

**Die Signaltransduktion durch den Interleukin-1  
Rezeptorkomplex:  
Funktion und Mechanismus der  
IL-1 Rezeptor Assoziierten Proteinkinase IRAK**

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

von

Dipl.Biochem. Johannes Knop  
geboren am 02. April 1971  
in Hannover

2000

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Korreferent: Prof. Dr. M. Martin

Tag der Promotion: 05.05.2000

Datum der Veröffentlichung: 05.06.2000

## Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IV</b>
<b>VORWORT.....</b>	<b>V</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Interleukin-1: Ein multifunktionelles proinflammatorisches Zytokin.....	1
1.2 Rezeptoren für Interleukin-1 .....	3
1.3 Die IL-1 Rezeptor/Toll Superfamilie .....	5
1.4 Intrazelluläre Signaltransduktionswege.....	7
1.5 Fragestellung.....	11
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>12</b>
2.1 Materialien, Geräte und Reagenzien .....	12
2.1.1 <i>Verwendete Geräte</i> .....	12
2.1.2 <i>Allgemein verwendete Materialien und Reagenzien</i> .....	12
2.1.3 <i>Puffer und Lösungen</i> .....	13
2.2 Zellkultur .....	15
2.2.1 <i>Passage von EL-4 und 293 Zellen</i> .....	15
2.2.2 <i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i> .....	15
2.3 Mikrobiologische Methoden.....	16
2.3.1 <i>Erzeugung kompetenter E.coli und Transformation</i> .....	16
2.3.2 <i>Plasmidpräparation aus E.coli</i> .....	17
2.4 Konstruktion von Expressionsplasmiden .....	17
2.4.1 <i>Klonierungsstrategie</i> .....	17
2.4.2 <i>Präparative PCR</i> .....	18
2.4.3 <i>Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung von DNA-Fragmenten</i> .....	19
2.4.4 <i>Klonierungstechniken</i> .....	20
2.4.5 <i>Sequenzierung</i> .....	21
2.5 Transfektion von eukaryotischen Zellen .....	22
2.5.1 <i>Transfektion durch Calciumphosphat-Präzipitation</i> .....	22
2.5.2 <i>DEAE-Dextran Transfektion</i> .....	23
2.5.3 <i>Verwendete Plasmide</i> .....	24
2.6 Reportergenassays .....	24
2.6.1 <i>Stimulation und Lyse von Zellen</i> .....	24
2.6.2 <i>Luciferaseassay</i> .....	25
2.6.3 <i>Proteinbestimmung nach Bradford</i> .....	25
2.7 Immunpräzipitation und Westernblot.....	25
2.7.1 <i>Verwendete Antikörper</i> .....	26
2.7.2 <i>Immunpräzipitation</i> .....	26
2.7.3 <i>SDS Polyacrylamidgelelektrophorese</i> .....	27
2.7.4 <i>Proteintransfer auf PVDF-Membranen</i> .....	27
2.7.5 <i>Immunfärbung</i> .....	28
2.8 Nachweis der IRAK Aktivierung.....	28
2.8.1 <i>Probenvorbereitung</i> .....	28
2.8.2 <i>in vitro Kinaseassay</i> .....	28
2.8.3 <i>Nachweis der IL-1 stimulierten Proteolyse von IRAK</i> .....	29

2.9	Nachweis der NFκB Translokation und Aktivierung.....	29
2.9.1	<i>Fraktionierung von cytosolischen und nukleären Proteinen.....</i>	29
2.9.2	<i>Nachweis von NFκB Untereinheiten im Westernblot.....</i>	30
2.9.3	<i>Gelretardationsanalyse (EMSA).....</i>	30
2.10	Nachweis der JNK Aktivierung.....	31
2.10.1	<i>Probenvorbereitung.....</i>	31
2.10.2	<i>JNK in vitro Kinaseassay.....</i>	32
2.11	IL-2 ELISA.....	32
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>33</b>
3.1	Charakterisierung der Testsysteme.....	33
3.1.1	<i>Aktivierung humaner IRAK in der Mauszelllinie EL-4.....</i>	33
3.1.2	<i>Transiente Expression cytosolischer Proteine in EL-4 Sublinien.....</i>	34
3.1.3	<i>Domänenstruktur von IRAK, Mutagenesestrategie.....</i>	35
3.2	IRAK Expression und Aktivierung von NFκB.....	38
3.2.1	<i>Einfluß der IRAK Expression auf die transaktivierende Aktivität von NFκB.....</i>	38
3.2.2	<i>Einfluß der IRAK Expression auf die Zusammensetzung und Translokation der NFκB Komplexe.....</i>	38
3.2.3	<i>Einfluß der IRAK Expression auf die Dosis- und Zeitabhängigkeit der NFκB Aktivierung....</i>	40
3.2.4	<i>IRAK Expression und Aktivierung der cJun N-terminalen Kinase (JNK).....</i>	41
3.3	Die Rolle der verschiedenen IRAK Domänen in der IL-1 Signaltransduktion.....	42
3.3.1	<i>Einfluß von IRAK-Fragmenten auf die IL-1 stimulierte NFκB Aktivierung.....</i>	42
3.3.2	<i>Einfluß kinaseinaktiver IRAK (K239S) auf die IL-1 Signaltransduktion.....</i>	44
3.4	Charakterisierung der Rolle und Spezifität der IRAK Autophosphorylierung.....	48
3.4.1	<i>IRAK Phosphorylierung und proteolytischer Abbau.....</i>	48
3.4.2	<i>Einfluß der Phosphorylierung auf die Interaktion mit MyD88 und TRAF6.....</i>	49
3.4.3	<i>IRAK Domänen als Substrat für IRAK.....</i>	51
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>55</b>
4.1	Bedeutung und hierarchische Stellung von IRAK in IL-1 stimulierten Signalwegen	55
4.2	Einfluß der IRAK Expression auf die IL-1 Signaltransduktion.....	59
4.3	Molekulare Mechanismen der frühen IL-1 Signaltransduktion.....	62
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>72</b>
	<b>ANHANG.....</b>	<b>83</b>

---

## Zusammenfassung

Interleukin-1 (IL-1) ist ein zentraler Mediator der proinflammatorischen Immunreaktion. IL-1 stimuliert auf Zielzellen die Bildung eines heterodimeren Rezeptorkomplexes, der intrazellulär die IL-1 Rezeptor Assoziierte Kinase (IRAK) über das Adaptermolekül MyD88 rekrutiert.

Untersuchungen mit IRAK Mutanten lieferten stichhaltige Hinweise, daß die Interaktion inaktiver IRAK mit MyD88 durch Heterodimerisierung der „Todesdomänen“ beider Moleküle vermittelt wird. Die nachgewiesene Fähigkeit von IRAK, über seine „Todesdomäne“ zu dimerisieren, stellt möglicherweise einen Mechanismus zur Kinaseaktivierung dar. Neben einer intramolekularen Phosphorylierung in der Kinasedomäne wurde eine multiple Phosphorylierung in der IRAK „Todesdomäne“ beobachtet, die zur Vergrößerung des apparenten Molekulargewichtes führt und mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Verlust der Interaktion mit MyD88 führt.

In transienten und stabil transfizierten Zellsystemen konnte erstmals nachgewiesen werden, daß IRAK entscheidend an zentralen IL-1 stimulierten Signalwegen, namentlich der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB und der cJun N-terminalen Kinasen (JNK), beteiligt ist. Für diese Funktion benötigt IRAK sowohl die N-terminale „Todesdomäne“ als auch den, bislang nicht näher charakterisierten, C-terminalen Bereich. Interessanterweise wirkt eine kinaseinaktive Mutante nicht als dominant negativer Inhibitor, sondern, vergleichbar mit der Wildtyp Form, als potenter Aktivator der IL-1 stimulierten Signalwege. Demnach scheint die Kinaseaktivität für die unmittelbare Signalweiterleitung nicht essentiell zu sein. Diese Hypothese wird durch den Nachweis gestützt, daß für die Interaktion von IRAK mit dem hierarchisch nachgeordneten Signalkoppler TRAF6 eine Phosphorylierung nicht zwingend erforderlich ist. Beobachtungen, daß IRAK Protein IL-1 abhängig durch Proteasom-abhängige Degradation reguliert wird, führten zur inzwischen bestätigten Vermutung, daß die Phosphorylierung ein Signal zur proteolytischen Deaktivierung darstellt. In Einklang damit konnte nachgewiesen werden, daß die IRAK Überexpression in IL-1 stimulierten Zellen zu einer verzögerten Deaktivierung der transienten NFκB und JNK Aktivität führt, ohne die Qualität des Signals zu verändern.

Zusammenfassend stellen diese Befunde IRAK als molekularen Adapter heraus, der über Proteinmenge und autokatalytische Aktivität die Länge des IL-1 Signals reguliert. Die Phosphorylierung von IRAK gibt das Signal zur Dissoziation vom Rezeptorkomplex und markiert das Protein zum Abbau am Proteasom.

