.2.1	Arrayuntersuchungen bergen Probleme	84
5.2.3	Fazit	85
5.3	IRAK ⁻ als Modellsystem ohne funktionelle IRAK-1	87
5.3.1	Die IRAK-1-Deletionsmutante in der Signaltransduktion	87
5.3.2	Unterschiede zwischen muriner und humaner IRAK-1	88
5.3.3	IRAK ⁻ exprimiert kein kinaseaktives Mitglied der IRAK-Familie	89
5.3.4	Fazit	91
6	Literaturverzeichnis	92
	Anhang	103

Zusammenfassung

Voraussetzungen für eine effektive Bekämpfung von Mikroorganismen sind die schnelle Erkennung einer Infektion sowie die erregerangepasste, koordinierte Reaktion durch den infizierten Organismus. Sowohl die Erkennung eingedrungener Mikroorganismen, z. B. bei Gram-negativen Bakterien über deren Membranbestandteil Lipopolysaccharid (LPS), als auch die Koordination der Immunantwort, z. B. durch die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-18 (IL-18), erfolgen über Rezeptoren der Toll- / IL-1-Rezeptor (TIR)-Familie. Diese besitzen ein gemeinsames homologes Signalelement (TIR-Domäne), durch das gemeinsame intrazelluläre Signalelemente aktiviert werden.

In dieser Arbeit wurden in verschiedenen Zelllinien die Expression von Toll- / IL-1-Rezeptoren untersucht und die Aktivierung prototypischer Signaltransduktionselemente durch IL-1, IL-18 und LPS miteinander verglichen. Ziel war es, Mechanismen aufzuklären, welche dem Organismus die für die Koordination einer angemessenen Immunantwort notwendige Unterscheidung der verschiedenen Stimuli erlauben.

Interessanterweise wurde trotz umfangreicher Analyse keine Zelllinie identifiziert, die auf alle drei Stimuli gleichzeitig reagierte. Auch die Herstellung einer stabilen triple-responsiven Linie gelang nicht, ein möglicher Hinweis darauf, dass eine solche Situation in der Natur nicht vorgesehen ist.

Die durch IL-1, IL-18 und LPS ausgelösten, intrazellulären Signalkaskaden unterscheiden sich in den untersuchten Zellsystemen praktisch nicht voneinander. Weder bei einer mit 1176 Genen breit angelegten Genexpressionsanalyse noch bei der direkten Untersuchung einzelner Signalkaskadenkomponenten wurden messbare Differenzen zwischen den unterschiedlich stimulierten Zellen gefunden. Dazu wurden zentrale Elemente der TIR vermittelten Signaltransduktion wie der Transkriptionsfaktor NF κ B und die Kinasen JNK, Akt und IRAK-1 analysiert.

Die IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase (IRAK-1) ist maßgeblich an der Signaltransduktion aller drei Stimuli beteiligt. Eine wichtige Frage ist, ob es neben IRAK-1 abhängigen Signalwegen auch IRAK-1 unabhängige Wege gibt und ob diese durch die Stimuli in gleichem Ausmaß aktiviert werden. Die Herstellung einer embryonalen Fibroblastenlinie aus einer IRAK-1 *knockout*-Maus eröffnete die Möglichkeit zur Untersuchung IRAK-1 unabhängiger Signalkomponenten. Unterschiede zwischen IL-1 und LPS aktivierten Signalwegen wurden aber auch in dieser Situation nicht deutlich.

Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die Differenzierung zwischen den verschiedenen Stimuli in den hier untersuchten Zellen primär über die Regulation der Rezeptorexpression erfolgt.

Auf der Rezeptorebene konnten gleich mehrere regulatorische Effekte aufgezeigt werden:

Verschiedene Zellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Rezeptorexpression voneinander und können nur auf einzelne der Stimuli reagieren.

Die Zellen können die Sensitivität gegenüber den Stimuli über die Expression einzelner Komponenten der komplex zusammengesetzten Rezeptoren regulieren.

Weiterhin konnte in einer Zelllinie ein kinetischer Effekt der Rezeptorkomponentenexpression auf die Aktivierung der Signalkaskade beobachtet werden.

Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit ist die Feststellung, dass die Antworten auf IL-1, IL-18 und LPS im Organismus hauptsächlich über differentielle Rezeptorexpression verschiedener Zellen und weniger über Unterschiede in der intrazellulären Signaltransduktion reguliert werden.

Schlagerworte: Toll- / IL-1-Rezeptor, IRAK, Signaltransduktion

Abstract

The prerequisites for an organism to effectively combat a microbial infection are the rapid recognition of and the specific, coordinated immune response to this infection. Both the recognition of the invaded microorganisms, e.g. of gram-negative bacteria through their membrane component lipopolysaccharide (LPS), as well as the coordination of the immune response, e.g. through the proinflammatory cytokines interleukin-1 (IL-1) and interleukin-18 (IL-18), occur via receptors of the Toll / IL-1 (TIR)-family. These possess a common homologous signaling element (TIR-domain), which is responsible for the activation of shared intracellular signals.

In this work the expression of Toll / IL-1 receptors was examined in different cell lines and the activation of prototypical signal transduction elements by IL-1, IL-18 and LPS were compared. The purpose of this work was to elucidate the mechanism that is responsible for the differentiation of the various stimuli, which allows the organism to coordinate the appropriate immune response.

Intriguingly however, in spite of extensive investigation, no cell line was identified, which simultaneously responded to all three stimuli. Also, the creation of a stable triple-responsive cell line did not succeed, a possible indication that such a situation was not intended in nature.

The intracellular signalling cascades, which are initiated by IL-1, IL-18 and LPS practically do not differ from one another in the investigated cell lines. No measurable differences between variously stimulated cells were found in a broad gene expression analysis. The same result was obtained from the direct investigation of pivotal signal cascade components of the TIR-mediated signaltransduction like the transcription factor NF κ B and the kinases JNK, Akt and IRAK-1.

The IL-1 receptor associated kinase (IRAK-1) plays a significant role in the signal transduction of all three stimuli. An important question is whether there are IRAK-1-independent signalling cascades and whether these are activated by these stimuli to the same extent. The creation of an embryonic fibroblast line from an IRAK-1 knockout mouse provided an opportunity to investigate IRAK-1-independent signalling components. However, again no differences between signalling pathways initiated by IL-1 and LPS became evident in this situation.

It is therefore assumed that the differentiation between the various stimuli in the cells examined takes place primarily via the regulation of the receptor expression. At the receptor level several regulatory effects could be shown:

The examined cells differ from one another with respect to receptor expression and thus they react to different of the mentioned stimuli.

The expression of the different receptor components of all three receptors influences the sensitivity of the cells towards the stimuli.

In addition, a kinetic effect of the expression of receptor components on the activation of the signalling cascade was observed in one cell line.

The most important result of this work is the determination that in the organism the response to IL-1, IL-18 and LPS is mainly regulated via differences in receptor expression of the various cells and less by variations in the intracellular signal transduction.

Key words: Toll / IL-1 receptor, IRAK, signal transduction

Vorwort

An dieser Stelle möchte ich all diejenigen erwähnen, die auf verschiedene Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich Prof. Dr. K. Resch, der mir als Leiter des Instituts für Pharmakologie die Durchführung dieser Dissertation ermöglicht hat.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. M. Martin für die Betreuung dieser Arbeit sowie für viele wertvolle Anregungen und hilfreiche Ideen.

Prof. Dr. W. Müller danke ich für die Übernahme des Referats und für die immer freundliche Unterstützung bei vielen Fragen im Studium.

Meinen Kollegen Christian Kollwe, Anne Mackensen, Detlef Neumann, Johannes Knop, Renate Schottmann, Anna Bauer und Christa Urban möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima im Labor danken. Dieser Dank gilt auch vielen Mitgliedern der anderen Arbeitsgruppen des Instituts.

Für die geduldige Hilfe bei der Auswertung der Arraydaten bedanke ich mich bei Dr. J. Lauber, Dr. B. Beutler, Dr. J. E. Sims, Dr. Z. Cao, Dr. F. Stelter, Dr. D. Boraschi und Dr. H. Wesche danke ich für zahlreiche nützliche Reagentien.

Herzlich danken möchte ich auch Christian für die unermüdliche Suche nach dem Sinn des Satzes, Bettina für die Farbe und Svenja für die englischen Worte.

Allen meinen Freunden danke ich für den nötigen Ausgleich neben der Arbeit. Ein besonderer Dank geht an Melanie – für so vieles.....

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für die langjährige, vielfältige Unterstützung.

Abkürzungsverzeichnis

AcPL	AcP artig (AcP <i>like</i>)
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Aktivierendes Protein 1
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serumalbumin
CMV	Cytomegalo Virus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
ECL	Verstärkte Chemolumineszenz (<i>enhanced chemolumineszenz</i>)
ECSIT	<i>evolutionary conserved signaling intermediate in Toll pathways</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionsassay (<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>)
EMSA	Gelretardationsassay (<i>electromobility shift assay</i>)
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zell Scanner
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
GST	Glutathion-S-Transferase
HBS	Hepes gepufferte Salzlösung (<i>hepes buffered saline</i>)
Hepes	4-(2-Hydroxymethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	Peroxidase aus Meerrettich (<i>horseradish peroxidase</i>)
I κ B	Inhibitor κ B
ICAM	Zelladhäsionsmolekül (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
ICE	Interleukin-1 β konvertierendes Enzym (<i>IL-1β converting enzyme</i>)
Ifn	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B Kinase
IL	Interneukin
IL-18BP	IL-18 Bindeprotein
IL-1R	IL-1-Rezeptor
IL-1Ra	IL-1-Rezeptorantagonist
IL-1RrP	IL-1-Rezeptor ähnliches Protein (<i>IL-1 receptor related protein</i>)
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP	Immunpräzipitation

JNK	cJun N-terminale Kinase
kD	Kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani Medium
LBP	LPS bindendes Protein
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
LPS	Lipopolysaccharid
Mal	MyD88- <i>adaptor-like</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP	(<i>monocyte chemoattractant protein</i>)
MIF	(<i>macrophage migration inhibitory factor</i>)
MW	Molekulargewicht
NFκB	Kernfaktor κB (<i>nuclear factor κB</i>)
NIK	NFκB induzierende Kinase
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	Einheit optischer Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI3-K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RLU	Relative Lichteinheiten (<i>relative light units</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (mRNA: <i>messenger RNA</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR aus revers transkribierter RNA
SAPK	Streß-aktivierte Proteinkinase
TAB2	TAK1 bindendes Protein 2
TAK1	TGF-β-aktivierte Kinase 1
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
TIR	Toll- / IL-1-Rezeptor Homologiedomäne
TIRAP	TIR <i>domain-containing adapter protein</i>
TLR	Toll-artiger Rezeptor (<i>Toll like receptor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tollip	mit Toll interagierendes Protein
TRAF	TNF Rezeptor assoziierter Faktor
TRIKA	TRAF6-regulierter IKK Aktivator
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (<i>vascular cell adhesion molecule</i>)

1 Einleitung

Unser Körper wird täglich mit einer Unmenge an Mikroorganismen konfrontiert. Es ist die Aufgabe des Immunsystems, die Ausbreitung eindringender Mikroorganismen zu unterbinden und sie unschädlich zu machen. Durch Mechanismen der angeborenen Immunität werden Pathogene entweder direkt beseitigt oder ihre Verbreitung eingedämmt und eine adaptive Immunantwort ausgelöst. Neben Komplementfaktoren, die eine Vielzahl von Erregern direkt töten können, kommt den gewebsständigen Makrophagen eine Schlüsselrolle zu. Über spezifische Rezeptoren erkennen sie Pathogenstrukturen wie Lipopolysaccharid (LPS), Lipoproteine, Glykolipide, Flagellin und bakterielle DNA und werden durch diese aktiviert. Durch Phagozytose können sie so erkannte, eindringende Erreger zerstören. Gleichzeitig werden u. a. durch aktivierte Makrophagen eine Reihe von Zytokinen freigesetzt, die die anschließenden Phasen der Immunantwort auslösen und regulatorisch beeinflussen. Dies sind z.B. die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) mit vielfältigen lokalen und systemischen Wirkungen. Dem ebenfalls von aktivierten Makrophagen freigesetzten IL-18 kommt bei der Differenzierung der T-Zellen und damit bei der Entscheidung, ob eine Immunreaktion zell- oder antikörpervermittelt abläuft, eine wichtige Funktion zu. Durch das Zusammenspiel dieser und weiterer Mechanismen wird die Immunreaktion auf die Art des Erregers und die Schwere der Infektion abgestimmt.

Funktionsstörungen in diesem komplexen System können Krankheitsverläufe negativ beeinflussen oder sogar Krankheiten verursachen.

1.1 Lipopolysaccharide sind starke Immunstimulatoren

Die ursprünglich als Endotoxin bezeichneten Lipopolysaccharide, essentielle Bestandteile der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien[1] lösen im höheren Organismus verschiedene Reaktionen aus, die von der Stimulation der angeborenen Immunität bis hin zum septischen Schock reichen.

Chemisch betrachtet bestehen Lipopolysaccharide aus einer hydrophoben Region - dem Lipoid A, über das sie in der Bakterienmembran verankert sind - und einem kovalent gebundenen hydrophoben Poly- oder Oligosaccharidanteil. Letzterer setzt sich aus einer an das Lipoid A gebundenen Kernregion und einer O-spezifischen Kette zusammen. Besonders die O-spezifischen Ketten weisen zwischen verschiedenen Spezies eine starke Heterogenität auf. Die extrem unterschiedliche endotoxische Wirksamkeit der LPS verschiedener Bakterien-spezies ist auf Strukturunterschiede im Lipoid A zurückzuführen, welches als die endotoxisch wirksame Struktur identifiziert wurde[1, 2]. Zu den endotoxisch besonders aktiven Formen gehört das LPS aus *Escherichia coli*.

LPS wirkt auf viele verschiedene Zielzellen. Die empfindlichsten Reaktionen zeigen jedoch mononukleäre Zellen. Schon eine Konzentration von 1-10 pg/ml LPS führt in Vollblut zur Aktivierung von Monozyten und damit zur Freisetzung eines großen Spektrums an Zytokinen und Entzündungsmediatoren, (s. Tabelle 1) darunter u.a. IL-1 und IL-18 (s.u.).

Einen großen Einfluss auf die LPS-Sensitivität haben LBP (LPS binding protein)[3, 4] und CD14[5].

LBP, ein 65 kD Glykoprotein, wird u. a. von Hepatozyten sezerniert. Bei Infektionen wird die Serumkonzentration dieses Akut-Phase-Proteins um den Faktor 10-100 erhöht. In vitro transferiert LBP LPS-Monomere aus Aggregaten auf CD14. Blut aus LBP^{-/-}-Mäusen[6] reagiert erst auf LPS-Konzentrationen, die um den Faktor 1000 höher liegen als sie bei LBP^{+/-}-Mäusen nötig sind. Dieser Effekt betrifft auch Leukozyten-Zellkulturen. Erst nach Zugabe von LBP-haltigem Serum reagieren die Zellen auf niedrige LPS-Konzentrationen. LBP^{-/-}-Mäuse zeigen auf LPS-Gabe jedoch annähernd gleiche Reaktionen wie die LBP^{+/-}-Mäuse. Im Gewebe könnte LPS entweder durch ein anderes Protein auf CD14 übertragen werden, oder eine hohe lokale Konzentration an löslichem CD14 macht den Transfer durch LBP überflüssig.

Wie durch die Zugabe von LBP kann auch durch die Überexpression von CD14 eine erhöhte LPS-Sensitivität erzeugt werden[7]. Dies gilt nicht nur für die Maus, sondern auch für stabil transfizierte Zelllinien[8, 9]. CD14 ist, wie die CD14^{-/-}-Maus zeigt, für die meisten LPS-Wirkungen notwendig. Erst durch hohe LPS-Konzentrationen wird in der CD14^{-/-}-Maus die TNF α und die IL-6 Freisetzung induziert.

CD14 ist ein 55 kD Glykoprotein mit einer hochaffinen Bindungsstelle für Lipid A. Es ist hauptsächlich auf mononukleären Phagozyten exprimiert. CD14 ist über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker an die Membran gebunden. Weiter zeichnet es sich durch 10 LLRs (leucin-rich repeats) aus. Es gibt drei lösliche Formen von CD14, die in einer Gesamtkonzentration von 6 bis 10 $\mu\text{g/ml}$ im Serum vorliegen.

Durch lösliches CD14 wird die Sensitivität von Zellen, die selbst wenig CD14 exprimieren, erhöht. Gleichzeitig überträgt lösliches CD14 LPS von Monozyten auf Plasma-Lipoproteine und nimmt so Anteil an der Regulation des Entzündungsgeschehens[10].

(Übersicht in[11] und[12])

Die Initiation der LPS-Signaltransduktion erfolgt über den *Toll-like* Rezeptor 4 (TLR4) (s. 1.4)[13, 14].

Lipidmediatoren	Reduzierte Sauerstoffspezies	Zytokine / Chemokine
Prostaglandin E2 Thromboxan A2 Leukotrien C4	Superoxid-Anion: O ₂ ⁻	TNF α , MIF, IL-1 β , IL-6, LIF, IL-15, IL-12, IL-18, IL-8, MCP-1, MCP-3,
Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)	Hydroxyl-Radikal: $\cdot\text{OH}$ Stickstoffmonoxid: NO	M-CSF, G-CSF, GM-CSF, IL-10, TGF β

Tabelle 1: Durch LPS induzierte Entzündungsmediatoren (nach[11]).

1.2 Interleukin-1

Interleukin-1 (IL-1 α und IL-1 β) ist ein proinflammatorisches Zytokin mit vielfältigen Wirkungen. Entdeckt als Kostimulus für T-Zellen[15, 16], weiß man heute von der zentralen Funktion von IL-1 in der Auslösung sowie der Regulation von Entzündungs- und anderen Immunreaktionen.

Zu der IL-1 Genfamilie gehört neben den agonistisch wirkenden IL-1 α und IL-1 β auch der IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1Ra). Vermutlich sind sie durch Duplikationen aus einem gemeinsamen Vorläufergen entstanden (Übersicht in[17]).

IL-1 α und IL-1 β werden als 31 kD Vorläuferproteine ohne *leader*-Sequenz synthetisiert[18, 19]. Die Spaltung in die „reifen“ Formen erfolgt durch spezifische Proteasen.

ProIL-1 α ist auch als Vorläuferprotein biologisch aktiv und verbleibt normalerweise im Zytosol. Sterbende Zellen setzen proIL-1 α frei, welches dann durch extrazelluläre Proteasen gespalten wird. IL-1 α kann aber auch nach Spaltung von proIL-1 α durch die kalzium-abhängige Cystein-Protease Calpain aus lebenden Zellen in den Extrazellulärraum freigesetzt werden[20, 21]. Es existiert auch eine membranständige Form von proIL-1 α . Ein Teil des intrazellulären proIL-1 α wird myristinyliert[22] und kann dann in der Zellmembran verankert werden[23], wo es biologisch aktiv ist.

Im Gegensatz zu IL-1 α ist IL-1 β nur in der „reifen“ Form biologisch aktiv[24]. Zur Freisetzung wird es durch ICE (interleukin-1 β converting enzyme)[25] proteolytisch gespalten. Eine membranständige Form existiert nicht. Die biologischen Wirkungen der beiden IL-1 Formen sind sehr ähnlich. Unterschiede finden sich bei der Regulation der Expression sowie der Regulation der Wirkung nach der Freisetzung durch antagonistische Moleküle. So binden die nicht signalweiterleitenden löslichen sowie membranständigen Typ II IL-1-Rezeptoren IL-1 β mit höherer Affinität als IL-1 α .

IL-1Ra wird im Gegensatz zu IL-1 α und IL-1 β mit Leadersequenz synthetisiert und als glykosyliertes 22 kD Protein sezerniert[26, 27]. Es konkurriert mit IL-1 α und IL-1 β um die Rezeptoren, vermittelt jedoch keine agonistischen Wirkungen. Als natürlicher Rezeptor-antagonist ist IL-1Ra damit ein wichtiger Regulator IL-1 induzierter Effekte.

Die Produktion von IL-1 wird durch fast alle Pathogene und deren Produkte direkt oder indirekt – über Antikörperkomplexe und Komplementfaktoren – ausgelöst. Auch Zytokine wie TNF, IFN und IL-1 selbst induzieren die IL-1 Synthese. Eine Vielzahl weiterer IL-1 Induktoren ist in[17] aufgelistet. Die Produktion von IL-1 erfolgt hauptsächlich durch Monozyten und Makrophagen. Neben diesen Zellen sind aber auch viele weitere Zelltypen in der Lage IL-1 zu synthetisieren, darunter dendritische Zellen, Astrozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und T-Zellen.

Die Funktion von IL-1 besteht in der Organisation von Immun- und Entzündungsreaktionen. Dies wird an der großen Zahl an Zielzellen, in denen die unterschiedlichsten Reaktionen ausgelöst werden, deutlich.

IL-1 fungiert als Kostimulus bei der Aktivierung von T-Zellen, indem es sowohl die Sekretion von IL-2 als auch die Expression des IL-2 Rezeptors induziert (Übersicht in[28]). B-Zellen werden durch IL-1 zur Antikörperproduktion angeregt[29]. IL-1 wirkt selbst chemotaktisch und induziert weitere chemotaktische Zytokine wie IL-8[30]. Gefäßendothelzellen werden zur Expression von Adhäsionsmolekülen angeregt[31], wodurch Leukozyten und Monozyten festgehalten werden, die dann das entzündete Gewebe infiltrieren können[32]. Dies wird durch die ebenfalls IL-1 induzierte Freisetzung von Proteasen, Kollagenasen und Hyaluronidasen erleichtert, die die Gefäß- und Gewebeporosität erhöhen. Durch die Induktion der Synthese von Gerinnungsfaktoren sowie einer proliferativen Wirkung auf Fibroblasten[33] fördert IL-1 die Wundheilung.

IL-1 induziert weiterhin die Enzyme iNOS, Cyclooxygenase 2 und Phospholipase A₂. Ihre Produkte NO, Prostaglandine und Leukotriene sind weitere potente Entzündungsmediatoren. So ist Prostaglandin E₂ (PGE₂) für Entzündungssymptome wie Fieber[34] und Schmerzen verantwortlich. Auch an der Induktion der Proteolyse im Muskel ist PGE₂ beteiligt[35]. Hierdurch werden Aminosäuren für die IL-6 induzierte Synthese der Akut-Phase Proteine in der Leber bereitgestellt[36]. IL-6 wird ebenfalls durch IL-1 induziert.

Durch die Induktion von Kolonie stimulierenden Faktoren (CSFs) greift IL-1 in die Hämatopoese ein und fördert die Reifung von Leukozytenvorläufern, die dann als Nachschub in der Entzündungsreaktion zur Verfügung stehen[37, 38].

IL-1 vermittelt seine Wirkung über spezifische, membranständige Rezeptoren (s. 1.4).

1.3 Interleukin-18

(Übersicht in[39-41])

Interleukin-18 wurde zuerst als Interferon γ induzierender Faktor (IGIF) beschrieben[42]. Nach der Klonierung[43-45] wurde aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit zu IL-1 auch IL-1 γ als Name vorgeschlagen. IL-18 wird wie IL-1 β mit einer unkonventionellen Leadersequenz synthetisiert. Das nicht glykosylierte 24 kD Vorläuferprotein wird durch ICE in die aktive, 18 kD große Form gespalten[46, 47]. Eine Strukturvorhersage ergibt wie für IL-1 eine Faserstruktur aus 12 β -Faltblättern[48]. Im Gegensatz zu IL-1 ist IL-18 spezies-spezifisch.

IL-18 wird durch eine Vielzahl von Zelltypen produziert. Darunter sind Makrophagen, dendritische Zellen[49], Kupffersche Sternzellen[50], Astrozyten, Mikrogliazellen[51], Epithelzellen[52], Keratinozyten[53] und Osteoblasten[54]. Die IL-18 Freisetzung erfolgt im allgemeinen nach bakteriellen[55] und viralen Infektionen[56].

IL-18 kann TNF α , IL-1 β , CXC- und CC-Chemokine, Fas-Ligand als auch die Translokation von NF κ B induzieren[57-59] und wird daher in die Gruppe der proinflammatorischen Zytokine eingeordnet. Die prominenteste Funktion von IL-18 ist aber die Induktion von IFN γ . In Kombination mit IL-12 regt IL-18 NK-Zellen, T-Zellen[60] sowie aktivierte Makrophagen[61] und B-Zellen[62] zur Produktion von IFN γ an. Viele weitere Wirkungen von IL-18 werden durch das induzierte IFN γ ergänzt bzw. vermittelt.

NK-Zellen werden durch IL-18 in Kombination mit IL-12 oder IL-2 zur Proliferation angeregt. Sie setzen nach Stimulation große Mengen an IFN γ frei und zeigen eine hohe NK-Aktivität[60]. Durch IL-18 werden sie zur Expression von Fas-Ligand angeregt, wodurch sie in virusinfizierten Zellen und Tumorzellen das Apoptoseprogramm auslösen können. Diese Wirkung hat IL-18 auch auf aktivierte T-Lymphocyten[63]. Die wichtigste Funktion von IFN γ ist die Aktivierung von Makrophagen. Voraktivierte Makrophagen sezernieren nach Stimulation mit IL-18 selbst IFN γ . Über die Aktivierung wichtiger Effektorzellen der angeborenen Immunität kommt IL-18 hier eine große Rolle zu.

Aber auch in der adaptiven Immunantwort greift IL-18 richtungsbestimmend ein. In Kombination mit IL-12 inhibiert es die IgE-Produktion durch Induktion von IFN γ in aktivierten B-Zellen[64].

IL-18 hat auch einen großen Einfluss auf die Entwicklung von T-Helferzellen. Induziertes IFN γ wirkt auf T_{H0}-Zellen und verursacht die Entwicklung zu T_{H1}-Zellen. Diese werden durch IL-18 über die Induktion von IL-2 zur Proliferation angeregt. Gleichzeitig werden T_{H2}-Zellen durch IFN γ inhibiert. IL-18 fördert so die zellvermittelte Immunantwort[65-67].

Untersuchungen in IL-18 *knockout*-Mäusen unterstreichen die kritischen Funktionen von IL-18 für die Aktivierung von NK-Zellen und die Entwicklung einer T_{H1}-Antwort[68].

Neuere Publikationen beschreiben IL-18 auch im Zusammenhang mit der Produktion von T_{H2}-Zytokinen und IgE[69, 70]. Die Funktion von IL-18 in der pro-T_{H1}-Entwicklung scheint jedoch die größere Rolle zu spielen (diskutiert in[71]).

Mit dem IL-18 bindenden Protein (IL-18BP) existiert auch im IL-18-System ein regulatorisch wirkendes Protein[72]. Durch IL-18BP kann wie durch IL-18-Antikörper eine LPS-induzierte IFN γ -Produktion unterbunden werden.

Die Wirkungen von IL-18 werden über einen spezifischen Rezeptor vermittelt (s. 1.4).

1.4 Die Toll- / IL-1-Rezeptor Superfamilie

Die oben beschriebenen Entzündungsmediatoren LPS, IL-1 und IL-18 vermitteln ihre Wirkung über jeweils spezifische Rezeptoren bzw. Rezeptorkomplexe, deren Komponenten aufgrund der gemeinsamen intrazellulären TIR-Domäne (Toll- / IL-1-Rezeptor) zu einer Superfamilie zusammengefasst werden[73].

Extrazellulär unterscheidet sich der LPS-Rezeptor jedoch deutlich vom IL-1- und IL-18-Rezeptor. Er gehört zu einer wachsenden Zahl an Rezeptoren, die aufgrund ihrer Homologie zu *Drosophila* Toll als Toll-artige-Rezeptoren (TLRs) bezeichnet werden.

Das namensgebende Molekül spielt bei der embryonalen Entwicklung[74] aber auch bei der Abwehr von Pilzen[75] in Insekten eine Rolle.

Für ein humanes Homolog, zunächst als hToll – später als hTLR4 – bezeichnet, wurde eine Beteiligung bei der NF κ B-Aktivierung gezeigt[76]. Im murinen System führte die genetische Untersuchung des *LPS*-Lokus des LPS insensitiven Mausinzuchtstammes C3H/HeJ zur Identifizierung eines murinen Toll-Homologs (mTLR4) als das für den Phänotypen verantwortliche Gen[77]. Auch in dem ebenfalls LPS-insensitiven Inzuchtstamm C57BL/10ScCr ist

eine Mutation in diesem Gen für den Phenotypen ursächlich[13]. TLR4 gilt heute als der LPS-Rezeptor.

Durch Homologieklonierungen sind inzwischen zehn funktionelle Toll-artige Rezeptoren bekannt. Sie bilden ein Sensorsystem, das eine ganze Reihe bakterieller Bestandteile aber auch körpereigene Proteine, die im Rahmen einer Infektion frei werden, erkennt. Darunter sind neben bakteriellen Membranbestandteilen auch bakterielle DNA, Flagellin, Hitzeschockproteine und Fibrinogen. Noch sind jedoch weder die Liganden zu allen TLRs noch die genauen Zusammensetzungen der Rezeptorkomplexe bekannt. Neben der Heterodimerisierung von TLRs spielen weitere Moleküle wichtige Rollen bei der Ligandenbindung. So ist für die durch LPS ausgelöste Signaltransduktion durch TLR4 MD-2 als essentielle Komponente beschrieben. Die Existenz weiterer Korezeptoren stellt die plausibelste Erklärung dafür dar, dass mehrere Liganden ohne gemeinsame Strukturmerkmale denselben TLR aktivieren können. So sind neben LPS auch Taxol[78], HSP60 (heat shock protein 60)[79] und RSV (respiratory syncytial virus) F Protein[80] Agonisten von TLR4.(Übersicht in[81, 82])

1.4.1 Der LPS-Rezeptorkomplex

TLR4 wurde in einer Vielzahl von Studien als zentrale Komponente des LPS-Rezeptorkomplexes beschrieben. Die Expression von TLR4 ist jedoch nicht ausreichend, die LPS-Signaltransduktion zu ermöglichen. TLR4 transfizierte HEK 293 reagieren nicht auf LPS. Experimente, in denen die Expression von TLR2 in HEK 293 eine LPS induzierte NF κ B-Aktivierung ermöglichte, deuteten anfangs auf TLR2 als LPS-Rezeptor[83, 84]. Inzwischen wurde jedoch eine Verunreinigung der LPS-Präparation als Ursache für die Aktivierung der Zellen über TLR2 erkannt[85]. Tatsächlich ist TLR2 Rezeptorbestandteil für eine Reihe bakterieller Bestandteile, darunter bakterielle Lipoproteine, Glycolipide, Peptidoglycan und möglicherweise auch LPS verschiedener grampositiver Bakterien.

Die LPS-induzierte Signaltransduktion durch TLR4 erfordert also weitere Moleküle. Eine wichtige Rolle spielt hier MD-2. HEK 293 Zellen, die mit CD14, TLR4 und MD-2 transfiziert wurden, reagieren auf LPS, und die Bindung von LPS an MD-2 konnte gezeigt werden[86-88]. MD-2 ist extrazellulär mit TLR4 assoziiert und vermittelt also die Aktivierung durch LPS. Für MD-2 wurde inzwischen auch eine Beteiligung an TLR2 vermittelten Signalen gezeigt[89, 90].

Abhängig von der Zellart werden weitere Korezeptoren für LPS vorgeschlagen. So kann der Komplex aus RP105 – einem weiteren Mitglied der Toll-Familie, welches in B-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert wird – und MD-1 in Transfektionsexperimenten die Funktion von MD-2 übernehmen[91, 92].

In Makrophagen ist CD11b/CD18 (Mac-1) für einen Teil der LPS induzierten Effekte verantwortlich[93].

1.4.2 Der IL-1-Rezeptorkomplex

Der IL-1-Rezeptorkomplex besteht aus dem IL-1-Rezeptor Typ I (IL-1RI)[94, 95] und dem IL-1-Rezeptor Akzessorischen Protein (IL-1RAcP)[96]. Nach Bindung von IL-1 an IL-1RI assoziiert IL-1RAcP an den ligandenbesetzten Rezeptor, wodurch die Signaltransduktion ausgelöst wird. Bei der Ausbildung des Komplexes wird gleichzeitig die Bindung des IL-1 stabilisiert. IL-1RAcP allein bindet kein IL-1[97-99].

Neben IL-1RI und IL-1RAcP existiert mit IL-1RII[100] ein weiteres Mitglied der IL-1-Rezeptorfamilie. Wie IL-1RI bindet es IL-1 und assoziiert danach mit IL-1RAcP. Aufgrund der fehlenden intrazellulären TIR-Domäne von IL-1RII wird durch diesen Komplex aber keine Signaltransduktion ausgelöst[101]. IL-1RII übernimmt damit eine regulatorische Funktion[102-105].

Sowohl IL-1RI als auch IL-1RII können durch membranständige Metalloproteasen[106] gespalten werden. Die dann löslich vorliegenden Extrazellularteile können weiterhin IL-1 binden, welches dann für die Initiation der Signaltransduktion nicht mehr zur Verfügung steht. Die große Zahl an Regulationsmechanismen spiegelt die Wichtigkeit der genau eingestellten Wirkung von IL-1 im Organismus wieder.

Extrazellulär bestehen die Mitglieder der IL-1-Rezeptorfamilie aus drei immunglobulinartigen Domänen und werden daher auch der Immunglobulinen-Superfamilie zugeordnet.

1.4.3 Der IL-18-Rezeptorkomplex

Der IL-18-Rezeptorkomplex ist dem IL-1-Rezeptorkomplex sehr ähnlich. Die IL-18 bindende Komponente, das IL-1Rrp (IL-1 Receptor related protein) wurde aufgrund der Homologie zum IL-1R zunächst als orphan-Rezeptor gefunden[59, 107]. Wie im IL-1-Rezeptorsystem existiert ein Korezeptormolekül, das selbst kein IL-18 bindet. Aufgrund der Homologie zum IL-1RAcP wird es als AcPL (accessory protein like) bezeichnet[108]. Auch die IL-18-Rezeptorkomponenten zeichnen sich durch drei extrazelluläre immunglobulinartige Domänen sowie die intrazelluläre TIR Domäne aus. Lösliche IL-18-Rezeptormoleküle sind bislang nicht beschrieben.

1.5 Signaltransduktionswege

Aufgrund der den Rezeptoren für IL-1, IL-18 und LPS gemeinsamen intrazellulären TIR-Domäne wurden gemeinsame intrazelluläre Signalwege für die Induktion von biologischen Effekten angenommen. Tatsächlich werden viele der aus dem IL-1 Signalweg bekannten Komponenten auch durch IL-18 und LPS aktiviert, bzw. haben dominant negative Mutanten der Komponenten Einfluss auf die durch alle drei Stimuli ausgelöste Signaltransduktion.

1.5.1 Aktivierung von NF κ B und AP-1

Die Signaltransduktionskaskade, die durch IL-1, IL-18 und LPS aktiviert werden kann, endet in der Aktivierung der Transkriptionfaktoren NF κ B (nuclear factor κ B) und AP-1 (activator protein-1), die bei der Induktion vieler entzündungsrelevanter Gene eine große Rolle spielen. Sie soll hier näher vorgestellt werden.

Nach der Bindung des Liganden an den Rezeptor kommt es zu einer Aggregation der TIR-Domänen der Rezeptorkomponenten. Diese Aggregation führt zur Rekrutierung des cytoplasmatischen Adapterproteins MyD88[109]. Die Wechselwirkung mit dem Rezeptor erfolgt über die C-terminale TIR-Domäne. Über die N-terminale Todesdomäne (*death domain*) von MyD88 kommt es zur Assoziation der Serin-Threonin-Kinase IRAK-1, die ebenfalls eine Todesdomäne besitzt. In unstimulierten Zellen liegt IRAK-1 an Tollip assoziiert vor. Durch die so erreichte Di- oder Oligomerisierung der IRAK-1 kommt es zu einer starken Auto- und / oder *Cross*phosphorylierung, was im SDS-Gel als Größenshift der IRAK-1 von ~80 auf ~100kD sichtbar wird und zu der Dissoziation von MyD88 führt. IRAK-1 ist dann an der Translokation von TRAF6 und TAB2[110] von der Membran ins Zytosol beteiligt, wo es zur Ausbildung eines IRAK-1-TRAF6-TAB2-TAK1-Komplexes kommt[111, 112]. In diesem Komplex kommt es zur Autophosphorylierung der MAPKKK TAK1[113, 114]. An dieser Aktivierung der TAK1 ist auch TAB1[115] beteiligt, welches als Komplex mit TAK1 und TAB2 als TRIKA2 (TRAF6-regulated IKK activator 2) identifiziert wurde. Zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der IKK (I κ B kinase) wird weiterhin TRIKA1 benötigt, ein Komplex aus Ubc13 und Uev1A, der zusammen mit TRAF6 eine Ubiquitynylierung von TAK1 katalysiert, die zur vollständigen Aktivierung nötig ist[116].

Auch MKK6 wird durch die ubiquitin aktivierte TAK1 phosphoryliert[117].

Neben TAK1 sind mit NIK (NF κ B inducing kinase) und MEKK1 (mitogen-activated protein kinase / ERK kinase kinase-1) zwei weitere MAPKKKs in der Signaltransduktion der Toll- / IL-1-Rezeptoren beschrieben.

MEKK1 ist über das Adapterprotein ECSIT[118] (evolutionary conserved signaling intermediate in Toll pathways) an TRAF6 gekoppelt und ist wie TAK1 in der Lage sowohl NF κ B als auch AP-1 zu aktivieren.

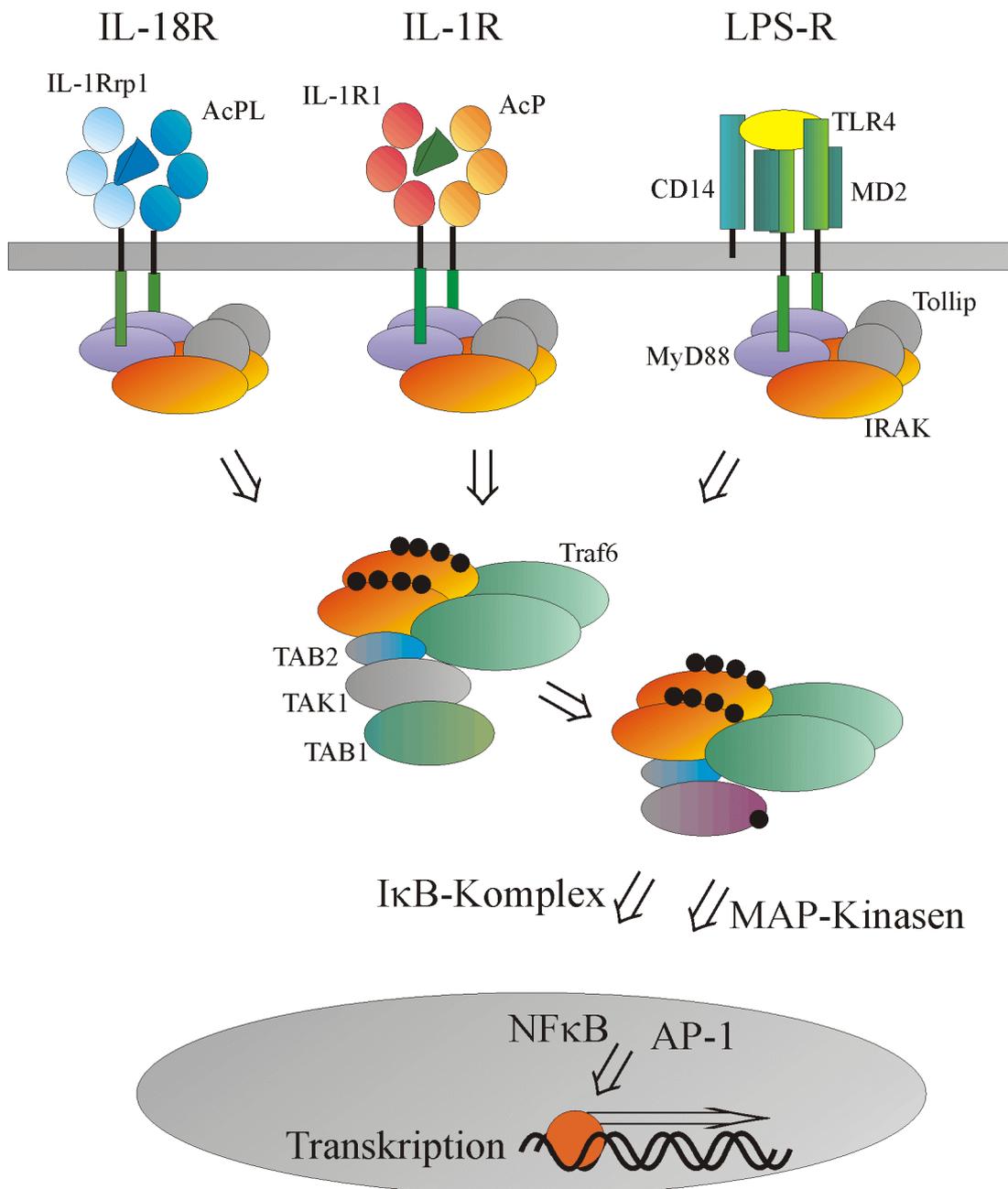


Abb. 1: Modell der Signaltransduktionskaskade, die durch IL-1, IL-18 und LPS aktiviert wird.

Durch Überexpression von NIK[119] wird nur NFκB und nicht AP-1 aktiviert[120]. Die Bedeutung von NIK in der IL-1 induzierten Signaltransduktion ist inzwischen fraglich, da die NFκB-Aktivierung durch IL-1 in NIK^{-/-}-Zellen nicht beeinflusst ist[121].

Durch die aktivierten MAPKKK kommt es zur Aktivierung von IKK-Komplexen, dadurch zur Phosphorylierung und folgenden Ubiquitinylierung von IκB, welches dann abgebaut wird. Dadurch wird das im Komplex mit IκB vorliegende NFκB frei, transloziert in den Zellkern und aktiviert die Transkription entsprechender Gene (Übersicht in[122]).

Außerdem aktivieren die MAPKKK die MAPKK, die wiederum die MAPK aktivieren. Zu den MAPK (mitogen aktivated protein kinases) zählen die ERK (extrazellulär signal-related kinases), die JNK (Jun amino-terminal kinases) sowie die p38 Proteine. Besonders JNK und

p38 kommen in der Regulation von AP-1 wichtige Rollen zu. Sie phosphorylieren c-Jun und ATF-2 und induzieren die Expression von jun und fos Genen (Übersicht in[123]).

Die Bedeutung einiger zentraler Komponenten für die Signaltransduktion wurde durch *knock-out*-Experimente unterstrichen. So sind viele sonst durch IL-1, IL-18 bzw. LPS ausgelöste Effekte in MyD88^{-/-}-Mäusen nicht zu finden[124, 125]. Für die TRAF6^{-/-}-Maus sind schwere Defekte in der IL-1 und LPS induzierten Signaltransduktion beschrieben[126]. Und in IRAK-1 *knockout* Mäusen sind die durch die drei Stimuli ausgelösten Effekte reduziert[127-130]. Möglicherweise können die Funktionen der IRAK-1 zumindest teilweise durch IRAK-2[131] und IRAK-M[132] übernommen werden.

1.5.2 Unterschiede zwischen den Signalwegen

Neben vielen Gemeinsamkeiten der IL-1, IL-18 bzw. LPS induzierten Signaltransduktion sind auch Unterschiede bekannt.

LPS, aber nicht IL-1, stimuliert murine (nicht humane) B-Zellen zur Proliferation. Ebenso werden dendritische Zellen durch LPS, aber nicht durch IL-1 zur Produktion von IL-12 angeregt und LPS induziert deutlich mehr IL-10 als IL-1 es tut[133].

Viele Hinweise auf Unterschiede zwischen den Signaltransduktionskaskaden kommen aus Untersuchungen von MyD88-*knockout* Mäusen. Während alle untersuchten IL-1 und IL-18 induzierten Effekte MyD88 abhängig sind[125], existieren sowohl MyD88 abhängige als auch MyD88 unabhängige Effekte, die durch LPS ausgelöst werden.