**Schlagerworte:** Interleukin-1, Proteinkinase, Signaltransduktion

## Abstract

Interleukin-1 (IL-1) is a key mediator of the proinflammatory immune response. On the target cell, IL-1 stimulates the formation of a heterodimeric receptor complex which intracellularly recruits the IL-1 Receptor Associated Kinase (IRAK) via the adaptor molecule MyD88.

Mutational analysis of IRAK suggested that the interaction of unphosphorylated IRAK and MyD88 is mediated by the *death domains* present in both molecules. The observation that IRAK is able to homodimerize via its *death domain* indicated a probable mechanism for kinase activation triggered by IL-1. Besides an autophosphorylation in the kinase domain, a crossphosphorylation in the *death domain* of IRAK was ascertained. The latter phosphorylation event is associated with an increase in the molecular weight and may explain the inability of phosphorylated IRAK to interact with MyD88.

Transient and permanent overexpression of wild type and mutated versions of IRAK demonstrated the crucial role of this protein kinase for IL-1 stimulated signaling events, namely activation of the transcription factor NF $\kappa$ B or the cJun N-terminal kinase (JNK). Both, the N-terminal *death domain* and the C-terminal part of IRAK are required for this function. Interestingly, a kinase-inactive mutant of IRAK did not block, but enhanced IL-1 stimulated signaling events in a manner comparable to wild type IRAK, suggesting that the kinase activity of IRAK may not be essential for signal transduction. Accordingly, phosphorylation was dispensable for interaction of IRAK with its downstream adaptor TRAF6. IRAK is degraded by a proteasome dependent pathway following IL-1 stimulation. As published recently, this is a process strictly dependent on the phosphorylation of IRAK. So, autophosphorylation of IRAK may be a downregulatory signal. In good accordance with this hypothesis, cells overexpressing IRAK showed a delayed deactivation of transient IL-1 signaling events, namely NF $\kappa$ B and JNK activity.

In conclusion, IRAK seems to act as a self-limiting adaptor which regulates the kinetics of IL-1 signals. Autophosphorylation of IRAK gives the signal to leave the receptor complex and flags IRAK protein for proteasome dependent degradation.

**Key words:** Interleukin-1, protein kinase, signal transduction

## Vorwort

Jeder kann sich denken, daß eine Arbeit wie die vorliegende nicht im luftleeren Raum entsteht. So ist es guter Brauch, an vorderster Stelle einige Sätze über diejenigen zu verlieren, die auf verschiedene Art und Weise am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Ein erster Dank gilt Prof.Dr. K.Resch, der mir als Leiter des Instituts für Pharmakologie die Durchführung dieser Dissertation ermöglicht hat.

Zu besonderem Dank bin ich Prof. Dr. M. Martin verpflichtet, der diese Arbeit vorbildlich und engagiert betreut hat.

Prof. Dr. W. Müller danke ich für die Übernahme des Referats.

Bei meinen Kollegen C. Kollwe, S. Lienenklaus, Dr. D. Neumann, R. Schottmann, und C. Urban möchte ich mich für das gute Arbeitsklima und die bereitwillige Unterstützung in experimentellen Fragen bedanken. Dieses gilt natürlich auch für die ehemaligen Kollegen und die Mitglieder der anderen Arbeitsgruppen am Institut für Pharmakologie.

Für zahlreiche Reagenzien und Ratschläge bedanke ich mich bei Dr. D. Boraschi (Dompé, L'Aquila, Italien) Dr. Z. Cao (Tularik, San Francisco, USA), Prof. Dr. W. Falk (Medizinische Klinik I, Universität Regensburg) und Prof. Dr. B. Lüscher (Molekularbiologie, MHH). In diesem Zusammenhang gebührt Dr. H. Wesche (Tularik, San Francisco, USA) ein besonderes Dankeschön für seine Unterstützung mit Reagenzien und vielen hilfreichen Anregungen.

Bei A. Garbe und Dr. H. Dulat muß ich mich schließlich dafür bedanken, daß sie mich höflich, aber bestimmt auf manche Unzulänglichkeit in Rechtschreibung und Satzbau aufmerksam gemacht haben.

Am Ende, aber nicht zum Schluß, ein Wort an jene, die im Grunde Schuld daran sind, daß es überhaupt so weit gekommen ist. An meine Eltern, an meine Geschwister und meine langjährigen Freunde: Danke.

## Abkürzungsverzeichnis

AP	Aktivierendes Protein
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
CIAP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm ( <i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> )
CKII	Caseinkinase Typ II
CMV	Cytomegalo Virus
COX-2	Cyclooxygenase-2
CSF	Kolonie stimulierender Faktor ( <i>colony stimulating factor</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (cDNA: <i>copy DNA</i> )
dNTP's	Äquimolares Gemisch der Nukleotide dATP, dTTP, dGTP und dCTP
dpm	Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
ECL	Verstärkte Chemolumineszenz ( <i>enhanced chemolumineszenz</i> )
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunsorptionsassay ( <i>enzyme linked immuno sorbent assay</i> )
EMSA	Gelretardationsassay ( <i>electromobility shift assay</i> )
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FLAG	Synthetisches Oktapeptid, Epitop-Tag
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin ( <i>influenza virus</i> ) Epitop-Tag
HBS	Hepes gepufferte Salzlösung ( <i>Hepes Buffered Saline</i> )
Hepes	4-(2-Hydroxymethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	Peroxidase aus Meerrettich ( <i>horseradish peroxidase</i> )
ICE	Interleukin-1 $\beta$ konvertierendes Enzym ( <i>IL-1<math>\beta</math> converting enzyme</i> )
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	I $\kappa$ B Kinase
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor (IL-1RI: Typ I IL-1R, IL-1RII: Typ II IL-1R)
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IL-1RAcP	Interleukin-1 Rezeptor Akzessorisches Protein
IL-1Rrp	IL-1 <i>receptor related protein</i>
IP	Immunpräzipitation
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Proteinkinase (hIRAK: humane IRAK)
I $\kappa$ B	Inhibitor $\kappa$ B
JNK	cJun N-terminale Kinase

---

kbp	Kilo-Basenpaare ( <i>kilo base pairs</i> )
kDa	Kilo-Dalton ( <i>kilo Dalton</i> )
LB	Luria-Bertani Medium
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBP	<i>myelin basic protein</i>
NFκB	Kernfaktor κB ( <i>nuclear factor κB</i> )
NIK	NFκB induzierende Kinase
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOS	NO-Synthase, iNOS: induzierbare NO-Synthase
OD	Einheit optischer Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>DNA polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglycol
PI3-K	Phosphoinositid-3 Kinase
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RLU	Relative Lichteinheiten ( <i>relative light units</i> )
RNA	Ribonukleinsäure (mRNA: <i>messenger RNA</i> )
RT	Raumtemperatur
SAPK	Streß-aktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sIL-1R	Löslicher IL-1 Rezeptor
SMase	Sphingomyelinase
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung ( <i>Tris Buffered Saline</i> )
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20( <i>Tris Buffered Saline/Tween20</i> )
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor Homologiedomäne
TLR	Tollartiger Rezeptor ( <i>Toll like receptor</i> )
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF Rezeptor assoziierter Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transformations- und Lagerungslösung ( <i>Transformation and storage solution</i> )
UpM	Umdrehungen pro Minute

# 1 Einleitung

Mechanismen der angeborenen Immunität ermöglichen dem Organismus, schnell und effizient auf Infektionen zu reagieren. Entweder werden Pathogene direkt beseitigt oder ihre Ausbreitung wird eingedämmt und eine adaptive Immunantwort eingeleitet. Eindringende Erreger aktivieren Gewebsmakrophagen durch invariable Oberflächenstrukturen, wie etwa LPS (Lipopolysaccharid, Endotoxin). In der Regel folgt eine Entzündungsreaktion, die maßgeblich durch die Produktion und Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 (IL-1, [1]) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) geprägt wird.

## 1.1 Interleukin-1: Ein multifunktionelles proinflammatorisches Zytokin.

Zunächst als Kostimulus für T-Zellen beschrieben [2], wurde Interleukin-1 über beinahe 30 Jahre intensiver Forschung als zentraler Mediator bei der Auslösung und Modulation von Entzündungs- und anderen Immunreaktionen etabliert.

### *Die Interleukin-1 Genfamilie*

Die IL-1 Genfamilie besteht aus drei Genen, die im Menschen auf Chromosom 2 lokalisiert sind [3] und für IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-1Ra kodieren. Diese drei Zytokine besitzen trotz geringer Sequenzhomologie ähnliche Proteinstrukturen. (Übersicht in [4]).

IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sind biologische Agonisten, die über die gleichen Rezeptoren wirken und nur geringe Spezifität aufweisen. Beide werden als 31 kDa Vorläuferformen ohne *leader*-Peptid synthetisiert [5, 6]. ProIL-1 $\alpha$  verbleibt weitgehend im Zytoplasma und gelangt nur bei massiver Zellschädigung in den Extrazellulärbereich [7]. Ein Teil wird nach Myristinylierung in der Zellmembran verankert [8, 9] und kann nach Prozessierung durch die Membranprotease Calpain als 17 kDa Form freigesetzt werden [10, 11]. Während sowohl ProIL-1 $\alpha$  als auch „reifes“ IL-1 $\alpha$  biologisch aktiv sind (Übersicht in [12]), entfaltet IL-1 $\beta$  seine Aktivität erst nach Prozessierung der Vorform [13] durch die Cystein-Protease *interleukin-1 $\beta$  converting enzyme* (ICE [14, 15]) und Freisetzung in die Zirkulation. Da IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sich in ihrer biologischen Wirksamkeit praktisch nicht unterscheiden, werden sie im Folgenden als „IL-1“ zusammengefaßt.

IL-1Ra ist ein echter, biologischer Rezeptorantagonist, der an IL-1 Rezeptoren bindet, ohne Signale auszulösen (Übersicht in [16]). IL-1Ra wird mit *leader*-Peptid synthetisiert [17, 18] und in der Regel als glycosyliertes 22 kDa Molekül sezerniert [19].

### ***Biologische Wirkungen von Interleukin-1***

Die Synthese und Freisetzung von IL-1 erfolgt hauptsächlich durch aktivierte Monozyten/Makrophagen, kann aber auch in vielen anderen Gewebs- und zirkulierenden Immunzellen induziert werden. Neben Pathogenbestandteilen sind körpereigene Faktoren, die an der Immunreaktion beteiligt sind, potente Induktoren für IL-1, z.B. Immunkomplexe, Gerinnungs- und Komplementfaktoren, IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  und IL-1 selbst (Übersicht in [20]). IL-1 kann auf fast jeden Zelltyp im Organismus wirken. Seine vielfältigen, lokalen, zentralen und hämatopoetischen Wirkungen dienen der Anpassung des Organismus an die Erfordernisse einer konzertierten Infektionsabwehr. Eine Übersicht ist in Tab. 1 wiedergegeben.

<b>Aspekte der direkten und indirekten Wirkungen von IL-1</b>
<p><b>Immunmodulation</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kostimulus für Wachstum und Aktivierung von T-Zellen</li> <li>• Antikörperproduktion von B-Zellen</li> <li>• Chemotaxis und Aktivierung von Leukozyten, Neutrophilen Granulozyten</li> </ul> <p><b>Metabolische Effekte</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteolyse im Muskel</li> <li>• Synthese von Akut-Phase Proteinen in der Leber</li> <li>• Verminderte Synthese von Albumin, Cytochrom p450 und Matrixproteinen</li> <li>• Knorpel- und Knochenkatabolismus</li> </ul> <p><b>Gefäßsystem</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verminderter Gefäßwiderstand</li> <li>• Erhöhte Gefäßpermeabilität</li> <li>• Induktion von Adhäsionsmolekülen auf Gefäßendothel, gesteigerte Leukozytenadhäsion</li> </ul> <p><b>Zentralnervöse Effekte</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fieber</li> <li>• Verminderter Appetit, Gewichtsverlust</li> </ul> <p><b>Lokale Effekte</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Produktion proinflammatorischer Zytokine</li> <li>• Induktion von Wachstumsfaktoren</li> <li>• Induktion und Freisetzung von Kollagenasen, Proteasen und Hyaluronidasen</li> <li>• Produktion von Arachidonsäuremetaboliten</li> </ul> <p><b>Blutgerinnung, Wundheilung</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wachstum, Aktivierung von Fibroblasten und Keratinozyten</li> <li>• Induktion von Fibrinogen und anderen Gerinnungsfaktoren</li> <li>• Enzymsynthese für den Gewebeumbau (<i>tissue remodeling</i>)</li> </ul> <p><b>Hämatopoetische Effekte</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Induktion von Kolonie-stimulierenden Faktoren und anderen Wachstumsfaktoren im Knochenmark</li> <li>• Reifung hämatopoetischer Vorläuferzellen, Einfluß auf die Lymphozytenreifung</li> </ul>

Tab. 1: Biologische Wirkungen von IL-1 (modifiziert nach [20, 21])

Lokale Wirkungen von IL-1 zielen auf die Rekrutierung und Aktivierung von immun-kompetenten Zellen. Neben direkten chemotaktischen Wirkungen induziert IL-1 Chemokine, wie IL-8 [22]. Expression von Adhäsionsmolekülen auf Gefäßendothel [23] ermöglicht die Anhaftung von Leukozyten [24]. IL-1 stimulierte Freisetzung von Proteasen, Kollagenasen und Hyaluronidasen fördert die Gefäß- und Gewebeporosität und damit die Infiltration der Leukozyten. Eine Beteiligung an der Wundheilung durch mitogene Wirkung auf Fibroblasten [25] und Induktion der Fibrinogensynthese wurde ebenfalls beschrieben.

Viele biologische Wirkungen von IL-1 beruhen auf der verstärkten Synthese und Freisetzung von Cytokinen (z.B. IL-6) und potenten, proinflammatorischen Mediatoren, wie Leukotrienen, Prostaglandinen und NO. Diese werden durch spezialisierte Enzyme, Cyclooxygenase-2 (COX-2), Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) und NO-Synthase (iNOS) gebildet, welche wiederum von IL-1 induziert werden können (Übersicht in [20]). Erhöhte Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) Freisetzung wird zum Beispiel mit der Auslösung von Fieber [26] und Induktion der Proteolyse im Muskel [27] in Zusammenhang gebracht. Letztere dient der Bereitstellung von Aminosäuren für die IL-6 induzierte Synthese von Akut-Phase Proteinen in der Leber [28].

IL-1 unterstützt Wachstum und Aktivierung von T-Zellen, unter anderem durch Induktion von IL-2 und des IL-2 Rezeptors (Übersicht in [29]). B-Zellen werden zu verstärkter Antikörperproduktion veranlaßt [30]. Ein Beispiel für hämatopoetische Wirkungen von IL-1 ist die Induktion von Stammzell- und Wachstumsfaktoren (*colony stimulating factors*, CSF's) [31]. Dadurch wird die Reifung von Leukozytenvorläufern im Knochenmark gefördert, die als Nachschub für eine Immunreaktion zur Verfügung stehen [32].

Die gleichen Mechanismen, mit denen IL-1 die physiologische Infektionsabwehr fördert, können im Fall der Fehlregulation zu schwersten Gewebeschäden, im Fall der Sepsis sogar zum Tode führen. So ist IL-1 an der Pathogenese vieler chronisch-entzündlicher und Autoimmunerkrankungen beteiligt. Ein gut dokumentiertes Beispiel ist die rheumatoide Arthritis [33, 34]. Die Aufklärung von Mechanismen, über die IL-1 seine physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen ausübt, ist daher von großem pharmakologischen Interesse.

## 1.2 Rezeptoren für Interleukin-1

Die Interleukin-1 Rezeptorfamilie umfaßt drei glycosylierte Typ I Transmembranproteine, die aufgrund ihrer drei extrazellulären, immunglobulinartigen Domänen der Immunglobulin-gen (Ig) Superfamilie zugeordnet werden (siehe Abb. 1).

### ***IL-1 Rezeptor Typ I, Typ II und IL-1 Rezeptor Akzessorisches Protein***

1985 wurde der signaltransduzierende Rezeptor für IL-1 identifiziert [35]. Dieser IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1RI) besitzt neben den extrazellulären Ig-artigen Domänen eine Transmembranregion (21 AS) und einen 217 AS langen Intrazellulärteil [36]. Er weist extrazellulär 28% Aminosäurehomologie zu einem weiteren, dem Typ II IL-1 Rezeptor, auf [37]. IL-1RII besitzt nur einen kurzen, cytoplasmatischen Rest von 29 AS und ist daher nicht in der Lage, IL-1 Signale auszulösen [38]. Ihm wird die Funktion eines Ligandenfängers zugeschrieben [39], der mit dem Typ I Rezeptor um den Liganden kompetiert. Beide Rezeptoren können sowohl IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  als auch den IL-1Ra binden. In Übereinstimmung mit der biologischen Funktion besitzt IL-1RII eine Präferenz für IL-1 $\beta$ , während der Typ I Rezeptor bevorzugt IL-1 $\alpha$  und IL-1Ra bindet (Übersicht in [40]).

Lösliche Formen der Rezeptoren (sIL-1RI bzw. sIL-1RII) entstehen durch proteolytische Abspaltung (*shedding*) des Extrazellulärteiles durch membranständige Metalloproteasen [41]. Die löslichen Rezeptoren binden IL-1, ohne jedoch Signale auszulösen, da die cytoplasmatische Domäne des IL-1RI für die Signalweiterleitung essentiell ist [42].