Kupffersche Sternzellen aus MyD88^{-/-}-Mäusen sezernieren nach Stimulation mit LPS IL-18, nicht jedoch IL-1 β oder IL-12[134]. Dendritische Zellen werden durch LPS zur Reifung angeregt, nicht jedoch zur Freisetzung von Zytokinen[135].

LPS aktiviert in Makrophagen aus MyD88^{-/-}-Mäusen MAP-Kinasen (p38, JNK, ERK1,2), nicht jedoch IRAK-1[124].

Zwei Gruppen haben mit TIRAP (TIR domain-containing adapter protein)[136] bzw. Mal (MyD88-adapter-like)[137] jüngst ein Molekül beschrieben, das wie MyD88 Adapterfunktionen – allerdings exklusiv an TLR4 – übernimmt.

Über TIRAP/Mal wird die PKR, eine RNA-regulierte Protein Kinase, aktiviert[136]. PKR ist in embryonalen Fibroblasten essentiell für die Aktivierung von p38, JNK, MKK3/6 und MKK4 durch LPS, aber auch für die Aktivierung von p38 und MKK3/6 durch IL-1[138].

TIRAP/Mal wechselwirkt nicht mit IRAK-1, wohl aber mit IRAK-2[137] (Übersicht in[139]). Hier deutet sich ein möglicher Einfluss der IRAK-Familie auf die Differenzierung zwischen IL-1, IL-18 und LPS-Signalen an.

1.5.3 Weitere Signalwege

Für alle drei Stimuli sind zahlreiche weitere Signalkaskadenkomponenten beschrieben, die durch sie aktiviert werden. Oft wurde jedoch die Aktivierung durch nur einen der Stimuli untersucht und die Arbeiten wurden in unterschiedlichen Zellen durchgeführt. Vergleichende Aussagen aufgrund von Literaturdaten sind daher schwierig. Als Modulatoren des „Hauptsignalweges“, die möglicherweise stimulusabhängig aktiviert werden, können diese Signalkaskadenkomponenten jedoch eine große Rolle spielen.

IL-1 aktiviert die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und darüber u.a. die Akt-Kinase oder auch Proteinkinase B (PKB), die bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse eine Rolle spielt (Übersicht in[140]). Die regulatorische Untereinheit p85 der PI3K bindet an den IL-1RI[141-144] und/oder an IL-1RAcP[145], wodurch die katalytische Untereinheit p110 aktiviert wird. Das für die Assoziation an IL-1RI beschriebene SH-2 Bindungsmotiv findet sich weder im IL-18-Rezeptorkomplex noch in TLR4. Dennoch ist sowohl für IL-18 als auch für LPS eine Beteiligung der PI3K an der Signaltransduktion gezeigt (IL-18: [146, 147], LPS: [148, 149]). Die LPS induzierte Aktivierung der PI3K kann durch Inhibition GTP-bindender Proteine der Rho-Familie durch Toxin B blockiert werden[148]. Die Beteiligung kleiner G-Proteine wird auch in der IL-1 Signaltransduktion diskutiert[150].

Wie die PI3K an der Signaltransduktion der IL-1- / Toll-Rezeptoren beteiligt ist, ist nicht endgültig geklärt.

Inhibitorstudien zeigen einen Einfluss auf die Aktivierung von NF κ B und AP-1[143]. Die PI3K abhängige Regulation von NF κ B erfolgt dabei weniger über die I κ B-Degradation, als vielmehr über die Phosphorylierung der NF κ B-Untereinheit p65/RelA[145].

Durch den PI3K-Inhibitor LY294002 wird die IL-18 induzierte Expression der Zelladhäsionsmoleküle E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 auf Endothelzellen reduziert[147]. Interessanterweise hat er in einer anderen Studie keinen Einfluss auf die IL-1 induzierte Expression von E-selektin oder ICAM-1[151]. Weitere Inhibitorstudien zeigen, dass auch Sphingomyelinasen, Proteinkinase C und MAPK die NF κ B abhängige Transkription aktivieren, ohne Einfluss auf den I κ B-Abbau und die DNA-Bindung von NF κ B zu haben[152].

Auch die α -Casein-Kinase CKII phosphoryliert nach Aktivierung durch IL-1 die NF κ B-Untereinheit p65 und kann so an der Regulation der Genexpression beteiligt sein.

Wie NF κ B bezeichnet auch AP-1 DNA-bindende Komplexe, deren Zusammensetzung durchaus variabel ist. Für die Genaktivierung spielt neben der genauen Zusammensetzung ebenfalls die Phosphorylierung der Untereinheiten eine Rolle. Im Zusammenhang mit der Regulation der AP-1 Aktivität sind erneut die MAP-Kinasen zu erwähnen[153], die u. a. durch die PI3K aktiviert werden (s.o.).

Das Zusammenspiel der Signalwege bei der Geninduktion ist komplex und nur teilweise verstanden. Die Vielzahl der Möglichkeiten zur Signalmodulation durch „Nebenwege“ der Signaltransduktionskaskaden ist aber offensichtlich.

1.6 Hinführung zur Fragestellung

Wie unterscheidet der Organismus verschiedene Pathogene? Wie wird die Immunantwort durch Zytokine reguliert? Der Stellenwert dieser Fragen wird besonders deutlich, wenn die optimale Reaktion auf einen Keim nicht gelingt. Bei der Lepra z. B. entscheidet die Art der Immunantwort über Leben und Tod des Erkrankten. Wird eine T_H1 abhängige, inflammatorische Immunantwort ausgelöst, kann der intrazellulär wachsende Erreger eliminiert werden. Wird jedoch eine T_H2 abhängige, humorale Immunantwort ausgelöst, kann der Erreger weiterwachsen, was zu tödlichen Gewebeerstörungen führen kann[154].

Unterschiedliche Pathogenstrukturen und die körpereigenen Zytokine IL-1 und IL-18 werden über Rezeptoren erkannt, deren intrazelluläre Domänen homolog sind. Können die durch diese verschiedenen Stimuli verursachten Signale noch unterschieden werden?

Zwei Prinzipien zur Unterscheidung der Stimuli sind denkbar:

1. Verschiedene Zellen reagieren auf verschiedene Stimuli. Im Extremfall reagiert eine Zellart auf nur einen Stimulus und setzt das Signal in eine Information für andere Zellen um, z.B. durch die Freisetzung eines Zytokins. Die einfachste Möglichkeit diese Selektivität zu erreichen, ist die Expression nur eines Rezeptors.

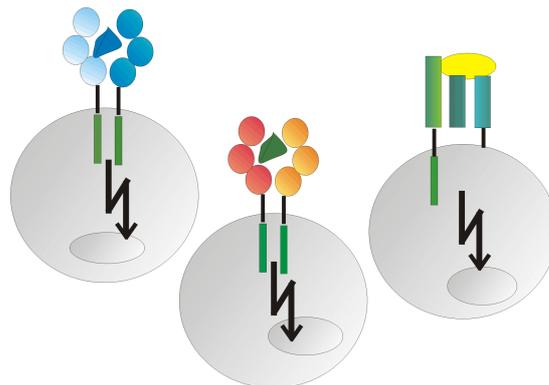


Abb. 2: Verschiedene Zellen reagieren auf verschiedene Stimuli

2. Eine Zelle kann auf mehrere oder alle Stimuli reagieren. Eine Signalunterscheidung muss dann durch Unterschiede in der Signaltransduktion erreicht werden. Neben einem möglichen gemeinsamen Signalweg muss es verschiedene Nebenwege geben.

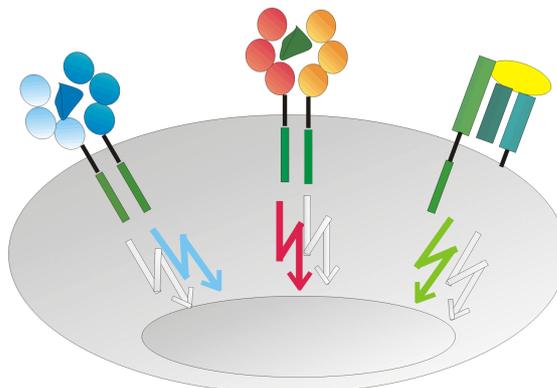


Abb. 3: Eine Zelle reagiert unterschiedlich auf verschiedene Stimuli

1.7 Fragestellung

- Wie wird die Unterscheidung von IL-1, IL-18 und LPS *in vivo* realisiert?
 - Welche Rezeptoren finden sich auf den verschiedenen Zellen?
 - Unterscheiden sich die Signaltransduktionsmechanismen, die durch die Stimuli ausgelöst werden?

Diesen Fragen wurde durch Untersuchungen verschiedener Zelllinien nachgegangen (s. 3)

Hilfreich bei dem Vergleich von weitgehend identischen Signaltransduktionsmechanismen sind Zellen mit natürlichen oder künstlichen Defekten. Wird der Defekt in einem Fall kompensiert, in dem anderen aber nicht, werden Unterschiede deutlich, die sonst möglicherweise in dem Gesamtsignal untergehen.

IRAK-1 ist für alle drei Stimuli als eine an der Signaltransduktion beteiligte Komponente beschrieben. Die Serin-Threonin-Kinase wird unmittelbar nach Stimulation an den Rezeptor rekrutiert und stellt in der Signalkaskade das erste Molekül mit enzymatischer Aktivität dar. Dadurch nimmt IRAK-1 eine zentrale Position in den Signaltransduktionskaskaden ein.

- Unterscheidet sich die Rolle der IRAK-1 in den durch IL-1, IL-18 oder LPS ausgelösten Signaltransduktionskaskaden?
- Hat das Fehlen von IRAK-1 unterschiedliche Einflüsse auf die Signaltransduktionsmechanismen, die durch die Stimuli ausgelöst wird?

IRAK⁻ ist eine Zelllinie aus einer IRAK-1 *knockout*-Maus, die die Voraussetzungen zur Beantwortung der Fragen mitbringt. Sie wurde im Zusammenhang mit den Fragen charakterisiert (s. 4.1).

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte

β-Szintillationszähler	Wallac 1410, Amersham Pharmacia biotech (Freiburg)
Agarosegelkammer	Wide Mini Sub Cell, BioRad (München)
Blotapparatur	Semidry Blotter, SchleicherSchuell (Dassel)
Brutschrank (Zellkultur)	Brutschrank CO ₂ Autozero, Heraeus (Hanau)
Durchflußcytometer	FACScan, Becton Dickinson (Heidelberg)
Elektrophoresekammern	Bio-Rad (München)
FACS	FACScan, Becton Dickinson
Geltrockner	GSD4, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) Maxidry D64, Biometra (Göttingen)
Hybridisierungsöfen	Biometra
Kühlzentrifugen	RT 6000B, Sorvall (Bad Homburg) 3K20 und 6K10, Sigma (Osterode, Harz)
Luminometer	Lumat LB9507, EG&G Berthold (Bad Wilbad)
Mikrotiterplatten-Photometer	MR 6500, Dynatech (Denkendorf)
Netzgeräte	EPS 301 / 1001, Amersham Pharmacia (Freiburg)
Phosphoimager	GS 250, BioRad (München) BAS 1000, BAS 1500 und BAS 2000, Fujifilm
Phosphoimagerplatten	Molecular Imaging Screen, BioRad (München) BAS Imaging Plate, Fujifilm
Schüttelinkubator	Certomat H, B. Braun Biotech International
Sequenzierautomat	ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer (Weiterstadt)
Sonifier	Branson Sonifier 250, Heinemann (Gmünd)
Spektralphotometer	UV-160A, Shimadzu (Hannover)
Sterilwerkbank	LaminAir HB2472, Heraeus (Hanau)
Thermocycler	VarioV, Landgraf (Hannover) Robocycler, Statagene
Thermostat	5320 und 5346, Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	Biofuge pico, Heraeus (Osterode, Harz)
Ultrazentrifugen	TL-100, Beckmann (München)
UV Transluminator	GelDoc 1000 System, BioRad (München)
Zellzentrifuge	RT 6000, DuPont (Bad Homburg)

2.2 Materialien und Reagenzien

DNA modifizierende Enzyme	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA Molekulargewichtsmarker	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Einweg Labormaterialien	Sarstedt (Nümbrecht)
FCS	PAA (Cölbe)
Feinchemikalien	Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Biomol (Hamburg)
Lösemittel	Mallinckrodt Baker (Griesheim), Merck (Darmstadt)
LPS: E. coli 055:B5	Difco Laboratories (Detroit)
Oligonucleotide	MWG-Biotech (Ebersberg), Qiagen (Hilden)
Prot. Molekulargewichtsmarker	Bio-Rad (München), MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
PVDF Membran	Immobilon P, Millipore
Radioaktive Verbindungen	NEN Life Sciences (Frankfurt a.M.)
Röntgenfilme	Biomax MR, Biomax MS, Eastman Kodak (New York)
Steriles Kunststoffmaterial	Nunc (Wiesbaden), Falcon (BD, Heidelberg), Greiner
Zellkulturmedien und Zusätze	GibcoBRL (Eggenstein)

IL-1: Rekombinantes humanes IL-1 β	zur Verfügung gestellt von D. Boraschi (Dompe, L'Aquila, Italien)
IL-18: Rekombinantes murines IL-18	PeptoTech (Rocky Hill, New York)
TNF: Rekombinantes humanes TNF α	BASF AG (Ludwigshafen)

2.3 Puffer und Lösungen

DEPC-H₂O

0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat in Wasser, über Nacht gerührt, autoklaviert

Akt-Lysepuffer I

20 mM HEPES
5 mM EGTA
pH 7,4

Akt-Lysepuffer II

50 mM HEPES
50 mM NaCl
5 mM EDTA
1 % (v/v) Triton X 100
pH 7,4

AP-Substratlösung

100 mM Tris pH 9,5
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂

Puffer A

10 mM HEPES
10 mM KCl
100 μ M EDTA
100 μ M EGTA
1 mM DTT
500 μ M PMSF

Puffer C

20 mM HEPES
400 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM EGTA
1 mM DTT
1 mM PMSF

AA/BisAA (30%)

30 % (w/v) Acrylamid
0,8 % (w/v) Bisacrylamid

AA/BisAA/Glycerol (30%)

30 % (w/v) Acrylamid
0,8 % (w/v) Bisacrylamid
30 % (v/v) Glycerol

Blotpuffer

25mM Tris-HCl pH 8,5
150mM Glycin
10 % (v/v) Methanol

Coomassie Färbelösung

1 g/l Coomassie Brilliant Blue
3,6 % (v/v) Methanol
7,2 % (v/v) Essigsäure

6x DNA-Auftragspuffer

0,01 % (w/v) Bromphenolblau
30 % (v/v) Glycerol

Polyacrylamidgel für EMSA

4,5 % (v/v) AA/BisAA
0,1 % (w/v) TEMED
0,1 % (w/v) APS

10x Hamburgpuffer

10 mM Tris-HCl pH 7,4
10 mM EDTA
10 mM DTT
0,5 M Natriumchlorid
50% (v/v) Glycerol

IP-Puffer

0,1 % (v/v) Nonident P-40
10 % (v/v) Glycerol
50 mM Hepes pH 7,9
250 mM Natriumchlorid
20 mM Glycerophosphat
5 mM p-Nitrophenylphosphat
1 mM EDTA
vor Versuchsbeginn frisch zugesetzt:
1 mM Natriumorthovanadat
5 mM DTT
1x Proteaseinhibitoren

10x JNK-Kinasepuffer

250 mM Hepes pH 7,4
100 mM Magnesiumchlorid
250 µM ATP

2x HBS (Hepes gepufferte Salzlösung)

50 mM Hepes pH 7,05
280 mM Natriumchlorid
1,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat

JNK-Lysepuffer

20 mM Tris-HCl pH 7,4
1 mM EDTA
1 mM EGTA
0,5 % (v/v) Triton X-100
2 mM DTT (frisch zusetzen)

5x IRAK-Kinasepuffer

100 mM Hepes pH 7,4
750 mM Natriumchlorid
25 mM Magnesiumchlorid
25 mM Manganchlorid

PBS (Phosphat- gepufferte Salzlösung)

2,7 mM Kaliumchlorid
1,47 mM Kaliumdihydrogenphosphat
137 mM Natriumchlorid
4,3 mM Dinatriumhydrogenphosphat
pH 7,4

3x Lämmli-Puffer

62,5 mM Tris-HCl pH 6,8
3 mM EDTA
6 % (w/v) SDS
30 % (v/v) Glycerol
15 % (v/v) β-Mercaptoethanol
0,05 % (w/v) Bromphenolblau

Luciferin Substratpuffer

0,436 mM D-Luciferin, Natriumsalz
20 mM Tricin
1,1 mM Magnesiumcarbonathydroxid
2,7 mM Magnesiumsulfat
33,3 mM DTT
0,53 mM ATP
0,222 g/l CoenzymA, Natriumsalz

Luria Bertani (LB) Medium

10 g/l Natriumchlorid
10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt

LB Agar

15 g/l Agar in LB Medium

SDS-Elektrodenpuffer

25 mM Tris pH 8,5
215 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS

20x SSC

175,3 g/l Natriumchlorid
88,2 g/l Na₃Citrate*2H₂O

SDS-Sammelgel (5 %)

125 mM Tris-HCl pH 6,8
5 % (v/v) AA/BisAA/Glycerol
0,1 % (w/v) SDS
0,25 % (v/v) TEMED
0,1 % (w/v) APS

SDS-Trenngel (7,5 – 12,5 %)

375 mM Tris-HCl pH 8,8
x % (v/v) AA/BisAA/Glycerol
0,1 % (w/v) SDS
0,15 % (v/v) TEMED
0,05 % (w/v) APS

TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer

40 mM Tris
1 mM EDTA
0,11 % (v/v) Essigsäure

TBE (Tris-Boat-EDTA) Puffer

90 mM Tris-Borat
2 mM EDTA
0,11 % (v/v) Essigsäure

TBS (Tris-gepufferte Salzlösung)

25 mM Tris-HCl pH 7,1
125 mM Natriumchlorid
5 mM Kaliumchlorid
0,7 mM Calciumchlorid
0,5 mM Magnesiumchlorid
0,6 mM Dinatriumhydrogenphosphat

TBST (TBS-Tween20)

20 mM Tris-HCl pH 7,4
500 mM Natriumchlorid
0,05 % (v/v) Tween20

TSS

10 % (w/v) PEG (6000 oder 8000)
5 % (v/v) DMSO
50 mM Magnesiumchlorid
pH 6,5-6,8 in LB Medium

2.4 Bakterienkultur

Zur Klonierung und zur Präparation von Plasmiden wurden die E. coli K12 Stämme XL1-blue, XL2-blue und LK111λ verwendet.

XL1-Blue strain: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F'proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]*

XL2-Blue strain: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F'proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]*^a

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37°C in LB Medium im Schüttelinkubator oder auf LB-Agar im Brutschrank. Transformierte Bakterien wurden durch Zusatz von Antibiotika selektiert. Je nach Resistenz wurden dem Medium die Antibiotika Ampicillin (80 µg/ml), Kanamycin (30 µg/ml) und Tetracyclin (12,5 µg/ml) zugesetzt.

2.4.1 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

Eine über Nacht gewachsene Bakterienkultur wurde 1:100 in LB verdünnt und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600\text{ nm}} = 0,4\text{--}0,6$) kultiviert. Die Bakterien wurden pelletiert (5000xg, 5 min, 4 °C), in 1/10 des ursprünglichen Volumens eiskaltem TSS resuspendiert, à 100 µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Zur Transformation wurde ein Aliquot mit 5 ng Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz versetzt und für 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 45 sec. auf 42 °C erhitzt und dann auf Eis abgeschreckt. Die Bakterien wurden nach Zugabe von 1 ml LB-Medium für 30 bis 60 min bei 37 °C geschüttelt. Von dieser Suspension wurden 10 bis 200 µl auf einer Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert, bis Kolonien zu erkennen waren.

2.4.2 Plasmidpräparation

Je nach Bedarf wurden Plasmide aus den transformierten Bakterien in unterschiedlichem Maßstab präpariert. Die Quick-Check –Methode diente ausschließlich zum *screenen* größerer Klonzahlen nach Transformationen. Für Klonierungsarbeiten und Sequenzierungen verwendete Plasmide wurde in der Regel mit dem GFX Micro Plasmid Kit¹ präpariert. Für Transfektionen eukaryotischer Zellen wurden ausschließlich Plasmide verwendet, die mit dem Midi- bzw. Maxiprep Kit² aufgereinigt wurden. Die Präparationen mit den Kits erfolgten nach den Angaben des jeweiligen Herstellers.

2.4.3 Quick-check

Die „Quick-Check“-Methode[155] bietet die Möglichkeit Bakterienklone schnell auf das Vorhandensein von Plasmiden und deren Größe zu überprüfen. RNA und chromosomale DNA wird dabei nicht entfernt und die Präparation eignet sich nicht für enzymatische Reaktionen.

200 µl Kulturmedium wurden mit den zu untersuchende Klonen angeimpft und für 3 bis 4 Stunden bei 37°C im Inkubator geschüttelt (250 rpm).

100 µl der Bakteriensuspension wurden mit 10 µl Quicky-Puffer (0,25 % Bromphenolblau, 40 % Glycerin) und 50 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt und für 30 sec gevortext. Zur Phasentrennung wurde die Probe 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 20 µl in der Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt.

¹ Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

² Qiagen (Hilden)

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Präparation

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy Kit³. Hierzu wurden bis zu 1×10^7 Zellen zweimal mit PBS gewaschen und nach Angaben des Herstellers weiterverarbeitet. Um Verunreinigungen der RNA durch gen. DNA zu verringern wurde auf der Affinitätsäule ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurde das DNase-Kit⁴ nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Alternativ wurde RNA mit Trizol⁵ präpariert. Ein DNase-Verdau erfolgte hier nach der Präparation in Lösung. Hierzu wurde der RNA-Präparation Puffer und DNase⁶ nach Angaben des Herstellers zugesetzt und für 15 min. inkubiert. Anschließend wurde die DNase durch Phenol-Chloroform-Extraktion abgetrennt, die RNA mit Ethanol gefällt, zweimal mit Ethanol (70 %) gewaschen und anschließend in Wasser gelöst.

Die beiden Präparationsmethoden wurden hinsichtlich Ausbeute und Verunreinigungen mit gen. DNA miteinander verglichen. (s. 3.3.1.1)

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch und wurde nach $c(\text{RNA}) [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = 40 \cdot \text{OD}_{260 \text{ nm}}$ berechnet.

2.5.2 DNA-Präparation

Genomische DNA wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit⁷ nach Angaben des Herstellers präpariert.

2.5.3 Reverse Transkription (RT)

RNA eignet sich nicht als Template für DNA-Polymerasen. Um mit Hilfe der PCR Aussagen über das Vorhandensein einer RNA-Spezies in einer RNA-Präparation machen zu können muss die RNA daher zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Durch den Einsatz von Hexanukleotiden als Primer für die Reverse Transkriptase werden alle RNA-Spezies in cDNA umgeschrieben.

Hierzu wurde folgender Ansatz pipettiert:

RT-Ansatz:

RNA (200 ng/ μl)	3 μl
RT-Puffer (10x)	0,6 μl
pd(N) ₆ (100 μM)	0,3 μl
dNTPs (10 mM each)	0,6 μl
DEPC-H ₂ O	1,35 μl
RT ⁸	0,15 μl

³ Qiagen (Hilden)

⁴ RNase-Free DNase Set, Qiagen (Hilden)

⁵ Trizol Reagent, Gibco Life Technologies

⁶ Deoxyribonuclease I, Amplification Grade, Gibco Life Technologies

⁷ Qiagen (Hilden)

Die RNA wurde zuvor für 10 min. bei 65 °C denaturiert. Die Reverse Transkription erfolgte bei 37 °C in einer Stunde und wurde durch 5 minütiges Erhitzen auf 95 °C gestoppt. Als Kontrolle auf Verunreinigungen durch genomische DNA wurde ein weiterer Ansatz ohne Reverse Transkriptase mitgeführt. PCR-Signale aus einem solchen Ansatz sind auf genomische DNA zurückzuführen.

Der einzelne Ansatz ist so dimensioniert, dass er für zwei PCR-Reaktionen mit Volumina von je 30 µl ausreicht.

Für die Hybridisierung der cDNA-Arrays erfolgte die RT mit spezifischen Primern und einer anderen Reversen Transkriptase (s. 2.14).

2.5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR wird ein durch die Wahl der Primer spezifisches DNA-Fragment exponentiell mit der Zahl der Zyklen amplifiziert. Die Amplifikation dient dabei zum Nachweis aus einem DNA-Gemisch oder zur Herstellung einer für weitere Reaktionen nötigen Menge des jeweiligen Fragmentes. Durch Modifikationen der Primer wurden so auch Restriktionsschnittstellen bzw. Punktmutationen in das PCR-Produkt eingeführt.

2.5.4.1 Präparative PCR

Für die präparative PCR wurde als thermostabiles Enzym Pwo-DNA-Polymerase⁹ verwendet. Das Enzym verfügt über eine 3'→5'-Exonucleaseaktivität und zeichnet sich daher durch eine geringe Fehlerrate beim Einbau der Nucleotide aus.

Für die Reaktion wurde folgender Ansatz pipettiert:

5 µl 10x Reaktionspuffer komplett
1,5-4,5 mM MgCl₂
5 ng Template (Plasmid) bzw. 5 µl cDNA (aus RT)
0,2 mM dNTP Mix¹⁰
0,5 µM sense Primer
0,5 µM antisense Primer
0-5 % (v/v) DMSO
1 U Pwo-DNA-Polymerase¹¹
ad 50 µl H₂O

Bis zum Start der Reaktion wurde der Ansatz konsequent auf Eis gehalten. Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte im Thermocycler.

⁸ Stratagene (Heidelberg)

⁹ Peqlab (Erlangen)

¹⁰ je 10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP, MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

¹¹ SAWADY Pwo-DNA-Polymerase, Peqlab (Erlangen)

Hierzu wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Wiederholungen	Zeit[sec.]	Temperatur	
1	180	95 °C	Initiale Denaturierung
25-30	30	95 °C	Denaturierung
	30	50-65 °C	Annealing
	45-180	72 °C	Elongation
1		4 °C	Aufbewahrung

Die Annealingtemperatur wurde abhängig von den verwendeten Primern gewählt und falls nötig optimiert. Eine Abschätzung erfolgte nach der 2+4-Regel:

$$2\text{ °C pro AT Bp} + 4\text{ °C pro GC Bp}$$

Die Elongationszeit war abhängig von der Länge des erwarteten Fragmentes. Es wurde von einer Prozessivität von 1 kBp / min ausgegangen.

Die Zahl der Wiederholungen wurde möglichst gering gewählt, um die Fehlerwahrscheinlichkeit zu minimieren.

Wenn keine ausreichende Menge an PCR-Produkt erhalten wurde, wurden die PCR-Bedingungen durch Variation der MgCl₂-Konzentration, der DMSO-Konzentration und der Annealingtemperatur optimiert. Neben Pwo-DNA-Polymerase wurde dann aufgrund der höheren Prozessivität auch Taq-DNA-Polymerase verwendet. Die daraus resultierende höhere Fehlerrate wurde in Kauf genommen.

2.5.4.2 Semiquantitative PCR

Die Menge an PCR-Produkt wächst exponentiell mit der Zahl der Zyklen. Sie bietet damit die Möglichkeit geringe Templatemengen in zwei unterschiedlichen Ansätzen miteinander zu vergleichen. Über den Zwischenschritt der Reversen Transkription kann man auch die Menge an RNA-Spezies in verschiedenen RNA-Präparationen miteinander vergleichen.

Hierzu wurde folgender Ansatz gewählt:

3 µl	sense Primer (10 µM)
3 µl	antisense Primer (10 µM)
3 µl	Puffer (10x)
1,8 µl	MgCl ₂ (50 mM)
0,6 µl	dNTP-Mix
3 µl	Template (RT-Ansatz)
15,4 µl	H ₂ O
0,2 µl	Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl) ¹²

Der Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet.

¹² Gibco Life Technologies

Das Temperaturprogramm entsprach dabei im wesentlichen dem der präparativen PCR.

Wiederholungen	Zeit[sec.]	Temperatur	
1	180	95 °C	Initiale Denaturierung
18-35	30	95 °C	Denaturierung
	30	50-55 °C	Annealing
	45	72 °C	Elongation
1		4 °C	Aufbewahrung

Hier wurde untersucht, ob Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Stimuli mRNA für bestimmte Gene hoch oder runterregulieren. Dazu wurden Zellen stimuliert, RNA von den Zellen präpariert (s. 2.5.1) und davon cDNA transkribiert (s. 2.5.3).

Diese cDNAs wurde in die PCR eingesetzt und die nach der Amplifikation erhaltenen Mengen im Agarosegel miteinander verglichen. Hierzu wurden die Banden mit dem Programm „Molecular Analyst¹³“ densitometrisch ausgewertet.

Als Kontrolle wurde die Menge an mRNA für ein Housekeeping-Gen in den RNA-Präparationen untersucht. Diese sollte sich durch die Stimulation nicht ändern.

Verwendete Primer:

Untersuchung der Rezeptorkomponenten

Primer	Sequenz 5'→3'
Ald S	TTC CAT GAG ACA CTC TAC CAG AAG G
Ald AS	ACC ATG TTG GGC TTC AGC AAG G
hIL-1R1s1069	TGA GTG ACA TTG CTT ACT GG
hIL-1R1as1452	CAT CTG AAG CTT TTA TTG GG
mIL1RI-s	CTG GAG ATT GAC GTA TGT ACA GAA TAT CCA AAT
mIL1RI-as	ATC CCC GGC AAT GTG GAG CCG CTG TGG GAA GGT GGC CTG TGT
hIL-1RAcPs791	AGC TAC TCA TTC CCT GTA CG
hIL-1RAcPas1485	AGA GGC CAT ATT TTC TAG GC
mIL-1RAcP-s (IL-IRAPU)	AAC CAT CGG TCA CTT GGT ATA AGG G
mIL-1RAcP-as (IL-IRAPL)	TTC ATC TGT TCC AAA GTG AGC TCG G
hIL-1Rrp109-s	ACT GTG GTT GAA GGG GAA CC
hIL-1Rrp603-as	TCC ATT ATG ATG AAG GAA ATG C
mIL-1Rrp452-s	CCG ATC ACA AAT TCA TGT GG
mIL-1Rrp1048-as	CCA ACC TTC TCA CAC TTT GG
hAcPL-1077s	CTC TGT GGA AAG GAG CAA CC
hAcPL-1859as	GGA GCC ACA TCT CTT TCA AGC
mAcPL-951s	TTC ATT GTC CCA GTC TCA GC
mAcPL-1742as	GAT TCA GAG CCA GGT GTT CC
hTLR2-217-s	TGT GAC CGC AAT GGT ATC TG
hTLR2-920-as	TCA TCG GTG ATT TTC ACA TTT C

¹³ Molecular Analyst V 1.4, BioRad (München)

hTLR4-328-s	CAA CCA AGA ACC TGG ACC TG
hTLR4-926-as	TTC TAA ACC AGC CAG ACC TTG
mTLR4s850	GAC TTC ATT CAA GAC CAA GC
mTLR4as1467	TTC TAG ACC CAT GAA ATT GG
hCD14-375s	GGT TCC TGC TCA GCT ACT GG
hCD14-783as	CGT CTC CAT TCC TGT GTT GC
mCD14-583s	AAC AGG TCC GCG TCT TCC
mCD14-965as	CTC ATC TGG GCT AGG GTT CC

Überprüfung der Array-Daten

Primer	Sequenz 5'→3'	Accession
mIL-6-1328s	ATG AAG TTC CTC TCT GCA AGA	X06203 / M20572.1
mIL-6-7620as	CTA GGT TTG CCG AGT AGA TCT C	
CKS-2 194s	CTG ATG TCC GAA GAG GAG TG	AA289122
CKS-2 482as	TGC AGT TGC ATT TGA CTG AG	
VCAM1 1107s	GAC AGA CAG TCC CCT CAA TG	M84487
VCAM1 1439as	AGG GAC TTT ATG CCC ATT TC	
myc 1402s	TCT GTG GAG AAG AGG CAA AC	X01023
myc 1758as	CAA TTC AGG GAT CTG GTC AC	
M-CSF 711s	AGT GCT CTA GCC GAG ATG TG	X05010
M-CSF 1087as	CCA GTT AGT GCC CAG TGA AG	
LAMR 391s	ACC TGG GAC CTT CAC TAA CC	J02870
LAMR 799as	AGC AGT GAA CTC AGG AGC TG	
grg 153s	GCA GTA TCA CAG CCT GAA GC	L12140
grg 554as	TGA GAA CCC AGA GCA GAG AG	
C/EBP 566s	ACC TCT TCA ACA GCA ACC AC	X61800
C/EBP 982as	GCT TCT GCT GCA TCT CCT G	
relB 845s	ACG ACA AGA AGT CCA CCA AC	M83380
relB 1241as	GAG CTG CTC AAC TCT CCA AG	
IRF1B 668s	AAA TTG AAG CTG CCA TTG AG	M21065
IRF1B 1065as	GTA GGG TGG CGT TTT GAA C	
p65 154s	ATG CGA TTC CGC TAT AAA TG	M61909
p65 554as	ACT GTC ACC TGG AAG CAG AG	
APO1 334s	TAA ATG CAG AAG ATG CAC AC	M83649
APO1 584as	ACA AAA CAA GGA TGG TCA AC	
TDAG51 656s	GGA AGG GCT ACT GCT CAT AC	U44088
TDAG51 955as	TTT TTG TAC TGC ACC ATC TG	
MCP3 75s	TGT GCC TGC TGC TCA TAG	S71251
MCP3 332as	TTG GGG TTT TCA TGT CTA AG	
AA3R 28s	AGA ACG GTT ACC ACT CAA AG	L20331
AA3R 350as	AAC TCC CGT CCA TAA AAT G	
RPS29 21s	CCA GCA GCT CTA CTG GAG TC	L31609
RPS29 181as	AGT CCA ACT TAA TGA AGC CTA TG	
TIMP2-357s	TGA TCA GAG CCA AAG CAG TG	X62622
TIMP2-753as	TCC ATC CAG AGG CAC TCA TC	
TIMP3-208s	CCT TTG GCA CTC TGG TCT AC	L19622

TIMP3-661as	TTG CTG ATG CTC TTG TCT GG	
rox737s	CTG GAC TCA GCA TTA AGG AG	Y07609
rox1002as	CCT TTT CTT CTG TTC ACT GG	
pax8 1117s	CCC CTT CCT CTT TAT CTA GC	X57487
pax8 1382as	GCC AGA ATA TTC ACT TCC TG	
c-fos 2496s	AAG ATG AGA AGT CTG CGT TG	M27129
c-fos 2794as	GAA GTC ATC AAA GGG TTC TG	
IKBa 631s	TAG CCT CTA CTC ACG GCT AC	U36277
IKBa 943as	GAC TCC GTG TCA TAG CTC TC	
IKBb 220s	AGT CTT TGG CTA CGT CAC TG	U19799
IKBb 552as	GTA TCT GAG GCA TCT CTT GG	
STRA14 748s	GAA CAG CCG TAC TTC AAA AG	Y07836
STRA14 1103as	AAG GGA GTC GGT ATC TTG TC	
ski 205s	GAG GCC TAC AAG AAG GAG AG	U14173
ski 563as	ATG ACT TTG AGG ATC TCC AG	
HTR1C 595s	CTA ATT GGC CTA TTG GTT TG	X72230
HTR1C 980as	ATG GAC GCA GTT GAA AAT AG	
ITGAL 597s	ATG AGG AAG CTC AGC AAT AC	M60778
ITGAL 1008as	TCT CAA AGG TGT CCA GAA TC	
NOTCH3 1937s	CAG TAA CCC CTG TAC CTT TG	X74760
NOTCH3 2331as	GAA AGC CTA TTC CAT CAC TG	
C8 127s	AAG GCT GTG GAA AAC AGT AG	AF055983
C8 477as	ATC ATT CGC ACT GTA AGA CC	
EPIM 316s	AGA AGA ACC ACA GCA TCA TC	D10475
EPIM 568as	ATC TGC GCT TCA TTG TAT TC	
Pmca2 1203s	GCA AGT CTG TGG ATA AGG AC	AF053471
Pmca2 1476as	ACC GAC TTC TCT TTC TTG TG	
MYF6 120s	GAT GGA CCT TTT TGA AAC TG	M30499
MYF6 436as	TCT TTA GTC TCC TCC TTT CG	
Eya1 400s	TCT CCA CCA CAG ATT TAT CC	U61110
Eya1 722as	GTG GTA AAG CTG CTA CCT TG	
hsp86 624s	CAT TGG CTA TCC CAT TAC TC	M36830
hsp86 976as	GTC CTT CAA CAG AAA AAT GC	
GST5-5 66s	TGG AAT ACA CAG ACA CAA GC	J04696
GST5-5 434as	TGC CCA GAA ACT CAG AGT AG	
IGFBP4 499s	GAA ATC GAA GCC ATC CAG	X81582
IGFBP4 884as	AGC TTC ACC CCT GTC TTC	
Fgfk 205s	GCA GGG GAC TAC CTG CTG	M30642
Fgfk 603as	TCT AGG AAG GAA GTG GGT TAC	
FHF-2 278s	AAG ACG AGG ACA GCA CTT AC	U66202
FHF-2 565as	TGT TCT TCT TCA CAT GGT TG	

2.5.5 Ligation

Restriktionsfragmente und geschnittene PCR-Produkte wurden mit entsprechend vorbereiteten Vektoren in folgendem Ansatz ligiert.

50-100 ng Vektor
x ng Insert
2 µl 10xLigasepuffer
1 µl T4 DNA-Ligase (5 U/µl)¹⁴
ad 20 µl H₂O

der Vektor wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und dephosphoryliert. Für die Insertmenge wurde ein 6-facher molarer Überschuß gegenüber dem Vektor angestrebt.

Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur für 2 Stunden oder bei 16 °C über Nacht.

Alternativ zu diesem Ansatz wurde ein Kit¹⁵ nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

PCR-Fragmente wurden teilweise mit Hilfe eines T/A Klonierungskits¹⁶ zwischenkloniert.

2.5.6 Restriktionsanalyse

Neu präparierte Plasmide wurden durch geeignete Restriktionsschnitte auf ihre Identität untersucht. Hierzu wurden Restriktionsendonucleasen der Firma MBI-Fermentas unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen eingesetzt.

Die erhaltenen Fragmente wurden in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (2.5.7).

2.5.7 Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einer Flachbett-Agarosegelelektrophorese. Je nach Größe der erwarteten Fragmente wurden 0,6 bis 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen zum Sieden gelöst. Zur späteren Visualisierung der DNA wurde das intercalierende Fluorophor Ethidiumbromid zugegeben (0,1 µg/ml final). Das Gel wurde bis etwa 50 °C abgekühlt, in einen Gelträger gegossen und dort erstarren gelassen.

Die Proben wurden zum Auftrag 1+5 mit 6-fach Auftragspuffer gemischt.

Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei 10 V/cm.

Die DNA-Banden wurden auf einem UV-Transluminator sichtbar gemacht und mit einer LCD-Kamera dokumentiert.

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurden die Banden mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe eines Gelextraktionskits nach Angaben des Herstellers aus dem Gelstück extrahiert.

¹⁴ MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

¹⁵ Rapid DNA Ligation Kit, Roche Diagnostics (Mannheim)

¹⁶ pGEM-T Easy Vector System I, Promega (Madison, USA)

2.5.8 Sequenzierung

Über PCR klonierte Plasmide, sowie Plasmide in die Punktmutationen eingefügt wurden, wurden durch Sequenzierung des Inserts auf ihre Integrität überprüft.

Hierzu wurde das Big Dye Terminator Cycle Sequenzierkit¹⁷ verwendet, das auf einer modifizierten Kettenabbruchmethode nach Sanger[156] beruht.

Die Durchführung der Sequenzierreaktion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Als Primer wurden neben den Vektorprimern T7 und SP6 auch im Insert liegende Primer verwendet.

Die Auftrennung und Detektion der erhaltenen Fragmente erfolgte im ABI Prism 310 Genetic Analyser. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software (ABI Prism Sequencing 2.1.1)

2.6 Zellkultur

Die Kultivierung der verwendeten Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 bzw. 10 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Luft.

Passagen und Experimente wurden mit sterilem Einwegmaterial in einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Suspensionszellen wurden alle zwei bis drei Tage gezählt und in frischem Medium auf eine Zelldichte von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Adhärente Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Hierzu wurde das Medium abgegossen, der Zellrasen zweimal mit PBS abgespült und dann mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA in PBS) inkubiert bis sich die Zellen ablösen. Die Zellsuspension wurde in frischem Medium aufgenommen und je nach Zelllinie 1/6 bzw. 1/10 auf neue Kulturflaschen aufgeteilt.

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Zur Bestimmung der Viabilität wurde die Zellsuspension 1/1 mit einer Lösung von Trypanblau (0,8 %) gemischt. Tote Zellen können den Farbstoff nicht aktiv aus dem Cytoplasma ausschleusen und färben sich blau. Sie können so von lebendigen Zellen unterschieden werden.

Zum Pelletieren der Zellen wurden sie für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert.

Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum Einfrieren wurden $1-5 \times 10^6$ Zellen pelletiert in 0,5 ml eiskaltem FCS resuspendiert und dann mit 0,5 ml eiskaltem FCS mit 20 % DMSO vermischt. Sie wurden dann in Kryoröhrchen abgefüllt und in einer auf 4 °C vorgekühlten mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox über Nacht auf -80 °C abgekühlt und am nächsten Tag in einen Stickstofftank umgelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen dem Stickstofftank entnommen, bei Handwärme aufgetaut, in 15 ml Medium gewaschen und in frischem Medium aufgenommen und dann normal im Brutschrank kultiviert.

¹⁷ ABI PRISM Big Dye Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit, PE Applied Biosystems (Weiterstadt)

Die Kultivierung der Zellen erfolgte abhängig von ihren Bedürfnissen in entsprechenden Vollmedien:

HEK 293, L929, Raw 264.7 und Swiss 3T3 wurden in DMEM mit 10 % FCS, 1 mM Pyruvat, 2 mM L-Glutamin, nicht essentielle Aminosäuren bei 10 % CO₂ kultiviert

70 Z/3 und Wehi 231 wurden in RPMI mit 10 % FCS, 1 mM Pyruvat, 2 mM L-Glutamin, nicht essentielle Aminosäuren, 50 µM β-Mercaptoethanol bei 5 % CO₂ kultiviert.

EL4 6.1 und die Subklone **EL4 D6/76** und **EL4 AcP1** wurden in RPMI mit 5 % FCS, 1 mM Pyruvat, 2 mM L-Glutamin, nicht essentielle Aminosäuren bei 10 % CO₂ kultiviert.

2.6.1 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Zur transienten Transfektion eukaryotischer Zellen kamen verschiedene Methoden zum Einsatz. Die DEAE-Dextran-[157] und die Calciumphosphat-Methode[158] beruhen auf dem gleichen Grundprinzip: Negativ geladene DNA wird durch ein positiv geladenes Agens komplexiert, kann dann an die Zellmembran adhären und in einem endocytoseartigem Vorgang in die Zelle aufgenommen werden.

FuGene¹⁸ ist ein kommerzielles Transfektionsreagenz, das hohe Effizienz bei geringer Toxizität verspricht. Es wurde entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet.

2.6.1.1 Transfektion durch Kalziumphosphat-Präzipitation

HEK 293, IRAK⁻, Swiss 3T3 und L929 wurden durch Kalziumphosphat-Präzipitate transfiziert.

Die Transfektion erfolgte in der Regel in 10 cm Petrischalen. Hierzu wurden die Zellen am Vortag in einer Dichte von 1-2x10⁶ Zellen / Schale ausgesät.

Das Präzipitat wurde folgendermaßen hergestellt:

10 µg Plasmid-DNA wurden auf 210 µl mit Wasser aufgefüllt und mit 30 µl 2 M CaCl₂-Lösung gemischt. Diese Mischung wurde dann unter heftigem Vortexen zu 240 µl 2xHBS getropft und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

In der Zeit wurde das Medium auf den Zellen gegen 10 ml frisches Medium mit 20 U/ml Penicillin und 20 µg/ml Streptomycin ersetzt.