Das dritte Mitglied der IL-1 Rezeptorfamilie ist das IL-1 Rezeptor Akzessorische Protein (IL-1RAcP [43]). Es besitzt extra- und intrazelluläre Homologien zum Typ I Rezeptor, ist jedoch nicht in der Lage, selbst IL-1 zu binden. Als echter Korezeptor bildet IL-1RAcP Heterodimere mit ligandenbesetztem IL-1RI. Die Ausbildung des Komplexes ändert die Bindungseigenschaften für IL-1, ob dieses jedoch auf einer erhöhten Affinität [43] oder einer veränderten Assoziations-/Dissoziationsrate [44] beruht, wird kontrovers diskutiert. Unstrittig ist jedoch, daß das IL-1RI/IL-1RAcP Heterodimer essentiell für die Auslösung von Signalen durch IL-1 ist [45, 46]. In einigen Geweben läßt sich mRNA nachweisen, die für lösliches IL-1RAcP (sIL-1RAcP) kodiert und wahrscheinlich durch alternatives *Splicing* entsteht [43]. Die Funktion dieses Moleküls ist jedoch bisher ungeklärt.

### ***Regulation des Interleukin-1/IL-1 Rezeptor Systems***

Die Empfindlichkeit, mit der Zielzellen bereits auf geringste Mengen IL-1 reagieren, erfordert eine genaue Kontrolle des IL-1/IL-1Rezeptor Systems. Die Ausbildung des signaltransduzierenden Rezeptorkomplexes wird daher auf mehreren Ebenen durch das Zusammenspiel agonistischer und antagonistischer Komponenten reguliert.

In Entzündungssituationen wird überwiegend IL-1 $\beta$  ausgeschüttet. Mit leichter zeitlicher Verzögerung folgt die Sezernierung von IL-1Ra, der mit dem Agonisten um Bindungsplätze

konkurriert. Während IL-1 $\beta$  mit zwei Kontaktflächen des IL-1RI interagiert, bindet der Rezeptorantagonist nur an eine dieser Regionen [47]. Röntgenstrukturanalysen legen nahe, daß dadurch die Ausbildung eines funktionellen Rezeptorkomplexes mit dem Korezeptor verhindert wird [48, 49]. Das Verhältnis der Expression von Typ I und Typ II Rezeptoren bestimmt maßgeblich die Responsivität von Zellen [50, 51]. IL-1RII bindet hochaffin IL-1 $\beta$  und maskiert es für den signaltransduzierenden IL-1RI. Darüber hinaus kann ligierter Typ II Rezeptor einen nicht-funktionellen Komplex mit IL-1RAcP bilden [52, 53]. Diese sogenannte Korezeptor-Kompetition ermöglicht eine inhibitorische Wirkung selbst bei sehr hohen IL-1 Konzentrationen. In Krankheitsbildern wie der Sepsis findet man erhöhte Level des löslichen Typ II Rezeptors in der Zirkulation [54]. sIL-1RII kann zwar nicht mehr um den Korezeptor kompetieren [55], bindet und maskiert jedoch nach wie vor IL-1 $\beta$ .

### 1.3 Die IL-1 Rezeptor/Toll Superfamilie

Intrazelluläre Homologien zwischen IL-1 Rezeptor Typ I und dem *Drosophila* Morphogenrezeptor Toll zeigen, daß es sich um ein phylogenetisch konserviertes Motiv handelt [56]. Diese als Toll/IL-1R (TIR) bezeichnete Domäne findet sich in verschiedenen Säugerproteinen der Ig Superfamilie und in Toll Homologen (TLRs, *toll like receptors*), die extrazellulär über leucinreiche Wiederholungsmuster (*leucine rich repeats*) verfügen (siehe Abb. 1). Selbst cytosolische Proteine aus Pflanzen und Säugern, wie der myeloide Differenzierungsfaktor MyD88 [57, 58], zählen zu den TIR Homologen. Einem Teil dieser Proteine konnte jedoch bisher kein Ligand zugeordnet werden. Dazu gehören Fit1 der Ratte bzw. seine Homologen in Maus und Mensch (ST2 bzw. T1 [59] oder IL-1Rrp2 (*IL-1 Receptor related protein 2* [60])).

#### ***Das Interleukin-18 System***

IL-1Rrp („*IL-1 Receptor related protein*“ [62]) wurde aufgrund seiner Homologien zum IL-1R identifiziert und stellte sich kürzlich als Rezeptor für Interleukin-18 (IL-18) heraus [63]. IL-18 wurde zunächst als IGIF (*Interferon- $\gamma$  inducing factor* [64]) beschrieben und ist ein proinflammatorisches Zytokin, das sowohl strukturelle, als auch biologische Ähnlichkeit zu IL-1 aufweist [65, 66]. So wird es ebenfalls von monozytären Zellen als inaktive Vorform synthetisiert und durch ICE prozessiert [67]. IL-18 spielt eine wichtige Rolle in der Th1 Immunantwort, hauptsächlich durch die IFN- $\gamma$  induzierende Wirkung, die es synergistisch mit Interleukin-12 auf T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen ausübt (Übersicht in [68, 69]). Wie im IL-1 System benötigt IL-1Rrp eine zweite Rezeptorkette, um IL-18 Signale ins

Zellinnere weiterleiten zu können. Dieser Korezeptor wurde aufgrund seiner Homologie zum IL-1RAcP „*Accessory protein like*“ (AcPL [70]) genannt.

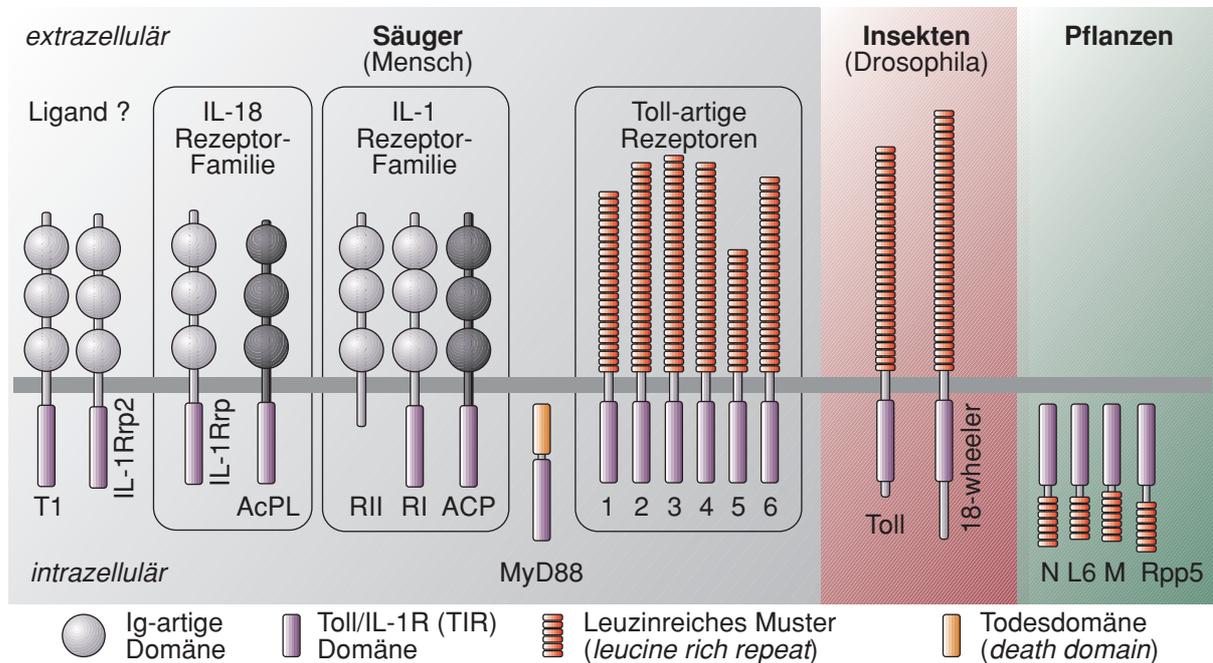


Abb. 1: Die IL-1R/Toll Superfamilie (modifiziert nach [61])

### ***Toll-artige Rezeptoren***

*Drosophila* Toll wurde als Rezeptor identifiziert, der nach Bindung des Peptidliganden Spaetzle [71] die dorsoventrale Polarisierung des Embryo reguliert [72]. In der adulten Fliege sind Toll und der homologe Rezeptor *18-Wheeler* an der Immunreaktion beteiligt [73, 74]. Homologe Pflanzenproteine, wie N, L6, M und Rpp5, werden mit der Resistenzbildung gegen spezifische Pathogene in Verbindung gebracht [75].