Das Präzipitat wurde gleichmäßig in der Petrischale verteilt und für mindestens 6 Stunden bis maximal 18 Stunden mit den Zellen im Brutschrank inkubiert.

Optional wurde ein Glycerolschock durchgeführt. Dazu wurde das Transfektionsmedium gegen 10 % Glycerol in Medium ersetzt und für 4 min bei RT inkubiert.

¹⁸ Boehringer (Mannheim)

Anschließend wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und die Zellen mit frischem Medium versorgt. Die Ernte der transfizierten Zellen erfolgte 48 Stunden nach Beginn der Transfektion.

Für Transfektionen in kleineren Gefäßen wurde der Ansatz entsprechend verkleinert.

2.6.1.2 Transfektion mit DEAE-Dextran

EL4 6.1 und 70Z/3 wurden mit der DEAE-Dextran-Methode nach jeweils optimierten Standardprotokollen[159] transfiziert.

Die Zellen wurden am Vortag in einer Dichte von nicht mehr als 5×10^5 Zellen/ml ausgesät.

Vor der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS und einmal in TBS gewaschen. Dann wurden je 1×10^7 Zellen in 1 ml Transfektionsgemisch für 30 min in 2ml Eppendorfgläsern bei Raumtemperatur langsam über Kopf geschüttelt.

Transfektionsgemisch:

EL4 6.1: 250 µg/ml DEAE-Dextran, 40 µg/ml Chloroquin, max. 2 µg/ml Plasmid-DNA in TBS

70Z/3: 50 µg/ml DEAE-Dextran, 50 µg/ml Chloroquin, max. 2 µg/ml Plasmid-DNA in TBS

Nach den 30 min Inkubation wurden die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen und dann in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in frischem Medium mit 20 U/ml Penicillin und 20 µg/ml Streptomycin aufgenommen. Die Ernte erfolgte 24 Stunden nach Transfektion.

Die Bedingungen zur Transfektion von 70Z/3 wurden im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Die Optimierung erfolgte im Luciferase-Reportergenassay durch Transfektion eines Plasmids, das Luciferase unter der Kontrolle des konstitutiver CMV-Promoters exprimiert (s. 2.11).

2.6.2 Vitalitätsbestimmung

Durch Transfektion werden Zellen z.T. erheblich geschädigt und auch diverse Stimuli können Einfluss auf die Vitalität der Zellen haben. Um den Einfluss von Zellsterben auf Versuchsergebnisse beurteilen zu können, wurden Vitalfärbungen mit MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) durchgeführt[160].

Der schwach gelbliche, wasserlösliche Farbstoff wird durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen in einen stark blauen, wasserunlöslichen Farbstoff umgesetzt.

Die Färbung erfolgte in 96-well-Platten. Das Kulturmedium wurde gegen 100 µl MTT (0,5 mg/ml) in Medium ohne FCS ausgetauscht. Nach ein bis vier Stunden (je nach Färbung der Zellen) Inkubation bei 37 °C wurde das Färbemedium entfernt und der gebildete Farbstoff in 100 µl Isopropanol mit 5 % Ameisensäure gelöst. Die Quantifizierung des Farbstoffes erfolgte im ELISA-Reader bei 570 nm (Referenz: 630 nm). Die Intensität der Färbung korreliert mit der Zahl lebender Zellen.

2.7 Immunpräzipitation und Westernblot

Zum Nachweis von Proteinen kann man sich spezifische Antikörper zunutze machen. Die Immunpräzipitation stellt dabei eine Möglichkeit dar, ein Protein aus einem Lysat anzureichern. Im Westernblot kann ein Protein durch eine spezifische Färbung nachgewiesen werden.

2.7.1 Verwendete Antikörper

Name/Klon	Antigen	Typ, Organismus	Quelle	Verd. im Blot
α IRAK	IRAK, Mensch	polyklonales Serum, Kaninchen	Z. Cao (Tularik Inc., San Francisco, USA)	1:5000
α TRAF6	TRAF6, Mensch	polyklonales Serum, Kaninchen	Z. Cao (Tularik Inc., San Francisco, USA)	1:5000
α MyD88	MyD88, Mensch	polyklonales Serum, Kaninchen	H. Wesche (Tularik Inc., San Francisco, USA)	1:1000
2A9	IRAK, Mensch	Maus IgG, monoklonal	H. Wesche (Tularik Inc., San Francisco, USA)	1:5000
α Akt	Akt, Mensch	polyklonales Serum, Kaninchen	PharMingen (San Diego, USA)	1:2000
α P-Akt	Akt (P-Ser 472/73/749), Mensch	polyklonales Serum, Kaninchen	PharMingen (San Diego, USA)	1:2000
c-Myc (A14)	c-Myc	polyklonales Serum, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologie	
M2-Agarose	Flag-Oktapeptid	Maus IgG, monoklonal, Agarose gekoppelt	Sigma Aldrich (Deisenhofen)	Immunpräzipitation
HRP- α rabbit	Kaninchen-immunglobuline	Ziehe Ig's, Peroxidase gekoppelt	Dako (Hamburg)	1:10000
HRP- α mouse	Mausimmunglobuline	Kaninchen Ig's, Peroxidase gekoppelt	Dako (Hamburg)	1:10000

Biotinylierte Antikörper wurden mit HRP-gekoppeltem Steptavidin¹⁹ oder mit AP-gekoppeltem Straptavidin²⁰ detektiert.

2.7.2 Immunpräzipitation

Die selektive Anreicherung eines Proteins aus einem Zelllysate erfolgte durch an Sepharose oder Agarose gekoppelte, spezifische Antikörper.

Zur Präzipitation Flag-Epitop markierter Proteine wurde M2-Agarose verwendet. Unmarkierte Proteine wurden mit einem spezifischen Antikörper markiert und über Protein-G-Sepharose präzipitiert. Die Präzipitation erfolgte für mindestens 2 Stunden bei 4 °C unter Schwenken. Nach der Inkubation wurden die Agarose/Sepharose-Kügelchen pelletiert (30 sec., 10000xg), zweimal mit Lysepuffer und einmal mit PBS gewaschen.

¹⁹ Dianova (Hamburg) Verdünnung: 1:50000

²⁰ Caltag (San Francisco, USA) Verdünnung: 1:5000

2.7.3 SDS Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur größenabhängigen Auftrennung von Proteingemischen wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli[161] durchgeführt. Abhängig von der Größe der zu untersuchenden Proteine wurde dabei eine Acrylamidkonzentration zwischen 7,5 und 12,5 % gewählt. Zur Fokussierung der Proteine wurde das Trenngel mit einem Sammelgel überschichtet. Zum Auftrag auf das Gel wurden die Proben in Lämmli-Puffer erhitzt (10 min, 95 °C). Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Elektrodenpuffer bei 15-20 mA.

Proteine wurden entweder unspezifisch durch Coomassie Brilliant Blue direkt im Gel angefärbt oder nach Transfer auf PVDF durch Immunfärbung spezifisch nachgewiesen.

Zur Färbung mit Coomassie Brilliant Blue wurde das Gel für 10 min in Coomassie Gebrauchslösung geschwenkt und anschließend in 7 % Essigsäure / 7 % Methanol entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden.

2.7.4 Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Zur Immunfärbung wurden die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierzu wurden das Gel, vier Filterpapiere und eine PVDF-Membran für 10 min in Blotpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde vorher kurz in Methanol aktiviert.

Eine *semidry* Blotapparatur wurde wie folgt aufgebaut:

Kathode
2 Lagen Filterpapier
Gel
PVDF-Membran
2 Lagen Filterpapier
Anode

Der Proteintransfer erfolgte bei 1 mA/cm^2 in einer Stunde. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran mit 5 % fettarmem Milchpulver in TBST für mindestens drei Stunden inkubiert.

2.7.5 Immunfärbung

Die Membran wurde mit einer Verdünnung des Primärantikörpers in TBST mit 1 % Milchpulver inkubiert (über Nacht, 4 °C). Der Primärantikörper wurde durch einen enzymgekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Hierzu wurde die Membran dreimal 10 min in TBST mit 1 % Milchpulver gewaschen und anschließend für mindestens eine Stunde mit einer Verdünnung des Sekundärantikörpers in TBST mit 1 % Milchpulver inkubiert (RT). Die Membran wurde in TBST noch dreimal gewaschen und anschließend mit einer Substratlösung für das gekoppelte Enzym inkubiert.

HRP-(Meerettich Peroxidase) gekoppelte Sekundärantikörper wurden in einer Chemolumineszenzreaktion mit ECL Reganz²¹ nach Angaben des Herstellers auf einen Röntgenfilm abgebildet. AP-(Alkalische Phosphatase) gekoppelte Sekundärantikörper wurden in einer Farbreaktion mit AP-Substratlösung direkt auf der Membran nachgewiesen.

2.8 FACS-Analyse

Der Fluoreszenz-Aktivierte-Zell-Scanner bietet die Möglichkeit einzelne Zellen zu untersuchen. Neben Größe und Granularität können verschiedene Fluoreszenzsignale bestimmt werden. Diese können z.B. durch mit Fluorophoren markierten Antikörpern erzeugt werden, die spezifisch an Oberflächenmolekülen einer Zelle binden.

In dieser Arbeit wurde die Expression der κ -leichten Kette untersucht. Zur Färbung wurde ein α -Maus-Ig κ -Antikörper aus der Ratte²² verwendet. Die Färbung erfolgte in 96-well Mikrotiterplatten. Pro Punkt wurden 5×10^5 Zellen in 20 μ l Pentaglobulinlösung (1/6 in PBS) in ein Loch der Platte pipettiert. Innerhalb einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden unspezifische Bindungsstellen (Fc-Rezeptoren) blockiert. Anschließend wurden 30 μ l des FITC-markierte Antikörpers in einer 1/30 Verdünnung zugegeben. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation wurden die Zellen gewaschen. Dazu wurde dreimal für drei Minuten bei 1200 rpm, 4 °C in der Zellzentrifuge zentrifugiert, der Zellüberstand abgeschlagen und in PBS resuspendiert.

Die Messung erfolgte im FACScan. Zur Auswertung der Daten wurde WinMDI 2.7 verwendet.

2.9 Kinaseassay

2.9.1 Akt-Kinaseassay

Aktivierte Akt-Kinase wurde durch spezifische Antikörper nachgewiesen (s. 2.7.1).

1×10^7 Suspensionszellen bzw. 2 Petrischalen (10 cm) adhärenente Zellen wurden für 24 Stunden in Medium ohne FCS gehungert. Die Stimulation erfolgte für 15 Minuten in konditioniertem Medium im Brutschrank und wurde durch Waschen mit eiskaltem PBS beendet.

Nach dem Waschen wurden die Zellen in 100 μ l Akt-Lysepuffer I resuspendiert und durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Sonifizieren (15x10 sec., auf Eis) aufgeschlossen.

Kerne und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 10 min. bei 13000xg und 4 °C abgetrennt. Durch erneute Zentrifugation des Überstandes (100000xg, 45 min, 4 °C) wurde die Membranfraktion (Pellet) von dem Cytoplasma (Überstand) abgetrennt. Die Membranfraktion wurde in 100 μ l Akt-Lysepuffer II resuspendiert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (13000xg, 4 °C, 5 min.) abgetrennt.

²¹ Super Signal Substrate, Pierce, KMF (Sankt Augustin)

²² Southern Biotechnology Association (SBA), Serva (Heidelberg)

Die Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford bestimmt. 20 bis 50 µg der Präparationen wurden auf zwei identischen 10 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf PVDF geblottet und gesamte Akt bzw. phospo-Akt durch spezifische Antikörper angefärbt (s. 2.7.5).

2.9.2 JNK-Kinaseassay

Die Aktivierung der cJun N-terminalen Proteinkinase (JNK) wurde in einem in vitro Kinaseassay nachgewiesen. Als spezifisches Substrat wurde ein rekombinantes Fusionsprotein aus GST und den Aminosäuren 1 bis 79 des Transkriptionsfaktors cJun[162] eingesetzt.

Pro Punkt wurden 5×10^6 Suspensionszellen bzw. eine Petrischale (10 cm) adhärenente Zellen eingesetzt. Die Stimulation erfolgte in konditioniertem Medium für 15 min im Brutschrank. Als Positivkontrolle für die Stimulation diente 500 mM Sorbitol. Die Stimulation wurde durch Waschen mit eiskaltem PBS beendet.

Nach dem Waschen wurden die Zellen in 100 µl JNK-Lysepuffer lysiert (30 min., auf Eis) und Kerne und Zelldebris durch Zentrifugation (30 min., 13000xg, 4 °C) abgetrennt. Die Proteinkonzentration in der so erhaltenen cytosolischen Fraktion wurde nach Bradford bestimmt.

Aufgrund der hohen Spezifität der JNK für das Substrat kann das Cytosol ohne weitere Aufreinigung auf JNK-Aktivität untersucht werden.

Hierzu wurde das cytosolische Protein bei 30 °C mit GST-cJun(1-79) und [32 P]γ-ATP inkubiert.

Reaktionsansatz:

- 1 µg cytosolisches Protein
- 4 µl 10x JNK-Kinasepuffer
- 1 µg GST-cJun(1-79)²³
- 2 µCi [32 P]γ-ATP
- ad 40 µl H₂O

Die Reaktion wurde durch Erhitzen mit 3-fach Lämmli-Puffer gestoppt (10 min., 95 °C). Die phosphorylierten Proteine wurden in einer 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert.

2.9.3 IRAK-Kinaseassay

IRAK phosphoryliert sich nach Aktivierung selbst. Diese Phosphorylierung kann im in vitro Kinaseassay sichtbar gemacht werden.

Hierzu wurden 1×10^7 Suspensionszellen bzw. 2 Petrischalen (10 cm Ø) adhärenente Zellen (1 Schale bei transfizierten Zellen) zweimal in PBS gewaschen und in 500 µl IP-Puffer auf Eis lysiert (1h). Kerne und Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (30 min., 10000xg, 4 °C). IRAK wurde aus den Lysaten immunpräzipitiert. Hierzu wurde αIRAK Serum oder ein

²³ Stratagene (Heidelberg)

monoklonaler α IRAK Antikörper zusammen mit Protein-G-Sepharose oder M2-Agarose (nur bei transfizierten, FLAG-Epitop markierten IRAK-Konstrukten) verwendet.

Die Immunkomplexe wurden durch zweimaliges Waschen in Kinasepuffer umgepuffert und anschließend für 10 min. mit [32 P] γ -ATP bei 30 °C inkubiert.

Reaktionsansatz:

- Protein-G Sepharose oder M2-Agarose beads
- 8 ml 5x Kinasepuffer
- 1 μ Ci [32 P] γ -ATP
- 1 μ M ATP
- ad 40 μ l H₂O

Die Reaktion wurde durch Erhitzen mit 3-fach Lämmli-Puffer gestoppt (10 min., 95 °C). Die phosphorylierten Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert.

2.10 Gelretardationsassay (EMSA)

(electrophoretic mobility shift assay)

Die Stimulus-induzierte Degradation von I κ B führt zur Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B in den Zellkern, wo er an eine DNA-Konsensussequenz bindet.

Diese DNA-bindende Aktivität kann durch Gelretardationsanalysen untersucht werden.

Hierzu werden Kernproteine aus Zellen isoliert und mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde inkubiert. Der entstehende DNA-NF κ B-Komplex wird im nicht denaturierenden Polyacrylamidgel (2.3) von der freien Sonde über seine geringere elektrophoretische Mobilität getrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen.

2.10.1 Fraktionierung von cytosolischen und nukleären Proteinen

Zur Trennung von Cytosol und Kernprotein wurde eine einfache Zellfraktionierung nach Bomsztyk *et al.* [163] durchgeführt.

Pro Punkt wurden 1×10^7 Zellen aufgearbeitet. Die Stimulation erfolgte in konditionierten Medium und wurde durch zweimaliges Waschen in eiskaltem PBS beendet.

Anschließend wurden die Zellen in 200 μ l Puffer A resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Zur Zelllyse wurden 12,5 μ l 10 % Nonident P-40 zugesetzt, kurz gemischt und sofort zentrifugiert (10000xg, 30 sec, RT).

Die Überstände wurden abgenommen (cytosolische Extrakte) und das Kernpellet wurde mit 25 μ l Puffer C extrahiert (15 min., auf Eis). Unlösliche Kernbestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (10000xg, 5min., 4 °C).

Die Proteinbestimmung in den Fraktionen erfolgte nach Bradford.

2.10.2 Markierung der Oligonukleotid Sonde

Als Sonde wurde ein doppelsträngiges Oligonukleotid verwendet, das eine NFκB Konsensussequenz[164] enthielt:



Zwei revers-komplementäre Oligonukleotide wurden dazu einzeln durch T4 Polynukleotidkinase mit [³²P]γ-ATP 3'-terminal markiert.

Markierungsansatz:

- 10 μl Oligonukleotid (1 μM)
- 6 μl 5x Polynukleotidkinasepuffer
- 30 μCi [³²P]γ-ATP
- 10 U T4 Polynukleotidkinase
- ad 30 μl H₂O

Beide Ansätze wurden 30 min. bei 37 °C inkubiert, vereinigt und durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C denaturiert. Das doppelsträngige Oligonukleotid entstand über Nacht durch langsames Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur.

Die Abtrennung von freiem [³²P]γ-ATP erfolgte über Gelfiltrationssäulen²⁴ nach Angaben des Herstellers.

Die Markierung wurde im β-Szintillationszähler überprüft. Die spezifische Aktivität des Oligonukleotids lag zwischen 0,5-1,0x10⁵ dpm/μl.

2.10.3 Bindereaktion und DNA-PAGE

Die Anlagerung der Kernproteine an die Sonde erfolgte in 30 min. bei Raumtemperatur. Um eine unspezifische Wechselwirkung zu verhindern, wurde dem Reaktionsgemisch eine große Menge Kompetitor-DNA zugesetzt.

Reaktionsgemisch:

- 1 μl 10x Hamburgpuffer
- 2 μg poly(dIdC) oder 300 ng DNA aus Heringssperma
- 1 μl markiertes Oligonukleotid
- ad 10 ml H₂O

Die Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer versetzt und auf einem 4,5 % Polyacrylamidgel in 0,25x TBE bei 10 V/cm aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und radioaktive Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

²⁴ S-200HR, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

2.11 Reporteragenassay

In Reportegenassays kann die Aktivität von Transkriptionsfaktoren gemessen werden. Damit eignen sie sich, den Einfluss von Stimuli und auch überexprimierter Moleküle auf die Transkriptionsfaktoraktivität zu untersuchen.

Hierzu wurden die zu untersuchenden Zellen mit Reporterplasmid und mit Plasmiden transfiziert, die für die zu untersuchenden Proteine codieren.

Das hier verwendete Reporterplasmid (p3xNFκB) codiert für *firefly* Luciferase unter der Kontrolle einer NFκB abhängigen Promotorregion (trimere NFκB Konsensussequenz). In den Zellen wird nach Transfektion abhängig von der NFκB-Aktivität Luciferase exprimiert.

Um die in den Zellen exprimierte Luciferase zu quantifizieren wurden sie nach zwei Waschschrritten in Reporterlysepuffer²⁵ lysiert (30 min. auf Eis) und Kerne und Zelldebris durch Zentrifugation (30 min., 10000xg, 4 °C) abgetrennt. Durch geeignete Wahl des Lysevolumens wurde eine Proteinkonzentration in den Lysaten von etwa 1 µg/µl eingestellt.

20 µl der Lysate wurden in Reagenzröhrchen vorgelegt und im Luminometer durch automatische Injektion von 100 µl Luciferin Substratpuffer versetzt. Die Luciferaseaktivität wurde in den Zellen durch eine Lumineszenzreaktion nachgewiesen. Die Lichtemission wurde im Luminometer über 10 sec. integriert und als RLU (relative Lichteinheiten) ausgegeben. Es wurden Doppelwerte bestimmt.

2.12 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach Bradford[165]. Hierzu wurde eine geeignete Verdünnung der zu bestimmenden Probe in einer Mikrotiterplatte 1+1 mit Bradford Reagenz²⁶ versetzt. Als Standard dienten Verdünnungen von BSA in PBS. Die Auswertung erfolgte am Mikrotiterplatten-Photometer bei 590 nm. Es wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.13 ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay)

IL-2 und IL-6 und PGE₂ aus Zellüberständen wurde im ELISA bestimmt.

Für **IL-2** und **IL-6** wurden kommerziell erhältliche Kits eingesetzt (Murine IL-2 Eli-pair²⁷ bzw. DouSet Mouse IL-6²⁸).

Ein auf Mikrotiterplatten immobilisierter Erstantikörper bindet das zu bestimmende Protein aus dem geeignet verdünnten zellfreien Zellkulturüberstand. Der Nachweis erfolgt durch einen Enzym-gekoppelten Zweitantikörper in einer Farbreaktion.

Die Durchführung entsprach dabei den Angaben der Hersteller.

²⁵ Promega (Mannheim)

²⁶ BioRad (München)

²⁷ Diaclone, Hölzel Diagnostika (Köln)

²⁸ R&D Systems (Wiesbaden)

PGE₂ wurde in einem kompetitiven ELISA bestimmt. Das PGE₂ der Proben bzw. der Eichlösungen konkurriert dabei mit PGE₂-Biocytin um die Bindung an den immobilisierten monoklonalen PGE₂ Antikörper. Nicht verdrängtes PGE₂-Biocytin wurde über Streptavidin-HRP in einer Farbreaktion nachgewiesen.

96 well Mikrotiterplatten²⁹ wurden mit je 150 µl einer 1/2000 Verdünnung eines Ziege α-Maus-IgG³⁰ in PBS beschichtet. Die Inkubation erfolgte für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

In jedes well wurden 100 µl einer Verdünnung von PGE₂-Biocytin (1/200) und einem monoklonalen PGE₂ Antikörper³¹ (1/200) in PBS 0,1% BSA pipettiert. Nach Zugabe von 50 µl Eichlösung bzw. Probe wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Eichlösungen hatten Konzentrationen zwischen 0,05 und 25 ng/ml.

Vor der Detektion wurde erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Zur Detektion von gebundenem PGE₂-Biocytin wurden in jedes well 150 µl einer Verdünnung eines Streptavidin-HRP-Konjugates³² in PBS, 0,1% BSA pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation wurde ungebundenes Konjugat durch dreimaliges Waschen entfernt.

Die Farbreaktion erfolgte nach Zugabe von je 150 µl Substrat in Substratpuffer und wurde nach etwa 30 min durch Zugabe von 50 µl 2 M Schwefelsäure gestoppt. Die optische Messung erfolgte bei 450 nm im ELISA-Reader.

Waschpuffer

0,9 % NaCl, 5 mM Tris, 0,02 % Tween 20

Substratpuffer

0,82 g NaAc, 2,1 g Zitronensäuremonohydrat in 100 ml, pH 4,9

Substrat in Substratpuffer

1mg TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidine) in
1 ml DMSO lösen
+ 9 ml Substratpuffer
+ 15 µl H₂O₂ (3 %ig)

²⁹ Maxisorp, Nunc (Wiesbaden)

³⁰ Dianova (Hamburg)

³¹ Boehringer (Mannheim)

³² Dianova (Hamburg); Verdünnung: 1:50000

2.14 Atlas cDNA Expression Array

Der Atlas cDNA Expressionsarray³³ bietet die Möglichkeit die Expressionslevel einer großen Zahl von Genen in verschiedenen Zell-Proben miteinander zu vergleichen.

Im hier verwendeten Array sind cDNAs von 1176 ausgewählten Genen auf Nylonmembranen fixiert (je 10 ng PCR-Produkt; 200-600 bp). Aus den Zellproben wurde RNA isoliert, und mit einem mitgelieferten spezifischen Primergemisch in cDNA transkribiert. Dabei wurden die cDNAs radioaktiv markiert. Die Nylonmembranen wurden dann mit diesen markierten cDNAs hybridisiert, gewaschen und gegen eine Phosphoimagerplatte exponiert. Die Versuchsdurchführung entsprach im wesentlichen den Angaben des Kit-Herstellers. Abweichungen bei der RNA-Präparation sowie bei der verwendeten reversen Transkriptase sind in (s. 3.3.1) beschrieben.

Die Auswertung der Daten erfolgte computergestützt in Kooperation mit Dr. Jörg Lauber an der GBF Braunschweig.

Die Phosphoimagerplatte wurde mit 16 Bit (65536) Graustufen ausgelesen und das erhaltene Datenfile mit dem Programm ArrayVision™ (Imaging Research Inc.) analysiert. Das Programm errechnet aus den Grauwerten zu jedem Arraypunkt eine Signalintensität und ein Hintergrundsignal für den umliegenden Bereich. Die Arraypunkte wurden mit Hilfe einer Schablone definiert. In einem EXCEL-Arbeitsblatt, welches von Dr. Lauber entwickelt wurde, erfolgte die weitere Auswertung.

Hier sollen nur die wesentlichen Berechnungen, die in dem Arbeitsblatt durchgeführt werden, kurz vorgestellt werden.

Hintergrundkorrektur:

Durch unspezifische Hybridisierungen entstehen Hintergrundsignale, die die Ergebnisse beeinflussen. Um diese Beeinflussung zu minimieren, werden die Signalintensitäten der Punkte mit Hilfe des für den umliegenden Bereich ermittelten Hintergrundsignals korrigiert.

Normierung der Signalintensitäten:

Um die Signalintensitäten vergleichen zu können, die von verschiedenen Membranen mit verschiedenen Sonden erhalten werden, müssen diese normiert werden. Hierzu werden die Signale von *housekeeping*-Genen herangezogen, die unabhängig von einer Stimulation der Zelle gleich stark exprimiert werden. Oft wird aber auch die Expression solcher Gene durch eine Stimulation beeinflusst. Bessere Ergebnisse werden – wie in dem verwendeten Arbeitsblatt durchgeführt – durch eine Normierung auf die Summe der Signalintensitäten aller untersuchten Gene erhalten.

Vergleich der Expressionslevel:

Der Vergleich der Expressionslevel erfolgt mit den hintergrundkorrigierten, normierten Signalintensitäten. Der Quotient dieser Werte steht für das Verhältnis der Expressionslevel des jeweiligen Gens in den verschiedenen Proben.

³³ Clontech (Heidelberg)

3 Ergebnisse I

3.1 Modellsysteme

Zelllinien, die auf mehrere Stimuli reagieren, eignen sich zum Vergleich von Signalwegen, die durch diese verschiedenen Stimuli induziert werden. Um solche Zelllinien zu finden, wurden zwei *screening*-Verfahren verwendet.

- Zum einen wurden Zelllinien in der RT-PCR auf die Existenz von mRNA für nötige Rezeptorkomponenten untersucht. Antikörper standen nicht für alle Rezeptorkomponenten zur Verfügung. Daher, und weil der Nachweis zumindest der IL-1-Rezeptorkomponenten aufgrund ihrer geringen Expression nicht unbedingt gelingt, wurde hier auf eine Nachweismethode für RNA zurückgegriffen. Die Untersuchung der Zell-mRNA durch RT-PCR oder Northern-Blot-Analysen stellt eine gute Methode dar, Hinweise auf die Expression der Rezeptorkomponenten zu erhalten.
- Zum anderen wurde im NF κ B-EMSA die Aktivierung einer Signaltransduktionskomponente untersucht, die für alle drei untersuchten Stimuli als aktivierbar beschrieben ist.

3.1.1 Screening von Zellen auf Existenz von mRNA der Rezeptorkomponenten

Das Vorhandensein von mRNA für die Rezeptorkomponenten ist eine Voraussetzung für ihre Expression und damit notwendig für die Reaktion einer Zelle auf den zugehörigen Stimulus.

Untersucht wurden hier die IL-1-Rezeptorkomponenten IL-1RI und IL-1RAcP, die IL-18-Rezeptorkomponenten IL-1Rrp und AcPL sowie TLR4 und CD14 als LPS-Rezeptorkomponenten. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen stand neben TLR4 auch TLR2 als LPS-Rezeptor zur Diskussion. Später wurden dann Moesin und MD-2 in der LPS-Signaltransduktion beschrieben. Die Daten für TLR2 sind hier nicht dargestellt. Die Expression von Moesin und MD-2 wurde nicht untersucht.

Die zur Untersuchung verwendeten Primer sind in Abschnitt 2.5.4.2 aufgelistet. Die PCR-Bedingungen für die jeweiligen Primerpaare wurden im Laufe der Untersuchung optimiert. Die PCRs wurden mit 35 Zyklen durchgeführt. Die Reverse Transkription wurde durch die Amplifikation eines Aldolasegenfragmentes aus den cDNAs kontrolliert. Zur Überprüfung der verwendeten Reagentien auf Kontaminationen wurde für jeden Ansatz eine PCR ohne Template pipettiert, in dem kein Amplifikat nachgewiesen werden durfte. Folgende Tabelle (Tabelle 2) stellt eine Übersicht der erhaltenen Ergebnisse dar.

Zelllinie	IL-1-Rezeptorkomponenten		IL-18-Rezeptorkomponenten		LPS-Rezeptorkomponenten	
	IL-1R1	AcP	IL-1Rrp	AcPL	TLR4	CD14
<i>human</i>						
HEK 293	+	+	+	-	+	+
U937	+	+	+	+	+	+
KB	+	+	+	+	+	+
HepG2	+	+	+	+	+	+
HELA	+	+	+	+	+	+
<i>murin</i>						
BaF3	-	+	+	+	n.u.	n.u.
L929	+	+	+	+	+	+
Swiss 3T3	+	+	+	+	+	+
EL4 6.1	+	+	+	+	+	-
AcP1	+	+	+	+	-	-
Wehi 231	-	+	+	+	+	-
Raw 264.7	+	+	+	+	+	+
IRAK ⁻	+	+	+	+	+	+
DC 80/1	-	+	+	+	n.u.	n.u.
DC XS52	+	+	-	+	n.u.	n.u.
70Z/3	+	+	+	+	+	+

Tabelle 2: Übersicht über die Existenz von mRNA für verschiedene Rezeptorkomponenten in Zelllinien. Die mRNA wurde in einer RT-PCR mit 35 Zyklen nachgewiesen (+) oder nicht nachgewiesen (-). In einigen Zelllinien wurden nicht alle Rezeptorkomponenten untersucht (n.u.).

In fast allen untersuchten Zelllinien konnte mRNA für alle untersuchten Rezeptorkomponenten nachgewiesen werden. Es war eher die Ausnahme, dass eine der mRNA-Spezies nicht nachgewiesen wurde. IL-1RI fehlt in BaF3, Wehi 231 und DC 80/1. IL-1Rrp wurde in DC XS52 nicht nachgewiesen. Ein AcPL-Transkript fand sich in allen Zellen außer in HEK 293. AcP1 und HEK 293 exprimieren kein TLR4, und CD14 fehlt in EL4 6.1, AcP1 und Wehi 231. Die Frage, ob und in welchem Ausmaß die mRNA in der Zelle in das entsprechende Protein translatiert wird, kann mit der Methode nicht beantwortet werden. Die Expression eines Proteins, für das keine mRNA nachgewiesen wurde, kann durch diese mit 35 Zyklen sehr sensitive Methode aber ausgeschlossen werden.

3.1.2 NF κ B-Aktivierung im Gelshift

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B ist zentraler Bestandteil der Signaltransduktionskaskaden, die durch IL-1, IL-18 und LPS aktiviert werden. Die DNA-bindende Aktivität von NF κ B kann im EMSA nachgewiesen werden. Hierzu wurden Zellen mit 10 ng/ml IL-1, 100 ng/ml IL-18 oder 1 μ g/ml LPS für 10 bzw. 50 min stimuliert.

Wenn in einer Zelllinie NF κ B aktiviert wurde, reichte eine Stimulationsdauer von 10 min normalerweise aus.

Lediglich in LPS aktivierten 70Z/3 konnte eine DNA-bindende Aktivität von NFκB erst nach 50 min nachgewiesen werden (vgl. Abb. 10, 3.1.3).

Folgende Tabelle fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen:

Zelllinie	IL-1 (10ng/ml)	IL-18 (100ng/ml)	LPS (1μg/ml)
<i>murin</i>			
L929	+	-	+
EL4 6.1	+	+	-
D6/76	-	+	-
AcP1	+	+	-
70Z/3	+	-	+
3T3	+	-	+
IRAK ⁻	+	-	+
<i>human</i>			
KB	+	-	-
Hela	+	-	-
HEK 293	+	-	-
HepG2	+	-	-

Tabelle 3: Übersicht über die stimulusinduzierte NFκB-Translokation in verschiedenen Zelllinien. Die Translokation wurde im EMSA nachgewiesen (+) bzw. nicht nachgewiesen (-).

Obwohl mit L929, 70Z/3, 3T3, IRAK⁻, KB, Hela und HepG2 viele der hier aufgeführten Zellen mRNA für die nötigen Rezeptorkomplexkomponenten haben, findet sich in diesem *Screening* keine Zelllinie, die nach Stimulation mit jedem der drei Stimuli NFκB aktiviert, Hinsichtlich der Aktivierung von NFκB sind jedoch mehrere Zelllinien doppelt responsiv. EL4 6.1 und AcP1, ein mit AcP stabil rekonstituierter Klon der AcP negativen EL4 Sublinie D6/76 reagieren auf IL-1 und IL-18. Die Fibroblastenzelllinien L929, Swiss 3T3 und IRAK⁻ reagieren wie die prä-B Zelllinie 70Z/3 auf IL-1 und LPS.

Diese doppelt responsiven Zellen eignen sich damit zum Vergleich der durch die verschiedenen Stimuli induzierten Signalwege und waren Gegenstand weiterer Untersuchungen.

3.1.3 Reaktionen von Zelllinien auf IL-1, IL-18 und LPS

Mit der T-Zelllinie EL4 6.1, der prä B-Zelllinie 70Z/3 den Fibroblastenlinien Swiss 3T3 und L929 sowie der makrophagenartigen Zelllinie Raw 264.7 wurden Zelllinien entzündungsrelevanter Zelltypen ausgewählt, die weiter charakterisiert wurden.

Neben NFκB wurden mit der cJun N-terminalen Kinase (JNK) und der Akt-Kinase weitere Signaltransduktionskomponenten hinsichtlich der Aktivierbarkeit durch die drei Stimuli untersucht.

Des Weiteren wurde, abhängig vom Zelltyp, die Freisetzung von Cytokinen (IL-2, IL-6) und PGE₂ untersucht (s. Einleitung).

Raw 264.7 setzen nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml), nicht jedoch nach Stimulation mit IL-1 (10 ng/ml) oder IL-18 (100 ng/ml) PGE₂ frei. Die Stimulation erfolgte für 20 Stunden. Da die Zellen nur auf einen der Stimuli reagieren, wurde von weiteren Untersuchungen abgesehen.

In **L929** wird durch Stimulation mit IL-1 und LPS, nicht jedoch durch Stimulation mit IL-18 die Transcription von IL-6-mRNA induziert (Abb. 4).

Die Zellen wurden in 6-well-Platten für 4 Stunden stimuliert und anschließend wie beschriebenen RNA präpariert. Die reverse Transcription wurde in PCRs mit Aldolaseprimern kontrolliert.

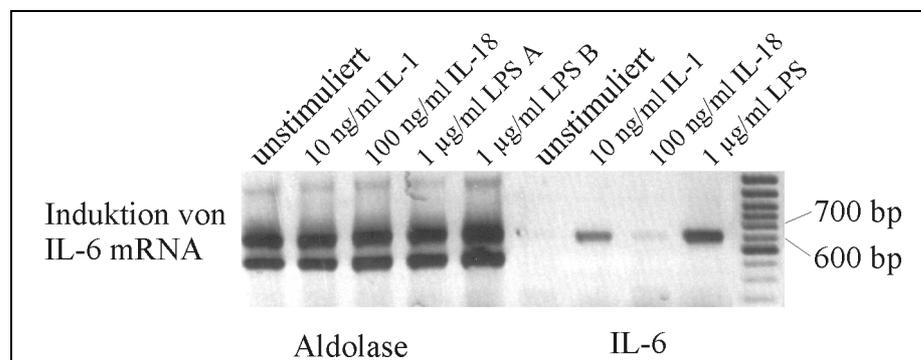


Abb. 4: Nachweis von IL-6 mRNA (621 bp) in L929 nach Stimulation.

Trotz der nachweisbaren IL-6-mRNA-Induktion lag die durch L929 in den Zellüberstand sezernierte Menge an IL-6 unter der Detektionsgrenze des zur Messung verwendeten ELISA (15 pg/ml).

Im Zellüberstand konnten nach Stimulation mit IL-1 und LPS aber geringe Mengen an PGE₂ nachgewiesen werden.

Swiss 3T3 reagieren ähnlich wie L929. Auch in Swiss 3T3 wird durch Stimulation mit IL-1 und LPS, nicht jedoch durch IL-18 IL-6-mRNA induziert. IL-6 und auch PGE₂ konnten im Überstand der Zellen nachgewiesen werden.

Die Stimulation der Zellen erfolgte in 96-well Platten. Je 1×10^4 Zellen waren am Vortag ausgesät worden. Zur Stimulation wurde das Medium gegen je 150 µl Medium mit unterschiedlichen Stimuluskonzentrationen ausgetauscht. Nach 24 Stunden Inkubation wurde der Zellüberstand abgenommen und im ELISA die PGE₂ und die IL-6-Konzentration bestimmt.

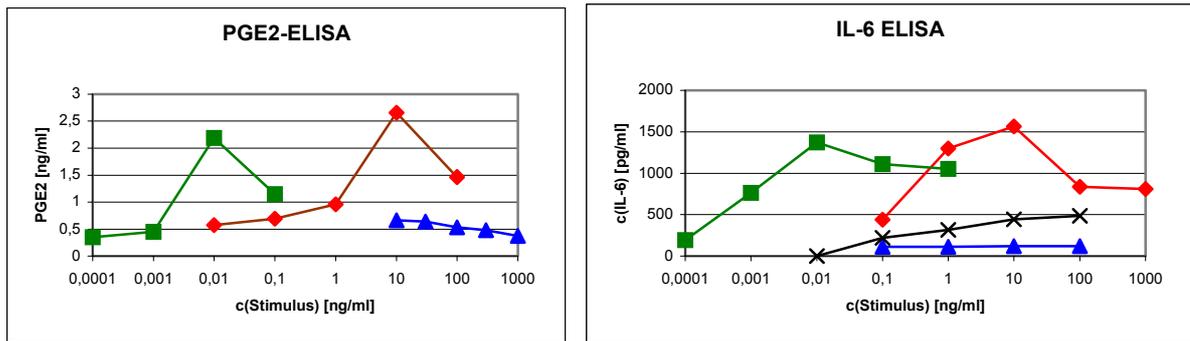


Abb. 5: PGE₂ und IL-6 im Zellkulturüberstand von Swiss 3T3 nach Stimulation mit IL-1 (■), IL-18 (▲) und LPS (◆) und TNF α (x).

Für die verschiedenen Stimuli wurden Dosis-Wirkungs-Kurven aufgenommen (Abb. 5).

Bei einer Stimuluskonzentration von 10 pg/ml IL-1 β bzw 10 ng/ml LPS ist sowohl die PGE₂- als auch die IL-6-Konzentration im Zellüberstand maximal. Höhere Stimuluskonzentrationen führen zu einer Abnahme der messbaren Konzentrationen an PGE₂ und IL-6 im Überstand.

Diese Beobachtung wurde mehrfach reproduziert. Eine toxische Wirkung des Stimulus in höheren Konzentrationen wurde durch eine Vitalitätsmessung der Zellen am Ende der Inkubationszeit ausgeschlossen. Möglicherweise werden PGE₂ und IL-6 bei einer hohen Stimuluskonzentration sehr schnell freigesetzt und während der Inkubationszeit schon wieder teilweise abgebaut.

Im Zellüberstand von unstimulierten Zellen wurde PGE₂ in einer Konzentration von 0,5 ng/ml und IL-6 in einer Konzentration von 100 pg/ml nachgewiesen; diese Mengen wurden auch nach Stimulation mit IL-18 gemessen.

Auch die JNK wird in Swiss 3T3 durch IL-1 und LPS aktiviert, während IL-18 dazu nicht in der Lage ist. In der Positivkontrolle wurde die JNK mit 500 mM Sorbitol stimuliert (Abb. 6).

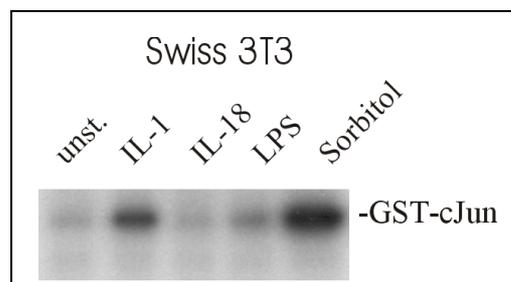


Abb. 6: *In vitro* JNK Assay: 1×10^5 Swiss 3T3 wurden in 6well-Platten für 15 min mit 10 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml IL-18, 1 μ g/ml LPS bzw mit 500 mM Sorbitol inkubiert.

Die Akt-Kinase wird durch IL-1 und LPS ebenfalls aktiviert (Abb. 7).

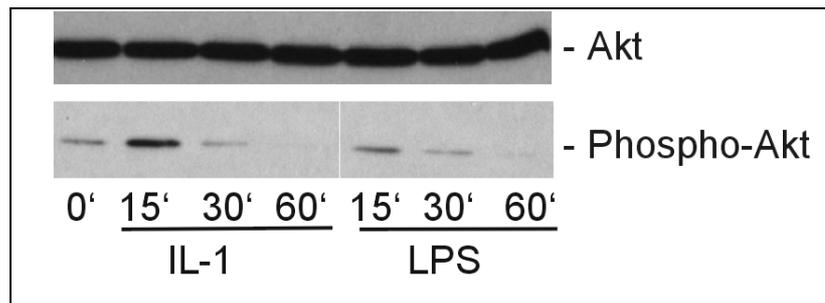


Abb. 7: Akt-Kinaseassay: Swiss 3T3 wurden mit IL-1 bzw. LPS stimuliert. Akt-Kinase (oben) und phosphorylierte Akt-Kinase (unten) wurden in einem Westernblot der cytosolischen Fraktion nachgewiesen.

Die Aktivierung der Akt-Kinase erfolgt sowohl durch IL-1 als auch durch LPS innerhalb von 15 min. Diese Aktivierung ist transient. Nach 30 min Stimulation ist die Menge an aktivierter Akt schon wieder deutlich reduziert, nach 60 min Stimulation ist keine aktivierte Akt mehr nachweisbar. Durch Stimulation mit IL-18 wird Akt in Swiss 3T3 nicht aktiviert.

Die untersuchten Reaktionen von Swiss 3T3 auf Stimulation mit IL-1 und LPS unterscheiden sich weder qualitativ noch quantitativ.

EL4 6.1 reagieren auf IL-1 und IL-18, nicht jedoch auf LPS.

1×10^4 EL4 6.1 wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an IL-1, LPS bzw. IL-18 und zusätzlich mit dem Calciumionophor A23187 (final 10^{-6} M) in je 200 μ l Gesamtvolumen inkubiert. Im Zellüberstand wurde IL-2 gemessen. Die Dosis-Wirkungskurven von IL-1 und IL-18 sind in Abb. 8 dargestellt. Die Gesamtmenge an IL-2, die nach Stimulation mit IL-18 freigesetzt wird, beträgt nur einen Bruchteil der durch die Stimulation mit IL-1 freigesetzten Menge. Eine mögliche Ursache hierfür ist eine geringe Anzahl an IL-18-Rezeptoren auf den Zellen (s. auch 3.2.1.1)

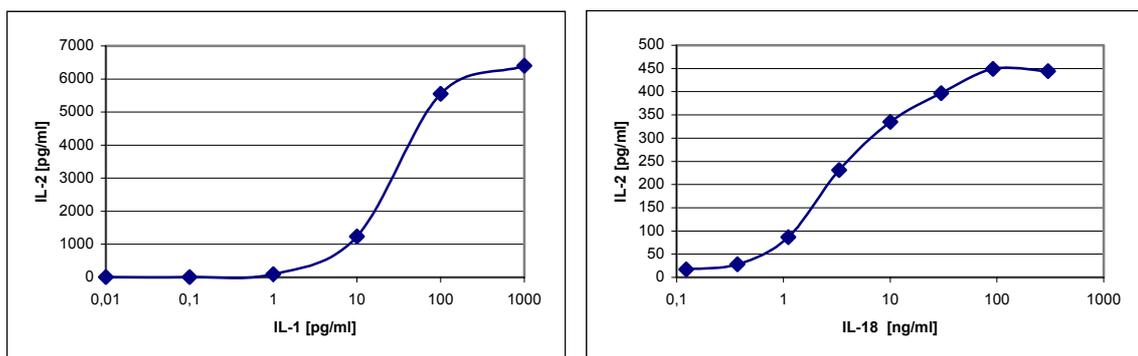


Abb. 8: IL-2 ELISA: IL-2 im Zellkulturüberstand von EL4 6.1 nach Stimulation mit IL-1 oder IL-18.

Für IL-12 ist ein Einfluss auf die IL-18-Rezeptorexpression gezeigt worden [62, 166].

Eine Vorinkubation der Zellen für 24 Stunden mit 10 ng/ml IL-12 hatte jedoch keinen Einfluss auf die IL-2-Freisetzung nach Stimulation mit IL-18.

Der Unterschied in der Intensität der Stimulation von EL4 6.1 durch IL-1 und IL-18 findet sich auch in der NFκB Induktion. Die Autoradiographie des EMSA zeigt für IL-1 stimulierte EL4 6.1 ein deutlich stärkeres Signal als für IL-18 stimulierte.

Eine Aktivität der JNK zeigt sich neben der mit Sorbitol stimulierten Positivkontrolle nur in IL-1 stimulierten EL4 6.1 (Abb. 9). Die durchweg schwächere Reaktion auf IL-18 bleibt in diesem Assay aus. Wenn die JNK in EL4 6.1 durch IL-18 aktiviert wird, dann liegt das Signal hier unter der Nachweisgrenze.

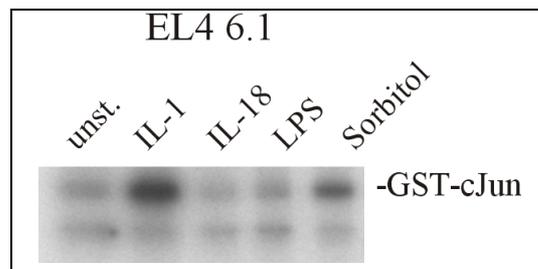


Abb. 9: In vitro JNK Assay: 1×10^6 EL4 6.1 wurden in 6well-Platten für 15 min mit 10 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml IL-18, 1 μ g/ml LPS bzw mit 500 mM Sorbitol inkubiert.

Eine Aktivierung der Akt in EL4 6.1 konnte durch keinen der drei Stimuli gezeigt werden.

Die Reaktionen von EL4 6.1 auf IL-1 und IL-18 unterscheiden sich in der Intensität. Auch nach Stimulation mit hohen IL-18-Konzentrationen bleiben die Reaktionen der Zellen schwächer als nach Stimulation mit IL-1.

70Z/3 reagieren auf LPS und IL-1 mit der Aktivierung von NFκB. Eine kinetische Untersuchung der NFκB-Aktivierung nach Stimulation zeigte jedoch deutliche Unterschiede zwischen Zellen, die mit LPS und solchen die mit IL-1 stimuliert wurden.

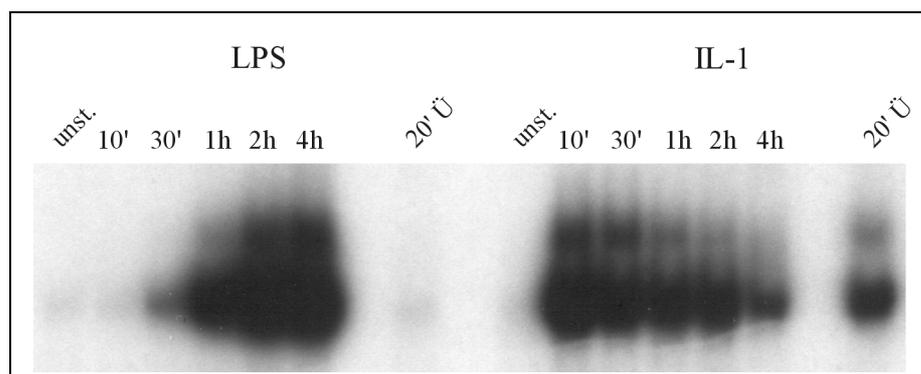


Abb. 10: Kinetik der NFκB-Aktivierung in 70Z/3: Je 1×10^7 Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 1 μ g/ml LPS bzw. 10 ng/ml IL-1 stimuliert. Je eine weitere Probe wurde mit dem Überstand des 4h Wertes für 20 min stimuliert.

Während die Stimulation mit IL-1 schon nach 10 min zu einer Translokation von NFκB führt, konnte durch Stimulation mit LPS erst nach 30 min eine NFκB-Translokation nachgewiesen werden. Innerhalb von vier Stunden nimmt das NFκB-Signal in IL-1 stimulierten Zellen

schon wieder deutlich ab, während das Signal der LPS-stimulierten 70Z/3 nach zwei bis vier Stunden erst seine maximale Intensität erreicht. Innerhalb der Stimulationsdauer nimmt die Aktivität des IL-1 nicht deutlich ab. In einer Probe, die für 20 Minuten mit dem Zellüberstand der für vier Stunden mit IL-1 stimulierten 70Z/3 stimuliert wurde, konnte deutlich eine NFκB-Translokation nachgewiesen werden. Eine ebenso mit LPS stimulierten Zellen durchgeführte Kontrolle zeigte kein NFκB-Translokationssignal. Eine durch LPS induzierte, NFκB unabhängige Freisetzung eines Mediators, der dann in einer Sekundärreaktion eine NFκB-Translokation induziert, kann also ausgeschlossen werden.

Neben diesem kinetischen Unterschied wurde zwischen IL-1 und LPS stimulierten 70Z/3 auch ein quantitativer Unterschied in der Antwort gefunden.

Die Oberflächenexpression der κ-leichten Kette wurde im FACS untersucht (Abb. 11).

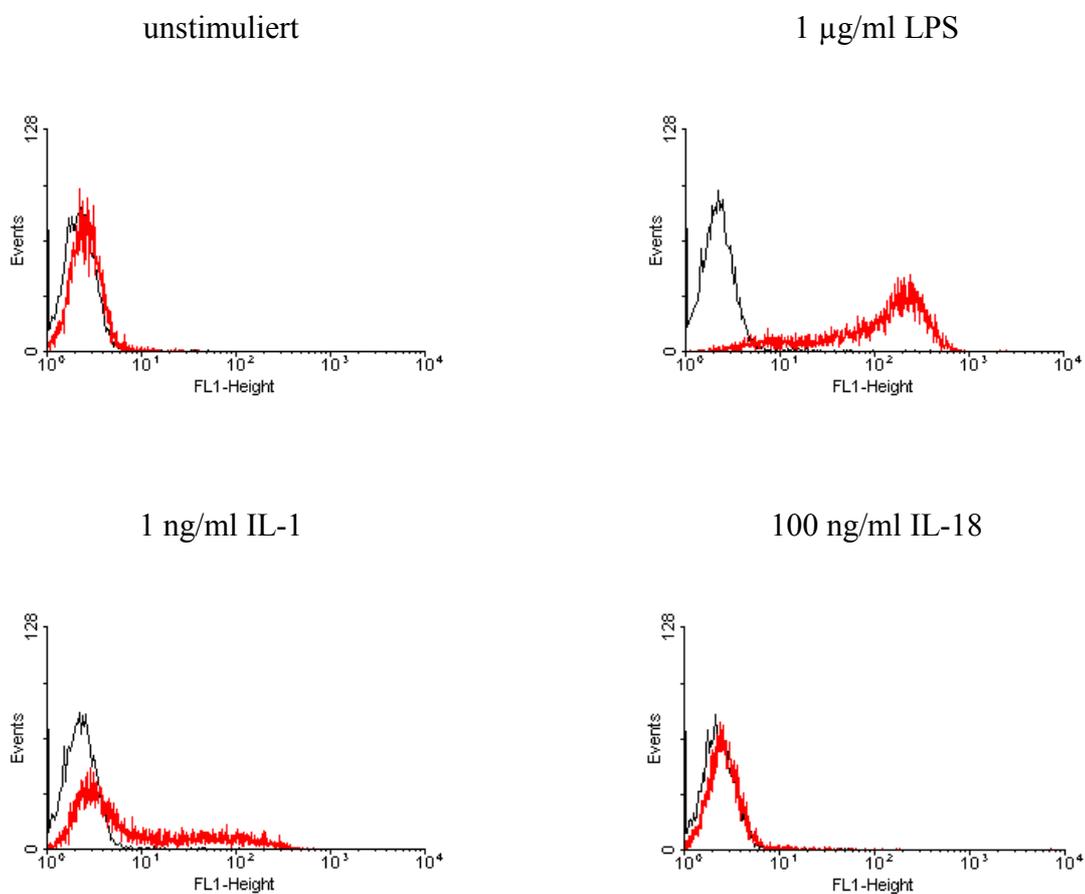


Abb. 11: Expression der κ-leichten Kette auf 70Z/3:

70Z/3 wurden für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen an IL-1, LPS und IL-18 stimuliert. Die Färbung der Zellen erfolgte mit einem FITC-markierten Antikörper³⁴. Die relative Zellzahl (*Events*) ist gegen die Fluoreszenzintensität (*FL1-Height*) aufgetragen.

³⁴ Ratte α Maus Igκ, Southern Biotechnology Association (SBA), Serva (Heidelberg)

Während auf unstimulierten 70Z/3 wie erwartet[167] keine κ -leichte Kette nachzuweisen ist, führt die Stimulation mit IL-1 (1 ng/ml) bzw. LPS (1 μ g/ml) zu einer nachweisbaren Expression von κ -leichter Kette auf der Zelloberfläche. Die durch Stimulation mit IL-1 erreichte Expression ist jedoch wesentlich geringer als die durch LPS erreichte. Weder eine höhere Stimuluskonzentration (100 ng/ml IL-1) noch eine längere Inkubationszeit (48 Stunden) hatten darauf einen Einfluss. Eine Stimulation mit geringeren Konzentrationen an IL-1 (10 pg/ml) und LPS (10 ng/ml) sowie eine Stimulation mit IL-18 (100 ng/ml) kann keine κ -leichte Kette Expression induzieren.

Eine in einem NF κ B-Reporterassay aufgenommene Dosis-Wirkungs-Kurve (Abb. 12) zeigt nach 9 Stunden Stimulation mit IL-1 bzw. LPS etwa gleiche maximale Luciferaseaktivität. In mit 10 ng/ml LPS stimulierten 70Z/3 lässt sich schon eine deutliche Luciferaseaktivität nachweisen. Die Expression der κ -leichten Kette wurde bei dieser LPS-Konzentration noch nicht induziert. Vielleicht wurde ein nötiger Schwellenwert nicht überschritten. Durch gleichzeitige Transfektion von CD14 wird die Dosis-Wirkungs-Kurve von LPS deutlich verschoben. Schon bei einer LPS-Konzentration von 1 ng/ml wird annähernd die Maximalstimulation erreicht (3.2.1.3).

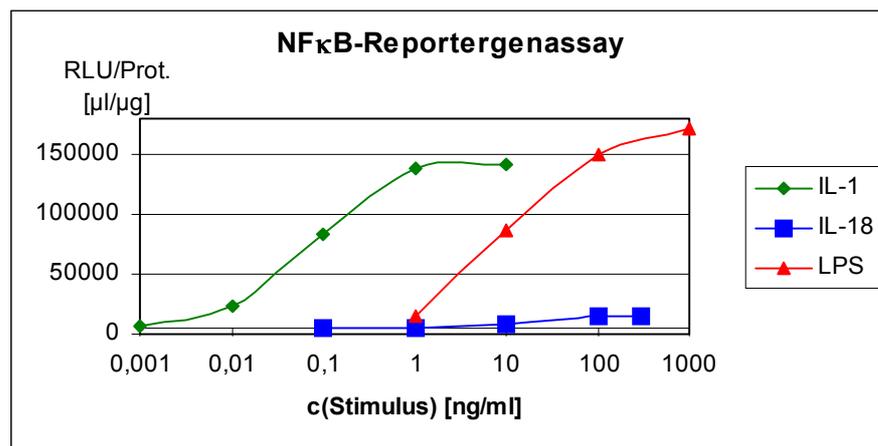


Abb. 12: NF κ B-Reporterassay: Pro Punkt wurden 2×10^6 70Z/3 mit p3xNF κ B transfiziert und 20 Stunden nach der Transfektion mit verschiedenen Konzentrationen an IL-1, LPS bzw. IL-18 stimuliert. Nach 9 Stunden Inkubation mit dem Stimulus wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität gemessen.

Die JNK wird in 70Z/3 weder durch IL-1 (10 ng/ml), LPS (1 μ g/ml) noch durch IL-18 (100 ng/ml) nachweisbar aktiviert (Abb. 13).

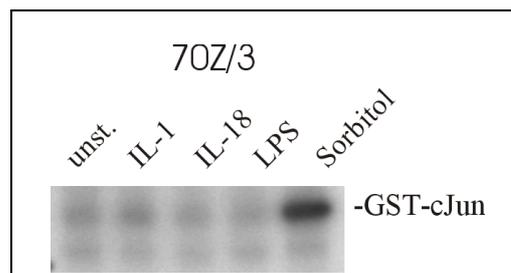


Abb. 13: In vitro JNK Assay: 1×10^6 70Z/3 wurden in 6well-Platten für 15 min mit 10 ng/ml IL-1 β , 100 ng/ml IL-18, 1 μ g/ml LPS bzw. 500 mM Sorbitol inkubiert.

Auch eine Aktivierung der Akt-Kinase durch einen der drei Stimuli konnte nicht nachgewiesen werden. Da die Stimulation mit LPS gegenüber IL-1 hinsichtlich der NF κ B-Aktivierung eine verzögerte Kinetik zeigte, wurde auch die Akt-Aktivierung durch LPS nach 15, 30 und 60 Minuten untersucht. Zu keinem der Zeitpunkte war aktivierte Akt nachweisbar.

3.2 Rekonstitution der Rezeptorkomplexe

Das initiale Ereignis bei der Aktivierung einer Zelle durch IL-1, IL-18 oder LPS ist die Bindung des Stimulus an den entsprechenden Rezeptor. Ob und in welcher Anzahl die Rezeptoren für die verschiedenen Stimuli auf der Oberfläche einer Zelle exprimiert werden, ist damit ausschlaggebend für die Fähigkeit einer Zelle, auf einen Stimulus zu reagieren.

Durch Transfektionen wurden die verschiedenen Rezeptorkomponenten einzeln und in Kombination auf nicht bzw. schwach responsiven Zellen überexprimiert und der Einfluss auf die Reaktivität untersucht.

3.2.1 Im transienten Überexpressionsexperiment

EL4 6.1 reagieren nur schwach auf IL-18 und gar nicht auf LPS. Die mRNA für die IL-18-Rezeptorkomponenten ist vorhanden, für CD14, einen Bestandteil des LPS-Rezeptorkomplexes, fehlt die mRNA jedoch (s. 3.1.1). Der Frage, ob die Überexpression von IL-18-Rezeptorkomponenten die Reaktivität von EL4 6.1 auf IL-18 erhöhen kann und ob sich durch Überexpression von LPS-Rezeptorkomponenten eine LPS-Responsivität erzeugen lässt, wurde in transienten Transfektionsexperimenten untersucht.

3.2.1.1 Überexpression von IL-18-Rezeptorkomponenten in EL4 6.1

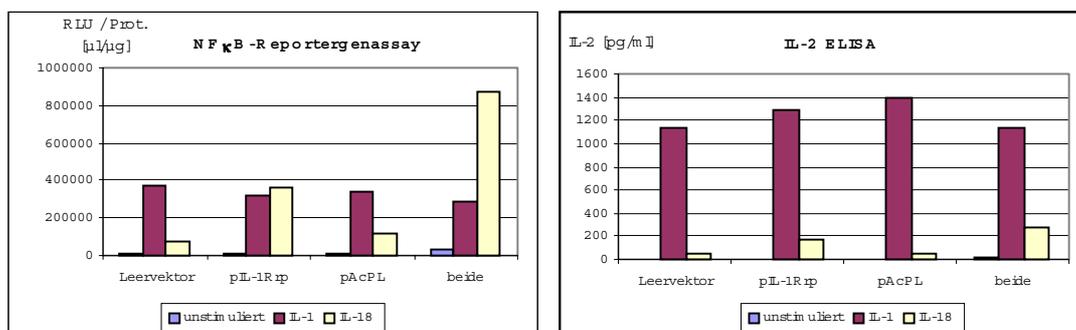


Abb. 14: NF κ B-Aktivierung (links) und IL-2 Produktion (rechts) von EL4 6.1 bei Überexpression von IL-18-Rezeptorkomponenten.

Je 1×10^7 EL4 6.1 wurden mit $1/3 \mu\text{g}$ p3xNF κ B und zusätzlich mit 1.) $2/3 \mu\text{g}$ pUC18, 2.) $1/3 \mu\text{g}$ pmIL-1Rrp + $1/3 \mu\text{g}$ pUC18, 3.) $1/3 \mu\text{g}$ pmAcPL + $1/3 \mu\text{g}$ pUC18, 4.) $1/3 \mu\text{g}$ pmIL-1Rrp + $1/3 \mu\text{g}$ pmAcPL transfiziert.

6 Stunden nach der Transfektion wurden die Ansätze für den anschließenden Reporterassay bzw. den IL-2-ELISA aufgeteilt. Je ein Drittel der Ansätze wurde unstimuliert gelassen, die anderen mit 10 ng/ml IL-1 bzw. 100 ng/ml IL-18 stimuliert. Für den IL-2 ELISA wurde zusätzlich 10^{-6} M A23187 zugegeben. Die Stimulation für den Reporterassay wurde nach 16 Stunden, die für den IL-2-ELISA nach 20 Stunden abgebrochen. Die Luciferaseaktivität wurde auf die Proteinmenge in den Lysaten normiert.

Durch die Überexpression von IL-1Rrp wird die durch IL-18 induzierte NFκB-Reportergenaktivität auf fast das fünffache gesteigert (von etwa 75000 auf etwa 367000). Durch zusätzliche Transfektion von AcPL wird die NFκB-Reportergenaktivität nochmal auf mehr als das doppelte gesteigert. AcPL alleine hat nur einen geringen Einfluss auf die NFκB-Reportergenaktivität. Im IL-2 ELISA sieht man den Einfluss der Überexpression der IL-18-Rezeptorkomponenten bestätigt. Vor dem Hintergrund untransfizierter Zellen fällt er lediglich schwächer aus.

Auf die als Kontrolle untersuchten IL-1 induzierten Effekte hat die Überexpression der IL-18-Rezeptorkomponenten keinen Einfluss.

In EL4 6.1 ist also eine geringe Expression von IL-1Rrp für die, verglichen mit IL-1 induzierten Effekten, schwachen Antworten auf IL-18 verantwortlich (Abb. 14).

3.2.1.2 Überexpression von LPS-Rezeptorkomponenten in EL4 6.1

Weder durch die Überexpression von CD14 oder TLR4 noch durch die Koexpression beider Moleküle konnte eine LPS-stimulierte IL-2 Produktion erreicht werden. Dies gilt sowohl für die humanen als auch für die murinen Moleküle.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist das Fehlen einer weiteren LPS-Rezeptorkomponente.

Sowohl der IL-1 als auch der IL-18-Rezeptorkomplex benötigen intrazelluläre TIR-Domänen zweier Rezeptormoleküle für die Aktivierung der Signaltransduktion. Um eine solche zweite TIR-Domäne im LPS-Rezeptorkomplex zur Verfügung zu stellen wurde ein Expressionsplasmid kloniert, das für ein Fusionsprotein aus CD14 und der TIR-Domäne von AcP codiert.

Klonierung eines CD14-AcP-Fusionsproteins

Als Expressionsvektor wurde pFLAG-CMV-1³⁵ gewählt. Nach einer Leadersequenz, die für eine membranständige Expression des codierten Proteins sorgt, folgt die Sequenz für das FLAG-Epitop. Die für das Fusionsprotein codierende Sequenz wurde über *EcoRI* und *BamHI* kloniert. Sie enthält die Sequenz für murines CD14³⁶ ohne Leader bis vor das GPI-Verankerungssignal (ω -site), danach folgt die Sequenz für murines AcP³⁷ beginnend mit neun extrazellulären Aminosäuren und der Transmembrandomäne bis zum Stopcodon. Die Sequenzen wurden durch PCR aus den Plasmiden pEF-BosxMaCD14 (erhalten von Felix Stelter) bzw. pAcP-Flag amplifiziert und in einer Fusions-PCR zusammengefügt. Die verwendeten Primer enthalten jeweils die Schnittstelle (unterstrichen) bzw. eine kurze Überlappungssequenz (fett) für die Fusion.

mCD14 s78- <i>EcoRI</i>	GCG <u>AAAT TCA</u> TCT CCC GCC CCA CCA GAG C
mCD14 as1055/mAcP	GTG GTA TGA CGG TGA CTA CGC CAG AGT TAA AC
mAcP s1185/mCD14	CGT AGT CAC CGT CAT ACC ACC AAG GTA CAC AG
mAcP s1887- <i>BamHI</i>	CGG <u>GAT CCT</u> CAT ACG TTT TTC AGG GAT GAG

³⁵ Sigma

³⁶ Accession: X13333

³⁷ Accession: X85999

Das erhaltene Expressionskonstrukt pFLCD14-AcP codiert für ein Flag-Epitop getagtes Protein mit einem Molekulargewicht von 62 kD. Nach Transfektion in HEK 293 wurde im α Flag-Westernblot ein Protein in der erwarteten Größe nachgewiesen.

Eine Transfektion von pFLCD14-AcP in EL4 6.1 führte zu einer dosisabhängigen aber stimulusunabhängigen Induktion der IL-2-Freisetzung. Diese konstitutive Aktivierung der Zellen wurde weder bei Überexpression von CD14 noch bei Überexpression von AcP beobachtet. Auch bei Koexpression des Fusionsproteins mit CD14 und / oder TLR4 blieb die IL-2-Freisetzung stimulusunabhängig (Daten nicht gezeigt).

3.2.1.3 Überexpression von LPS-Rezeptorkomponenten in 70Z/3

Die Überexpression von CD14 in 70Z/3 hat einen Einfluss auf die Sensitivität der Zellen gegenüber LPS[8]. Dies konnte im NF κ B-Reportergenassay reproduziert werden. Nach Expression von CD14 alleine, von CD14 in Kombination mit mTLR4 und nach Expression des mCD14-AcP-Fusionsproteins wird eine annähernd maximale NF κ B-Aktivierung schon bei 1 ng/ml LPS erreicht. Das Fusionsprotein verhält sich hier wie CD14. Der CD14 Anteil von mCD14-AcP wird also funktionell exprimiert.

Zusätzliche Expression von TLR4 hat keinen Einfluss auf die Sensitivität der Zellen gegenüber LPS und die Maximalintensität des NF κ B-Signals wird durch keine der LPS-Rezeptorkomponenten beeinflusst.

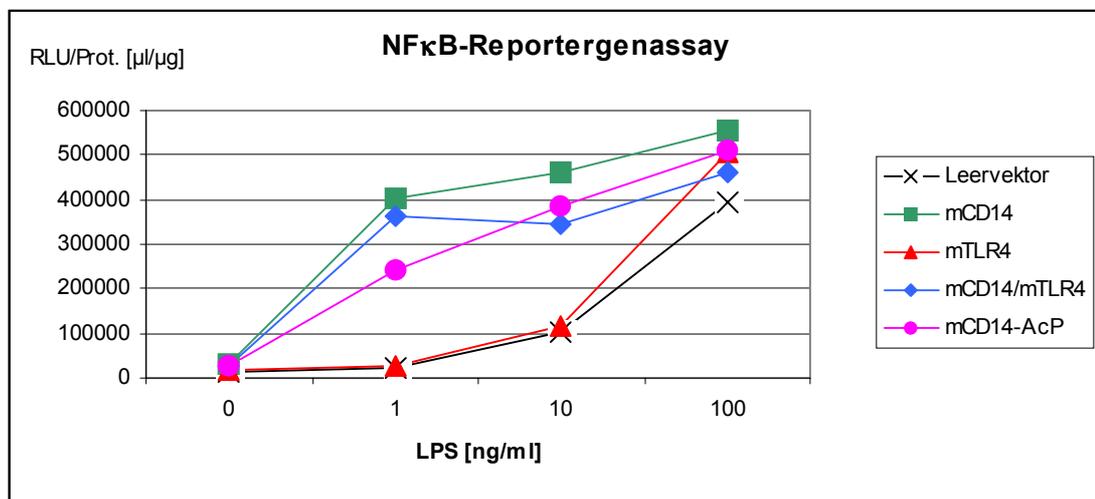


Abb. 15: Dosis-Wirkung der NF κ B-Aktivierung bei Überexpression von LPS-Rezeptorkomponenten.

Je 1×10^7 70Z/3 wurden mit 0,7 μ g p3xNF κ B und zusätzlich mit 1.) 1,4 μ g pUC18, 2.) 0,7 μ g pEF-Bos x MaCD14 + 0,7 μ g pUC18, 3.) 0,7 μ g pmTLR4 + 0,7 μ g pUC18, 4.) 0,7 μ g pEF-Bos x MaCD14 + 1/3 μ g pmTLR4, 5.) 0,7 μ g pmCD14-AcP + 0,7 μ g pUC18 transfiziert.

18 Stunden nach der Transfektion wurden je 1/4 der Ansätze unstimuliert gelassen bzw. mit 1, 10 oder 100 ng/ml LPS stimuliert. Nach weiteren 8 Stunden Inkubation wurden die Zellen für den Reportergenassay lysiert. Die gemessene Luciferaseaktivität wurde auf die Proteinmenge in den Lysaten normiert.

3.2.1.4 Überexpression von IL-18-Rezeptorkomponenten in L929

L929 wurden in 96-well Platten nach der Kalziumphosphatmethode transfiziert (s. 2.6.1.1).

Die Transfektion erfolgte für 6 Stunden mit anschließendem Glycerolschock. 20 Stunden nach Transfektionsstart wurde stimuliert. Die Zellüberstände wurden nach weiteren 24 Stunden abgenommen und die PGE₂-Konzentration im ELISA bestimmt.

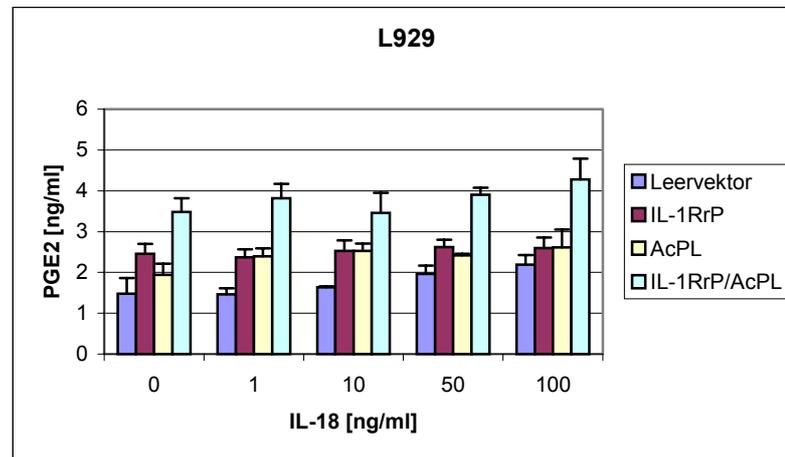


Abb. 16: Konstitutive Aktivierung von L929 durch Überexpression von IL-18-Rezeptorkomponenten.

Die Transfektion erfolgte in 100 µl Medium mit 1/40 des Standardtransfektionsgemisches. Zur Herstellung des Transfektionsgemisches wurden 1.) 15 µg pDC304 (Leervektor), 2.) 5 µg pIL-1RrP + 10 µg pDC304, 3.) 5 µg pAcPL + 10 µg pDC304 und 4.) 5 µg pIL-1RrP, 5 µg pAcPL + 5 µg pDC304 im Standardansatz eingesetzt.

Durch die Überexpression von IL-18-Rezeptorkomponenten wird eine stimulusunabhängige, konstitutive PGE₂ Freisetzung induziert. Die Überexpression der einzelnen Rezeptorkomponenten führt je zu einer schwachen Erhöhung der PGE₂ Freisetzung. Durch die Kombination der beiden Rezeptorketten wird die PGE₂ Menge im Zellüberstand verdoppelt (Abb. 16).

3.2.2 Versuch der Herstellung einer triple-responsiven Zelllinie

Wie in L929 wurde auch in Swiss 3T3 untersucht, ob die fehlende IL-18 Responsivität auf das Fehlen der IL-18-Rezeptorkomponenten zurückzuführen ist.

In stabil transfizierten Zellen sollte auch die Aktivierung der Signalwegkomponenten untersucht werden, was in transient transfizierten Zellen aufgrund des Transfektionsstresses oder vor dem Hintergrund untransfizierter Zellen nicht gelang. Swiss 3T3 wären nach einer durch stabile Transfektion erreichte IL-18 Responsivität triple-responsiv und damit ideal für den direkten Vergleich aller drei Signalwege geeignet.

Swiss 3T3 wurden mit FuGene³⁸ in 6-well Platten mit je 0,5 µg pFLIL-1RrP+ und pFLAcPL+ bzw. mit pcDNA3 als Kontrolle transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen aus einem well in zwei 10 cm Schalen verteilt. Nach einem weiteren Tag wurde mit 1 mg/ml G418

³⁸ Böhlinger (Mannheim)

selektiert. Das Selektionsmedium wurde alle zwei Tage erneuert. Nach zwei Wochen wurden aus den entstandenen kleinen Plaques Einzelzellklone erzeugt.

Die Auswahl IL-18 responsiver Klone erfolgte im IL-6 ELISA nach Stimulation der Zellen mit IL-18.

3.2.2.1 Klonierung von pFLIL-1Rrp+ und pFLAcPL+

Zur stabilen Transfektion von Swiss 3T3 mit den IL-18-Rezeptorkomponenten wurden Expressionsplasmide kloniert, die für N-terminal Flag-Epitop getagte Rezeptorketten codieren. Gleichzeitig sollten die Expressionsplasmide einen Selektionsmarker enthalten.

Als Ausgangsmaterial standen die Vektoren pIL-1Rrp1 und pAcPL zur Verfügung, die in pDC304 die Sequenzinformationen für die beiden Rezeptorketten incl. endogener Leadersequenzen enthalten. Die Klonierung wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

- Amplifikation der Sequenzen von IL-1Rrp und AcPL ohne die endogenen Leadersequenzen durch PCR. Einführen von Restriktionsschnittstellen durch die verwendeten Primer (1+2 bzw. 3+4)
- Klonierung der PCR-Produkte in pFlag-CMV-1 über *HindIII* und *XbaI* (pFLIL-1Rrp und pFLAcPL)
- Amplifikation der Sequenzen von IL-1Rrp und AcPL incl Flag und Leadersequenz aus pFlag-CMV-1, dabei Einführung von *NotI* (Primer: 5+2 bzw. 5+3)
- Klonierung der PCR-Produkte in pcDNA3 über *NotI* und *XbaI* (pFLIL-1Rrp+ und pFLAcPL+)

Verwendete Primer:

1. IL-1Rrp s435 *HindIII* ACA AGC TTT CAA AAA GTT GTA TTC ACC
2. IL-1Rrp as 1994 *XbaI* ACT CTA GAT CAA GGT GCT GAG AGA AC
3. AcPL s494 *HindIII* ACA AGC TTT TTA ATC ATT CAG
4. AcPL as2281 *XbaI* ACT CTA GAT CAG CAC CTC TTC TGG TC
5. Leader/Flag s *NotI* CTT GCG GCC GCA CCA TGT CTG CAC TTC TGA TC

Die über die Primer eingeführten Schnittstellen sind unterstrichen.

Die beiden Plasmide pFLIL-1Rrp+ und pFLAcPL+ wurden sequenziert. Punktmutationen wurden „repariert“, indem geeignete Bereiche durch Restriktionsspaltungen gegen die Sequenz aus den Originalvektoren ersetzt wurden.

Nach Transfektion der Plasmide in HEK 293 wurden im α Flag Westernblot der Zelllysate Proteine der erwarteten Größe nachgewiesen (FLIL-1Rrp: 60,9 kD; FLAcPL: 69,3 kD). IL-1Rrp liegt zum Teil modifiziert, mit einem größeren Molekulargewicht vor.

3.2.2.2 Untersuchung der Klone

In einem ersten *screening* wurden 20 Klone aus 5 verschiedenen Pools identifiziert, die nach Stimulation mit IL-18 IL-6 freisetzten. Zur weiteren Charakterisierung wurden zunächst drei Klone ausgewählt, in denen die IL-6-Freisetzung nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an IL-1, LPS und IL-18 untersucht wurde.

In diesem Experiment reagierte nur einer der drei Klone auf IL-18. Die Stimulation von D1/E12 mit IL-18 (100 ng/ml) verdoppelte die sezernierte Menge an IL-6 von 50 auf 100 pg/ml. Durch IL-1 (10 pg/ml) wurde der gleiche Effekt erzielt, während im Überstand LPS stimulierter (10 ng/ml) Zellen eine IL-6-Konzentration von 180 ng/ml gemessen wurde.

In einem anschließenden NFκB-EMSA wurde in D1/E12 keine durch IL-18 induzierte NFκB Translokation nachgewiesen, während IL-1 und LPS eine Translokation induzierten.

In diesem Experiment fiel eine Konzentrationsabhängigkeit der NFκB-Aktivierung durch IL-1 und LPS auf (s. Abb. 17).

Daraufhin wurden alle 20 Klone erneut im IL-6 ELISA auf IL-18 Responsivität untersucht.

Eine IL-18 abhängige IL-6-Freisetzung wurde in keinem der Klone wiedergefunden.

Vier Klone reagierten weder auf IL-18 (10-200 ng/ml) noch auf IL-1 (1 ng/ml). Die übrigen Klone sezernierten auch ohne Stimulation IL-6 (zwischen 50 und 500 pg/ml). Durch Stimulation mit IL-1 (1 ng/ml) wurde die sezernierte IL-6 Menge um den Faktor 2-10 erhöht, während IL-18 auch auf diesen Zellen keinen Einfluss hatte.

Durch die Transfektion wurde kein stabiler, IL-18 responsiver Klon erhalten. Die IL-18 induzierte IL-6-Freisetzung, die sowohl beim *screening* als auch bei dem Klon D1/E12 beobachtet wurde, zeigt jedoch, dass eine IL-18 induzierte Antwort in IL-18-Rezeptor rekonstituierten Swiss 3T3 möglich ist. Die Expression von IL-18-Rezeptoren reguliert also auch in Swiss 3T3 wie schon in L929 und EL4 6.1 die IL-18-Responsivität der Zelle.

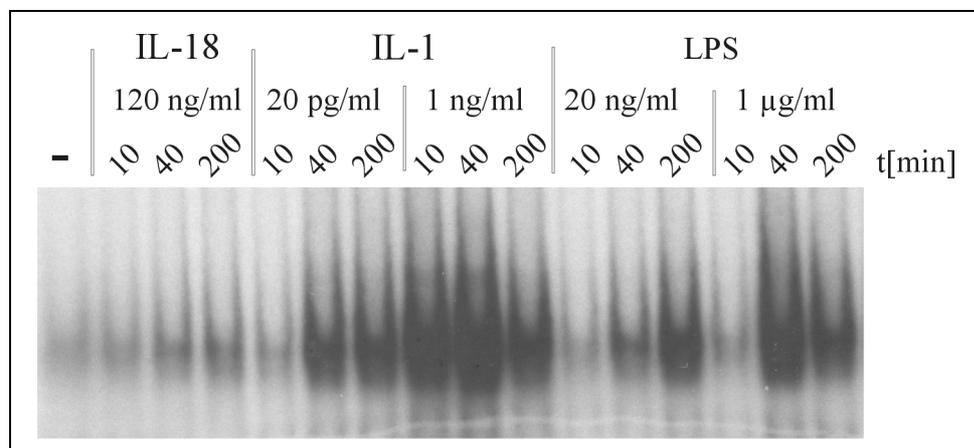


Abb. 17: NFκB-EMSA: Der 3T3-Klon D1/E12 wurde für verschiedene Zeiten mit unterschiedlichen Konzentrationen an IL-18, IL-1 oder LPS stimuliert.

In D1/E12 induzieren sowohl 20 pg/ml als auch 1 ng/ml IL-1 die DNA-bindende Aktivität von NFκB. Bei einer IL-1-Konzentration von 20 pg/ml ist dies jedoch erst nach 40 min nachweisbar, während bei 1 ng/ml schon nach 10 min eine Translokation von NFκB stattfindet. Ähnlich ist die Konzentrationsabhängigkeit bei LPS. Bei einer LPS-Konzentration von 20 ng/ml nimmt die DNA-bindende Aktivität von 40 bis 200 min noch zu, während bei 1 µg/ml LPS das Maximum schon nach 40 min erreicht ist.

Die gleichen Kinetiken zeigte auch der zur Kontrolle mitgeführte leervektortransfizierte Klon.

3.3 Vergleich von Geninduktionsprofilen mit cDNA Arrays

In Swiss 3T3 waren alle bislang untersuchten Reaktionen auf die Stimulation mit IL-1 und LPS praktisch identisch. Der Vergleich des Geninduktionsprofils von Swiss 3T3, die mit IL-1 stimuliert wurden, mit solchen, die mit LPS stimuliert wurden, sollte diese Aussage erweitern oder Unterschiede aufzeigen. Hierzu wurde ein cDNA Expressions Array der Firma Clontech verwendet, mit dem gleichzeitig die mRNA-Level von 1176 Genen untersucht werden können (s. 2.14). Parallel wurden die Geninduktionsprofile von EL4 6.1 untersucht, um Unterschiede zwischen IL-1 und IL-18 stimulierten Zellen zu finden.

Unterschiede im Geninduktionsprofil verschieden stimulierter Zellen deuten auf Unterschiede in den Signaltransduktionskaskaden hin, die durch die Stimuli ausgelöst werden.

3.3.1 Einfluss experimenteller Abweichungen vom Herstellerprotokoll

Die Durchführung der Sondenpräparation und Hybridisierung erfolgte im Wesentlichen nach Angaben des Kit-Herstellers. Bei der RNA-Präparation und bei der Reversen Transkription wurden andere Produkte verwendet.

3.3.1.1 RNA-Präparation und DNase-Verdau

Clontech empfiehlt neben einer eigenen Phenol:Chlorophorm basierten RNA-Präparationsmethode das NucleoSpin RNA II Kit von Machery Nagel. Dieses Kit nutzt wie Qiagens RNeasyKit ein Silikatgel und war diesem in einem früheren Vergleich hinsichtlich Ausbeute an RNA unterlegen. Außerdem gelang die Amplifikation von PCR-Produkten mit revers transkribierter RNA aus dem RNeasy-Kit besser. Die RNA-Präparation erfolgte daher zunächst mit dem RNeasy-Kit von Qiagen.

Die Autoradiographie der hybridisierten Arraymembranen zeigte einen relativ hohen unspezifischen Hintergrund. Als mögliche Ursache werden von Clontech Verunreinigungen der RNA durch genomische DNA genannt. Dieser möglichen Ursache wurde mit einer PCR nachgegangen. Neben einer RNA-Präparation mit RNeasy wurde eine RNA-Präparation mit Trizol vor und nach DNase-Verdau untersucht (Abb. 18).

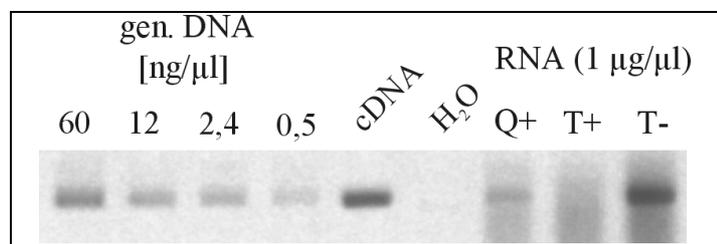


Abb. 18: PCR zur Untersuchung von RNA auf Kontamination durch genomische DNA. Es wurden 40 PCR-Zyklen durchgeführt: 1,5 mM MgCl₂, 30 sec Denaturieren, 30 sec. Annealing (55 °C), 60 sec Elongation. Als Template wurde genomische DNA in versch. Konzentrationen, cDNA aus RNA von Swiss 3T3, Wasser als Negativkontrolle und RNA, die mit Qiagens RNeasy-Kit mit DNase-Verdau auf der Säule (Q+) bzw mit Trizol vor (T-) und nach (T+) DNase-Verdau präpariert wurde, eingesetzt.

Verwendete Primer: maldolase 4344s (5' -AGC TGT CTG ACA TCG CTC AC-3')
 maldolase 4706as (5' -ACC TTA ATG CCC ACA ACA CC-3')

Die PCR zeigte bei der mit dem RNeasy-Kit durchgeführten RNA-Präparation trotz DNase-Verdau eine deutliche Verunreinigung durch genomische DNA. Der DNase-Verdau auf der Silikat-Membran der Säule war also unvollständig. Ein Vergleich mit PCR-Produkten aus definierten Mengen genomischer DNA zeigt, dass der Anteil an genomischer DNA in der Präparation bei ~0,1 % liegt. Laut Clontech sollte dieser Anteil nicht größer als 0,001 % sein. Der DNase-Verdau in Lösung, der nach Trizol-Aufreinigung durchgeführt wurde ließ keine nachweisbaren Mengen an genomischer DNA zurück. Ein positiver Einfluss der RNA-Präparation mit Trizol auf das Hintergrundsignal späterer Hybridisierungen konnte dennoch nicht festgestellt werden.

3.3.1.2 Reverse Transkription

Zur Hybridisierung mit der Membran wird die RNA der stimulierten Zellen in einer Reversen Transkription mit einem für den verwendeten Array spezifischen Primergemisch in cDNA umgeschrieben und dabei radioaktiv markiert.

Neben der von Clontech mitgelieferten Reversen Transkriptase wird von vielen Anwendern die Superscript II von Gibco empfohlen. Letztere weist im Gegensatz zu der mitgelieferten Reversen Transkriptase keine RNase H-Aktivität auf und liefert daher größere Ausbeuten bei der cDNA-Synthese.

Diese beiden Reversen Transkriptasen wurden hinsichtlich der Ausbeute an radioaktiv markierter cDNA miteinander verglichen. Mit den jeweiligen Pufferbedingungen der Hersteller wurde RNA unter sonst gleichen Bedingungen revers transkribiert. Die Aktivität der Proben wurde nach Abtrennung freier Nucleotide im Szintillationszähler gemessen.

In der mit Superscript II umgesetzten Probe wurde mehr als doppelt soviel Aktivität gefunden wie in der Probe, die mit der im Kit mitgelieferten RT revers transkribiert wurde.

Daher wurde bei der Herstellung der Proben zur Hybridisierung der Membranen auf die Superscript II zurückgegriffen.

3.3.2 Überprüfung der Arraydaten durch semiquantitative RT-PCR

Die bei einmaliger Durchführung eines Arrays erhaltenen Daten gelten im allgemeinen nicht als verlässlich. Zu viele Parameter beeinflussen die einzelnen Hybridisierungssignale.

In dieser Arbeit wurden die Arrays zum *screening* genutzt, um Hinweise auf Kandidatengene zu bekommen, die dann weiter untersucht wurden. Statt der mehrfachen Untersuchung einer Zelllinie zu einem Zeitpunkt wurde das Geninduktionsprofil von Swiss 3T3 nach zwei bzw. 22 Stunden Stimulation und außerdem das Geninduktionsprofil von EL4 6.1 nach zwei Stunden Stimulation untersucht. So sollte von den aufgrund der hohen Kosten nur begrenzt zur Verfügung stehenden Membranen ein Maximum an Informationen erhalten werden. Die daraus resultierende Notwendigkeit der genauen Überprüfung interessanter Daten wurde in Kauf genommen.

Kandidatengene wurden in einer Reihe semiquantitativer RT-PCRs überprüft. Die verwendeten Primer sind in Abschnitt 2.5.4.2 aufgelistet.