In der Literatur sind bislang 6 humane Toll-artige Rezeptoren beschrieben worden (hTLR1–6, *human Toll like receptors* [76-78]). Schnell fanden sich strukturelle und funktionelle Hinweise, daß es sich um Rezeptorsysteme der angeborenen Immunität handeln könnte [77]. Tatsächlich wurde für einige Vertreter gezeigt, daß sie an der Responsivität gegenüber invariablen Bakterienbestandteilen beteiligt sind. Mäuse, die keinen funktionellen TLR4 exprimieren, reagieren nicht auf LPS, einen Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien [79, 80]. In humanen Zellkultursystemen kann LPS-Responsivität auch durch Expression von TLR2 erzeugt werden [81, 82]. *In vivo* scheint TLR2 eher Reaktivität gegen gram-positive Erreger zu vermitteln, da *knockout* Mäuse weiterhin auf LPS, nicht mehr jedoch auf Peptidoglycan oder Lipoprotein reagieren [83]. Inzwischen unterstützen eine

Reihe von *in vitro* Untersuchungen diese These [84-88]. Abb. 1 gibt einen Überblick über einige Vertreter der Toll/IL-1 Rezeptorfamilie.

#### 1.4 Intrazelluläre Signaltransduktionswege

IL-1 erreicht eine Vielzahl seiner biologischen Effekte über die Modulation des biosynthetischen Profils von Zielzellen. Faktoren der *immediate early response* Genfamilie, Elk-1, NF-IL6, AP-1 und NF $\kappa$ B regulieren dabei die Aktivität inflammatorischer Gene für Cytokine (IL-6, IL-2), Cytokinrezeptoren (IL-2R), Chemokine (IL-8), Adhäsionsmoleküle, iNOS und Enzyme des Lipidmetabolismus (PLA<sub>2</sub>, COX-2, Übersicht in [89]).

##### **Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF $\kappa$ B**

Die beiden wichtigsten und am besten untersuchten IL-1 aktivierbaren Transkriptionsfaktoren sind AP-1 (*Activator protein-1*) und NF $\kappa$ B (*Nuclear factor  $\kappa$ B*). Die Aktivität dieser Proteine wird über cytosolische Kinasekaskaden reguliert.

AP-1 beschreibt eine Gruppe von DNA-bindenden Heterodimeren aus Untereinheiten der *jun* und *fos* Genfamilie [90, 91]. Die transkriptionelle Aktivität von AP-1 wird über Phosphorylierung der Untereinheiten durch Mitglieder der MAP-Kinasen (MAPK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase) reguliert. Diese lassen sich in drei Gruppen unterteilen. ERK's (extrazellulär regulierte Kinasen), werden vorwiegend durch mitogene Stimuli wie Wachstumsfaktoren aktiviert. JNK (c-Jun N-terminale Kinasen) und p38 MAP-Kinasen spielen auch bei der Streßantwort auf UV-Strahlung oder osmotischen Schock eine wichtige Rolle. Die mehrstufigen MAP-Kinasekaskaden werden über kleine G-Proteine aktiviert. Ser/Thr-spezifische MAP3K phosphorylieren MAP2K („Kinase-Kinasen“), die dann ERK, JNK und p38 durch Phosphorylierung an spezifischen Tyrosin- und Threoninresten aktivieren (Übersicht in [92]). IL-1 kann Mitglieder aller drei MAP-Kinase Familien aktivieren (Übersicht in [89]). Eine kritische Rolle für die AP-1 Genregulation wird der Aktivierung der Stress-aktivierten Proteinkinase JNK und p38 zugeschrieben. Diese phosphorylieren AP-1 Komponenten, wie c-Jun und ATF-2, und induzieren die Expression von *jun* und *fos* Genen (Übersicht in [93]). Obwohl es eine Reihe von Hinweisen gibt, daß IL-1 kleine G-Proteine aktiviert, läßt sich die physiologische Relevanz dieser Beobachtungen bisher nicht abschließend klären (Übersicht in [61, 94]).

NF $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor der *rel* Genfamilie und liegt vorwiegend als Dimer aus DNA-bindenden p50 und transaktivierenden p65 Untereinheiten vor. In ruhenden Zellen ist NF $\kappa$ B im Cytosol mit der inhibitorischen Komponente I $\kappa$ B komplexiert, die das nukleäre Translokationssignal maskiert (Übersicht in [95]). Aktivierung durch IL-1 führt zur Phospho-

rylierung von I $\kappa$ B an zwei spezifischen Serinresten, gefolgt von Polyubiquitinylierung und Abbau am Proteasom (Übersicht in [96, 97]). Freierwerdende NF $\kappa$ B Dimere können in den Kern translozieren und dort an ihre Zielsequenzen binden.

Kürzlich stellte sich heraus, daß für diesen Prozeß ein Multiproteinkomplex verantwortlich ist. Der IKK (I $\kappa$ B Kinase) Komplex enthält zwei Kinasen, IKK- $\alpha$  und - $\beta$ , die I $\kappa$ B phosphorylieren [98-100]. Eine weitere Untereinheit, NEMO (NF $\kappa$ B essentieller Modulator [103] bzw. IKK- $\gamma$  im Menschen [102]), ist an der koordinierten Aktivierung des IKK-Komplexes beteiligt. In der Literatur werden verschiedene Kinasen als direkte Aktivatoren der IKKs diskutiert. Ein Beispiel ist die MAP3K verwandte Kinase NIK (NF $\kappa$ B induzierende Kinase [104]), die *in vitro* mit den IKK's assoziiert [100, 105].

### ***Weitere Signalwege***

Eine Vielzahl weiterer IL-1 stimulierbarer Signalwege ist beschrieben worden (Übersicht in [20, 89]). Die  $\alpha$ -Caseinkinase CKII bindet nach IL-1 Stimulation an NF $\kappa$ B und phosphoryliert die p65 Untereinheit *in vitro* [106]. CKII wird daher als potentieller Regulator der NF $\kappa$ B Aktivität diskutiert. Weiterhin wurde eine  $\beta$ -Caseinkinase nachgewiesen, die ausschließlich in IL-1 oder TNF stimulierten Zellen aktiviert wird [107]. Der Stellenwert dieser, als TIP bezeichneten, Kinase für die Biologie von IL-1 ist allerdings bislang unklar.

Eine Reihe von spezialisierten Enzymen des Lipidmetabolismus katalysieren die Bildung von Phospholipiden, die als *second messenger* dienen können. Sphingomyelinasen (SMasen) bilden Ceramid, welches mit der Regulation von NF $\kappa$ B in Zusammenhang gebracht wird [108]. In IL-1 stimulierten Zellen läßt sich die Aktivierung sowohl der sauren, als auch der neutralen SMase nachweisen (Übersicht in [109, 110]). Interessanterweise scheint die Aktivierung der neutralen SMase unabhängig von der IL-1RAcP Expression zu sein [111].

PI3-Kinasen (PI3-K) werden von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren aktiviert und mit der JNK/SAPK abhängigen AP-1 Regulation in Verbindung gebracht [112, 113]. Die physiologischen Wirkungen von PI3-K sind vielfältig, da sie neben einer Lipidkinaseaktivität, die zur Bildung biologisch aktiver Phosphatidylinositol-Phosphate führt, über Proteinkinaseaktivität verfügen können. Es wurde gezeigt, daß PI3-Kinase IL-1 abhängig an die TIR Domäne des IL-1Rezeptors bindet und die NF $\kappa$ B Aktivierung beeinflusst [114, 115].