Wie gut die semiquantitative PCR Unterschiede der Templatemengen detektieren kann, wurde mit einem Primerpaar für Hypoxantin-guanine Phosphoribosyltransferase (HPRT) exemplarisch untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 19 dargestellt.

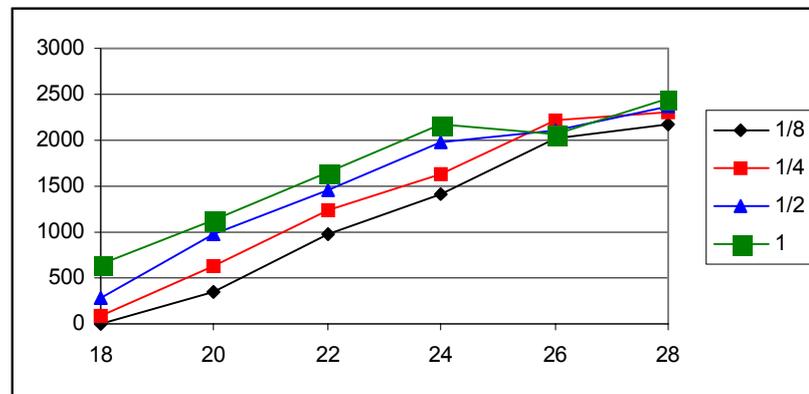


Abb. 19: Sensitivität der semiquantitative PCR: Mit einem Primerpaar für HPRT wurden PCR-Reaktionen mit cDNA aus Swiss 3T3 als template durchgeführt. Das Template wurde in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt (unverdünnt bis 1/8) und die PCR wurde nach verschiedenen Zykluszahlen (x-Achse) abgebrochen. Auf der y-Achse ist die rel. Intensität der PCR-Produkt-Bande im Agarosegel aufgetragen.

Die Unterscheidung der eingesetzten Templateverdünnungen gelang gut. In dem Bereich bis 24 Zyklen verlaufen die Intensitätskurven für die verschiedenen Templatemengen annähernd parallel. Bei halbiertem Template ist ein weiterer PCR-Zyklus nötig, um die gleiche Signalintensität zu erreichen. Oberhalb von 24 Zyklen gilt diese Abhängigkeit nicht mehr. Die PCR kommt in die Sättigung. Die theoretisch exponentielle Abhängigkeit der PCR-Produktmenge von der Zahl der PCR-Zyklen wird durch viele Faktoren beeinflusst. Die Polymerase verliert an Aktivität, die Eduktkonzentrationen nehmen ab, die Produktkonzentrationen zu, und beim Annealing lagern sich immer öfter PCR-Produkte aneinander, wodurch die Primerbindung verhindert wird.

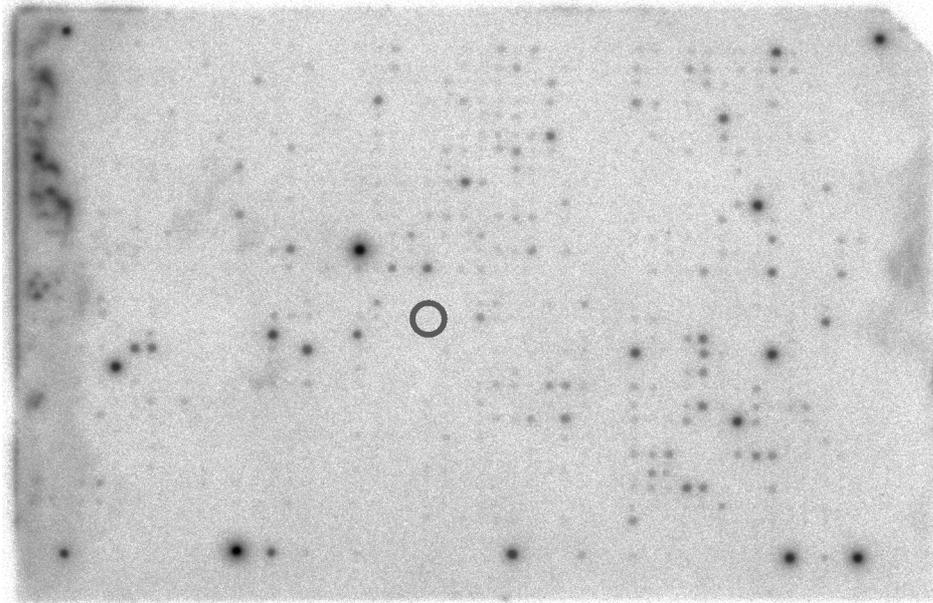
Die optimalen Bedingungen für eine aussagekräftige RT-PCR sind abhängig vom verwendeten Primerpaar.

Die PCR-Reaktionen zur Überprüfung der Kandidatengene wurden daher jeweils mit verschiedenen Zykluszahlen durchgeführt. Als interne Kontrolle wurden teilweise Parallelansätze mit halben Templatemengen mitgeführt.

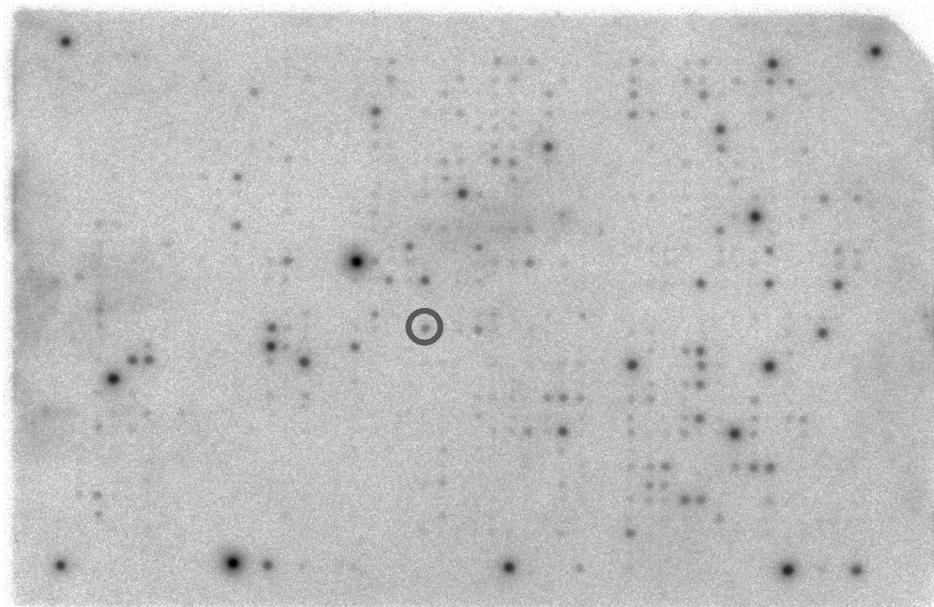
3.3.3 Geninduktionsprofil von Swiss 3T3

Zunächst wurde das Geninduktionsprofil von Swiss 3T3 verglichen, die entweder unstimuliert blieben oder für zwei Stunden mit LPS (10 ng/ml) bzw. IL-1 β (100 pg/ml) stimuliert wurden.

Die erhaltenen Phosphoimagerdaten der unstimulierten und der mit IL-1 stimulierten Zellen sind in Abb. 20 beispielhaft dargestellt.



Swiss 3T3, unstimuliert



Swiss 3T3, 2h IL-1 β (100pg/ml)

Die Position E05b entspricht dem Gen IL-6: ○

Abb. 20: Phosphoimagerdaten der Arrayhybridisierung mit RNA von unstimulierten und 2 Stunden mit IL-1 stimulierten Swiss 3T3. Die Position des durch IL-1 hochregulierten Gens IL-6 ist markiert.

Die computergestützte Auswertung (s. 2.14) lieferte 97 Gene, deren Expression sich in zwei der untersuchten Proben um mehr als den Faktor 1,5 unterschied. Die Expression von 39 Genen unterschied sich um mehr als den Faktor zwei. 20 dieser Signale konnten bei einer manuellen Überprüfung der Computerdaten nicht bestätigt werden. Die Signalintensitäten der verbleibenden 19 Gene sind in folgender Grafik dargestellt:

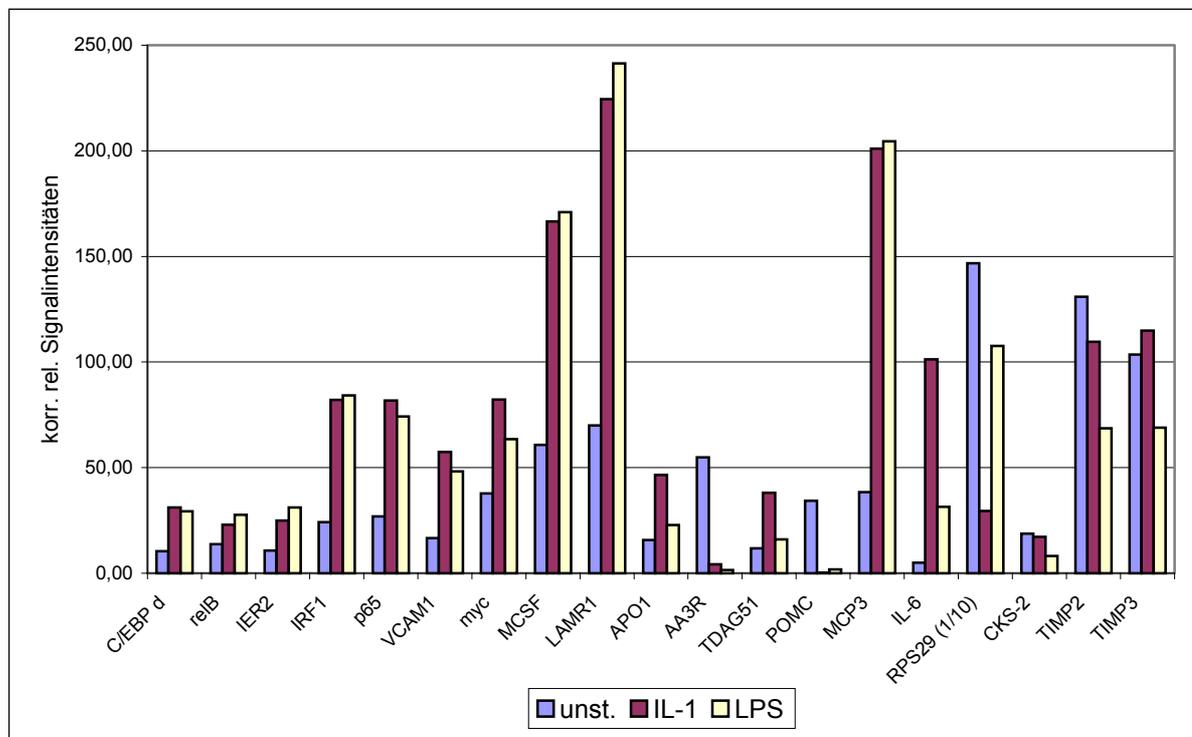


Abb. 21: Genexpressionsprofil von Swiss 3T3: Das Balkendiagramm zeigt die korrigierten, relativen Signalintensitäten ausgewählter Gene. Zur besseren Darstellung wurden die Signalintensitäten für RPS29 durch 10 dividiert.

C/EBP δ , relB, IER2, IRF1, p65, VCAM1, myc, MCSF, LAMR, MCP3 und IL-6 scheinen durch IL-1 und LPS in gleichem Maße hochreguliert zu werden. Die mRNA von AA3R und POMC scheint durch beide Stimuli gleichermaßen runterreguliert zu werden. APO1 und TDAG51 scheinen nach Stimulation mit IL-1, nicht jedoch nach Stimulation mit LPS hochreguliert zu werden. RPS29 wird offenbar durch Stimulation mit IL-1 runterreguliert.

Besonderes Interesse galt Genen, die zwischen den IL-1 und LPS stimulierten Proben unterschiedliches Expressionsverhalten zeigten. Mit CKS-2, TIMP2 und TIMP3 wurden in der semiquantitativen RT-PCR drei weitere Gene untersucht, die zwischen IL-1 und LPS stimulierten Zellen unterschiedlich reguliert zu sein schienen, wenn auch mit Signalunterschieden kleiner zwei. IER2 und POMC wurden hier nicht weiter untersucht.

3.3.3.1 Überprüfung der Daten in der RT-PCR

Die differentielle Expression von 17 im Array regulierten Genen wurde mit semiquantitativer RT-PCR (Abb. 22) überprüft. Tabelle 4 bietet eine Übersicht über die Gene bzw. die codierten Proteine und die erhaltenen Ergebnisse.

		Regulation		Array bestätigt?
		IL-1	LPS	
C/EBP δ CCAAT/enhancer binding protein delta	Aktivator der Transkription von Genen der Immun- und Entzündungsreaktion	kein Amplifikat (3)	(2,8)	-
relB transcription factor relB	Induktion durch z.B. durch Mitogene	+ (1,7)	+ (2)	ja
IER2 immediate early response protein 2		nicht untersucht (2,3)	(2,9)	-
IRF1 interferon regulatory factor 1	Aktivierung von MHC-Klasse I Genen, Induktion durch Viren und IFN	+ (3,4)	+ (3,5)	ja
NFkB p65 NFkB transcription factor p65 subunit (relA)		+ (3)	(2,8)+	ja
VCAM1 vascular cell adhesion molecule 1	Wechselwirkung mit β 1-Integrin; Zelladhäsion/Signaltransduktion, Leukozytenmigration	+ (3,4)	+ (2,9)	ja
myc myc proto-oncogene		+ (2,2)	+ (1,7)	ja
MCSF macrophage colony stimulating factor 1	Stimulation von Makrophagen	+ (2,7)	+ (2,8)	ja
LAMR1 laminin receptor 1 (67kD, ribosomal protein SA)		0 (3,2)	0 (3,4)	nein
APO1 apoptosis antigen 1 (fasL receptor)	Apoptose	+ (3)	+ (1,5)	nein
AA3R adenosine A3 receptor	Rezeptor für Adenosin	kein Amplifikat (0,08)	(0,03)	-
TDAG51 T cell death associated gene	FAS Expression, Apoptose	+ (3,2)	+ (1,4)	nein
POMC pro-opiomelanocortin-alpha	Vorstufe von Corticotropin-Lipotropin	nicht untersucht (0,005)	(0,05)	-
MCP3 monotype chemoattractant protein 3	Chemotaktisch auf Monocyten und Eosinophile, Induktion durch LPS beschrieben	0 (5,2)	0 (5,3)	nein
IL-6 interleukin 6	Fieber, Freisetzung von Proteinen der akuten Phase	+ (20,1)	+ (6,2)	ja
RPS29 40S ribosomal protein S29		0 (0,2)	0 (0,77)	nein
CKS-2 cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2	Regulatorische Untereinheit der Cyclin abhängigen Kinase (Zellzyklus)	0 (0,9)	0 (0,43)	nein
TIMP2 tissue inhibitor of metalloproteinase 2	Inhibitor von Metalloproteinasen (z.B. Kollagenasen), Degradation der extrazellulären Matrix	0 (0,83)	0 (0,52)	nein
TIMP3 tissue inhibitor of metalloproteinase 3		0 (1,1)	0 (0,67)	nein

Tabelle 4: Übersicht über die untersuchten Gene/Genprodukte und deren Regulation nach Stimulation.

Unter den Ergebnissen der PCR (+: hochreguliert, 0: nicht reguliert, -: runterreguliert) ist in Klammern der aus den Arraydaten errechnete „Regulationsfaktor“ angegeben. (Der „Regulationsfaktor“ ist der Quotient aus den korrigierten, relativen Signalintensitäten der stimulierten und unstimulierten Probe.)

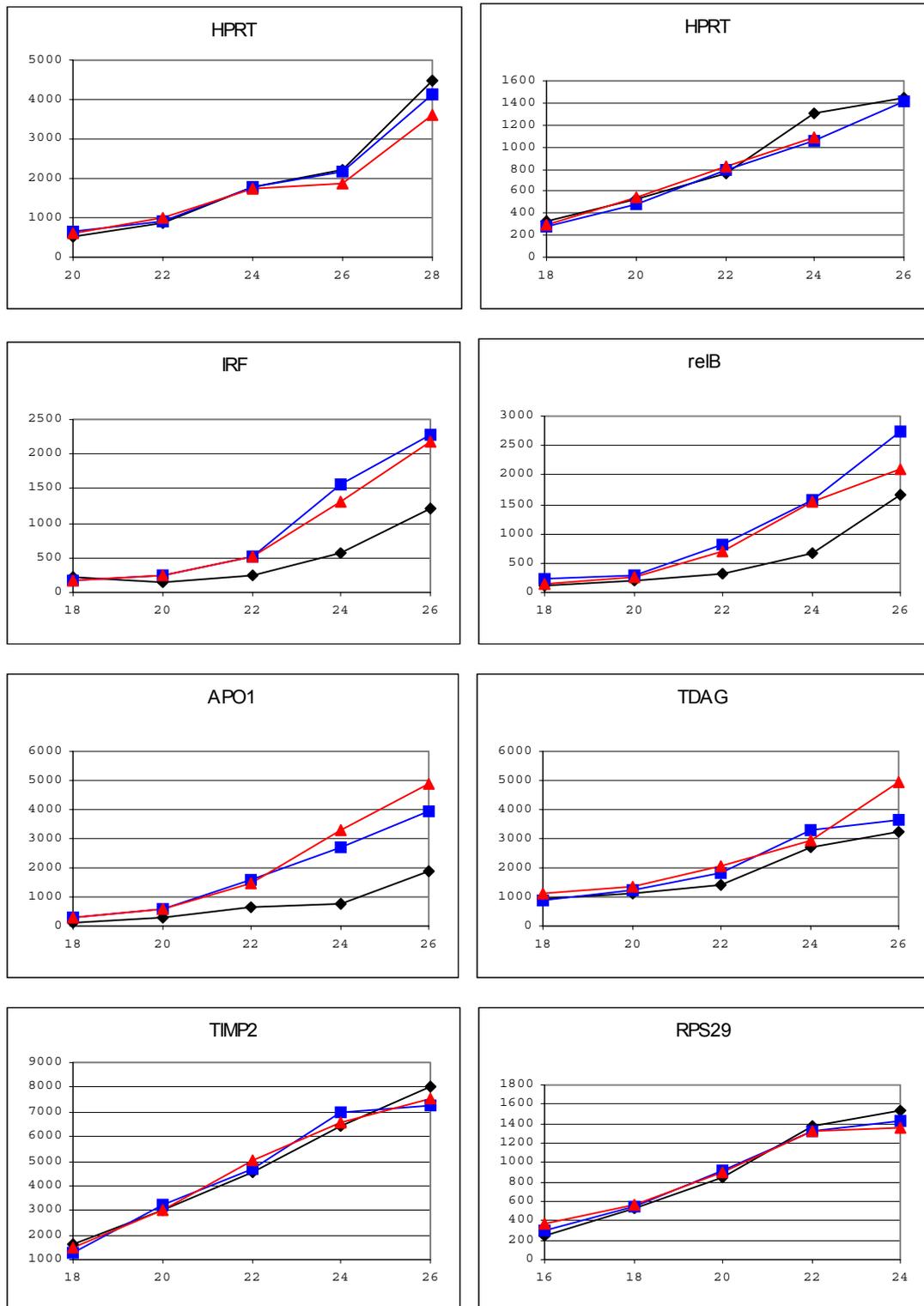


Abb. 22: Überprüfung der Arraydaten in der semiquantitativen RT-PCR. Die x-Achse gibt die Zyklenzahl, die y-Achse die relative Bandenintensität wieder. Die Daten zu unstimulierten Zellen sind schwarz (◆), zu IL-1 stimulierten blau (■) und zu LPS stimulierten rot dargestellt (▲). HPRT (Hypoxantin-guanine Phosphoribosyltransferase) wurde als Kontrolle (s. 2.5.4.2) untersucht und hier sind zwei unabhängige Experimente dargestellt.

Für relB, IRF1, p65, MCSF und IL-6 wurde die im Array gefundene Hochregulation durch IL-1 und LPS klar bestätigt. Der im Array gefundene quantitative Unterschied bei IL-1 bzw. LPS induziertem IL-6 wurde in mehreren PCRs nicht gefunden. VCAM1 und myc zeigten in der RT-PCR eine leichte Hochregulation durch IL-1 und LPS. Viele der im Array erhaltenen Daten konnten jedoch nicht bestätigt werden. APO1 erwies sich in der RT-PCR sowohl durch IL-1 als auch durch LPS deutlich, TDAG51 als schwach hochreguliert. MCP3, RPS29, CKS-2, TIMP2, TIMP3 und LAMR1 wurden durch IL-1 und LPS in der Expression nicht beeinflusst.

Die im Array gefundenen Unterschiede in der Geninduktion nach Stimulation mit IL-1 oder LPS konnten in der RT-PCR durchweg nicht bestätigt werden.

Abb. 22 zeigt die RT-PCR Daten ausgewählter Gene.

3.3.3.2 Geninduktionsprofil von Swiss 3T3 nach 22 Stunden Stimulation

In einer weiteren Arrayanalyse wurde das Geninduktionsprofil von Swiss 3T3 nach 22 Stunden Stimulation mit IL-1 bzw. LPS untersucht. Neben Genen, deren Induktion einen längeren Zeitraum als zwei Stunden beansprucht, könnten hierbei auch Gene gefunden werden, deren unterschiedliche Regulation eine Sekundärreaktion auf in dem Array nicht erfasste, aber differentiell regulierte Genprodukte darstellt.

Die Auswertung des Arrays wurde durch einen sehr hohen Hintergrund erheblich erschwert. Die Qualität der Membranen nimmt bei mehrfacher Benutzung ab. In diesem Experiment wurden sie zum dritten mal verwendet, was wohl die Ursache für den hohen Hintergrund darstellt.

Besonderes Interesse galt auch in diesem Experiment Genen, die durch IL-1 und LPS unterschiedlich reguliert sind. Elf solcher Gene wurden bei der computergestützten Auswertung gefunden. Sechs davon konnten bei der manuellen Überprüfung bestätigt werden (Tabelle 5).

MYF6 (myogenic factor 6)	Induktion der Differenzierung von Fibroblasten zu Myoblasten
EYA1 (eyes absent homolog 1)	Drosophilahomolog (Embryogenese)
HSP86-1 (heat shock 86-kDa protein 1)	Chaperon mit ATPase Aktivität
GSTM2 (glutathione S-transferase mu 2)	Überträgt Glutathion auf elektrophile Substrate
IGFBP4 (insulin-like growth factor-binding protein 4)	Regulation von insulinartigen Wachstumsfaktoren
FGF4 (fibroblast growth factor 4)	Wachstumsfaktor

Tabelle 5: Differentiell regulierte Gene nach 20 Stunden Stimulation mit IL-1 bzw. LPS.

Das Analyseprogramm fand für diese Gene bei LPS stimulierten Swiss 3T3 eine Expression, die um den Faktor 2-7 niedriger lag als bei IL-1 stimulierten Zellen. Diese Resultate wurden in der RT-PCR überprüft. Mit den Primerpaaren für MYF6 und FGF4 wurde kein Amplifikat erhalten. Die Ergebnisse für die anderen Primerpaare sind in Abb. 23 dargestellt. Aldolase wurde als „*housekeeping-gene*“ und IL-6 als Positivkontrolle mituntersucht.

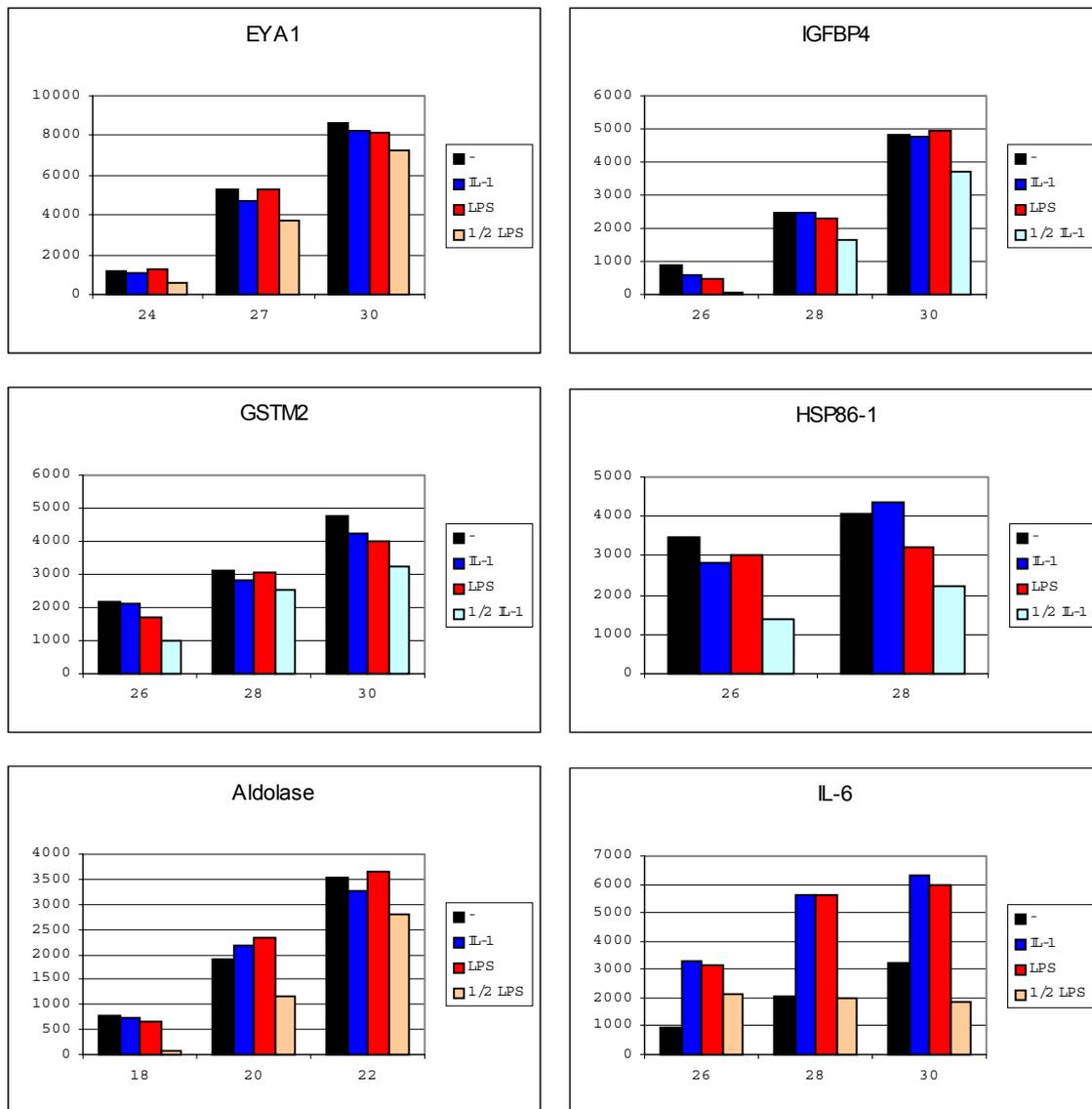


Abb. 23: Überprüfung der Arraydaten in der semiquantitativen RT-PCR. Die x-Achse gibt die Zyklenzahl, die y-Achse die relative Bandenintensität wieder. Als interne Kontrolle wurden hier jeweils PCR-Ansätze mit der halben Templatmenge einer der Proben mitgeführt.

Für IL-6 zeigt sich wie erwartet eine Hochregulation durch IL-1 und LPS. Für Aldolase und die anderen hier untersuchten Gene zeigt sich in der RT-PCR keine Regulation durch einen der Stimuli. Die Arraydaten konnten also nicht bestätigt werden.

Die meisten nach 2 Stunden durch IL-1 und LPS hoch bzw. herunterregulierten Genen wurden nach 22 Stunden Stimulation in der Arrayauswertung nicht wiedergefunden. Lediglich TDAG51 und MCP3 (Erhöhung um Faktor 3) und IL-6 (Erhöhung um Faktor 3, jedoch nur durch IL-1) wurden von dem Auswerteprogramm als reguliert identifiziert. In weiteren RT-PCRs wurde gezeigt, dass die nach zwei Stunden durch IL-1 und LPS hochregulierten Gene APO1, relB, MCSF1 und IRF1 auch nach 22 Stunden durch beide Stimuli hochreguliert sind. Die Hochregulation von MCP3 nach 22 Stunden Stimulation wurde in der RT-PCR bestätigt.

3.3.3.3 Zusammenfassung

Die durch IL-1 induzierte Genregulation von Swiss 3T3 unterscheidet sich weder nach zwei noch nach 22 Stunden Stimulationsdauer von der LPS induzierten Genregulation. Die Reaktionen der Zellen auf beide Stimuli sind gleich.

Diese Aussage muss natürlich eingeschränkt werden. Zum einen wurde mit dem Array nur eine begrenzte Zahl an Genen untersucht, zum anderen kann aufgrund experimenteller Probleme nicht für jedes Gen auf dem Array eine definitive Aussage getroffen werden.

Obwohl besonders solche Gene genauer untersucht wurden, deren Expression sich nach Stimulation mit IL-1 bzw. LPS zu unterscheiden schien, erwiesen sich in der RT-PCR alle untersuchten Gene entweder als nicht reguliert oder als durch die beiden Stimuli gleich reguliert.

3.3.4 Geninduktionsprofil von EL4 6.1 nach 2 Stunden Stimulation

Zusätzlich zum Geninduktionsprofil von Swiss 3T3 wurde das von EL4 6.1 untersucht.

EL4 6.1 blieben entweder unstimuliert oder wurden für zwei Stunden mit A23187 (10^{-6} M), A23178 und IL-1 (1 ng/ml) oder A23187 und IL-18 (200 ng/ml) stimuliert.

In der computergestützten Analyse wurden 20 Gene gefunden deren Expression sich zwischen der IL-1 und der IL-18 stimulierten Probe um mehr als den Faktor 2 unterschieden. Nach manueller Überprüfung der Arraydaten wurden 10 Gene ausgewählt, deren Expressionslevel in der RT-PCR miteinander verglichen wurden (Tabelle 6).

rox max-binding protein mnt	basisches helix-loop-helix Protein, inhibiert als Heterodimer mit max Transkription
STRA14 stimulated by retinoic acid protein	Maushomolog zu BHLHB2 (basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2)
fos proto-oncogene	
ski proto-oncogene	
HTR1C 5-hydroxytryptamine receptor 1C receptor	Serotonin Rezeptor
ITGAL integrin alpha L; CD11A antigen	Rezeptor für ICAM1-4: Leukozyten-Endothelzell Interaktion,
NOTCH3 neurogenic locus notch protein homolog 3	Homolog zu Drosophila NOTCH: Beeinflusst Zell-Zell-Interaktionen
IKB α I-kappa B alpha subunit	Inhibiert NF κ B
IKB β	
C8 proteasome component C8	Proteasomenuntereinheit

Tabelle 6: Differentiell regulierte Gene nach Stimulation für 2 Stunden mit IL-1 bzw. IL-18

Sieben der Gene waren laut Analyseprogramm in den IL-1 stimulierten Proben stärker exprimiert, drei Gene in den IL-18 stimulierten Proben.

Als Positivkontrolle wurde auch die Expression von IL-2 in den Proben miteinander verglichen. Abb. 24 zeigt einen Teil der RT-PCR Ergebnisse.

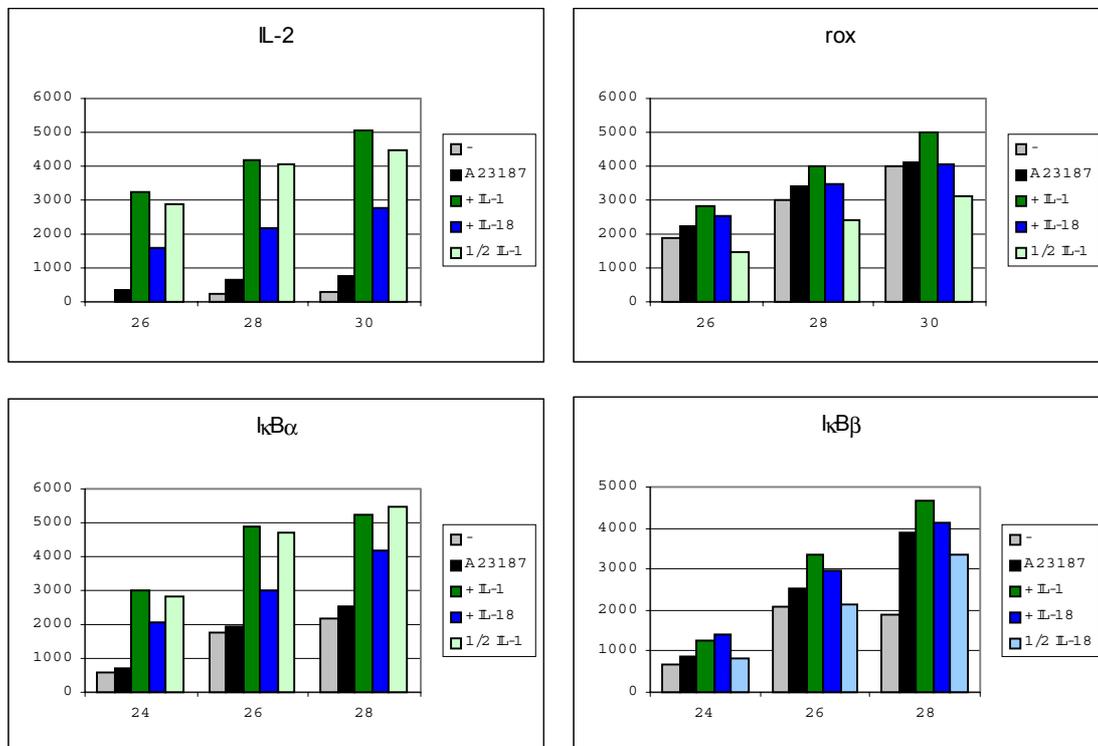


Abb. 24: Semiquantitative RT-PCR. Die x-Achse gibt die Zyklenzahl, die y-Achse die relative Bandenintensität wieder. Als interne Kontrolle wurden hier jeweils PCR-Ansätze mit der halben Templatmenge einer der Proben mitgeführt.

Stra14, rox, fos, ski und IκBβ sind nach den Arraydaten in IL-1 stimulierten Zellen etwa zwei bis dreimal stärker exprimiert als in IL-18 stimulierten Proben. IκBα ist um den Faktor 16 und die Proteasomenuntereinheit C8 sogar um den Faktor 50 stärker exprimiert. Für Stra14, rox, IκBα und IκBβ konnte das in der RT-PCR auch bestätigt werden. C8 und fos scheinen nicht reguliert zu werden. Der Vergleich mit der Expression der Gene in der unstimulierten bzw. A23187 stimulierten Probe zeigt jedoch, dass dieser Unterschied nur quantitativ und nicht qualitativ ist. Wie schon in 3.1.3 beobachtet, reagieren EL4 6.1 auf IL-18 nicht so stark wie auf IL-1. Die Arraydaten zeigen für HTR1C, ITGAL und NOTCH3 in den IL-18 stimulierten Proben eine stärkere Expression als in den IL-1 stimulierten Proben. Dies konnte in der RT-PCR nicht bestätigt werden.

Auch in EL4 6.1 bestätigt sich der in 3.3.3 gewonnene Eindruck. Die Toll- / IL-1-Rezeptoren vermitteln gleiche Reaktionen, die sich hier in der Intensität unterscheiden. Als Ursache für den Intensitätsunterschied wurde bereits in 3.2.1.1 die unterschiedliche Rezeptorexpression vorgeschlagen.

4 Ergebnisse II

4.1 IRAK⁻: Ein zelluläres System ohne IRAK-1

Zur Untersuchung der Funktion der IRAK-1 in der Signaltransduktion wurden uns embryonale Fibroblasten aus einer IRAK-1 *knockout*-Maus zur Verfügung gestellt [129]. Das hierzu verwendete Konstrukt ersetzt die Exons 5 bis 7 der IRAK-1 gegen eine Neomycinresistenz. Für die angestrebten Untersuchungen waren die embryonalen Fibroblasten jedoch nicht geeignet, da sie nur für wenige Passagen in Kultur gehalten werden konnten. IRAK⁻ ist eine Zelllinie, die spontan aus diesen Fibroblasten entstanden ist. Die Integration der Neomycinresistenz in das IRAK-1-Gen wurde in einer PCR mit genomischer DNA aus IRAK⁻ verifiziert³⁹. IRAK-1 wird von einem single copy Gen auf dem X-Chromosom codiert. Die embryonalen Fibroblasten, und damit auch IRAK⁻, tragen ein X- und ein Y-Chromosom. Sie sind aus stabil transfizierten männlichen embryonalen Stammzellen entstanden[130]. IRAK⁻ kann also keine IRAK-1 mehr exprimieren.

Im Vergleich mit EL4 6.1 wurde IRAK⁻ im IRAK-Kinaseassay auf IRAK-Kinaseaktivität untersucht. Eine IRAK-Kinaseaktivität wurde in IRAK⁻ wie erwartet nicht nachgewiesen. (Abb. 25)

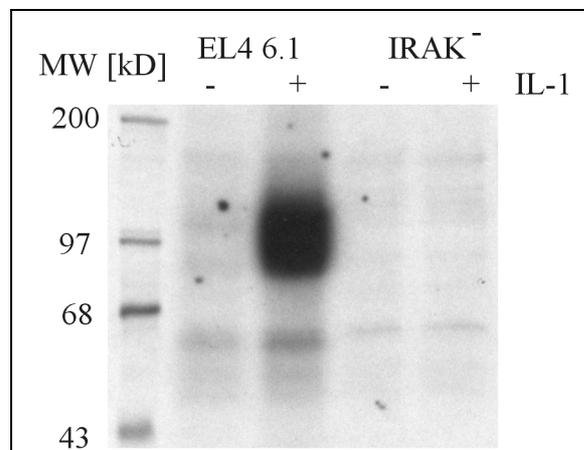


Abb. 25: IRAK Kinaseassay. EL4 6.1 bzw. IRAK⁻ wurden für 10 min mit 10 ng/ml IL-1 β stimuliert oder unstimuliert gelassen. IRAK-1 wurde mit α -IRAK Serum präzipitiert und im *in vitro* Kinaseassay auf Kinaseaktivität untersucht (7,5 % PAAGE).

³⁹ Primer: IRAK-2564R (5'-CTC CTC ACC TCT TGA TGT CTC CAT-3'), Neo-1564 (5'-AAC GCA CGG GTG TTG GGT CGT TTG-3'), Annealing 65°C, erwartete Größe 1000 bp, nach Wai-Ping Fung-Leung

4.2 Reaktionen von IRAK⁻ auf IL-1, IL-18 und LPS

Obwohl IRAK⁻ keine IRAK-1 exprimiert, reagiert die Zelllinie auf Stimulation mit IL-1 und LPS. NFκB wird aktiviert, IL-6 mRNA wird induziert und IL-6 wird freigesetzt. (Abb. 26)

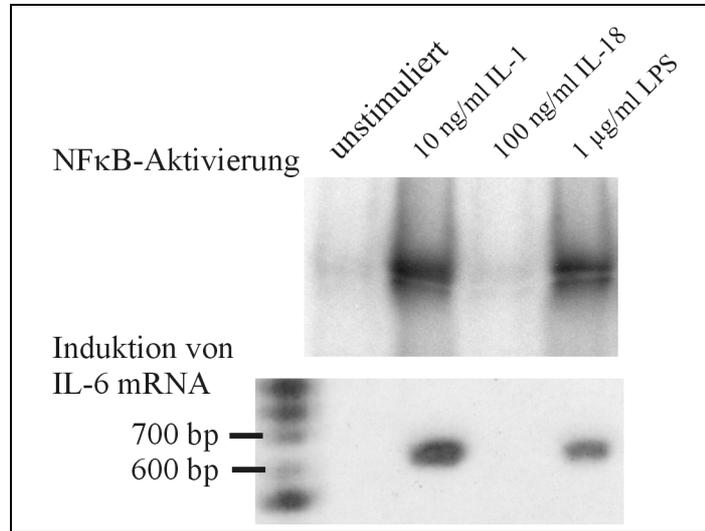


Abb. 26: NFκB EMSA und IL-6 RT-PCR nach Stimulation von IRAK⁻ mit IL-1, IL-18 oder LPS.

Sowohl hinsichtlich der NFκB-Aktivierung als auch der IL-6 mRNA Induktion verhält sich IRAK⁻ wie L929 und Swiss 3T3, die beide IRAK-1 exprimieren. Die im ELISA nachgewiesene Menge an freigesetztem IL-6 (Abb. 27) ist deutlich größer, als die von Swiss 3T3 freigesetzte Menge (vgl. 3.1.3). Auch wenn dieser Vergleich der beiden verschiedenen Zelllinien wenig Schlussfolgerungen zulässt, so wird zumindest deutlich, dass das Fehlen von IRAK-1 in IRAK⁻ kompensiert wird.

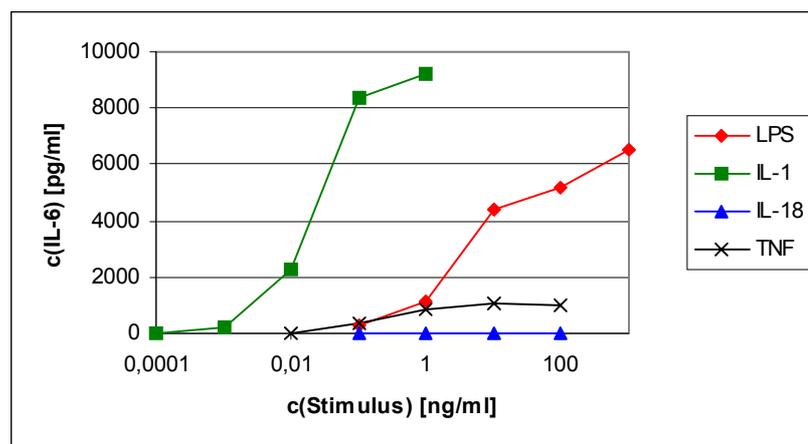


Abb. 27: IL-6 im Zellkulturüberstand von IRAK⁻ nach Stimulation mit IL-1 (■), IL-18 (▲) und LPS (◆).

Der Einfluss von überexprimierter IRAK-1 auf die IL-6 Freisetzung wurde nach transients Transfektion untersucht. (s. 4.5.3)

4.3 IRAK⁻ exprimiert eine IRAK-Deletionsmutante

In einer RT-PCR mit RNA aus IRAK⁻ wurde ein Teilstück der mRNA für IRAK-1 nachgewiesen. Mit dem Primerpaar mPLK 1250s / mPLK 1654as wurde wie aus Swiss 3T3 ein etwa 400 bp großes Stück amplifiziert. Eine genauere Untersuchung der mRNA für IRAK-1 in IRAK⁻ mit weiteren Primerpaaren zeigte, dass diese Zelllinie eine verkürzte IRAK-1-mRNA transkribiert (Abb. 28).

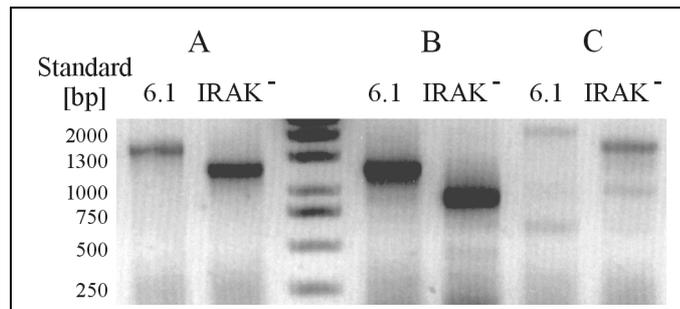


Abb. 28: RT-PCR mit RNA von EL4 6.1 und IRAK⁻

A: Primerpaar: mIRAK 284s / mPLK 1654as, erwartete Größe: 1628 bp

B: Primerpaar: mPLK 16s-BamHI / mPLK 1268as, erwartete Größe: 1252 bp

C: Primerpaar: mPLK 16s-BamHI / mPLK 2049as-XhoI, erwartete Größe: 2033 bp

Primersequenzen in Tabelle 7.

Das mit dem Primerpaar mPLK 16s-BamHI / mPLK 1268as erhaltene PCR-Produkt wurde sequenziert. Die Sequenz zeigt eine Deletion von 321 bp von Pos. 717 bis 1085 (NM_008363.1) und codiert also für eine Deletionsmutante der IRAK-1, der die AS 181 bis 303 fehlen. Die Deletion betrifft damit die Kinasesubdomänen 1–5 und einen Bereich von 31 Aminosäuren vor der Kinasedomäne (s. Anhang).

Bei der verkürzten mRNA handelt es sich um eine Splicevariante, die in IRAK⁻, nicht jedoch in anderen Zellen nachgewiesen werden konnte.

Die genomische Sequenz der murinen IRAK-1 ist nicht vollständig publiziert (AF121351). Der Vergleich des publizierten Bereichs mit der vollständig publizierten Sequenz der humanen IRAK-1 (U52112, AF030876) zeigt eine Übereinstimmung der Intron-Exon-Übergänge in den beiden Spezies. Unter der Annahme, dass die Übergänge auch im nicht publizierten Bereich der murinen IRAK-1 identisch sind, betrifft die Deletion die Exons 5 bis 7, die in den Embryonalen Stammzellen gegen die Neomycinresistenz ausgetauscht wurden.

Die RT-PCR Untersuchungen zeigen, dass sich die Menge der mRNA für die Deletionsmutante in IRAK⁻ nicht wesentlich von der für IRAK-1 in anderen Zellen unterscheidet. Ein Nachweis der Deletionsmutante auf Proteinebene gelang nicht. Zwar eignen sich die verfügbaren α -humane-IRAK Antikörper zum Nachweis der murinen IRAK-1 und auch der Deletionsmutante (s. Abb. 31, 4.4), der Nachweis im Westernblot gelingt jedoch nur in der Überexpressionssituation. Während humane IRAK-1 im Westernblot direkt aus Totallysaten von HEK 293 nachgewiesen werden kann, lässt sich murine IRAK-1 nach IP aus Totallysaten

von $\sim 1 \times 10^8$ Swiss 3T3 nur ganz schwach anfärben. Im Immunpräzipitat aus Totallysat von $\sim 1 \times 10^8$ IRAK⁻ wurde weder die Deletionmutante noch natürliche IRAK-1 nachgewiesen. Die Affinität der Antikörper zu den murinen Molekülen reicht nicht aus, eine Aussage über die Expression der Deletionmutante machen zu können.

4.4 Klonierung der IRAK-Deletionsmutante aus IRAK⁻

Zur Charakterisierung der IRAK-Deletionsmutanten aus IRAK⁻ in Überexpressionsexperimenten wurde ein Expressionsplasmid kloniert, das für diese Mutante codiert. Als Kontrollen wurden desweiteren Expressionsplasmide kloniert, die für die murine *full length* IRAK-1, zwei kinasetote IRAK-1-Mutanten bzw. eine N-terminal um 33 Aminosäuren verkürzte Mutante codieren. Alle Konstrukte tragen N-terminal ein Flag-Epitop (Abb. 29).

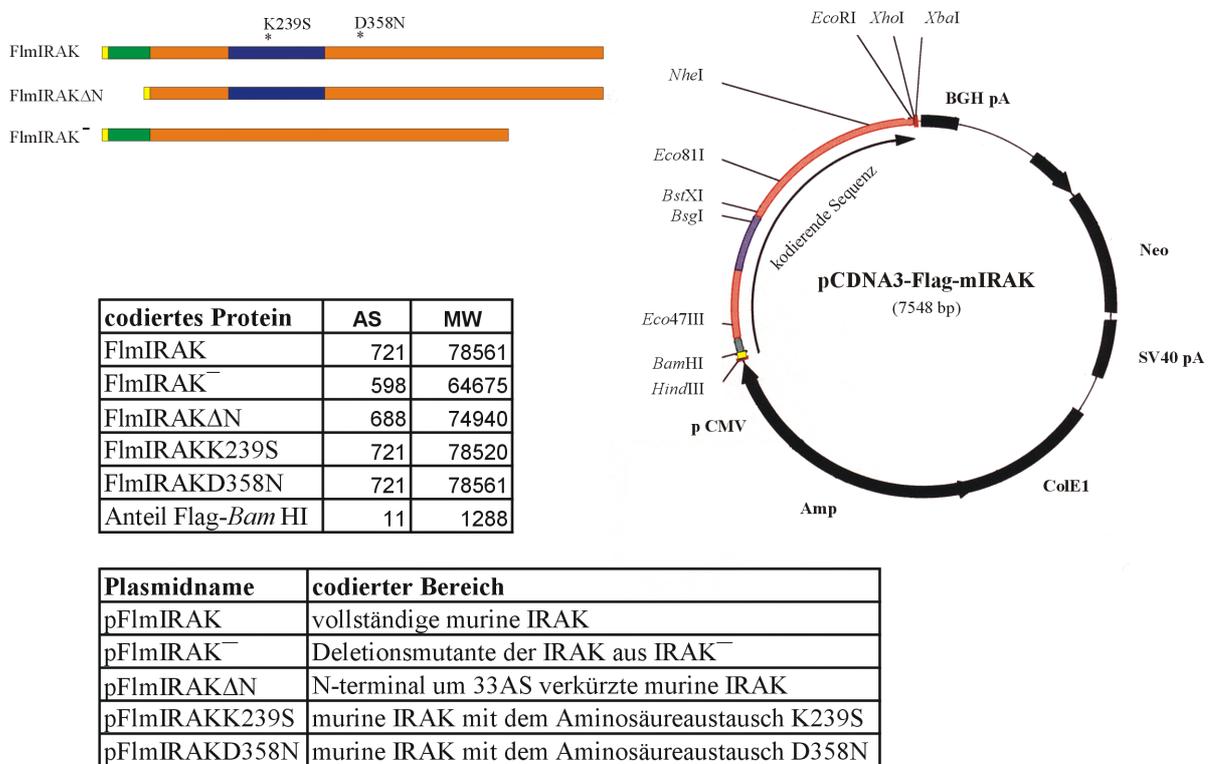


Abb. 29: Übersicht über die klonierten IRAK-Konstrukte

Die codierenden Bereiche für die Plasmide pFlmIRAK, pFlmIRAK⁻ und pFlmIRAKΔN wurden mittels RT-PCR aus RNA-Präparationen von EL4 6.1 bzw. IRAK⁻ amplifiziert. Die hierzu verwendeten Primer führten die zur Klonierung nötigen Restriktionsschnittstellen in die Amplifikate ein.

Die Primer mPLK 1268as und mPLK 934s wurden benötigt um Teilfragmente der mIRAK-1 cDNA zu amplifizieren, da die Herstellung des Gesamtfragmentes nicht gelang bzw. zur Reparatur einer Punktmutation.

Die Punktmutationen, die für die Aminosäureaustausche verantwortlich sind, wurden durch gerichtete Mutagenese mit einem Kit⁴⁰ nach Angaben des Herstellers in pFlmIRAK eingeführt. Die resultierenden Plasmide codieren für kinaseinaktive Moleküle. Die Mutation K239S betrifft dabei die putative ATP-Bindungsstelle in Kinasesubdomäne II und D358N die Kinasesubdomäne VII[168].

Abb. 30 stellt die Positionen der verwendeten Primer und der verwendeten Restriktionschnittstellen schematisch dar.

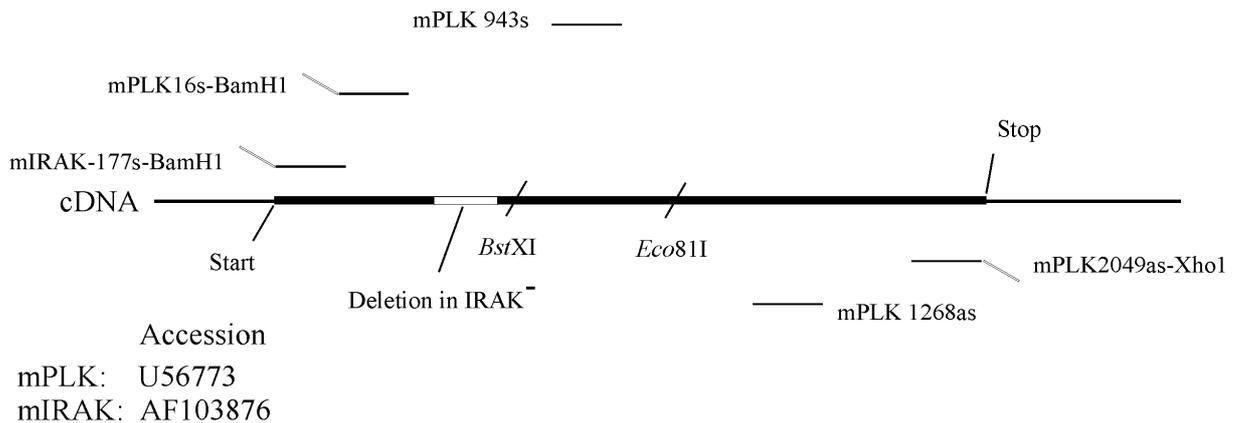


Abb. 30: Schematische Darstellung der zur Klonierung verwendeten Primer und Restriktionschnittstellen.

Primernamen	Sequenz (5'→3')
mIRAK-177s-BamHI	CCG <u>GAT CCA</u> TGG CCG GGG GGC C
mPLK2049as-XhoI	TGC TCG <u>AGT</u> CAG CTC TGG AAT TCA TCA C
mPLK16s-BamHI	CCG <u>GAT CCA</u> TGG ACG CCC TGG AGC CC
mPLK 1268as	CTT TTC AGG GTC ACT CCA GC
mIRAK 284s	CCT GGA GCC CGC CGA CT
mPLK 943s	AGT TCT AAC GTG CTT CTG G
mIRAKK239Ssense	CTA CAT ATG CTG TGA GCA GAC TGA AGG AGG AAG CTG ACC
mIRAKK239Sas	GGT CAG CTT CCT CCT TCA GTC TGC TCA CAG CAT ATG TAG
mIRAKD358Nsense	GCC CAA GCT GGG AAA CTT TGG CCT GGC TCG
mIRAKD358Nas	CGA GCC AGG CCA AAG TTT CCC AGC TTG GGC
mPLK 1250s	CTG GAG TGA CCC TGA AAA GC
mPLK 1654as	TGG GAC TTC TCT GGA GTT GC

Tabelle 7: Verwendete Primer. Die eingeführten Schnittstellen sind unterstrichen, die eingefügten Punktmutationen sind fett gedruckt.

Zur Klonierung von pFlmIRAK Δ N wurde das mit dem Primerpaar mPLK16s-BamHI / mPLK2049as-XhoI erhaltene PCR-Produkt mit BamHI und XhoI verdaut und über die entsprechenden Schnittstellen in pcDNA3-Flag inkloniert.

⁴⁰ QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene (Heidelberg)

Eine Punktmutation wurde entfernt, indem der Bereich zwischen den Schnittstellen für *Eco81I* und *XhoI* gegen ein entsprechend geschnittenes RT-PCR-Produkt ausgetauscht wurde, das mit dem Primerpaar mPLK943s / mPLK2049as-*XhoI* erhalten wurde.

pFlmIRAK und pFlmIRAK⁻ wurden aus pFlmIRAKΔN generiert, indem der Bereich zwischen den Schnittstellen für *BamHI* und *Eco81I* gegen die PCR-Produkte ausgetauscht wurden, die mit dem Primerpaar mIRAK-177s-*BamHI* / mPLK 1268as aus revers transkribierter RNA von EL4 6.1 bzw. IRAK⁻ erhalten wurden.

Eine Punktmutation in pFlmIRAK⁻ wurde durch Austausch des Bereiches zwischen *BstXI* und *Eco81I* gegen den entsprechenden Bereich aus pFlmIRAK entfernt.

Dieses etwas umständliche Vorgehen wurde nötig, da mit dem Primerpaar mIRAK-177s-*BamHI* / mPLK2049as-*XhoI* kein Produkt amplifiziert werden konnte.

Alle überexprimierten Moleküle konnten spezifisch nachgewiesen werden (Abb. 31). Die apparenten Molekulargewichte der Mutanten entsprachen in etwa den berechneten Molekülgrößen, wobei die murine IRAK-1 neben einer Bande bei dem erwarteten Molekulargewicht (~80 kD) eine Bande bei etwa 90 kD zeigt. Die humane IRAK-1 erscheint bei einem apparenten Molekulargewicht von etwa 100 kD (oft findet man auch eine zusätzliche Bande bei dem errechneten Molekulargewicht von 78 kD).

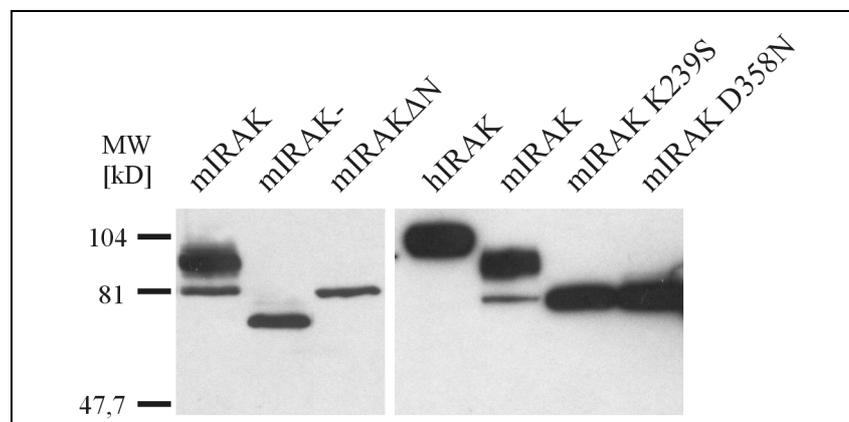


Abb. 31: Expressionskontrolle der IRAK-Konstrukte: Totallysate von transfizierten HEK 293 wurden in einer 10% SDS PAGE aufgetrennt, geblottet und α -Flag (Bio-M2) (linker Abschnitt) bzw. α IRAK (2A9) (rechter Abschnitt) gefärbt.

Die murine sowie die humane *full length* IRAK-1 werden in der Überexpressionssituation modifiziert, was sich im veränderten Laufverhalten in der Elektrophorese zeigt. Fehlende Kinaseaktivität in mIRAK K239S, mIRAK D358N und mIRAK⁻ sowie eine deletierte Wechselwirkungsdomäne in mIRAKΔN führen dazu, dass diese Modifikation nicht stattfindet.

Die Modifikationen der überexprimierten IRAK-Molekülen erfolgen auch in transient transfizierten IRAK⁻.

4.5 Charakterisierung der IRAK-Deletionsmutante aus IRAK⁻

Das Verhalten der IRAK-Deletionsmutante wurde in Überexpressionsexperimenten untersucht. Es wurde überprüft welche für die humane bzw. murine IRAK-1 beschriebenen Funktionen das Molekül trotz der Deletion übernehmen kann.

4.5.1 Enzymatische Aktivität

Die Funktion der Kinaseaktivität von IRAK-1 ist bislang nicht vollständig geklärt.

Da die Deletion einen Teil der Kinasedomäne betrifft, wurde die Mutante im *in vitro* Kinaseassay auf Kinaseaktivität untersucht. Neben der Deletionsmutante wurden mit mIRAK K239S und mIRAK D358N zwei Moleküle untersucht, die als kinaseinaktiv beschrieben sind[169, 170]. Murine und humane *full length* IRAK-1 dienten als Positivkontrollen (Abb. 32).

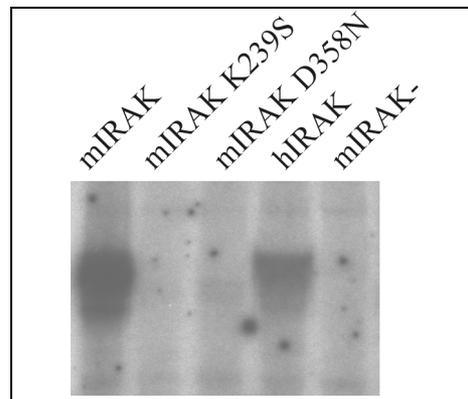


Abb. 32: *In vitro* Kinaseassay mit verschiedenen IRAK-Konstrukten. HEK 293-Zellen wurden transfiziert, die exprimierten Moleküle mit M2-Agarose präzipitiert und im *in vitro* Kinaseassay auf Kinaseaktivität untersucht.

Die Überexpression von muriner und humaner IRAK-1 führt zur Autophosphorylierung der Moleküle. Die markierten Phosphoproteine hinterlassen starke Signale in der Autoradiographie. MIRAK K239S und mIRAK⁻ zeigen keine Autophosphorylierung. Wie im Westernblot (vgl. Abb. 31) sind auch im Kinaseassay leichte Unterschiede in der Größe der phosphorylierten Moleküle zu erkennen. Phosphorylierte murine IRAK-1 erscheint etwas kleiner als das humane Phosphoprotein. MIRAK D358N zeigt ein sehr schwaches Phosphorylierungssignal. Dieses eigentlich als kinaseinaktiv beschriebene Molekül scheint eine Restaktivität zu besitzen.

4.5.2 Wechselwirkungen mit anderen Komponenten des Signalweges

Im Rahmen der Signalweiterleitung wechselwirkt IRAK – wahrscheinlich als Dimer – mit MyD88 und TRAF6. Als weiterer Interaktionspartner ist Tollip beschrieben[171]. Inwieweit die Deletion die Fähigkeit zur Bindung der Interaktionspartner beeinflusst, wurde in Koimmunpräzipitationsexperimenten untersucht. Aufgrund der fehlenden Kinaseaktivität liegt mIRAK⁻ in der Überexpressionssituation unphosphoryliert vor. Um Aussagen über die

Auswirkung dieser fehlenden Modifikation auf die Wechselwirkungsfähigkeit machen zu können, wurden auch die kinasetoten *full length* Moleküle untersucht.

Die untersuchten Proteine wurden dazu jeweils einzeln und gemeinsam in HEK 293 überexprimiert. 40 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit jeweils spezifischen Antikörpern (s. 2.7.1). Der Nachweis der Proteine in den Lysaten bzw. den Immunpräzipitaten erfolgte im Westernblot.

4.5.2.1 Wechselwirkung mit TRAF6

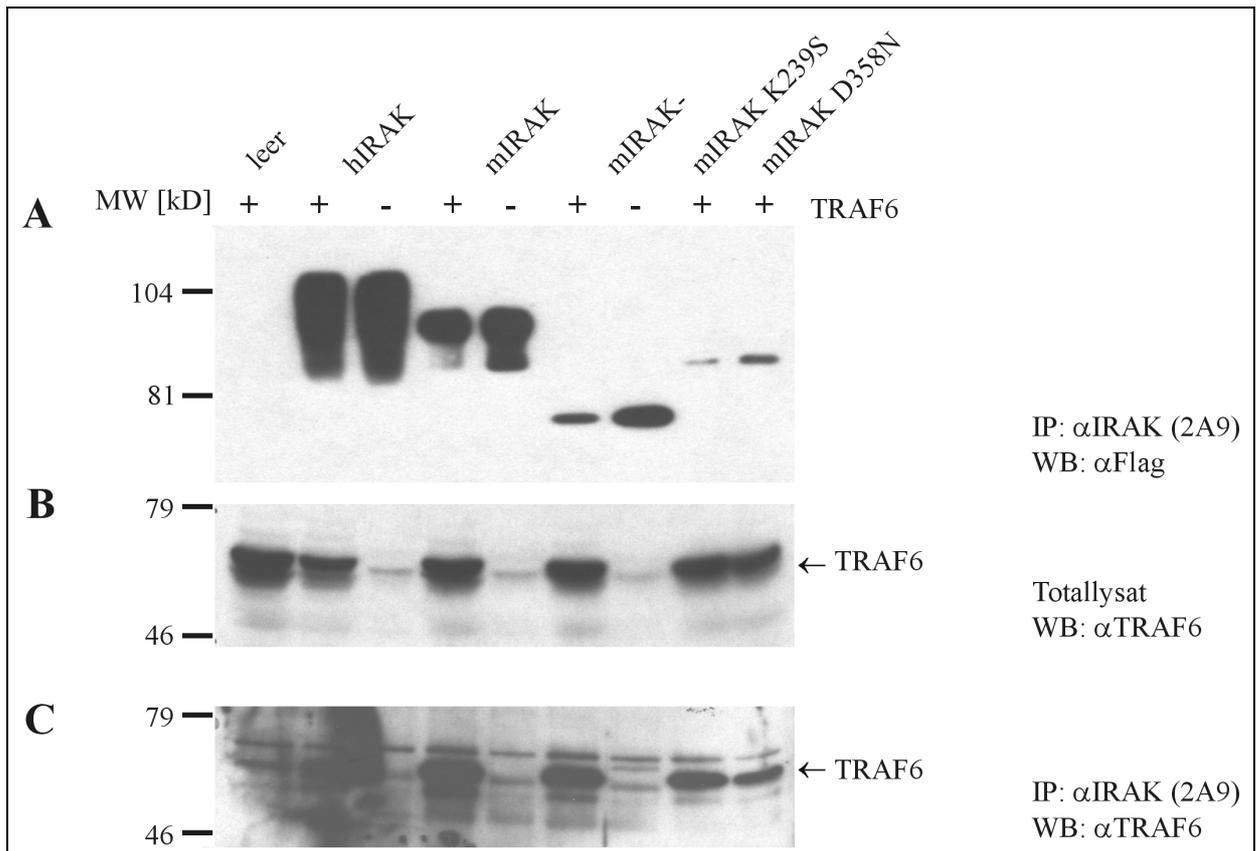


Abb. 33: Koimmunpräzipitation verschiedener IRAK-Konstrukte und TRAF6⁴¹. HEK 293 Zellen wurden mit verschiedenen IRAK-Konstrukten und teilweise zusätzlich mit pFITRAF6 transfiziert. IRAK-Moleküle wurden aus dem Lysat immunpräzipitiert (2A9) und kopräzipitiertes TRAF6 im Westernblot nachgewiesen. A: IP: αIRAK (2A9) WB: αFlag, B: Totallysat WB: αTRAF6, C: IP: αIRAK (2A9) WB: αTRAF6

Im αFlag Westernblot (Abb. 33 A) wurde nachgewiesen, dass die transfizierten IRAK-Konstrukte in den jeweiligen Ansätzen exprimiert und in der αIRAK- Immunpräzipitation auch präzipitiert wurden. TRAF6 wurde im Totallysate aller mit pFITRAF6 transfizierten Ansätze mit einem spezifischen Serum nachgewiesen (Abb. 33 B). TRAF6 wird über alle transfizierten IRAK-Konstrukte kopräzipitiert (Abb. 33 C). In der Kontrollprobe (ganz links) wurde im αIRAK-Immunpräzipitat kein TRAF6 nachgewiesen.

Alle untersuchten IRAK-Konstrukte wechselwirken also mit TRAF6.

⁴¹ Accession: XM006284, MW: 59,6 kD

4.5.2.2 Wechselwirkung mit MyD88

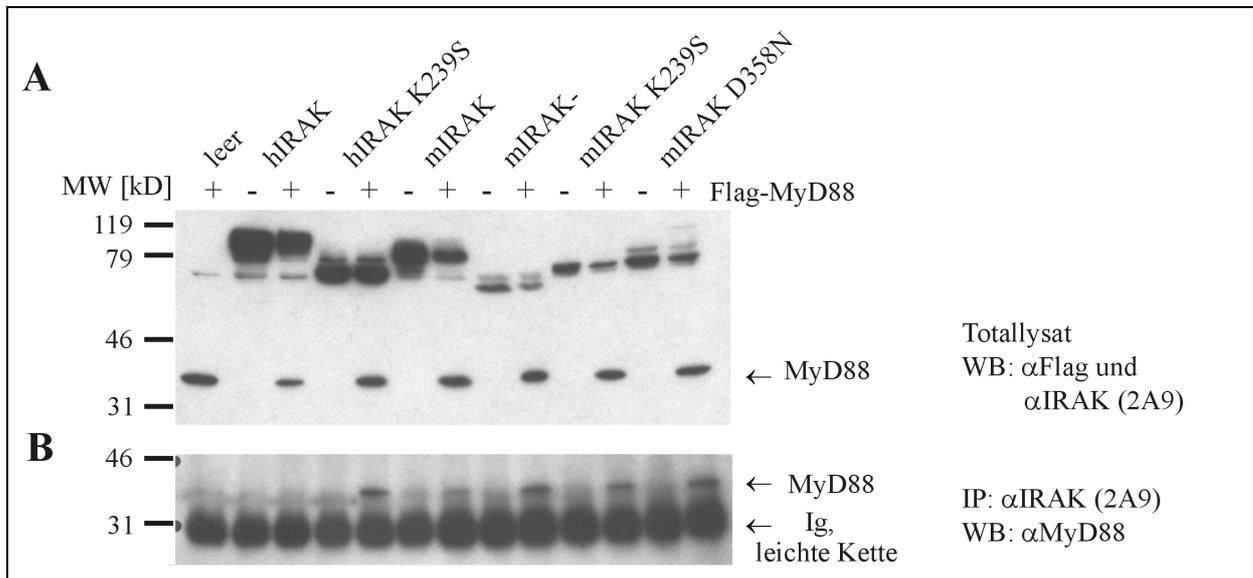


Abb. 34: Koimmunpräzipitation verschiedener IRAK-Konstrukte und MyD88⁴². HEK 293 Zellen wurden mit verschiedenen IRAK-Konstrukten und teilweise zusätzlich mit pFIMyD88 transfiziert. IRAK-Moleküle wurden aus dem Lysat immunpräzipitiert (2A9) und kopräzipitiertes MyD88 im Westernblot nachgewiesen. A: Totallysat WB: α Flag und α IRAK (2A9) B: IP: α IRAK (2A9) WB: α MyD88

Im Westernblot mit Totallysaten der transfizierten HEK 293 lassen sich sowohl MyD88 als auch alle transfizierten IRAK-Konstrukte nachweisen. MyD88 wurde hier über das Flag-Epitop als Bande zwischen 31 und 46 kD sichtbar gemacht (MW = 33,2 kD), die IRAK-Konstrukte wurden zusätzlich über den monoklonalen α IRAK Antikörper 2A9 angefärbt. (Der Nachweis der IRAK-Konstrukte über das Flag Epitop ist schwierig.)

Nach Immunpräzipitation der IRAK-Konstrukte mit 2A9 kann im Westernblot kopräzipitiertes MyD88 nachgewiesen (Abb. 34 B) werden. Die spezifische Bande wird oberhalb der durch den Sekundärantikörper angefärbten leichten Kette des Primärantikörpers sichtbar.

In dem Ansatz ohne IRAK und in dem mit humaner *full length* IRAK-1 wird kein MyD88 kopräzipitiert. Die MyD88 Bande aus dem Ansatz mit muriner *full length* IRAK-1 ist deutlich schwächer als die Banden aus den Ansätzen mit den kinasetoten Molekülen.

Die in der Überexpressionssituation modifizierten *full length* Moleküle wechselwirken also nur schwach oder gar nicht mehr mit MyD88. Die Deletionsmutante bindet MyD88 genauso wie die kinasetoten Moleküle.

⁴² Accession: XM002883, MW: 33,2 kD

4.5.2.3 Wechselwirkung mit Tollip

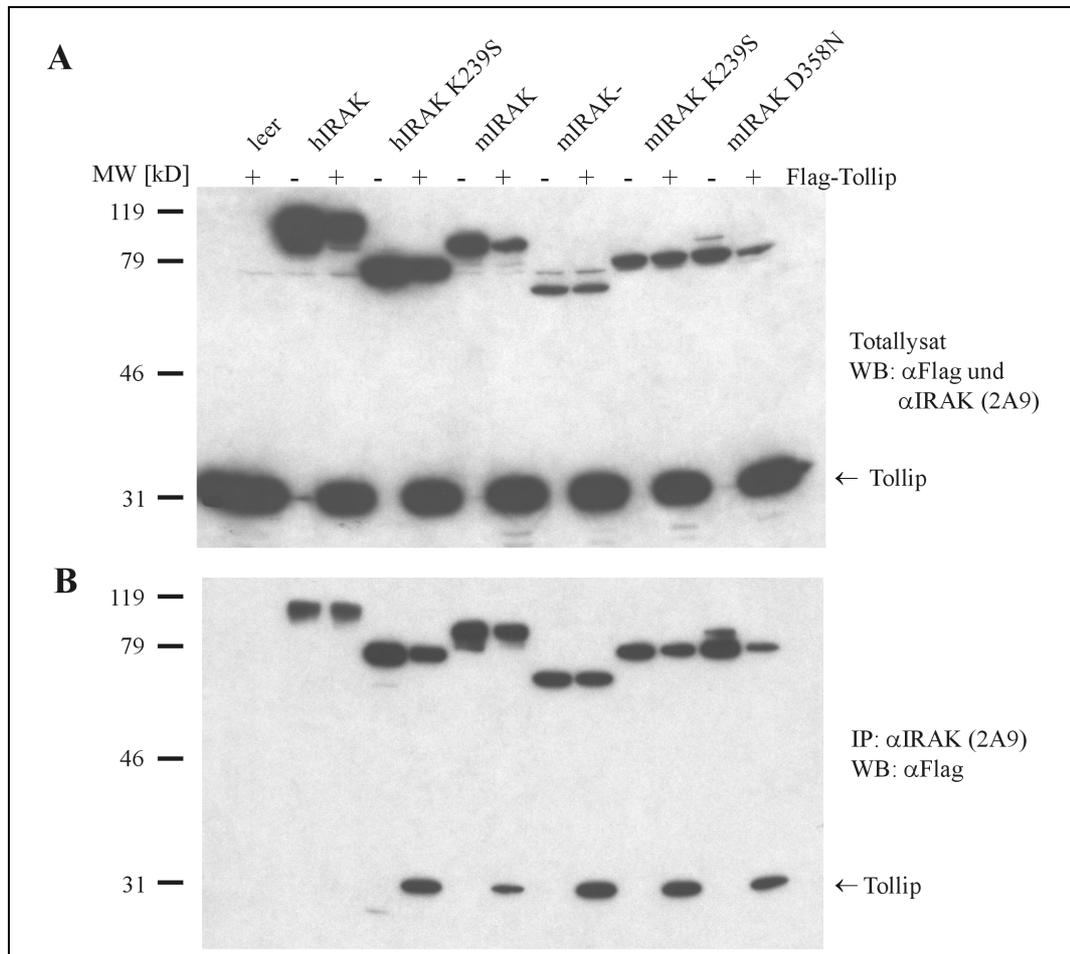


Abb. 35: Koimmunpräzipitation verschiedenen IRAK-Konstrukte und Tollip⁴³. HEK 293 Zellen wurden mit verschiedenen IRAK-Konstrukten und teilweise zusätzlich mit pFlmTollip transfiziert. IRAK-Moleküle wurden aus dem Lysat immunpräzipitiert (2A9) und kopräzipitiertes Tollip im Westernblot nachgewiesen. A: Totallysat WB: αFlag und αIRAK (2A9) B: IP: αIRAK (2A9) WB: αFlag

Der Westernblot mit den Totallysaten (Abb. 35 A) beweist die Expression aller transfizierten Konstrukte. Tollip erscheint als Bande bei etwa 31 kD und wurde hier über das Flag-Epitop sichtbar gemacht. Die IRAK-Konstrukte wurden wiederum (vgl. oben) zusätzlich mit 2A9 angefärbt und werden im oberen Bereich des Blots sichtbar.

Im αIRAK-Immünpräzipitat (2A9) (Abb. 35 B) kann Tollip in der Kontrollprobe und in der Probe mit humaner *full length* IRAK-1 nicht nachgewiesen werden. Tollip kopräzipitiert jedoch mit allen murinen IRAK-Konstrukten sowie mit der kinasetoten humanen IRAK-1. Die Menge an Tollip, welche mit der murinen *full length* IRAK-1 präzipitiert wird, erscheint verglichen mit den durch die kinasetoten Molekülen präzipitierten Mengen geringer.

⁴³ Accession: XM00617, MW: 30,3 kD

4.5.2.4 Dimerisierung der IRAK

Die Dimerisierung der IRAK erfolgt über ihre Todesdomäne. Hier wurde die Wechselwirkung der IRAK-Konstrukte mit IRAKDDL untersucht. Diese C-terminal trunkierte IRAK-Form kann im Westernblot gut über die Größe und ihr eingefügtes myc-Epitop von den anderen IRAK-Molekülen unterschieden werden.

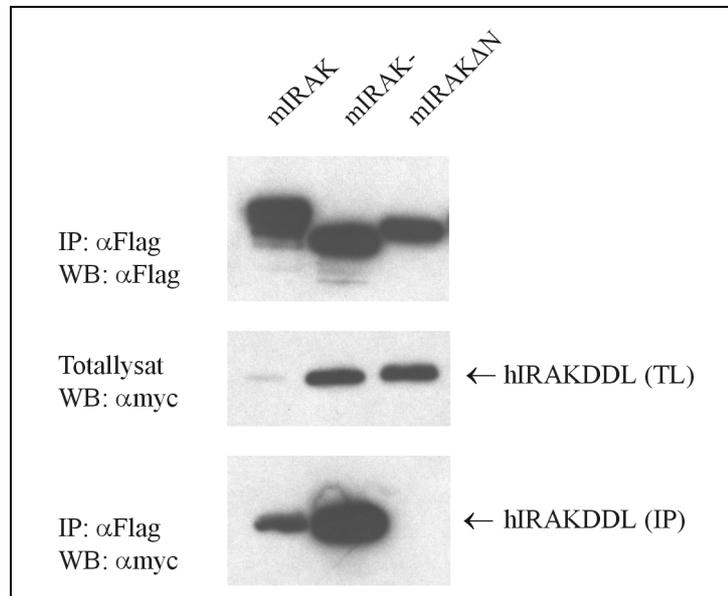


Abb. 36: Koimmunpräzipitation von mIRAK, mIRAK⁻ und mIRAK Δ N mit IRAKDDL. HEK 293 Zellen wurden mit pmycIRAKDDL und zusätzlich mit pFlmIRAK, pFlmIRAK⁻ bzw. pFlmIRAK Δ N transfiziert. Nach Immunpräzipitation aus den Totallysaten mit M2-Agarose wurde IRAKDDL im α myc-Westernblot nachgewiesen (unten).

Im α Flag Westernblot nach α Flag Immunpräzipitation (Abb. 36 oben) wurde nachgewiesen, dass die transfizierten IRAK-Konstrukte in den jeweiligen Ansätzen exprimiert und auch präzipitiert wurden. IRAKDDL wurde im Totallysate aller transfizierten Ansätze über das myc-Epitop nachgewiesen (Abb. 36 Mitte). Die Expressionslevel von IRAKDDL in den unterschieden sich erheblich, möglicherweise aufgrund von Koexpressionsartefakten. IRAKDDL wird von mIRAK und mIRAK⁻ nicht jedoch von mIRAK Δ N kopräzipitiert (Abb. 36 unten).

Die aus IRAK⁻ klonierte IRAK-Deletionsmutante verhält sich hinsichtlich der Wechselwirkungsfähigkeit mit beschriebenen Interaktionspartnern der IRAK-1 wie die kinasetoten IRAK Moleküle. Sie erfüllt damit alle bekannten Voraussetzungen für die Signalweiterleitung vom aktivierten Rezeptorkomplex zu NF κ B.

4.5.3 Einfluss überexprimierter mIRAK⁻ auf die Signaltransduktion

IRAK⁻-Zellen setzen nach Stimulation mit IL-1 oder LPS IL-6 frei (vgl. 4.2). Durch Überexpression von humaner IRAK-1, kinasetoter humaner IRAK K239S oder muriner IRAK-1 wird abhängig von der transfizierten Plasmidmenge ebenfalls eine IL-6 Sekretion induziert. Im Überstand leervektortransfizierten IRAK⁻ wurde eine IL-6-Konzentration von knapp 40 pg/ml gemessen. Durch Überexpression von muriner sowie humaner IRAK-1 wurde die

freigesetzte IL-6-Menge auf über 100 pg/ml mehr als verdoppelt, durch Überexpression der kinasetoten K239S auf 450 pg/ml mehr als verzehnfacht. Durch Überexpression von mIRAK⁻ wird die IL-6-Freisetzung nicht beeinflusst. Die IL-6-Konzentration im Überstand untransfizierter Zellen liegt unter der Nachweisgrenze des ELISA von 15 pg/ml.

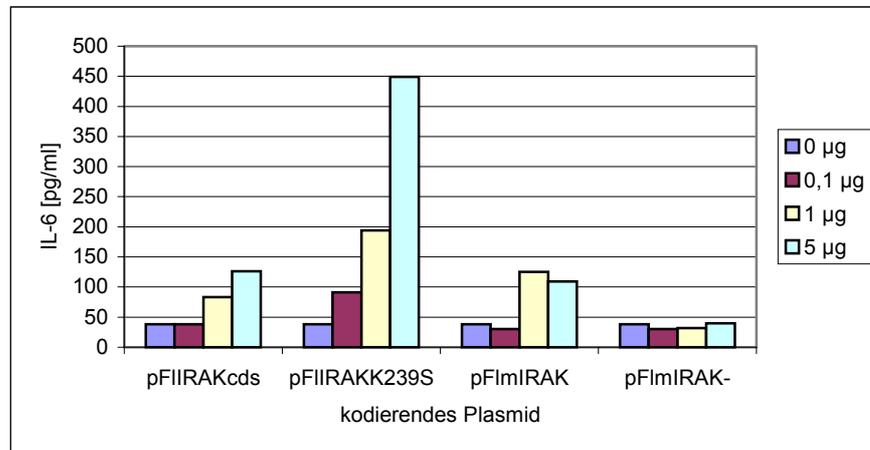


Abb. 37: IL-6 ELISA: IRAK⁻ wurden in 6 well Platten transfiziert. Die IL-6-Konzentration im Überstand wurde nach 24 Stunden gemessen.

Eine solche stimulusunabhängige Aktivierung durch Überexpression von IRAK-1 wurde auch in NIH 3T3 gefunden. Die Überexpression von humaner sowie muriner IRAK-1 induziert eine NFκB-Aktivierung, welche im Reporterassay gemessen wurde. Auch in NIH 3T3 verhält sich mIRAK⁻ neutral.

In EL4 6.1 lässt sich der Einfluss von IRAK-Molekülen auf die stimulusinduzierte NFκB-Aktivierung untersuchen. (Abb. 38)

In 70Z/3 hat überexprimierte IRAK-1 keinen Einfluss auf die IL-1 oder LPS induzierte NFκB-Aktivierung. IRAK-1 scheint in diesem System nicht die limitierende Komponente zu sein (Daten nicht gezeigt).

Was für die humane IRAK-1 und die kinasetote Mutante K239S schon gezeigt wurde, gilt genauso für die murine IRAK-1 sowie deren kinasetoten Mutanten K239S und D358N. Durch die Überexpression von mIRAK, mIRAK K239S und mIRAK D358N wird die IL-1 induzierte NFκB-Aktivierung im Vergleich zu leervektortransfizierten Zellen auf mehr als das Doppelte gesteigert. Auf die unstimulierten sowie die mit 150 ng/ml TNF stimulierten Proben hat die Überexpression der Plasmide keinen Einfluss. Auch in IL-18 stimulierten Zellen hat überexprimierte IRAK keinen Einfluss auf die NFκB-Aktivierung. In Abschnitt 3.2.1.1 wurde bereits der Rezeptorkomplex als limitierende Komponente für die NFκB-Aktivierung in EL4 6.1 beschrieben.

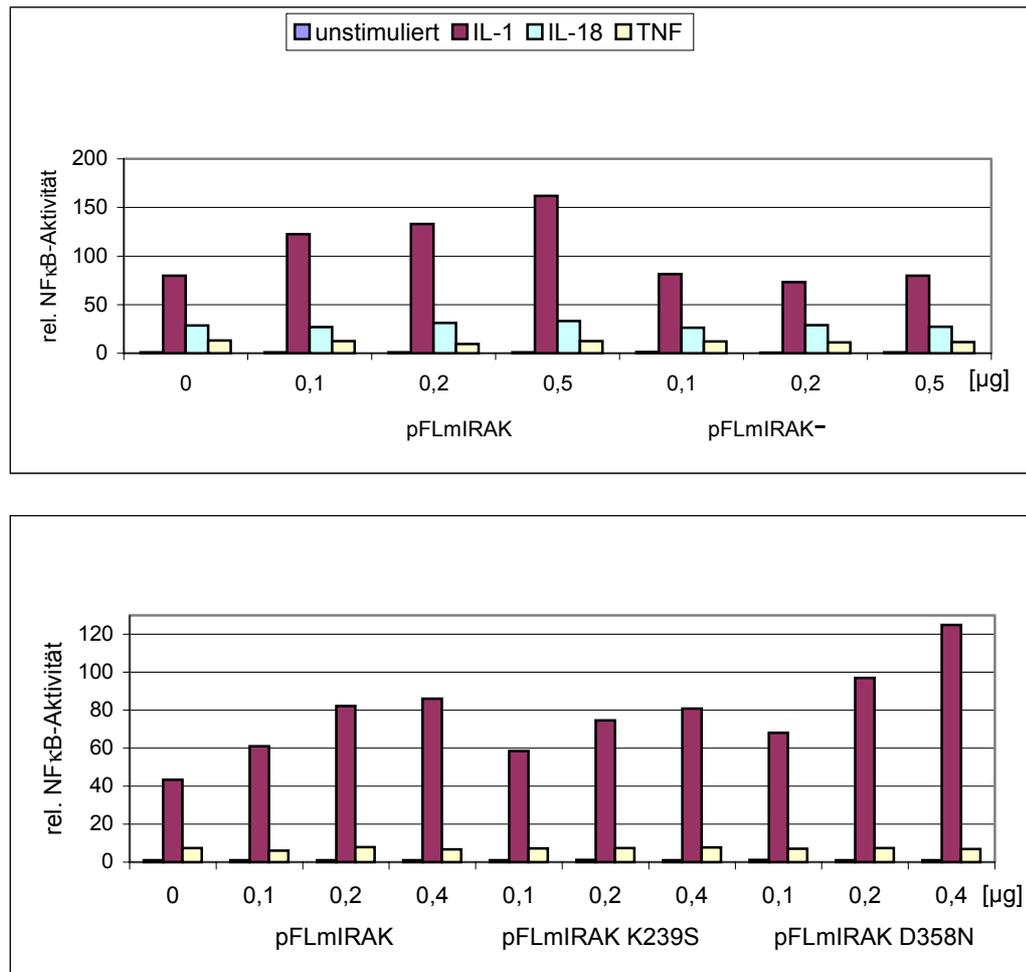


Abb. 38: NFκB-Reportergenassay: EL4 6.1 wurden mit den angegebenen Plasmiden und zusätzlich 0,33 µg p3xNFκB transfiziert. Mit pcDNA3-Leervektor wurde auf gleiche Gesamtplasmidmengen aufgefüllt. 5 Stunden nach der Transfektion wurde mit 1 ng/ml IL-1, 100 ng/ml IL-18 bzw. 100 ng/ml TNF stimuliert. Nach 16 Stunden Inkubation wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität im Lysat gemessen.

Die Überexpression der IRAK-Deletionsmutante hat keinen Einfluss auf die IL-1 induzierte NFκB-Aktivierung in EL4 6.1. Die fehlende Kinaseaktivität wurde als mögliche Ursache hierfür ausgeschlossen, da sie weder im humanen noch im murinen System für die IL-1 induzierte NFκB-Aktivierung benötigt wird.

Die Überexpression der Deletionsmutante aus IRAK⁻ hat weder in der stimulusunabhängigen noch in der IL-1 abhängigen NFκB-Aktivierung einen Einfluss. Die mIRAK⁻ verhält sich weder aktivierend noch dominant negativ. Letzteres wäre zu erwarten, falls sie, wie durch die Koimmunpräzipitationsexperimente impliziert wird, in den aktivierten Rezeptorkomplex eintreten könnte, jedoch nicht zur Signalweiterleitung fähig wäre. Möglicherweise finden die gezeigten Wechselwirkungen nur in der Überexpressionssituation der jeweils untersuchten Wechselwirkungspartner statt. Vielleicht wird die Funktion der IRAK durch die Deletion und die dadurch bedingte Strukturänderung gerade soweit eingeschränkt, dass eine Aktivierung des Signalweges durch Überexpression nicht gelingt.