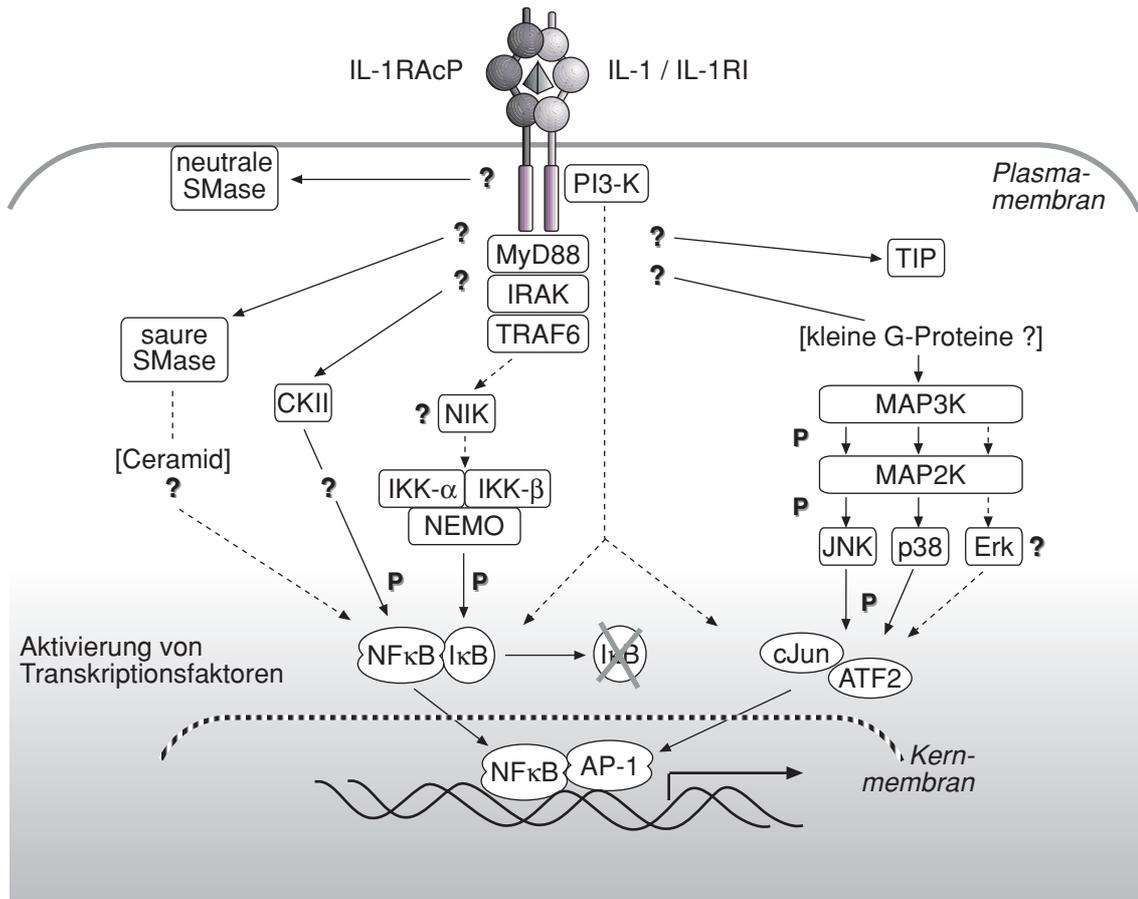


Abb. 2: IL-1 Signalwege. Fragezeichen deuten auf unbekannte Kopplungsmechanismen, gestrichelte Linien auf unvollständig definierte Signalwege hin. „P“ zeigt Phosphorylierungsereignisse an.

### Rezeptornahe Signalkoppler

Die Aktivierung der beschriebenen Signalkaskaden durch den IL-1 Rezeptorkomplex erfordert zusätzliche Proteine, da weder IL-1RI noch IL-1RAcP über intrazelluläre Enzymaktivität verfügen. Hinweise auf mögliche Kopplungsmechanismen lieferte die *Drosophila* Toll Signaltransduktion. Toll aktiviert den NFκB homologen Faktor Dorsal, dessen Aktivität von einer inhibitorischen Komponente, dem IκB Homolog Cactus, reguliert wird (Übersicht in [116]). Durch genetische Studien wurden die essentiellen Signalkoppler Tube [117] und Pelle [118] identifiziert. Pelle ist eine Serin/Threoninkinase, Tube ein Adapterprotein, das für die Rekrutierung von Pelle benötigt wird [119, 120].

Mit dem IL-1 Rezeptor läßt sich ebenfalls nach kurzer IL-1 Stimulation eine Serin/Threonin-spezifische Kinaseaktivität kopräzipitieren [121]. Die Klonierung dieser 80 kDa großen „Interleukin-1 Rezeptor assoziierten Kinase“ (IRAK) zeigte, daß sie deutliche Homologien zu Pelle aufweist [122, 123]. Für die Rekrutierung von IRAK an den IL-1 Rezeptor sind spezifische, hochkonservierte Bereiche in der TIR notwendig, die auch für die IL-1 stimulierte NFκB Aktivität essentiell sind [124, 125]. Aktivierung am Rezeptorkomplex führt zur

Autophosphorylierung von IRAK und einer Vergrößerung des apparenten Molekulargewichtes auf etwa 100 kDa [122].

TRAF6, ein Protein aus der Familie der TNF-Rezeptor assoziierten Faktoren, bindet nach IL-1 Stimulation an IRAK, findet sich jedoch nicht in Rezeptorimmunpräzipitaten [126]. MyD88 wurde als weiteres Molekül identifiziert, das mit dem aktivierten Rezeptorkomplex kopräzipitiert [128]. Dieses Molekül ist zunächst als Differenzierungsmarker beschrieben worden und besitzt eine C-terminale TIR und eine N-terminale „Todesdomäne“ (*death domain*, siehe Abb. 1 [129, 130]). MyD88 kann IRAK in den Rezeptorkomplex rekrutieren und spielt damit eine ähnliche Rolle wie Tube im *Drosophila* Toll System. Durch Überexpressionsstudien mit dominant negativen Konstrukten wurde die Beteiligung von TRAF6 und MyD88 an der IL-1 stimulierten NF $\kappa$ B Aktivierung nachgewiesen und gezeigt, daß in dieser Signalkaskade IRAK hierarchisch zwischen MyD88 und TRAF6 agiert [126-128, 131]. Die Rolle von IRAK innerhalb dieser Gruppe und die molekularen Mechanismen, mit denen der IL-1 Rezeptorkomplex Signale über MyD88 und IRAK an TRAF6 weiterleitet, sind dagegen nur unvollständig geklärt. Einen Überblick über die beschriebenen IL-1 Signalwege zeigt Abb. 2.

Die Parallelen zwischen phylogenetisch so weit entfernten Systemen, wie dem IL-1 Rezeptor und *Drosophila* Toll, legen die Vermutung nahe, daß auch andere homologe Systeme auf ähnliche Signaltransduktionsmechanismen zurückgreifen. Tatsächlich mehren sich in jüngster Zeit Berichte, daß sowohl das IL-18 Rezeptorsystem [132-134] als auch TLRs [81, 135-137] Signale via MyD88/IRAK/TRAF6 übertragen können.

## 1.5 Fragestellung

Die initialen Signaltransduktionsprozesse, die durch den Interleukin-1 Rezeptorkomplex ausgelöst werden, sind von großem pharmakologischen Interesse. IRAK wird IL-1 spezifisch über das Adaptermolekül MyD88 in den Rezeptorkomplex rekrutiert und stellt somit die einzige bekannte Enzymaktivität dar, die exklusiv von Rezeptoren der IL-1R/Toll Familie aktiviert wird. Weder die Rolle von IRAK in den Signalwegen, die für die IL-1 induzierte Genregulation verantwortlich sind, noch die molekularen Mechanismen, über die IRAK rekrutiert, als Kinase aktiviert und wieder deaktiviert wird, sind bisher genauer charakterisiert worden. Insbesondere die Bedeutung der Kinaseaktivität und Autophosphorylierung von IRAK sind bislang völlig unklar.

Die vorliegende Arbeit verfolgt daher zwei Ziele.

Durch Untersuchung stabil transfizierter Zelllinien soll der Einfluß der IRAK Expression auf essentielle IL-1 Signalwege funktionell und biochemisch charakterisiert werden.

In Mutagenesestudien sollen Hinweise auf Struktur-/Funktionsbeziehungen des IRAK Moleküls erarbeitet werden. Besonderes Augenmerk gilt dabei der IL-1 stimulierten Kinaseaktivität und der resultierenden Phosphorylierung des IRAK Moleküls. Weiterhin soll die Bedeutung einzelner Molekülbereiche für die funktionelle Kopplung von IRAK an seine Interaktionspartner untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien, Geräte und Reagenzien

#### 2.1.1 *Verwendete Geräte*

Brutschrank (Zellkultur)	Brutschrank CO <sub>2</sub> Autozero, Heraeus (Hanau)
Geltrockner	GSD4, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
	Maxidry D64, Biometra (Göttingen)
Kühlzentrifugen	RC2B, Sorvall (Bad Homburg)
	3K20 und 6K10, Sigma (Osterode, Harz)
Mikrotiterplatten-Photometer	MR 6500, Dynatech (Denkendorf)
Phosphoimager	GS 250, Bio-Rad (München)
Spektralphotometer	UV-160A, Shimadzu (Hannover)
Sterilwerkbank	LaminAir HB2472, Heraeus (Hanau)
Thermocycler	VarioV, Landgraf (Hannover)
Thermostat	5320 und 5346, Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	Biofuge pico, Heraeus (Osterode, Harz)
UV Transilluminator	GelDoc System, Bio-Rad (München)
Zellzentrifuge	RT 6000, DuPont (Bad Homburg)
Durchflußcytometer	FACScan, Becton Dickinson (Heidelberg)
Luminometer	Lumat LB9507, EG&G Berthold (Bad Wildbad)
Elektrophoresekammern	Bio-Rad (München)
Sequenzierautomat	ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer (Weiterstadt)
Blotapparatur	Semidry Blotter, Schleicher&Schuell (Dassel)
β-Szintillationszähler	Wallac 1410, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

#### 2.1.2 *Allgemein verwendete Materialien und Reagenzien*

Steriles Kunststoffmaterial für Zell- und Bakterienkultur	Nunc (Wiesbaden), Falcon (BD, Heidelberg)
Einweg Labormaterialien	Sarstedt (Nümbrecht)
Röntgenfilme	BIOMAX MR, Eastman Kodak (New York, USA)
Feinchemikalien, Biochemica	Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Biomol (Hamburg)
Lösemittel	Mallinckrodt Baker (Griesheim), Merck (Darmstadt)
DNA modifizierende Enzyme	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Radioaktive Verbindungen	NEN Life Sciences (Frankfurt a.M.)
Zellkulturmedien und Zusätze	GibcoBRL (Eggenstein)
Bakteriologische Medienbestandteile	Difco (BD, Heidelberg)
Oligonukleotide, HPLC gereinigt	MWG-Biotech (Ebersberg)
DNA Molekulargewichtsmarker	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Protein Molekulargewichtsmarker vorgefärbt, biotinyliert	Bio-Rad (München)
<sup>14</sup> C Protein Molekulargewichtsmarker	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
IL-1: Rekombinantes humanes IL-1β	zur Verfügung gestellt von D.Boraschi (Dompe, L'Aquila, Italien)
TNF: Rekombinantes humanes TNFα	BASF AG (Ludwigshafen)

Spezielle Materialien und Reagenzien sind bei den einzelnen Methoden aufgeführt.