5 Diskussion

IL-1, IL-18 und LPS spielen eine große Rolle bei vielen immunologischen Prozessen wie der Eindämmung und Bekämpfung von Infektionen (s. 1). Die wichtige Funktion zeigt sich auch an einer Reihe von Krankheitsbildern, an denen Dysregulationen von IL-1 und IL-18 beteiligt sind. Die gezielte Beeinflussung der durch die drei Stimuli ausgelösten Mechanismen ist daher von besonderem Interesse, ein gutes Verständnis der zugrunde liegenden Signalwege hierfür Voraussetzung.

Die Vermittlung ihrer Wirkung über die wachsende Familie der Toll- / IL-1-Rezeptoren stellt eine wichtige Gemeinsamkeit nicht nur dieser Stimuli, sondern auch vieler weiterer mikrobieller Bestandteile dar. Diese und weitere schon bekannte Gemeinsamkeiten in der Signaltransduktion bieten Möglichkeiten für die gemeinsame Beeinflussung der diversen Signalwege. Von großem Interesse ist aber auch die Möglichkeit der gezielten Beeinflussung der durch einzelne dieser Stimuli ausgelösten Signale. Hierzu kommen als Ziele besonders Signalwegkomponenten in Frage, die nur in einzelnen der Signalwege Funktionen übernehmen.

In dieser Arbeit wurden die durch IL-1, IL-18 und LPS ausgelösten Signalwege in verschiedenen Zelllinien miteinander verglichen. Von den untersuchten Zelllinien reagiert keine auf alle drei Stimuli. Auch in der Literatur ist eine triple-responsive Zelle bisher nicht beschrieben. Diese selektive Reaktivität der Zellen gegenüber den Stimuli stellt die erste und einfachste Möglichkeit für den Organismus dar, zwischen den Stimuli zu unterscheiden.

5.1 Regulationen auf der Rezeptorebene

Ob eine Zelle auf einen Stimulus reagiert oder nicht, hängt zuallererst von der Expression der zugehörigen Rezeptoren ab. Über die Zahl der Rezeptoren, aber auch die Expression von Korezeptoren kann die Sensitivität einer Zelle gegenüber einem Stimulus über einen großen Bereich reguliert werden. Interessanterweise hat die Rezeptor-/ Korezeptorexpression auch Einfluss auf die Kinetik einer Antwort, die durch einen Stimulus ausgelöst wird.

5.1.1 Rezeptorexpression von Zelllinien

Die Rezeptoren von IL-1, IL-18 und LPS bestehen aus zumindest zwei Komponenten. Um die Voraussetzungen für die mögliche Reaktivität einer Zelllinie gegenüber den Stimuli zu untersuchen, wurde hier die mRNA-Expression für die verschiedenen Rezeptorkomponenten analysiert.

Dieses *screening* zeigte eine weite Verbreitung der Rezeptorkomponenten-RNA. Ein direkter Rückschluss auf die Oberflächenexpression ist bei der verwendeten Methode jedoch nur möglich, wenn keine mRNA nachgewiesen wurde.

- Durch die hohe erreichte Sensitivität wurden auch sehr geringe Transkriptmengen nachgewiesen. Lee *et al.* weisen ebenfalls mit RT-PCR im Gegensatz zu den hier gefundenen Ergebnissen in 70Z/3 kein CD14 nach[8]. Gleichzeitig zeigen Lee *et al.* eine dramatische Erhöhung der Sensitivität von 70Z/3 durch die Transfektion von

CD14. Ob dies durch das Auftauchen von CD14 auf der Oberfläche der Zellen oder durch die vermehrte Expression der ohnehin vorhandenen aber schwach exprimierten Rezeptorkomponente zustandekommt, bleibt offen.

- Auch kann aus dem Nachweis der mRNA nicht unbedingt auf die Expression des codierten Proteins geschlossen werden. Der Zusammenhang zwischen Transkription eines Gens und der Expression des zugehörigen Proteins wird auch im Rahmen moderner Arrayuntersuchungen viel diskutiert[172] (s. auch 5.2.2.1).

Unter den untersuchten Zelllinien sind mit BaF3 und Wehi 231 eine proB- und eine B-Zelllinie, die keinen IL-1RI exprimieren. Da B-Zellen aber grundsätzlich auf IL-1 reagieren[29], handelt es sich hier vermutlich um Abnormalitäten der Linien.

Kein CD14 exprimieren Wehi 231 und die T-Zelllinie EL4 6.1 sowie der EL4 Subklon AcP1. Dies überrascht nicht, da mit der pre-B Zelle 70Z/3 schon eine B-Zelle als CD14 negativ beschrieben wurde. B-Zellen reagieren also erst auf hohe LPS-Konzentrationen bzw. die Regulation der Sensitivität erfolgt über lösliches CD14[173].

T-Zellen können zwar durch LPS zur Proliferation bzw. Zytokinproduktion stimuliert werden, dies erfordert jedoch direkten Kontakt zu Monozyten[174]. Eine direkte Aktivierung von T-Zellen über einen LPS-Rezeptor ist nicht beschrieben. Wie gezeigt wurde (3.2.1.2), ist in EL4 6.1 jedoch nicht das Fehlen von CD14 für die nicht vorhandene Responsivität gegenüber LPS ursächlich.

In AcP1 findet sich im Gegensatz zu EL4 6.1 keine mRNA für mTLR4. Dies unterstreicht einmal mehr, dass sich die Eigenschaften von Zelllinien durch Subklonierung bzw. stabile Transfektion ändern können. (AcP1 entstand aus dem AcP negativen EL4 Subklon D6/67 durch stabile Transfektion mit humanem AcP[99].)

Interessant sind die Unterschiede der beiden dendritischen Zelllinien DC 80/1 und DC XS52. Während DC 80/1 keine mRNA für IL-1RI exprimiert, findet sich in DC XS52 keine mRNA für den IL-18 Receptor IL-1Rrp1.

Dendritische Zellen sind sehr potente Aktivatoren von T-Zellen, ein regulatorischer Einfluss auf die T-Zell-Differenzierung ist möglich. Unterschiedliche Reaktivitäten verschiedener dendritischer Zellen gegenüber IL-1 und IL-18 könnten in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen.

Die Expression von CD14 und mTLR4 wurde in den dendritischen Linien hier nicht untersucht. Bouis *et al.*[175] finden jedoch mRNA für CD14 und mTLR4 in DC XS52 und dendritische Zellen sind als LPS sensitiv beschrieben[176]. Die dendritischen Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Radeke zur Verfügung gestellt. Aufgrund der schwierigen Kulturbedingungen wurde von der weiteren Untersuchung der Zellen abgesehen.

Als *screening* auf der Suche nach einer triple-responsiven Zelllinie erwies sich die Überprüfung der mRNA-Expression der Rezeptorkomponenten aufgrund ihrer weiten Verbreitung als wenig hilfreich. Daher wurde in einem weiteren *screening* die Aktivierung von NFκB untersucht.

5.1.2 NF κ B-Aktivierung

Die Transkription eines Gens stellt nur den ersten Schritt auf dem Weg zur funktionellen Expression eines Proteins dar. Die Untersuchung der mRNA der Rezeptorkomplexe kann die Frage nach der Stimulierbarkeit einer Zelle daher nicht positiv beantworten. Ob eine Rezeptorkomponente auf der Zelloberfläche erscheint, ließe sich durch Markierung mit geeigneten Antikörpern (s. 3.1) zwar noch untersuchen, über die Funktionalität des Rezeptorkomplexes ließe sich aber auch mit diesem Wissen keine Aussage machen. Die einzige Möglichkeit, sicher die Funktionalität eines Rezeptors nachzuweisen, geht über seine Funktion.

Bislang ist kein System beschrieben, in dem die Stimulation von IL-1-, IL-18- oder LPS-Rezeptor – vorausgesetzt es kommt überhaupt zu einer Reaktion der Zelle – nicht zur Aktivierung von NF κ B führt. NF κ B stellt sich damit als elementarer Bestandteil aller drei Signaltransduktionswege dar. Da die Translokation von NF κ B im EMSA zudem relativ einfach zu messen ist, eignet sich die Untersuchung dieser Signaltransduktionskomponente als *readout* für die Aktivierbarkeit einer Zelle durch IL-1, IL-18 oder LPS in einem weiteren *screening*.

Keine der untersuchten Linien reagiert auf alle drei Stimuli (s. 3.1.2). Es wurden aber mehrere doppelt responsive Zelllinien gefunden, die sich damit zum Vergleich je zweier Signalwege eignen.

Auf IL-18 reagieren nur die Linien der EL4-Familie. Hinsichtlich der Aktivierbarkeit durch IL-1 verhalten sie sich wie erwartet. Der AcP negative EL4 Subklon D6/76 zeigt nach Stimulation durch IL-1 keine Aktivierung von NF κ B, während die Mutterlinie und die stabil mit humanem AcP rekonstituierte Linie AcP1 auf Stimulation mit IL-1 durch die Translokation von NF κ B reagieren (vgl.[99]).

Die murinen Fibroblastenlinien L929, Swiss 3T3 und IRAK⁻ sowie die murine pre-B Zelllinie 70Z/3 reagieren auf IL-1 und LPS.

In murinen B-Zellen wie Wehi 231 ist NF κ B konstitutiv aktiv[177]. Eine zusätzliche Stimulation ändert nichts an dem Signal im EMSA.

5.1.2.1 Rezeptor-mRNA und Aktivierbarkeit von NF κ B.

Die Expression von mRNA für die verschiedenen Rezeptorkomponenten reicht nicht aus, um in den Zellen mit dem entsprechenden Stimulus NF κ B aktivieren zu können.

Wie schon erwähnt (5.1.1) lässt der Nachweis von mRNA keinen unbedingten Rückschluss auf die Expression eines Proteins zu. Die Funktion der Rezeptorkomplexe kann aber auch aufgrund fehlender, essentieller Bestandteile ausbleiben, nach denen in dem mRNA-*screening* nicht gesucht wurde. Mit Moesin und MD-2 wurden inzwischen weitere Moleküle beschrieben, die in der LPS-Signaltransduktion eine Rolle spielen.

Moesin wurde als unabhängiger LPS-Rezeptor auf Makrophagen vorgeschlagen[178, 179]. Es bindet an LPS, und Antikörper gegen Moesin blockieren in Makrophagen die komplette LPS-Antwort. Moesin gehört zu den ERM (ezrin / radixin / moesin) Proteinen und hat im Gegensatz zu anderen Mitgliedern dieser Familie eine extrazelluläre Domäne, was eine Funktion als

Rezeptor ermöglicht. Wie und ob Moesin mit LBP, CD14 und TLR4 wechselwirkt, ist bislang unklar.

MD-2 wurde in verschiedenen Systemen als essentielle Komponente der LPS-Signaltransduktion beschrieben[86, 87]. Das lösliche, extrazelluläre Protein[180] gelangt wahrscheinlich im Komplex mit TLR4 an die Zelloberfläche[86, 87], wo es als Bestandteil des LPS-Rezeptorkomplexes[86] an der Bindung von LPS[181] beteiligt ist.

Für den IL-18-Rezeptorkomplex gibt es bislang keinerlei Hinweise auf weitere Bestandteile. Auch die hohe Homologie zum intensiv untersuchten IL-1-Rezeptorkomplex legt nahe, dass die beiden bekannten Rezeptorketten wie in diesem hinreichend für die Signaltransduktion sind. Dennoch reagieren L929, Swiss 3T3, IRAK⁻ und 70Z/3 nicht auf IL-18, obwohl mRNA für die beiden Rezeptorketten in den Zellen nachzuweisen ist. Durch Überexpression der Rezeptorkomponenten lässt sich aber eine Responsivität gegenüber Interleukin-18 erreichen (s. 3.2.1.4 / 3.2.2).

Aufgrund der geringen biologischen Aktivität von IL-18 ist, um auf den Stimulus zu reagieren, vielleicht eine recht große Rezeptorzahl auf den Zellen nötig, die erst in der Überexpressionssituation erreicht wird.

Der Nachweis der IL-1-Rezeptorkomponenten ist hier in allen Zellen hinreichend für eine NFκB-Aktivierung nach Stimulation mit IL-1. EL4 D6/76 zeigen keine Reaktion aufgrund des fehlenden AcP.

5.1.2.2 Kinetische Unterschiede

Die kinetische Untersuchung der NFκB-Translokation in 70Z/3 nach Stimulation mit IL-1 bzw. LPS zeigte in den durch die zwei Stimuli ausgelösten Reaktionen Unterschiede (Abb. 10). Während durch IL-1 eine schnelle transiente NFκB-Translokation induziert wird, ist die Aktivierung von NFκB durch LPS verzögert.

Brophy und Sibley beschreiben mit 1B8[182, 183] eine Mutante von 70Z/3, die verglichen mit 70Z/3 deutlich verzögerte Antworten auf eine Stimulation mit LPS zeigt. Durch stabile Transfektion von humanem CD14 konnten sie die LPS induzierte NFκB Translokation in 1B8 – aber auch in 70Z/3 selber – deutlich beschleunigen. Die Kinetik entspricht dann in der Anfangsphase der hier für die Stimulation mit IL-1 gefundenen, ist aber im Gegensatz zu dieser nicht transient. NFκB bleibt in LPS-stimulierten 70Z/3 über mindestens 24 Stunden aktiv. Dieser Unterschied zwischen IL-1 und LPS induzierter NFκB-Aktivierung ist möglicherweise für die unterschiedliche Oberflächenexpression der κ-leichten Kette in IL-1 und LPS stimulierten 70Z/3 verantwortlich, die durch LPS deutlich stärker induziert wird als durch IL-1 (Abb. 11). Die Ursache für die transiente NFκB Aktivierung durch IL-1 ist nicht die abnehmende Aktivität des Stimulus (Abb. 10). IL-1 muss vielmehr ein Signal induzieren, das den Signalweg auch wieder abschaltet, welches durch LPS nicht aktiviert wird. Oder LPS induziert Signale, die die NFκB-Aktivität erhalten, z.B. indem eine Resynthese von IκB inhibiert wird. Ein solches Signal könnte z.B. über das Adapterprotein TIRAP (s. 1.5.2) vermittelt werden, welches an den LPS-Rezeptor, nicht jedoch an den IL-1-Rezeptor rekrutiert wird (s. Abb. 39)

Das transfizierte CD14 wirkt sich nicht nur auf die Kinetik, sondern – wie für dieses System auch schon früher gezeigt wurde[8] – auch auf die Sensitivität der Zellen gegenüber LPS aus (s. 1.1). Dieser Befund konnte im transienten Expressionsexperiment reproduziert werden (3.2.1.3).

Ein derart großer Unterschied in den Kinetiken der durch IL-1 und LPS ausgelösten NFκB-Translokation wurde in allen anderen hier untersuchten Zellen nicht gefunden. Kinetische Unterschiede gibt es aber z.B. auch in Swiss 3T3 (Abb. 17). NFκB wird auch in diesem System durch LPS etwas langsamer aktiviert als durch IL-1. Die Unterschiede liegen aber in dem Bereich, der auch durch Veränderung der Stimuluskonzentrationen erreicht werden kann und lassen daher nicht auf Unterschiede in den Signalwegen schließen.

Die LPS induzierte NFκB-Aktivität ist in 3T3 (und auch in L929 und IRAK⁻) jedoch im Gegensatz zu 70Z/3 wie die IL-1 induzierte transient.

CD14 hat eine hohe Affinität zu LPS und kann es auf TLR4 übertragen (s. 1.1). Wahrscheinlich beruht der starke Einfluss sowohl auf die Sensitivität als auch auf die Kinetik der Aktivierung einer Zelle auf dieser Eigenschaft. CD14 erhöht die lokale LPS-Konzentration auf der Zelloberfläche oder die Affinität von TLR4 zu von CD14 gebundenem LPS ist größer als die zu freiem.

Die Dauer der NFκB-Aktivität nach Stimulation einer Zelle mit IL-1 bzw. LPS unterscheidet sich nicht generell. Die in 70/3 gefundene anhaltende Aktivität nach Stimulation mit LPS ließ sich in anderen Zellen nicht wiederfinden, ist also zelltypspezifisch. Es handelt sich hier um einen zelltypspezifischen Unterschied zwischen den beiden Signaltransduktionswegen. Die Ursache für diesen Unterschied konnte nicht festgemacht werden. Unterschiedliche Aktivierung der untersuchten Signalkaskadenkomponenten IRAK-1, JNK und Akt wurden in 70Z/3 nicht gefunden.

5.1.3 Rekonstitution von Rezeptorkomplexen

Bei den Versuchen zur Rekonstitution der Rezeptorkomplexe sollten zwei Fragen beantwortet werden. Sind tatsächlich fehlende Rezeptorkomponenten für das Ausbleiben der Reaktionen der Zellen auf einzelne Stimuli verantwortlich, oder muss es intrazellulär Unterschiede zwischen den Signalwegen geben? Ist es möglich, durch stabile Transfektion von Rezeptorkomponenten eine triple-responsive Zelllinie zu generieren, in der dann alle drei Signaltransduktionswege direkt miteinander verglichen werden können?

Die doppelt responsiven Zelllinien EL4 6.1, L929 und Swiss 3T3 wurden in den Rezeptorrekonstitutionsexperimenten eingesetzt.

EL4 6.1 zeigen keinerlei Reaktion auf LPS (s. 3.1.2). Die mRNA-Untersuchungen deuten auf CD14 als mögliche Ursache für das Fehlen der Responsivität hin. In NFκB Reporterassays konnte jedoch weder nach Transfektion von CD14 noch von TLR4 eine Reaktion der Zellen auf LPS gemessen werden. Es fehlen also weitere Moleküle. Wie schon erwähnt kommen hier z.B. Moesin und / oder MD-2 in Frage. Es sind aber auch noch unbekannte Komponenten denkbar, die zwar im LPS-Signalweg, nicht jedoch in denen von IL-1 und IL-18 benötigt werden.

In der Zwischenzeit im Labor durchgeführte Experimente in HEK 293 Zellen zeigen, dass nach Kotransfektion von TLR4, CD14 oder CD14-AcP und MD-2 in diesen sonst nicht auf LPS reagierenden Zellen eine Antwort auf LPS erhalten werden kann (Großversuch Christof Bohnen). MD-2 ist in diesem System unverzichtbar (s. 1.4.1).

Die Reaktionen von EL4 6.1 gegenüber IL-18 sind deutlich geringer als die gegenüber IL-1. IL-18 hat eine deutlich geringere biologische Aktivität als IL-1, aber auch in der Sättigung sind durch IL-18 induzierte Signale kleiner als durch IL-1 induzierte. Als Ursache hierfür wurde die geringe IL-18-Rezeptorexpression gefunden (s. 3.2.1.1).

Die Regulation der Antwort einer Zelle auf IL-18 durch die Rezeptorexpression ist aus der Literatur bekannt. Die synergistischen Effekte zwischen IL-12 und IL-18 wurden schon in der Einleitung erwähnt. IL-12 kann in diesem Zusammenspiel sowohl die Expression von IL-1Rrp1[62] als auch von AcPL[166] erhöhen, und auch die durch die beiden Zytokine induzierten Transkriptionsfaktoren wirken synergistisch[184].

IL-12 hat aber keinen Einfluss auf die Aktivierung von EL4 6.1 durch IL-18 (s. 3.1.3).

L929 und Swiss 3T3 reagieren nicht auf IL-18. In beiden Zelllinien lässt sich durch Transfektion der IL-18-Rezeptorkomponenten eine Responsivität gegenüber diesem Zytokin erreichen. Die stabile, funktionelle Rekonstitution des IL-18-Rezeptorkomplexes gelang jedoch nicht. Eine anfangs gemessene Responsivität einiger Klone auf IL-18 ging wieder verloren.

In der Literatur sind wenige Zellen beschrieben, die auf IL-1 und IL-18 reagieren. Dazu gehören vor allem T_H0 -Zellen, aber auch aktivierte B-Zellen[62].

Möglicherweise beeinflussen sich die verschiedenen Rezeptoren gegenseitig in ihrer Expression. Im Laufe der Differenzierung der T_H0 -Zellen zu T_H1 bzw. T_H2 Zellen verlieren sie die Responsivität gegenüber IL-18(T_H2) oder IL-1(T_H1)[67]. Die gegenseitige Verdrängung der Rezeptoren von der Zelloberfläche findet eventuell auch auf anderen Zellen statt.

5.2 Intrazelluläre Signaltransduktion

5.2.1 Einzelne Signalkaskadenkomponenten

In Bezug auf die untersuchten intrazellulären Signalkaskadenkomponenten verhalten sich die betrachteten Zelllinien nach Stimulation mit den verschiedenen Stimuli weitgehend gleich. Wenn in L929, Swiss 3T3 oder 70Z/3 eine Komponente durch LPS aktiviert wird, dann wird sie auch durch IL-1 aktiviert und anders herum.

Aufgrund des großen Intensitätsunterschiedes der Reaktionen von EL4 6.1 gegenüber IL-1 und IL-18 ist eine solche Aussage für dieses System schwierig. So kann hier nicht beurteilt werden, ob JNK durch IL-18 im Gegensatz zu IL-1 nicht aktiviert wird oder ob das Signal nur unterhalb der Nachweisgrenze des Assays liegt. Für die NF κ B-Aktivierung und die IL-2 Freisetzung gilt diese Aussage jedoch. Beide Stimuli aktivieren NF κ B und induzieren die Freisetzung von IL-2. Weder nach Stimulation mit IL-1 noch nach Stimulation mit IL-18 kann eine Aktivierung der Akt gemessen werden.

Wenn die IL-18 induzierte JNK-Aktivierung stattfindet, jedoch unter der Nachweisgrenze liegt, könnte eine Überexpression von AcPL wie im Falle von NFκB und IL-2 für eine Verstärkung des IL-18-Signals sorgen. Zur Untersuchung der Stress-empfindlichen Kinase müßten jedoch stabile Klone generiert werden.

In der murinen T_H1-Linie AE7 wurde die JNK-Aktivierung durch IL-18 gezeigt[108]. Bei der Differenzierung von T_H0 zu T_H1 scheint die Reaktivität gegenüber IL-18 zu wachsen, wahrscheinlich aufgrund der Rezeptorexpression.

70Z/3 reagieren sowohl auf IL-1 als auch auf LPS, die Reaktionen unterscheiden sich aber in der Kinetik (NFκB) und der Quantität (κ-leichte Kette). Weder JNK noch Akt noch IRAK-1 werden durch die Stimuli in messbarem Maße aktiviert. Die kinetischen Unterschiede können daher nur an der NFκB-Aktivierung festgemacht werden.

Während verschiedene Stimuli in gleichen Zellen gleiche Signalwege aktivieren, aktivieren die Stimuli in verschiedenen Zellen verschiedene Signalkaskadenkomponenten. In Swiss 3T3 wird JNK, Akt und NFκB aktiviert, in EL4 6.1 JNK und NFκB und in 70Z/3 nur NFκB in messbarem Ausmaß. Bekannterweise führt die Aktivierung der Zellen auch zur Induktion verschiedener Gene. In Swiss 3T3 wird z.B. IL6, in EL4 6.1 IL-2 und in 70Z/3 die κ-leichte Kette induziert.

5.2.2 Genexpressionsanalyse

Direkt untersucht wurde hier nur eine kleine Zahl an Signalkaskadenkomponenten. Auch wenn unter diesen keine qualitativ unterschiedliche Aktivierung durch die verschiedenen Stimuli gefunden wurde, könnten sich nicht untersuchte Signalwege hinsichtlich der Aktivierbarkeit durch die Stimuli natürlich unterscheiden.

Die Untersuchung des Geninduktionsprofils bietet eine gute Möglichkeit gleichzeitig Unterschiede zwischen vielen Signalwegen abzufragen. Wenn Unterschiede zwischen den Signalkaskaden bestehen, die durch die verschiedenen Stimuli ausgelöst werden, dann sollte dies zu Unterschieden in der Geninduktion führen. In modernen Arrays lässt sich gleichzeitig die Induktion sehr vieler Gene untersuchen. So gefundene Unterschiede lassen dann Rückschlüsse auf Abweichungen in den Signalkaskaden zu.

In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass ein Gen durch verschiedene Stimuli mit unterschiedlichen Mechanismen induziert werden kann. So ist NFκB für die Induktion von IL-6 durch TNF verantwortlich und hinreichend, während für die IL-6 Induktion durch Staurosporin Transkriptionsfaktoren an AP-1-, cAMP-responsive element- und CAAT enhancer-binding protein-abhängige Sequenzen binden müssen[185]. Trotz Unterschieden in der Signaltransduktion kann es also zur Induktion desselben Gens kommen. Durch die Untersuchung vieler Gene wird jedoch gewährleistet, dass vorhandene Unterschiede dennoch gefunden werden können.

Die in dieser Arbeit untersuchten Geninduktionsprofile von Swiss 3T3 und EL4 6.1 bestätigen das bei der Untersuchung einzelner Signalkaskadenkomponenten erhaltene Bild. Wird in Swiss 3T3 ein Gen durch IL-1 aktiviert, so geschieht dies auch durch LPS und anders herum. Im Falle von EL4 6.1 findet man nach Stimulation mit IL-18 wieder schwächere Reaktionen als nach Aktivierung durch IL-1. Ein Gen, das durch IL-18, nicht jedoch durch IL-1 induziert wird, wurde nicht gefunden.

Eine gleiche Reaktion der Zellen auf die beiden Stimuli ist also die Regel, die unterschiedliche Regulation – falls es sie überhaupt gibt – die Ausnahme.

Die gefundene, durch IL-1 oder LPS induzierte Genexpression deckt sich gut mit Daten aus der Literatur. Besonders ergiebig ist ein Vergleich mit Rieneck *et al.*[186], die die IL-1 induzierte Genexpression einer β -Zelllinie aus der Rattenpankreas in einem Array mit 24000 mRNAs untersucht haben. In dem System sind wie in Swiss 3T3 IRF1, IL-6 und C/EBP δ nach Stimulation hochreguliert. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren RelA, RelB, IRF1 und C/EBP δ im Rahmen von Immun- und Entzündungsreaktionen ist beschrieben[187]. Die Neusynthese nach Aktivierung erscheint sinnvoll. Auch die Beteiligung von M-CSF und MCP3 am Entzündungsgeschehen ist bekannt.

Für die IL-18 induzierte Geninduktion liegen bislang keine Arrayuntersuchungen vor.

5.2.2.1 Arrayuntersuchungen bergen Probleme

Erstaunlich ist die schlechte Korrelation der in den Arrays gefundenen Regulationen mit den Ergebnissen der RT-PCR. Nicht einmal die Hälfte der Gene, die im Array reguliert erscheinen und in der RT-PCR überprüft wurden, erweisen sich in beiden Untersuchungen als reguliert (Tabelle 4).

Beide Methoden bergen potentielle Fehlerquellen. Auf die geringe Zuverlässigkeit der Arraydaten bei einmaliger Durchführung wurde schon bei der Begründung der Notwendigkeit einer weiteren Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse hingewiesen (s. 3.3.2).

Bei den RT-PCRs galt es, für jedes Primerpaar Bedingungen zu finden, unter denen reproduzierbar Templatemengenunterschiede detektiert werden können. Hier spielt sicherlich nicht nur die Zyklenzahl eine Rolle (Abb. 19). Durch interne Kontrollen und meist mehrfache Durchführung wurden Fehler aber weitestgehend ausgeschlossen.

Taylor *et al.*[188] zeigen eine Problematik bei der Handhabung von cDNA-Bibliotheken auf, durch die es zu fehlerhaften Sequenzzuordnungen der Dots auf Arraymembranen kommen kann. Ob es bei Clontech hier Probleme gab, kann ich nicht beurteilen.

Viel diskutiert wird die Korrelation zwischen mRNA und Protein Level. Es gibt sowohl Arbeitsgruppen, die eine schlechte Korrelation[189, 190] als auch solche, die eine gute Korrelation[191, 192] zwischen den beiden Parametern finden.

Regulationsmechanismen auf der Ebene der Translation sind bekannt. So ist die LPS induzierte TNF α Transkription NF κ B abhängig[193, 194], JNK, SAPK und MAPK regulieren dann die mRNA-Translation[195, 196].

Während Mechanismen, die die Translation über die mRNA-Stabilität regulieren in mRNA-Messungen erfasst werden, wirkt sich die Regulation der Translationsinitiation nur auf die Proteinmenge aus.

Neben solchen Regulationsmechanismen kommen als Ursache für schlechte Korrelationen zwischen mRNA- und Proteindaten aber auch fehlerhafte Arraydaten in Frage.

Ursachen hierfür könnten fehlerhafte Sequenzzuordnungen (s.o.), vor allem aber Kreuzhybridisierungen aufgrund von Sequenzhomologien sein. Diese Fehlerquelle ist bekannt. So betreibt Affymetrix bei ihren *GeneChips* einen sehr großen Aufwand, um Kreuzhybridisierungen experimentell ausschließen zu können.

Ein direkter Vergleich von Daten, die auf mRNA-Expression beruhen, ist bei der Beurteilung der Qualität von Arraydaten nötig. Ein solcher Vergleich wurde z.B. von Lian *et al.*[172] durchgeführt, die Arraydaten mit Ergebnissen aus Differential Display (DD) Experimenten verglichen haben. Sie finden Diskrepanzen zwischen Array- und DD-Daten und eine Überprüfung mittels Northern-Blot bestätigt in 5 von 6 Fällen die DD-Daten.

Als Ursachen für die schlechte Reproduzierbarkeit der Arraydaten in der RT-PCR kommen also neben der nur einfachen Durchführung der Arrayhybridisierungen auch systembedingte Fehler der Arrays in Frage.

5.2.3 Fazit

Unterschiede in der Signaltransduktion zwischen den jeweiligen Stimuli wurden in Swiss 3T3 und EL4 6.1 nicht gefunden. Möglicherweise war die Zahl der untersuchten Gene zu gering, um vorhandene Abweichungen auszumachen. Vielleicht sind in diesen Zellen aber auch tatsächlich keine Abweichungen vorhanden.

Besonders Unterschiede zwischen der IL-1 und LPS induzierter Signaltransduktion sind inzwischen aber bekannt (s. 1.5.2). Auf Geninduktionsebene wären die LPS abhängige IL-12- und IL-10-Induktion in dendritische Zellen[133] und auch die LPS abhängige B-Zell Proliferation – bzw. die sich daraus ergebende Induktion von Genen – zu nennen. IL-10 und IL-12 sind auf dem Array vorhanden und mit einer großen Zahl an Zyklinen, Zellzyklus regulierenden Kinasen, deren Inhibitoren und weiteren Zellzyklus Proteinen sind auch viele Gene repräsentiert, die bei verstärkter Zellproliferation reguliert würden.

In Swiss 3T3 oder EL4 6.1 werden jedoch weder IL-10 noch IL-12 exprimiert und durch Stimulation auch nicht induziert. Auch ein Einfluss der Stimulation auf die Proliferation der immortalisierten Zelllinien wurde nicht beobachtet.

In MyD88 *knockout*-Systemen gefundene Unterschiede zwischen LPS und IL-1 – wie die LPS-abhängige Induktion von B7-1, B7-2 und MHC II im Rahmen der Reifung dendritischer Zellen[135] – werden in MyD88^{+/+}-Systemen durch MyD88-abhängige Effekte überlagert. Unterschiede in der Regulation dieser Gene wurden in Swiss 3T3 und EL4 6.1 auch nicht gefunden. (B7-2 ist auf dem Array vertreten, B7-1 und MHC II nicht.) Die Expression dieser zelltypspezifischen Gene war auf T-Zellen und Fibroblasten auch nicht zu erwarten.

Aufgrund der bekannten Unterschiede zwischen der IL-1 und LPS Signaltransduktion waren in dem hier untersuchten System nicht unbedingt unterschiedliche Genregulationen zu

erwarten. Die bislang gefundenen Unterschiede sind zelltypspezifisch. Biologisch erscheint das durchaus sinnvoll. Einige Zellen reagieren gleichermaßen auf verschiedene Entzündungsmediatoren und leisten einen allgemeinen Anteil an der Bekämpfung der Infektion. Andere Zellen mit besonderen Funktionen können zwischen den Stimuli unterscheiden und so das Entzündungsgeschehen steuern (Abb. 39).

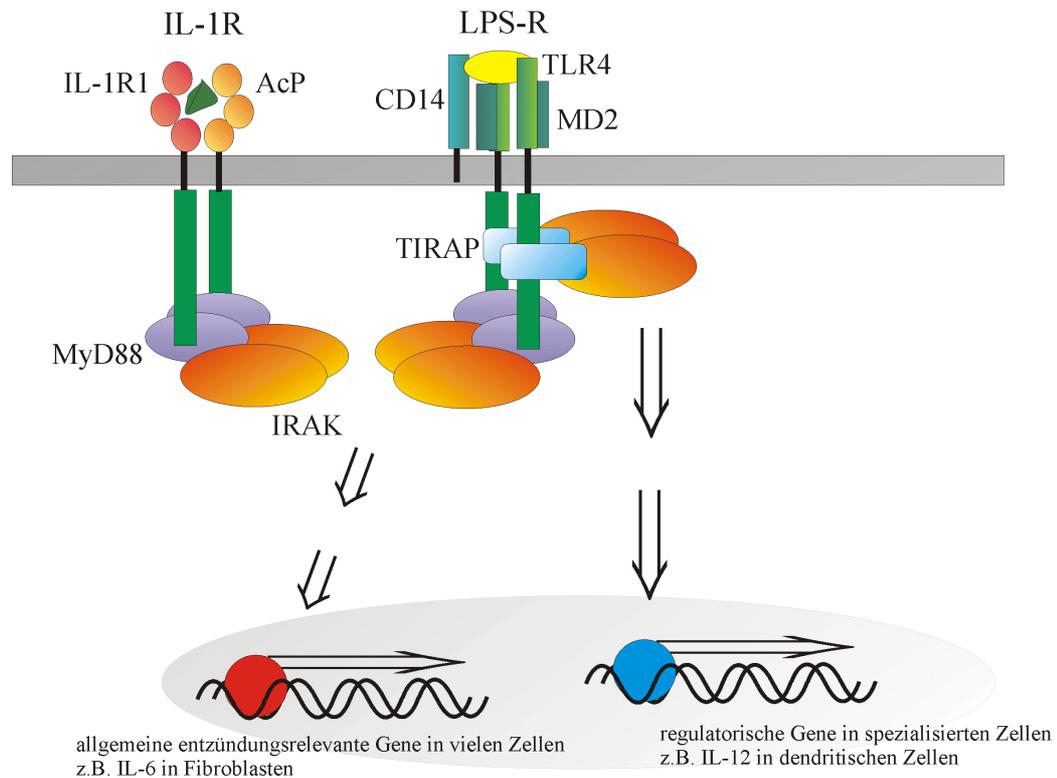


Abb. 39: Modell zur differentiellen Geninduktion in spezialisierten Zellen

Diese These wird dadurch gestützt, dass Unterschiede bisher nur in wenigen Zellen beschrieben wurden. Mit B-Zellen, dendritischen Zellen, Kupfferschen Sternzellen und Makrophagen sind dies vor allem „immunologisch spezialisierte“ Zellen (s. 1.5.2). Hierbei gilt es auch zu bedenken, dass gerade in diesen Zellen weitere LPS-Rezeptoren an der Unterscheidung der Stimuli beteiligt sein können (s. 1.4.1). Die Möglichkeiten zur Differenzierung gehen also über intrazelluläre Mechanismen, wie sie im Zusammenhang mit TIRAP diskutiert werden, hinaus.

5.3 IRAK⁻ als Modellsystem ohne funktionelle IRAK-1

In einer Reihe von Untersuchungen wurde IRAK-1 als zentrale Komponente sowohl der LPS als auch der IL-1 und IL-18 Signaltransduktionskaskaden beschrieben (Übersicht in [197]). Viele Informationen stammen aus Zellen von IRAK-1 *knockout*-Mäusen. Zwei Arbeitsgruppen haben solche Mäuse generiert und in diesen dann IL-1 und IL-18[129, 130] bzw. IL-1, IL-18 und LPS[127, 128] induzierte Signale untersucht. In der *knockout*-Situation sind alle bislang untersuchten Signalwege beeinflusst, eine Restreaktivität der Signalkaskadenkomponenten bleibt aber bestehen. IRAK-2[131] und IRAK-M[132] werden als alternative Signalkoppler diskutiert.

Beide Moleküle haben keine Kinaseaktivität, lassen sich aber wie die kinasetote IRAK-1-Mutante K239S durch IRAK-1 phosphorylieren. Sie wechselwirken wie IRAK-1 mit TRAF6 und wie K239S mit MyD88. Vor allem aber können beide Moleküle in der IRAK negativen Zelllinie 29311A die IL-1 induzierte Signaltransduktion rekonstituieren.

IRAK⁻ ist aus embryonalen Fibroblasten der IRAK-1 *knockout*-Maus von Kanakaraj *et al.* entstanden. Wie erwartet lässt sich keine IRAK-1 Kinaseaktivität nachweisen (Abb. 25), ansonsten zeigt die Zelllinie jedoch deutliche Reaktionen auf Stimulation mit IL-1 und LPS. Der Vergleich der IL-6 Freisetzung durch IRAK⁻ mit der durch einen IRAK⁻-Klon, der stabil mit humaner IRAK-1 transfiziert wurde, zeigt aber, dass die Responsivität bei fehlender IRAK-1 stark eingeschränkt ist (Olaf Rosati). So weit entsprechen die Daten denen von Kanakaraj *et al.*. Die Zelllinie verhält sich wie die Primärzellen aus der *knockout*-Maus.

In IRAK⁻ lässt sich ein mRNA-Transkript nachweisen, das für eine Mutante der IRAK-1 codiert (Abb. 28). Im Gegensatz zu Thomas *et al.*, die einen großen Teil des 5'-regulatorischen Bereichs sowie die Exons 1-8 und das meiste von Exon 9 des IRAK-1 Gens gegen die Neomycinresistenz ausgetauscht haben, sind in der *knockout*-Maus von Kanakaraj *et al.* nur die Exons 5-7 deletiert. Die eingefügte Neomycinresistenz wird hier als Intron aus dem Primärtranskript herausgespleißt (s. 4.3). Als Spleißstellen werden die Sequenzen 3' des Exon 4 und 5' des Exon 8 erkannt. Die zum Spleißing ebenfalls benötigte Verzweigungsstelle ist wahrscheinlich im Intronbereich vor dem Exon 8 erhalten geblieben. Ein so entstandenes „künstliches Intron“ kann durchaus prozessiert werden[198]. Nach der Rekombination des *knockout*-Konstruktes mit dem IRAK-1-Gen codiert dieses für eine Deletionsmutante der IRAK-1, wird erfolgreich transkribiert und prozessiert.

5.3.1 Die IRAK-1-Deletionsmutante in der Signaltransduktion

Der Nachweis der Proteinexpression der Deletionsmutante in IRAK⁻ gelang nicht. Das mRNA Transkript ist in IRAK⁻ aber gut nachzuweisen. Bis auf die Deletion entspricht es dem der IRAK-1. Ein Einfluss der Deletion auf die Stabilität der mRNA ist möglich; regulatorische Proteine können auch innerhalb der codierenden Sequenz einer mRNA binden. Aufgrund der in der RT-PCR nachgewiesenen Transkriptmenge scheint dieser Einfluss jedoch nicht groß zu sein.

Die Überexpression der Deletionsmutante ist nach transienter Transfektion in verschiedenen Zellsystemen möglich. Die Expression des Proteins in IRAK⁻ ist daher wahrscheinlich.

Die Deletion betrifft u. a. die Kinaseaktivität. Diese ist jedoch für die Signalweiterleitung nicht nötig[169, 170], sondern spielt eine Rolle bei der Abschaltung der über IRAK vermittelten Signale[199].

Zur Beurteilung der IRAK⁻ als Modellsystem und zur Interpretation der Daten aus der *knockout*-Maus ist die Frage interessant, welche Funktionen der IRAK-1 auch diese Deletionsmutante übernehmen kann. Neben der Deletionsmutanten wurden in den Experimenten auch zwei kinasetote IRAK-1 Moleküle untersucht, um den Einfluss der fehlenden Kinaseaktivität beurteilen zu können.

Die Deletionsmutante interagiert mit MyD88, Tollip, TRAF6 und sie kann dimerisieren oder zumindest mit IRAK-1 *full length* Molekülen interagieren (s. 4.5.2). Sie verhält sich wie IRAK-1 bzw. hinsichtlich der Interaktion mit MyD88 und Tollip wie die mituntersuchten kinasetoten Moleküle (und auch IRAK-2 und IRAK-M (s.o.)). In diesem Zusammenhang gibt es auch interessante Unterschiede zwischen muriner und humaner IRAK-1 (s. 5.3.2).

Durch die Überexpression der Deletionsmutante wird, im Gegensatz zu den kinasetoten Molekülen, weder NFκB direkt aktiviert noch die IL-1 induzierte NFκB-Aktivierung verstärkt.

Eine Erklärung fällt hier schwer. Aufgrund der gezeigten Wechselwirkungen mit den Kopplungspartnern und der ebenfalls gezeigten Verzichtbarkeit der Kinaseaktivität für die Signalweiterleitung wäre zu erwarten gewesen, dass die Deletionsmutante die Signalkopplung übernehmen kann. Durch die Deletion kommt es jedoch zu einem Funktionsverlust der IRAK, möglicherweise durch die strukturelle Veränderung oder durch den Verlust funktioneller Bereiche. Es ist aber auch kein dominant negativer Effekt festzustellen (Abb. 38). Es wird also auch keine Signalkaskadenkomponente durch die Wechselwirkung mit der Deletionsmutante merklich inhibiert. Damit die Deletionsmutante in der Überexpressionssituation nicht mit endogener IRAK-1 konkurriert, muss die Wechselwirkung erheblich schwächer sein. Die Koimmunpräzipitationsexperimente stützen diese These zwar nicht, schließen sie aber auch nicht aus. Unterschiedliche Affinitäten der Moleküle werden aufgrund einer Signalsättigung in der Überexpressionssituation möglicherweise nicht sichtbar.

Die gefundene Passivität der Deletionsmutante in der Signaltransduktion erklärt, dass die beiden *knockout*-Mäuse gleiche Ergebnisse geliefert haben. Bei einer Beeinflussung der Signaltransduktion durch die IRAK-Mutante wären Unterschiede zu erwarten gewesen.

5.3.2 Unterschiede zwischen muriner und humaner IRAK-1

Die murine und die humane IRAK-1 unterscheiden sich deutlich im Laufverhalten in der Gelelektrophorese (Abb. 31). Die humane IRAK-1 läuft bei etwa 100 kD, während die murine IRAK-1 ein apparentes Molekulargewicht von nur etwa 90 kD hat. Die Ursache hierfür sind nicht die unterschiedlichen theoretischen Molekulargewichte, welche sich um weniger als ein Kilodalton unterscheiden, sondern unterschiedliche Modifikationen der beiden Moleküle. Diese sind abhängig von der Spezies der IRAK-1, nicht von der Spezies des Expressions-

systems. Es handelt sich dabei vor allem um Phosphorylierungen, die durch Auto- und / oder Crossphosphorylierung der Serin-Threonin-Kinase zustande kommen. Die genauen Phosphorylierungsstellen der IRAK sind bisher nicht bekannt. Sowohl die Anzahl an Serinen und Threoninen als auch deren Position kommt damit als potentielle Ursache für die unterschiedlichen Modifikationen in Frage. Ein Allingment der murinen und der humanen IRAK-1 (s. Anhang) zeigt 87 Serine / Threonine in identischen Positionen. An einer Position ist in der murinen Sequenz ein Threonin statt eines Serins in der humanen Sequenz. In der murinen Sequenz sind weitere 29, in der humanen weitere 13 Serine und Threonine. Allein die Anzahl der potentiellen Phosphorylierungsstellen kann damit nicht erklären, warum die humane IRAK-1 stärker modifiziert wird als die murine.

Christian Kollwe, Johannes Knop und Detlef Neumann haben eine Serin-/ Threonin-reiche Region (ProST) identifiziert (s. Anhang), die bei der Phosphorylierung der IRAK-1 eine große Rolle spielt. Besonders Mutationen der Aminosäuren T113, T114, S119, S120, S140 und T141 haben Einfluss auf die Phosphorylierung der humanen IRAK-1. Alle diese Aminosäuren finden sich auch in der murinen IRAK-1 (anstelle des Threonin 113 findet sich in der murinen Sequenz ein Serin). Die Gründe für die unterschiedlichen Modifikationen der humanen und der murinen IRAK-1 bleiben auch mit diesem Wissen ungeklärt.

Die Modifikationen der IRAK-1-Moleküle beeinflussen die Wechselwirkung mit MyD88 und Tollip. Im Koimmunpräzipitationsexperiment kann eine deutliche Interaktion von MyD88 und auch von Tollip mit kinasetoter, eine schwache mit muriner und gar keine mit humaner IRAK-1 nachgewiesen werden.

Über die Regulation der Interaktion mit MyD88 und Tollip kann die Art der Modifikation auch Einfluss auf die Regulation der IRAK-Aktivität haben. Die der Modifikation der IRAK-1 folgende Dissoziation von MyD88 wurde für die humane IRAK schon von Wesche *et al.*[109] postuliert. Speziesunterschiede wurden jedoch in diesem Zusammenhang bislang nicht untersucht. Auch hinsichtlich des im Zusammenhang mit der Phosphorylierung diskutierten Abbaus der IRAK-1 (s.u.) sind Speziesunterschiede noch nicht untersucht worden.

5.3.3 IRAK⁻ exprimiert kein kinaseaktives Mitglied der IRAK-Familie

Die in IRAK⁻ exprimierte IRAK-Deletionsmutante ist nicht in der Lage die Aktivierung von NFκB zu vermitteln. Wie in beiden *knockout*-Mäusen wird diese Funktion auch in IRAK⁻ durch andere Moleküle – wahrscheinlich durch IRAK-2 und / oder IRAK-M – übernommen (s.o.). Diese beiden Moleküle konnten in IRAK⁻ nachgewiesen werden (Olaf Rosati).

Keines der bekannten, in IRAK⁻ exprimierten IRAK-Moleküle hat eine Kinaseaktivität. Dies hat am ehesten Konsequenzen für die Regulation der IRAK abhängigen Signaltransduktion. Die Phosphorylierung der IRAK spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation ihrer Stabilität[200]. Eine Splicevariante der IRAK-1 (IRAK-1b), die wie IRAK-2 und IRAK-M nicht autophosphoriliert, zeichnet sich durch eine stark erhöhte Stabilität nach Aktivierung durch IL-1 aus[201], und auch kinaseinaktive IRAK-1 scheint langsamer abgebaut zu werden als der Wildtyp[202] (Abb. 40 B).

Sowohl IRAK-2 als auch IRAK-M haben ein geringeres Potential zur Aktivierung von NF κ B als IRAK-1[132]. Die im Vergleich mit dem stabil mit humaner IRAK-1 transfizierten IRAK⁻-Klon geringere IL-6-Produktion von IRAK⁻ ist also nicht einfach auf eine reduzierte Menge an funktioneller IRAK zurückzuführen, sondern auch auf die geringere Aktivität der noch vorhandenen IRAK-Familienmitglieder (Abb. 40 C).

Weitere Konsequenzen wären bei IRAK abhängigen Signalwegen, die nicht unabhängig von der Kinaseaktivität sind, zu suchen. Die LPS abhängige Aktivierung der p38-Kinase in Makrophagen wäre hier zu nennen[203]. Ob auch die IL-1 abhängige Aktivierung der p38-Kinase von der IRAK-Kinaseaktivität abhängt, wurde in der Arbeit nicht untersucht (Abb. 40 C).

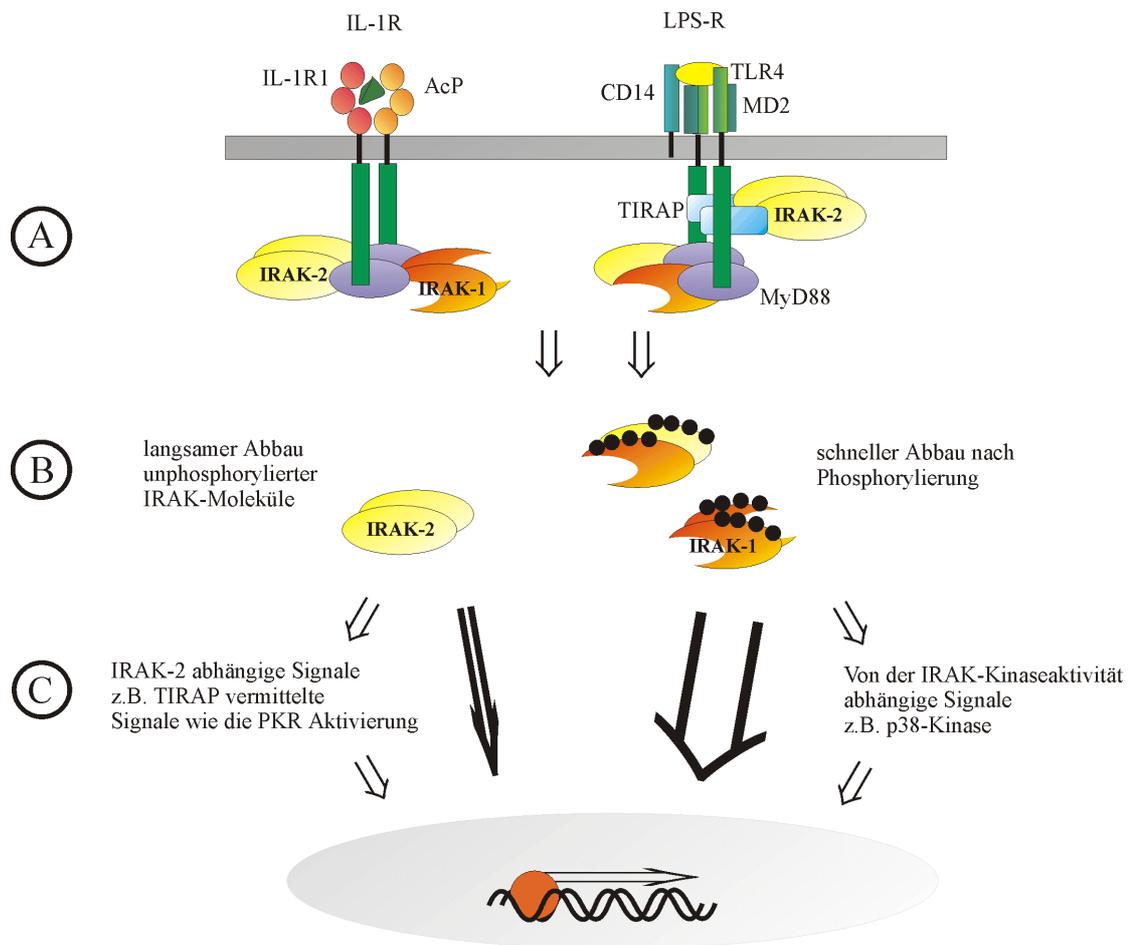


Abb. 40: Signaltransduktion in IRAK⁻

A: Unterschiedliche Bindungsstellen der IRAK-Familienmitglieder an den aktivierten Rezeptorkomplexen

B: Regulation der Signaldauer durch Phosphorylierung

C: Die IRAK-Familienmitglieder aktivieren den Hauptsignalweg mit unterschiedlicher Intensität und können unterschiedliche Nebenwege aktivieren.

Auf die Darstellung der IRAK-M wurde zugunsten besserer Übersichtlichkeit verzichtet. Die dargestellten IRAK-1 abhängigen Wege laufen in IRAK⁻ aufgrund der Deletion in IRAK-1 nicht ab.

Vig *et al.* finden, dass die Überexpression von mIRAK, nicht jedoch von der kinasetoten Mutante D358N ein IL-8-Promotor abhängiges Reportergen aktiviert. Auf dem IL-8-Promotor finden sich neben Bindungsstellen für NFκB auch solche für AP-1 und NF-IL-6. Allerdings finden sie auch eine Verstärkung der IL-1 abhängigen Aktivierung dieses und auch eines nur von NFκB abhängigen Reportergens durch D358N[169].

Die Funktionen der verschiedenen Mitglieder der IRAK-Familie können sich aber noch weiter unterscheiden als durch die unterschiedliche Stabilität gegenüber stimulusinduzierter Proteolyse und die daraus resultierende Dauer der Signalweiterleitung. Ein bekannter Unterschied ist die Wechselwirkung von TIRAP mit IRAK-2, nicht jedoch mit IRAK-1[137]. IRAK-1 interagiert mit IL-1RAcP, IRAK-2 lässt sich jedoch bevorzugt über IL-1RI präzipitieren[131]. Die Mitglieder der IRAK-Familie bilden untereinander alle denkbaren Homo- und Heterodimere, möglicherweise auch Oligomere[132]. Die Deletionsmutante kann daher auch im Komplex mit IRAK-2 oder IRAK-M Einfluss auf die Signaltransduktion haben.

5.3.4 Fazit

IRAK⁻ eignet sich als Modellsystem zur Untersuchung des Einflusses von IRAK-1 auf die Signaltransduktion. Ohne endogene IRAK-1-Kinaseaktivität bietet sich die Zelllinie besonders an, die Strukturen zu untersuchen, die für die beobachtete Autophosphorylierung der IRAK-1 verantwortlich sind, aber auch, dem Einfluss der Kinaseaktivität auf IRAK abhängige Signalwege näherzukommen.

- Hat die fehlende IRAK-1 Kinaseaktivität in IRAK⁻ Einfluss auf die Kinetik der NFκB-Aktivierung?
- Unterscheidet sich dieser Einfluss zwischen dem IL-1 und LPS Signalweg?
- IRAK-2 spielt aufgrund der Wechselwirkung mit TIRAP im LPS-Signalweg möglicherweise eine andere Rolle als im IL-1-Signalweg. Wird dieser Unterschied in der IRAK-1 *knockout*-Situation deutlich?

Weder bei der NFκB-Aktivierung (nicht bei der Kinetik und auch nicht bei der Intensität) noch bei der IL-6-mRNA Induktion oder der IL-6-Freisetzung lassen sich hierauf Hinweise finden. Wie in Swiss 3T3 unterscheiden sich die gemessenen Kinetiken und Intensitäten zwischen den zwei Stimuli nicht dramatisch. Wenn hier Unterschiede existieren, so sind dies kleinere, die erst im direkten Vergleich mit dem gerade erst verfügbaren, stabil mit humaner IRAK-1 transfizierten IRAK⁻-Klon festzustellen sein könnten. Ein Einfluss der Deletionsmutante in diesen Zusammenhängen ist aufgrund der gezeigten Interaktionsmöglichkeiten denkbar, eine echte *knockout*-Zelle wäre für solche Untersuchungen besser geeignet.

Trotz der zentralen Funktion der IRAK-1 in den untersuchten Signalwegen wirkt sich ein Fehlen dieses Moleküls weit weniger dramatisch aus als z.B. die Abwesenheit von MyD88 (s. 1.5.2). Der durch IL-1 und LPS aktivierbare „Hauptsignalweg“ über NFκB wird nicht blockiert. Wenn durch die Deletion in der IRAK-1 Nebenwege der IL-1 oder LPS-Signaltransduktion betroffen sind, so hat das weder auf die Transkription noch auf die Translation von IL-6 einen großen Einfluss.

6 Literaturverzeichnis

1. Raetz, C.R., *Biochemistry of endotoxins*. Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 129-70.
2. Rietschel, E.T. and H. Brade, *Bacterial endotoxins*. Sci Am, 1992. **267**(2): p. 54-61.
3. Tobias, P.S., K. Soldau, and R.J. Ulevitch, *Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum*. J Exp Med, 1986. **164**(3): p. 777-93.
4. Schumann, R.R., *et al.*, *Structure and function of lipopolysaccharide binding protein*. Science, 1990. **249**(4975): p. 1429-31.
5. Wright, S.D., *et al.*, *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein*. Science, 1990. **249**(4975): p. 1431-3.
6. Wurfel, M.M., *et al.*, *Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein gene leads to profound suppression of LPS responses ex vivo, whereas in vivo responses remain intact*. J Exp Med, 1997. **186**(12): p. 2051-6.
7. Ferrero, E., *et al.*, *Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(6): p. 2380-4.
8. Lee, J.D., *et al.*, *Transfection of CD14 into 70Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein*. J Exp Med, 1992. **175**(6): p. 1697-705.
9. Sugiyama, T., *et al.*, *The expression of membrane-bound CD14 renders mouse B-1 cells susceptible to LPS*. J Endotoxin Res, 2001. **7**(3): p. 223-6.
10. Kitchens, R.L., *et al.*, *Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins*. J Clin Invest, 2001. **108**(3): p. 485-93.
11. Alexander, C. and E.T. Rietschel, *Bakterielle Lipopolysaccharide - Hochaktive Stimulatoren der angeborenen Immunität*. Biospektrum, 1999. **5**(4): p. 275-282.
12. Fenton, M.J. and D.T. Golenbock, *LPS-binding proteins and receptors*. J Leukoc Biol, 1998. **64**(1): p. 25-32.
13. Poltorak, A., *et al.*, *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
14. Beutler, B., X. Du, and A. Poltorak, *Identification of Toll-like receptor 4 (Tlr4) as the sole conduit for LPS signal transduction: genetic and evolutionary studies*. J Endotoxin Res, 2001. **7**(4): p. 277-80.
15. Gery, I., R.K. Gershon, and B.H. Waksman, *Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell*. J Exp Med, 1972. **136**(1): p. 128-42.
16. Gery, I. and B.H. Waksman, *Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s)*. J Exp Med, 1972. **136**(1): p. 143-55.
17. Dinarello, C.A., *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2095-147.
18. March, C.J., *et al.*, *Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs*. Nature, 1985. **315**(6021): p. 641-7.
19. Auron, P.E., *et al.*, *Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(24): p. 7907-11.
20. Kobayashi, Y., *et al.*, *Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(14): p. 5548-52.

21. Kavita, U. and S.B. Mizel, *Differential sensitivity of interleukin-1 alpha and -beta precursor proteins to cleavage by calpain, a calcium-dependent protease*. J Biol Chem, 1995. **270**(46): p. 27758-65.
22. Stevenson, F.T., *et al.*, *The 31-kDa precursor of interleukin 1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propiece*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(15): p. 7245-9.
23. Brody, D.T. and S.K. Durum, *Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction*. J Immunol, 1989. **143**(4): p. 1183-7.
24. Black, R.A., *et al.*, *Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor*. J Biol Chem, 1988. **263**(19): p. 9437-42.
25. Cerretti, D.P., *et al.*, *Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme*. Science, 1992. **256**(5053): p. 97-100.
26. Hannum, C.H., *et al.*, *Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor*. Nature, 1990. **343**(6256): p. 336-40.
27. Mazzei, G.J., *et al.*, *Purification and characterization of a 26-kDa competitive inhibitor of interleukin 1*. Eur J Immunol, 1990. **20**(3): p. 683-9.
28. Dinarello, C.A., *The biological properties of interleukin-1*. Eur Cytokine Netw, 1994. **5**(6): p. 517-31.
29. Hoffmann, M.K., *et al.*, *An essential role for interleukin 1 and a dual function for interleukin 2 in the immune response of murine B lymphocytes to sheep erythrocytes*. J Mol Cell Immunol, 1987. **3**(1): p. 29-36.
30. Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis, *Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine*. FEBS Lett, 1992. **307**(1): p. 97-101.
31. Bevilacqua, M.P., *et al.*, *Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells*. J Exp Med, 1984. **160**(2): p. 618-23.
32. Bevilacqua, M.P., *et al.*, *Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines*. J Clin Invest, 1985. **76**(5): p. 2003-11.
33. Schmidt, J.A., *et al.*, *Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation*. J Immunol, 1982. **128**(5): p. 2177-82.
34. Bernheim, H.A., T.M. Gilbert, and J.T. Stitt, *Prostaglandin E levels in third ventricular cerebrospinal fluid of rabbits during fever and changes in body temperature*. J Physiol, 1980. **301**: p. 69-78.
35. Baracos, V., *et al.*, *Stimulation of muscle protein degradation and prostaglandin E2 release by leukocytic pyrogen (interleukin-1). A mechanism for the increased degradation of muscle proteins during fever*. N Engl J Med, 1983. **308**(10): p. 553-8.
36. Ramadori, G., *et al.*, *Interleukin 6, the third mediator of acute-phase reaction, modulates hepatic protein synthesis in human and mouse. Comparison with interleukin 1 beta and tumor necrosis factor-alpha*. Eur J Immunol, 1988. **18**(8): p. 1259-64.
37. Bagby, G.C., Jr., *Interleukin-1 and hematopoiesis*. Blood Rev, 1989. **3**(3): p. 152-61.
38. Hestdal, K., *et al.*, *Interleukin-1 (IL-1) directly and indirectly promotes hematopoietic cell growth through type I IL-1 receptor*. Blood, 1994. **84**(1): p. 125-32.
39. Akira, S., *The role of IL-18 in innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(1): p. 59-63.

40. Dinarello, C.A., *et al.*, *Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor.* J Leukoc Biol, 1998. **63**(6): p. 658-64.
41. Martin, M.U., *Interleukin 18: Ein Überblick.* In Vitro (Beckman-Coulter), 2000. **5**(8): p. 59-66.
42. Nakamura, K., *et al.*, *Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production.* Infect Immun, 1989. **57**(2): p. 590-5.
43. Okamura, H., *et al.*, *Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells.* Nature, 1995. **378**(6552): p. 88-91.
44. Ushio, S., *et al.*, *Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in Escherichia coli, and studies on the biologic activities of the protein.* J Immunol, 1996. **156**(11): p. 4274-9.
45. Culhane, A.C., *et al.*, *Cloning of rat brain interleukin-18 cDNA.* Mol Psychiatry, 1998. **3**(4): p. 362-6.
46. Ghayur, T., *et al.*, *Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production.* Nature, 1997. **386**(6625): p. 619-23.
47. Gu, Y., *et al.*, *Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme.* Science, 1997. **275**(5297): p. 206-9.
48. Bazan, J.F., J.C. Timans, and R.A. Kastelein, *A newly defined interleukin-1?* Nature, 1996. **379**(6566): p. 591.
49. Stoll, S., *et al.*, *Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development.* Eur J Immunol, 1998. **28**(10): p. 3231-9.
50. Matsui, K., *et al.*, *Propionibacterium acnes treatment diminishes CD4+ NK1.1+ T cells but induces type I T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells.* J Immunol, 1997. **159**(1): p. 97-106.
51. Prinz, M. and U.K. Hanisch, *Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18.* J Neurochem, 1999. **72**(5): p. 2215-8.
52. Takeuchi, M., *et al.*, *Immunohistochemical and immuno-electron-microscopic detection of interferon-gamma-inducing factor ("interleukin-18") in mouse intestinal epithelial cells.* Cell Tissue Res, 1997. **289**(3): p. 499-503.
53. Stoll, S., *et al.*, *Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes.* J Immunol, 1997. **159**(1): p. 298-302.
54. Udagawa, N., *et al.*, *Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation.* J Exp Med, 1997. **185**(6): p. 1005-12.
55. Vankayalapati, R., *et al.*, *Production of interleukin-18 in human tuberculosis.* J Infect Dis, 2000. **182**(1): p. 234-9.
56. Pirhonen, J., *et al.*, *Virus infection activates IL-1 beta and IL-18 production in human macrophages by a caspase-1-dependent pathway.* J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7322-9.
57. Puren, A.J., *et al.*, *Interleukin-18 (IFNgamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via TNFalpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells.* J Clin Invest, 1998. **101**(3): p. 711-21.
58. Matsumoto, S., *et al.*, *Interleukin-18 activates NF-kappaB in murine T helper type 1 cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **234**(2): p. 454-7.

59. Torigoe, K., *et al.*, *Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 25737-42.
60. Tomura, M., *et al.*, *A critical role for IL-18 in the proliferation and activation of NK1.1+ CD3- cells*. J Immunol, 1998. **160**(10): p. 4738-46.
61. Munder, M., *et al.*, *Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation*. J Exp Med, 1998. **187**(12): p. 2103-8.
62. Yoshimoto, T., *et al.*, *IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3400-7.
63. Tsutsui, H., *et al.*, *IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones*. J Immunol, 1996. **157**(9): p. 3967-73.
64. Yoshimoto, T., *et al.*, *Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 3948-53.
65. Micallef, M.J., *et al.*, *Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production*. Eur J Immunol, 1996. **26**(7): p. 1647-51.
66. Kohno, K., *et al.*, *IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12*. J Immunol, 1997. **158**(4): p. 1541-50.
67. Robinson, D., *et al.*, *IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB*. Immunity, 1997. **7**(4): p. 571-81.
68. Takeda, K., *et al.*, *Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 383-90.
69. Yoshimoto, T., *et al.*, *IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6*. Nat Immunol, 2000. **1**(2): p. 132-7.
70. Nakanishi, K., *et al.*, *Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 423-74.
71. Swain, S.L., *Interleukin 18: tipping the balance towards a T helper cell 1 response*. J Exp Med, 2001. **194**(3): p. F11-4.
72. Novick, D., *et al.*, *Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response*. Immunity, 1999. **10**(1): p. 127-36.
73. Gay, N.J. and F.J. Keith, *Drosophila Toll and IL-1 receptor*. Nature, 1991. **351**(6325): p. 355-6.
74. Stein, D., *et al.*, *The polarity of the dorsoventral axis in the Drosophila embryo is defined by an extracellular signal*. Cell, 1991. **65**(5): p. 725-35.
75. Lemaitre, B., *et al.*, *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.
76. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature, 1997. **388**(6640): p. 394-7.

77. Poltorak, A., *et al.*, *Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region.* Blood Cells Mol Dis, 1998. **24**(3): p. 340-55.
78. Kawasaki, K., *et al.*, *Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol.* J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2251-4.
79. Ohashi, K., *et al.*, *Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex.* J Immunol, 2000. **164**(2): p. 558-61.
80. Kurt-Jones, E.A., *et al.*, *Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus.* Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 398-401.
81. Heldwein, K.A., D.T. Golenbock, and M.J. Fenton, *Recent Advances in the Biology of Toll-like Receptors.* Mod. Asp. Immunobiol., 2001. **1**(6): p. 249.
82. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.* Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 675-80.
83. Yang, R.B., *et al.*, *Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling.* Nature, 1998. **395**(6699): p. 284-8.
84. Kirschning, C.J., *et al.*, *Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide.* J Exp Med, 1998. **188**(11): p. 2091-7.
85. Hirschfeld, M., *et al.*, *Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2.* J Immunol, 2000. **165**(2): p. 618-22.
86. da Silva Correia, J., *et al.*, *Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2.* J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21129-35.
87. Shimazu, R., *et al.*, *MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4.* J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1777-82.
88. Yang, H., *et al.*, *Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1.* J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20861-6.
89. Dziarski, R., *et al.*, *MD-2 enables Toll-like receptor 2 (TLR2)-mediated responses to lipopolysaccharide and enhances TLR2-mediated responses to Gram-positive and Gram-negative bacteria and their cell wall components.* J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1938-44.
90. Dziarski, R. and D. Gupta, *Role of MD-2 in TLR2- and TLR4-mediated recognition of Gram-negative and Gram-positive bacteria and activation of chemokine genes.* J Endotoxin Res, 2000. **6**(5): p. 401-5.
91. Ogata, H., *et al.*, *The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells.* J Exp Med, 2000. **192**(1): p. 23-9.
92. Miyake, K., *et al.*, *Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4/MD-2 and RP105/MD-1.* J Endotoxin Res, 2000. **6**(5): p. 389-91.
93. Perera, P.Y., *et al.*, *CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression.* J Immunol, 2001. **166**(1): p. 574-81.
94. Dower, S.K., *et al.*, *Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1.* J Exp Med, 1985. **162**(2): p. 501-15.
95. Sims, J.E., *et al.*, *Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(22): p. 8946-50.

96. Greenfeder, S.A., *et al.*, *Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex*. J Biol Chem, 1995. **270**(23): p. 13757-65.
97. Korherr, C., *et al.*, *A critical role for interleukin-1 receptor accessory protein in interleukin-1 signaling*. Eur J Immunol, 1997. **27**(1): p. 262-7.
98. Wesche, H., K. Resch, and M.U. Martin, *Effects of IL-1 receptor accessory protein on IL-1 binding*. FEBS Lett, 1998. **429**(3): p. 303-6.
99. Wesche, H., *et al.*, *The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases)*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 7727-31.
100. McMahan, C.J., *et al.*, *A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types*. Embo J, 1991. **10**(10): p. 2821-32.
101. Heguy, A., *et al.*, *A chimeric type II/type I interleukin-1 receptor can mediate interleukin-1 induction of gene expression in T cells*. J Biol Chem, 1993. **268**(14): p. 10490-4.
102. Bossu, P., *et al.*, *Transfected type II interleukin-1 receptor impairs responsiveness of human keratinocytes to interleukin-1*. Am J Pathol, 1995. **147**(6): p. 1852-61.
103. Re, F., *et al.*, *Inhibition of interleukin-1 responsiveness by type II receptor gene transfer: a surface "receptor" with anti-interleukin-1 function*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1841-50.
104. Lang, D., *et al.*, *The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness*. J Immunol, 1998. **161**(12): p. 6871-7.
105. Malinowsky, D., *et al.*, *Interleukin-1 receptor accessory protein interacts with the type II interleukin-1 receptor*. FEBS Lett, 1998. **429**(3): p. 299-302.
106. Orlando, S., *et al.*, *Role of metalloproteases in the release of the IL-1 type II decoy receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(50): p. 31764-9.
107. Parnet, P., *et al.*, *IL-1Rrp is a novel receptor-like molecule similar to the type I interleukin-1 receptor and its homologues T1/ST2 and IL-1R AcP*. J Biol Chem, 1996. **271**(8): p. 3967-70.
108. Born, T.L., *et al.*, *Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling*. J Biol Chem, 1998. **273**(45): p. 29445-50.
109. Wesche, H., *et al.*, *MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 837-47.
110. Takaesu, G., *et al.*, *TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway*. Mol Cell, 2000. **5**(4): p. 649-58.
111. Takaesu, G., *et al.*, *Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(7): p. 2475-84.
112. Qian, Y., *et al.*, *IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NFkappa B*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 41661-7.
113. Irie, T., T. Muta, and K. Takeshige, *TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages*. FEBS Lett, 2000. **467**(2-3): p. 160-4.

114. Kishimoto, K., K. Matsumoto, and J. Ninomiya-Tsuji, *TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop*. J Biol Chem, 2000. **275**(10): p. 7359-64.
115. Ono, K., *et al.*, *An evolutionarily conserved motif in the TAB1 C-terminal region is necessary for interaction with and activation of TAK1 MAPKKK*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 24396-400.
116. Deng, L., *et al.*, *Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain*. Cell, 2000. **103**(2): p. 351-61.
117. Wang, C., *et al.*, *TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 346-51.
118. Kopp, E., *et al.*, *ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway*. Genes Dev, 1999. **13**(16): p. 2059-71.
119. Malinin, N.L., *et al.*, *MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1*. Nature, 1997. **385**(6616): p. 540-4.
120. Song, H.Y., *et al.*, *Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(18): p. 9792-6.
121. Yin, L., *et al.*, *Defective lymphotoxin-beta receptor-induced NF-kappaB transcriptional activity in NIK-deficient mice*. Science, 2001. **291**(5511): p. 2162-5.
122. Hatada, E.N., D. Krappmann, and C. Scheidereit, *NF-kappaB and the innate immune response*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(1): p. 52-8.
123. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
124. Kawai, T., *et al.*, *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 115-22.
125. Adachi, O., *et al.*, *Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function*. Immunity, 1998. **9**(1): p. 143-50.
126. Lomaga, M.A., *et al.*, *TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling*. Genes Dev, 1999. **13**(8): p. 1015-24.
127. Thomas, J.A., *et al.*, *Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 978-84.
128. Swantek, J.L., *et al.*, *IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin*. J Immunol, 2000. **164**(8): p. 4301-6.
129. Kanakaraj, P., *et al.*, *Interleukin (IL)-1 receptor-associated kinase (IRAK) requirement for optimal induction of multiple IL-1 signaling pathways and IL-6 production*. J Exp Med, 1998. **187**(12): p. 2073-9.
130. Kanakaraj, P., *et al.*, *Defective interleukin (IL)-18-mediated natural killer and T helper cell type 1 responses in IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)-deficient mice*. J Exp Med, 1999. **189**(7): p. 1129-38.
131. Muzio, M., *et al.*, *IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling*. Science, 1997. **278**(5343): p. 1612-5.
132. Wesche, H., *et al.*, *IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 19403-10.
133. Wesa, A.K. and A. Galy, *IL-1 beta induces dendritic cells to produce IL-12*. Int Immunol, 2001. **13**(8): p. 1053-61.

134. Seki, E., *et al.*, *Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta*. J Immunol, 2001. **166**(4): p. 2651-7.
135. Kaisho, T., *et al.*, *Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5688-94.
136. Horng, T., G.M. Barton, and R. Medzhitov, *TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 835-41.
137. Fitzgerald, K.A., *et al.*, *Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction*. Nature, 2001. **413**(6851): p. 78-83.
138. Goh, K.C., M.J. deVeer, and B.R. Williams, *The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin*. Embo J, 2000. **19**(16): p. 4292-7.
139. Henneke, P. and D.T. Golenbock, *TIRAP: how Toll receptors fraternize*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 828-30.
140. Kandel, E.S. and N. Hay, *The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB*. Exp Cell Res, 1999. **253**(1): p. 210-29.
141. Maraldi, N.M., *et al.*, *Phosphatidylinositol 3-kinase translocation to the nucleus is an early event in the interleukin-1 signalling mechanism in human osteosarcoma Saos-2 cells*. Adv Enzyme Regul, 1999. **39**: p. 33-49.
142. Marmiroli, S., *et al.*, *Phosphatidylinositol 3-kinase is recruited to a specific site in the activated IL-1 receptor I*. FEBS Lett, 1998. **438**(1-2): p. 49-54.
143. Reddy, S.A., J.H. Huang, and W.S. Liao, *Phosphatidylinositol 3-kinase in interleukin 1 signaling. Physical interaction with the interleukin 1 receptor and requirement in NFkappaB and AP-1 activation*. J Biol Chem, 1997. **272**(46): p. 29167-73.
144. Bavelloni, A., *et al.*, *Phosphatidylinositol 3-kinase translocation to the nucleus is induced by interleukin 1 and prevented by mutation of interleukin 1 receptor in human osteosarcoma Saos-2 cells*. J Cell Sci, 1999. **112**(Pt 5): p. 631-40.
145. Sizemore, N., S. Leung, and G.R. Stark, *Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(7): p. 4798-805.
146. Guo, F.K. and S.G. Wu, *Phosphatidylinositol 3-kinase modulates IL-18-induced nuclear factor-kappa B activation*. Acta Pharmacol Sin, 2000. **21**(4): p. 321-4.
147. Morel, J.C., *et al.*, *A Novel Role for Interleukin-18 in Adhesion Molecule Induction through NFkappa B and Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase-dependent Signal Transduction Pathways*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37069-75.
148. Hmama, Z., *et al.*, *Monocyte adherence induced by lipopolysaccharide involves CD14, LFA-1, and cytohesin-1. Regulation by Rho and phosphatidylinositol 3-kinase*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 1050-7.
149. Monick, M.M., *et al.*, *Ceramide regulates lipopolysaccharide-induced phosphatidylinositol 3-kinase and akt activity in human alveolar macrophages*. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5977-85.
150. Martin, M.U. and W. Falk, *The interleukin-1 receptor complex and interleukin-1 signal transduction*. Eur Cytokine Netw, 1997. **8**(1): p. 5-17.
151. Madge, L.A. and J.S. Pober, *A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, activated by tumor necrosis factor or interleukin-1, inhibits apoptosis but does not activate NFkappaB in human endothelial cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 15458-65.

152. Bergmann, M., *et al.*, *IkappaBalpha degradation and nuclear factor-kappaB DNA binding are insufficient for interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha-induced kappaB-dependent transcription. Requirement for an additional activation pathway.* J Biol Chem, 1998. **273**(12): p. 6607-10.
153. Karin, M., *The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases.* J Biol Chem, 1995. **270**(28): p. 16483-6.
154. Janeway, C.A. and P. Travers, *Immunologie.* 1995, Heidelberg ; Berlin ; Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
155. Akada, R., *Quick-check method to test the size of Escherichia coli plasmids.* Biotechniques, 1994. **17**(1): p. 58.
156. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
157. McCutchan, J.H. and J.S. Pagano, *Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran.* J Natl Cancer Inst, 1968. **41**(2): p. 351-7.
158. Graham, F.L. and A.J. van der Eb, *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.* Virology, 1973. **52**(2): p. 456-67.
159. Ausubel, F.M., *et al.*, eds. *Current Protocols in Molecular Biology.* . 1994, Greene Publishing Associates/Wiley&Sons: New York.
160. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.* J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
161. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(259): p. 680-5.
162. Hibi, M., *et al.*, *Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain.* Genes Dev, 1993. **7**(11): p. 2135-48.
163. Bomsztyk, K., *et al.*, *Role of cAMP in interleukin-1-induced kappa light chain gene expression in murine B cell line.* J Biol Chem, 1990. **265**(16): p. 9413-7.
164. Iwasaki, T., *et al.*, *Comparison of IL-1 alpha effectiveness in activating murine pre-B and T cell lines.* Cytokine, 1993. **5**(5): p. 416-26.
165. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
166. Neumann, D. and M.U. Martin, *Interleukin-12 upregulates the il-18beta chain in balb/c thymocytes.* J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(8): p. 635-42.
167. Paige, C.J., P.W. Kincade, and P. Ralph, *Murine B cell leukemia line with inducible surface immunoglobulin expression.* J Immunol, 1978. **121**(2): p. 641-7.
168. van den Heuvel, S. and E. Harlow, *Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control.* Science, 1993. **262**(5142): p. 2050-4.
169. Vig, E., *et al.*, *Modulation of tumor necrosis factor and interleukin-1-dependent NF-kappaB activity by mPLK/IRAK.* J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 13077-84.
170. Knop, J. and M.U. Martin, *Effects of IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) expression on IL-1 signaling are independent of its kinase activity.* FEBS Lett, 1999. **448**(1): p. 81-5.
171. Burns, K., *et al.*, *Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(6): p. 346-51.

172. Lian, Z., *et al.*, *Genomic and proteomic analysis of the myeloid differentiation program*. Blood, 2001. **98**(3): p. 513-24.
173. Dziarski, R., *et al.*, *Soluble CD14 enhances membrane CD14-mediated responses to peptidoglycan: structural requirements differ from those for responses to lipopolysaccharide*. Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 5254-60.
174. Ulmer, A.J., *et al.*, *Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS)*. Toxicology, 2000. **152**(1-3): p. 37-45.
175. Bouis, D.A., *et al.*, *Dendritic cells phagocytose and are activated by Treponema pallidum*. Infect Immun, 2001. **69**(1): p. 518-28.
176. Kato, T., H. Yamane, and H. Nariuchi, *Differential effects of LPS and CD40 ligand stimulations on the induction of IL-12 production by dendritic cells and macrophages*. Cell Immunol, 1997. **181**(1): p. 59-67.
177. Miyamoto, S., B.J. Seufzer, and S.D. Shumway, *Novel IkappaB alpha proteolytic pathway in WEHI231 immature B cells*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 19-29.
178. Amar, S., *et al.*, *Moesin: a potential LPS receptor on human monocytes*. J Endotoxin Res, 2001. **7**(4): p. 281-6.
179. Tohme, Z.N., S. Amar, and T.E. Van Dyke, *Moesin functions as a lipopolysaccharide receptor on human monocytes*. Infect Immun, 1999. **67**(7): p. 3215-20.
180. Visintin, A., *et al.*, *Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(21): p. 12156-61.
181. Viriyakosol, S., *et al.*, *MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide*. J Endotoxin Res, 2000. **6**(6): p. 489-91.
182. Brophy, V.H. and C.H. Sibley, *Expression of CD14 corrects the slow response to lipopolysaccharide in the 1B8 mutant of the B cell lymphoma 70Z/3*. Immunogenetics, 1998. **47**(3): p. 196-205.
183. Mains, P.E. and C.H. Sibley, *LPS-nonresponsive variants of mouse B cell lymphoma, 70Z/3: isolation and characterization*. Somatic Cell Genet, 1983. **9**(6): p. 699-720.
184. Nakahira, M., *et al.*, *Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-gamma Gene Expression: IL-12-Induced STAT4 Contributes to IFN-gamma Promoter Activation by Up-Regulating the Binding Activity of IL-18-Induced Activator Protein 1*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1146-53.
185. Vanden Berghe, W., *et al.*, *The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 32091-8.
186. Rieneck, K., *et al.*, *Massive parallel gene expression profiling of RINm5F pancreatic islet beta-cells stimulated with interleukin-1beta*. Apmis, 2000. **108**(12): p. 855-72.
187. Genecards, <http://nciarray.nci.nih.gov/cards/index.html>. .
188. Taylor, E., *et al.*, *Sequence verification as quality-control step for production of cDNA microarrays*. Biotechniques, 2001. **31**(1): p. 62-5.
189. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, *Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words*. Electrophoresis, 1998. **19**(11): p. 1853-61.
190. Gygi, S.P., *et al.*, *Correlation between protein and mRNA abundance in yeast*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 1720-30.
191. Futcher, B., *et al.*, *A sampling of the yeast proteome*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(11): p. 7357-68.

192. Greenbaum, D., *et al.*, *Interrelating different types of genomic data, from proteome to secretome: 'oming in on function.* Genome Res, 2001. **11**(9): p. 1463-8.
193. Shakhov, A.N., *et al.*, *Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages.* J Exp Med, 1990. **171**(1): p. 35-47.
194. Swantek, J.L., L. Christerson, and M.H. Cobb, *Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha promoter activity is inhibitor of nuclear factor-kappaB kinase-dependent.* J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11667-71.
195. Swantek, J.L., M.H. Cobb, and T.D. Geppert, *Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK.* Mol Cell Biol, 1997. **17**(11): p. 6274-82.
196. Lee, J.C., *et al.*, *A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis.* Nature, 1994. **372**(6508): p. 739-46.
197. O'Neill, L.A. and C.A. Dinarello, *The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense.* Immunol Today, 2000. **21**(5): p. 206-9.
198. Sharp, P.A., *On the origin of RNA splicing and introns.* Cell, 1985. **42**(2): p. 397-400.
199. Martin, M.U. and C. Kollwe, *Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 (IRAK-1): A self-regulatory adapter molecule in the cascade of the Toll/IL-1 receptor family.* Signal Transduction, 2001. **2**(1-2): p. 37-50.
200. Yamin, T.T. and D.K. Miller, *The interleukin-1 receptor-associated kinase is degraded by proteasomes following its phosphorylation.* J Biol Chem, 1997. **272**(34): p. 21540-7.
201. Jensen, L.E. and A.S. Whitehead, *Irak1b, a novel alternative splice variant of interleukin-1 receptor-associated kinase (irak), mediates interleukin-1 signaling and has prolonged stability.* J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 29037-44.
202. Knop, J., *Die Signaltransduktion durch den Interleukin-1 Rezeptorkomplex: Funktion und Mechanismus der IL-1 Rezeptor Assoziierten Proteinkinase IRAK,* in *Fachbereich Chemie.* 2000, Universität Hannover: Hannover.
203. Schmidt, A., E. Caron, and A. Hall, *Lipopolysaccharide-induced activation of beta2-integrin function in macrophages requires Irak kinase activity, p38 mitogen- activated protein kinase, and the Rap1 GTPase.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(2): p. 438-48.

Alignment der murinen und humanen IRAK-1

(mit DNASIS for Windows 2.5, Hitachi Software Engineering Co., Ltd)

mIRAK 1	MAGGPGPGEPVVPGAQHFLYEVPWVMCRFYKVMdalePADWCQFAALIV	50
hIRAK 1	MAGGPGPGEPAAPGAQHFLYEVPWVMCRFYKVMdalePADWCQFAALIV	50
51	RDQTELRLCERSEQR TAS VLWPWINRNARVADLVHIL THL QLLRARDI IT	100
51	RDQTELRLCER SGQR TASVLWPWINRNARVADLVHIL THL QLLRARDI IT	100
101	AWHPPAPVVP- PSTA APRP SSI SAGSEAGDWS SPR KLQ SSAST FLSPAFPG	150
101	AWHPPAPL- PS PG TT APRP SSI IPAPAEAEAW SPR KLP SSAST FLSPAFPG	150
151	SQTH SESEL-LQVPLP VS LG PPL SS AP S STK SS PES PV SGL QRAH PS PF	200
151	SQTH SGPELGL-V SP AS LW PP PS P AP S STK PG PES SV SL LQGAR PS PF	200
201	CWPFCEI SQGT CNF SE ELRIGEGGFGCVYRAVMR NTT YAVKRLKEEADLE	250
201	CWPLCEI SRG THNF SE ELKIGEGGFGCVYRAVMR NTV YAVKRLKENADLE	250
251	WT MV K QS F L TEVE QL SRFRHPNIVDFAGYCAES GLY CLVYG F L PNG S L ED	300
251	WT AV K QS F L TEVE QL SRFRHPNIVDFAGYCAQNGFYCLVYG F L PNG S L ED	300
301	QLHL QT QAC S PLSWPQR LD ILLG T ARAIQFLHQ D SP S LIHGDI K SS N VLL	350
301	RLHC QT QAC P PLSWPQR LD ILLG T ARAIQFLHQ D SP S LIHGDI K SS N VLL	350
351	DERLMPKLGDFGLAR F SRFAGAKA SQ S ST VART ST VRG T LAYLPEEY I KT	400
351	DERL T PKLGDFGLAR F SRFAG SS PS Q SS M VART Q T VR G T LAYLPEEY I KT	400
401	GRLAVD TD TF S FGVVILE T LAGQRAVR TQ GA TK YLKDLIEDEAE EAG VT	450
401	GRLAVD TD TF S FGVVLE T LAGQRAV KT HGART TK YLKDLVEEEAE EAG V A	450
451	LK ST Q P TLWVGVA TD AWAAP IA AQ IY KKHLD SR PGPCPP Q LGLAL AQ LAC	500
451	LR ST Q ST LQAGLAADAWAAP IA MQ IY KKHLD DR PGPCPP EL GLGL Q LAC	500
501	CCM H RAK R PP M TQVYK R LEGLQA---GPPWELE V AG H GS--P- S PQEN	550
501	CCL H RAK R PP M TQVYER L EKLQAVVAGVP H LEAA--- S CIP S PQEN	550
551	S Y M ST T GS A Q S GDEPW Q PLVV T TRAP--A--QAA Q L R S P N Q P V ES D ES	600
551	S Y V SS T GRA H SGA A P W Q P LA---AP S GA S AQ A E Q L R GP N Q P V E S D ES	600
601	VPGL S ATL H SWHL T PG S HP S -PAS F REAS T QGG T TRE SS VR S SPGF Q PT	650
601	LGGL S AAL R SWHL T P- S CPLDPAPLREAGCP Q GD T AGE SS W G SG P SR P T	650
651	T ME G S P T G SS- S LL S SE P P Q I I IN P AR Q K M V Q KLALY E EG V LD S L Q LL S S	700
651	AVEGLAL G SS A SS- S SE P P Q I I IN P AR Q K M V Q KLALY E D G ALD S L Q LL S S	700
701	GFF P GLDLE E PK S Q G PE E S D EF Q S.....	750
701	SSL P GLGLE Q DR- Q G P EE S D E F Q S.....	750

- Der in IRAK⁻ deletierte Bereich der IRAK-1 ist gelb unterlegt.
- Der Bereich der ProST (AS 101-211) ist grün, besonders phosphorylierungsrelevante Aminosäuren sind blau unterlegt.
- Serine und Threonine sind rot markiert.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefan Lienenklaus
Geburtsdatum, -ort: 06.03.1971 in Münster
Adresse: Karl-Kraut-Straße 3
30177 Hannover

Schulbildung

1977-1981 Grundschule (Pleisterschule Münster)
1981-1990 Gymnasium Wolbeck
5/1990 Abitur

Wehrdienst

7/1990-6/1991 Nachschubkompanie 190 in Ahlen

Hochschulstudium

7/1991-8/1997 Studium der Biochemie an der Universität Hannover mit dem Studienziel Diplom
14.10.1993 Vordiplom
2/1997-8/1997 Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie an der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. W. Bautsch
9.8.1997 Diplom
3/1998-12/2001 Dissertationsarbeit in der Abteilung Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Martin