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

#### 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% (w/v) Glycerol

#### Blotpuffer:

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

#### Coomassie Färbelösung

- 1,0 g/l Coomassie Brillant Blue
- 3,6% (v/v) Methanol
- 7,2% (v/v) Essigsäure

#### 10xDNA Auftragspuffer

- 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
- 30,0 % (v/v) Glycerol

#### DNA-Polyacrylamidgel

- 4,5% (v/v) AA/BisAA
  - 0,1% (v/v) TEMED
  - 0,1% (v/v) APS
- in 1x TBE

#### 10x Hamburgpuffer

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

#### 2x HBS (Hepes gepufferte Salzlösung)

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

#### IP-Puffer:

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

#### 10xJNK-Kinasepuffer

- 250 mM Hepes pH 7,4
- 100 mM Magnesiumchlorid

#### JNK-Lysepuffer

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

#### 5x Kinasepuffer:

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

#### 3x Laemmli-Puffer

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

#### Luciferin Substratpuffer:

- 0,436 mM D-Luciferin, Natriumsalz
- 20 mM Tricin
- 1,07 mM Magnesiumcarbonathydroxid
- 2,67 mM Magnesiumsulfat
- 33,3 mM DTT
- 0,53 mM ATP
- 0,222 g/l CoenzymA, Natriumsalz

#### Luria Bertani (LB) Medium

- 10 g/l Natriumchlorid
  - 5 g/l Hefeextrakt
  - 10 g/l Trypton
- Das Medium wurde autoklaviert, entsprechende Antibiotika wurden jeweils frisch zugesetzt.

#### LB Selektivagar

- 15 g/l Agar in LB Medium
- Nach dem Autoklavieren wurde der Agar auf 50°C temperiert, mit entsprechenden Antibiotika versetzt und in Petrischalen ausgegossen.

#### PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)

- 2,7 mM Kaliumchlorid
  - 1,47 mM Kaliumdihydrogenphosphat
  - 137 mM Natriumchlorid
  - 4,3 mM Dinatriumhydrogenphosphat
- in bidest. H<sub>2</sub>O, pH 7,4

\* Complete®, Roche Diagnostics (Mannheim)

**SDS-Elektrodenpuffer**

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

**SDS-Sammelgel (5%)**

126 mM Tris-HCl pH 6,8  
5,0% (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%)**

0,375 M Tris pH 8,8  
x% (v/v) AA/BisAA/Glycerol  
0,1% (w/v) SDS  
0,15% (v/v) TEMED  
0,06 (w/v) APS

**Stripping Puffer**

25 mM Glycin-HCl pH 2,0  
1% (w/v) SDS

**TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer**

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

**TBE (Tris-Borat-EDTA) Puffer**

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

**TBS (Tris-gepufferte Salzlösung)**

25 mM Tris-HCl pH 7,4  
123 mM Natriumchlorid  
5 mM Kaliumchlorid  
0,7 mM Calciumchlorid  
0,5 mM Magnesiumchlorid  
0,6 mM Dinatriumhydrogenphosphat

**TBST (Tris gepufferte Salzlösung/Tween20)**

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

**TSS (Transformations- und Lagerungslösung)**

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

## 2.2 Zellkultur

Als Modellsystem für die IL-1 Signaltransduktion diente die etablierte murine Thymomalinie EL-4 6.1, die mehrere tausend IL-1 Rezeptoren auf der Oberfläche exprimiert [138]. Die EL-4 Sublinien IRAK-11, -19 und -30 wurden durch stabile Transfektion mit einem Expressionsplasmid für humane IRAK mit anschließender Einzelzellklonierung generiert. Als Kontrolllinie diente EL-4 6-pc, die durch stabile Transfektion mit dem Kontrollplasmid pcDNA3 entstanden ist [139]. Für Koimmunpräzipitationsexperimente wurde die etablierte, humane Zelllinie 293 verwendet. Dabei handelt es sich um Adenovirus-5-transformierte embryonale Nierenzellen. Bei der Sublinie 293RI handelt es sich um einen stabil transfizierten Einzelzellklon, der humanen Typ I IL-1 Rezeptor überexprimiert [122].

### 2.2.1 Passage von EL-4 und 293 Zellen

Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und hoher Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Zur Zellzählung wurde eine Probe der Zellsuspension 1+1 mit Trypanblaulösung (0,8% in PBS) gemischt und mit Hilfe einer Neubauer-Kammer im Lichtmikroskop ausgezählt. Trypanblau dringt durch die Zellmembran und wird von lebenden Zellen aktiv ausgeschieden, während geschädigte oder tote Zellen sich blau färben.

EL-4 Sublinien wurden in RPMI 1640 mit 5% (v/v) FCS (fötales Kälberserum), 1 mM Pyruvat, 2 mM L-Glutamin und nicht-essentiellen Aminosäuren kultiviert und alle zwei bis drei Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen gezählt, abzentrifugiert (1200 UpM, 10 min., RT) und mit frischem Medium auf  $5 \times 10^4$  -  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt.

293 Zellen wurden in DMEM mit 10%(v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 20 U/ml Penicillin und 20 µg/ml Streptomycin kultiviert. Alle vier bis fünf Tage wurde das Medium abdekantiert, einmal mit sterilem PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA in PBS) bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich die Zellen ablösten (1-3 min.). Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und je nach gewünschter Dichte auf 4-6 neue Kulturflaschen mit je 10 ml Medium verteilt.

### 2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in FCS mit 10% DMSO eingefroren. Dazu wurden die Zellen in FCS auf  $10^7$  Zellen/ml eingestellt und auf 0°C gekühlt. Anschließend wurde die Zellsuspension 1+1 mit eiskaltem DMSO (20% in FCS) gemischt und in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden in einem mit Isopropanol gefüllten und auf 4°C vorgekühlten Einfrierbehälter über Nacht bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssi-

gem Stickstoff gelagert. Bei Bedarf wurden die Zellen dem Stickstoffgefäß entnommen, bei Handwärme aufgetaut und sofort mit 10 ml Medium zentrifugierend gewaschen (1.200 UpM, 5 min., RT). Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen, im Brutschrank kultiviert und am folgenden Tag nochmals passagiert.

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

Zur Klonierung und Präparation von Plasmiden wurde der *E.coli* K12 Stamm XL1-blue verwendet.

Genotyp: *recA1 endA1 gyA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F<sup>+</sup> *proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)*]

Die Methoden zur Kultivierung und Transformation sind den *Current Protocols in Molecular Biology* [140] entnommen. XL1-blue wurden in autoklaviertem Luria-Bertani Medium (LB) mit 12,5 µg/ml Tetracyclin bei 37°C kultiviert. Zur Selektion transformierter Bakterienklone wurden dem Medium 50 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin zugesetzt. Dauerkulturen wurden angelegt, indem eine dicht gewachsene Bakterienkultur 5:1 mit sterilem Glycerol gemischt und bei -80°C eingefroren wurde.

### 2.3.1 Erzeugung kompetenter *E.coli* und Transformation

Eine über Nacht gewachsene Bakterienkultur wurde 1:100 mit LB verdünnt und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD^{600\text{nm}} = 0,4 - 0,6$ ) bei 37°C kultiviert. Die Bakterien wurden pelletiert (5.000xg, 5 min., 4°C) und in 1/10 des ursprünglichen Volumens eiskaltem TSS resuspendiert. Die Suspension wurde sofort aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurde ein 100 µl Aliquot kompetenter *E.coli* mit 5 ng Plasmid-DNA oder 10-20 µl Ligationsansatz (siehe 2.4.4) versetzt. Der Ansatz wurde 60 min. auf Eis inkubiert, 45 sec. auf 42°C erwärmt und für 2 min. auf Eis abgeschreckt. Anschließend wurde mit 0,9 ml LB-Medium/20 mM Glucose verdünnt und für 60 min. bei 37°C inkubiert. 100-200 µl der Bakteriensuspension wurden auf Selektivagar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Mit der beschriebenen Methode ließen sich Transformationseffizienzen von  $10^6$ - $10^7$  Klonen pro µg DNA erreichen. Für kritische Klonierungen, die höhere Effizienzen erforderten, wurden kommerziell erhältliche, kompetente XL1-blue\* verwendet und nach Herstellerangaben transformiert.

---

\* *Epicurian Coli® XL1-blue competent cells*, Stratagene (Heidelberg)

### 2.3.2 Plasmidpräparation aus *E.coli*

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA wurde eine geeignete Menge Selektivmedium mit einer Einzelkolonie transformierter *E.coli* beimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus bis zu 2 ml Bakteriensuspension wurde das GFX Micro Plasmid Kit\* verwendet. Größere Mengen wurden mit dem QIAGEN Midi- (bis 100 ml) bzw. Maxiprep Kit† (bis 500 ml Kulturvolumen) nach Herstellerangaben isoliert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris-HCl pH 8,0 gelöst. Mit einer Verdünnung der Plasmidpräparation wurde ein UV Absorptionsspektrum aufgenommen. Zur Abschätzung der DNA Konzentration diente die Formel  $1,0 \text{ OD}^{260 \text{ nm}} = 50 \mu\text{g/ml}$  (Schichtdicke: 1 cm).

## 2.4 Konstruktion von Expressionsplasmiden

### 2.4.1 Klonierungsstrategie

Zur Untersuchung einzelner IRAK Domänen wurde eine Reihe von Expressionsplasmiden kloniert. Die entsprechenden cDNA-Fragmente wurden über PCR (Polymerasekettenreaktion) mit spezifischen *Primern* hergestellt. Als Template diente das Expressionsplasmid pRK5-IRAK, das die vollständige cDNA für humane IRAK‡ kodiert. Zur Klonierung von kinaseinaktiven IRAK Mutanten wurde das Plasmid IRAK K->S als *Template* verwendet, das sich von pRK5-IRAK durch eine Punktmutation unterscheidet, die zum Aminosäureaustausch Lys239->Ser in der putativen ATP Bindungsstelle führt.

Über den *sense Primer* (-S) wurde 5'-terminal eine *BclI*-Schnittstelle (Sequenz unterstrichen) eingeführt. Die *antisense Primer* (-AS) führten 3'-terminal ein Stopcodon (fett) und eine *EcoRI*-Schnittstelle (unterstrichen) ein.

Primername	Sequenz (5'->3')
IRAK83-S	TGT <u>GAT CAG</u> CCG GGG GGC CGG GCC CG
IRAK524-S	TGT <u>GAT CAG</u> GCT CCC AGA CCC ATT CAG G
IRAK1667-S	TGT <u>GAT CAG</u> GGC ATT TGG AGG CCG CC
IRAK544-AS	ACG <u>AAT TCT</u> <b>CAC</b> CCT GAA TGG GTC TGG GAG
IRAK1689-AS	ACG <u>AAT TCT</u> <b>CAG</b> CTG GCG GCC TCC AAA TGC
IRAK2215-AS	ACG <u>AAT TCT</u> <b>CAG</b> CTC TGA AAT TCA TCA CT

Tab. 2: Klonierungsprimer

\* *GFX Micro Plasmid Prep Kit*, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

† *Midi/Maxi Plasmid Kit*, QIAGEN (Hilden)

‡ *Genbank Accession#* L76191

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit *Bcl*I und *Eco*RI geschnitten und in die *Bam*HI/*Eco*RI Schnittstellen des eukaryotischen Expressionsvektors pcDNA3-FL inkloniert. Die Ligation der überhängenden *Bcl*I/*Bam*HI Enden führte zur Zerstörung der Schnittstelle.

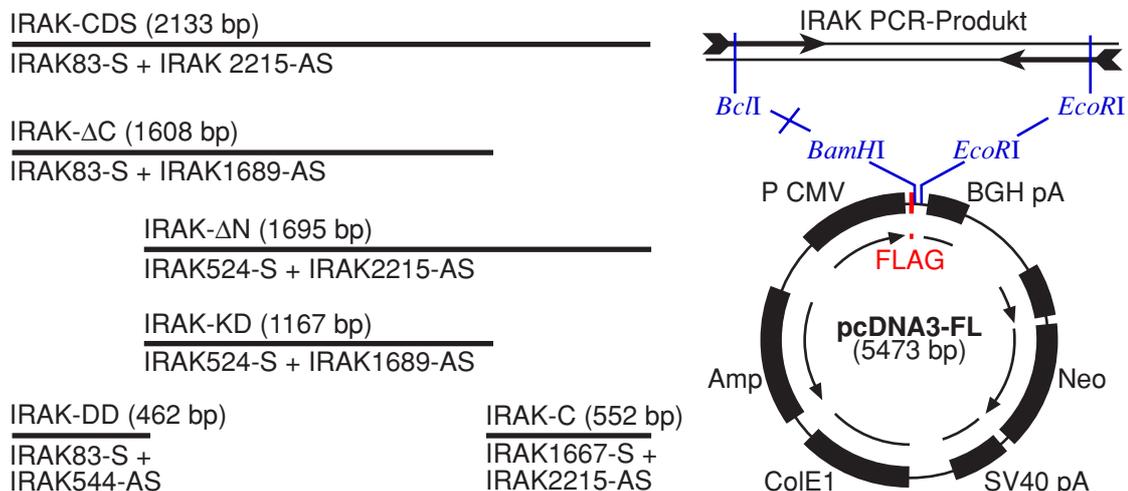


Abb. 3: Klonierungsstrategie

Abb. 3 gibt einen Überblick über die mit verschiedenen *Primer*kombinationen erzeugten PCR Produkte und die Klonierungsstrategie. Die Klonierung war so ausgelegt, daß die IRAK-Fragmente mit N-terminalem FLAG-Epitop unter Kontrolle des konstitutiven CMV (*Cytomegalovirus*) Promotors exprimiert werden konnten. Die entstehenden Konstrukte wurden wie folgt benannt:

Plasmidname	Template	kodierter cDNA Bereich	Produktname
pFL-IRAK-CDS	pRK5-IRAK	vollständige IRAK (bp 83-2215)	IRAK-wt
pFL-IRAK-ΔC	(IRAK-wt)	IRAK ohne C-Terminus (bp 83-1689)	IRAK-ΔC
pFL-IRAK-ΔN		IRAK ohne N-Terminus (bp 524-2215)	IRAK-ΔN
pFL-IRAK-KD		IRAK Kinasedomäne (bp 524-1689)	IRAK-KD
pFL-IRAK-DD		IRAK „Todesdomäne“ ( <i>death domain</i> ) (bp 83-544)	IRAK-DD
pFL-IRAK-C		IRAK C-Terminus (bp 1667-1689)	IRAK-C
pFL-K239S-CDS	IRAK K->S	„kinasetote“ vollständige IRAK (bp 83-2215)	K239S
pFL-K239S-ΔC	(K239S)	„kinasetote“ IRAK ohne C-Terminus (bp 83-1689)	K239S-ΔC
pFL-K239S-ΔN		„kinasetote“ IRAK ohne N-Terminus (bp 524-2215)	K239S-ΔN
pFL-K239S-KD		„kinasetote“ IRAK Kinasedomäne (bp 524-1689)	K239S-KD

Tab. 3: Beschreibung der klonierten Expressionsplasmide

#### 2.4.2 Präparative PCR

Als thermostabiles Enzym zur Amplifikation der *Inserts* kam *Pfu*DNA-Polymerase zum Einsatz, die über Exonukleaseaktivität verfügt und daher eine besonders niedrige Fehlerrate erreicht.

**Präparativer PCR-Ansatz:**

10 µl 10x PCR Puffer  
 10 ng Template DNA  
 0,2 mM dNTP Mix\*  
 0,5 µM sense Primer  
 0,5 µM antisense Primer  
 5 % (v/v) DMSO  
 2,5 U *pfu*DNA Polymerase†  
 ad 100 µl bidest. H<sub>2</sub>O

Die Ansätze wurden mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die Amplifikation der cDNA-Fragmente erfolgte über 25 Zyklen in einem Thermocycler. Da die verwendeten Primer sich deutlich in ihren Schmelztemperaturen unterschieden, wurde für die Anlagerung (*annealing*) eine Temperaturrampe verwendet, d.h. die Temperatur wurde langsam von 65°C auf 50°C abgesenkt. Für alle cDNA-Fragmente mit einer Länge über 1,2 kbp wurde eine Elongationszeit von 240 sec. verwendet, für kleinere Fragmente 120 sec. Da im Verlauf des Prozesses die Prozessivität der *pfu*DNA Polymerase nachläßt, wurde die Elongationszeit nach jedem Zyklus um 10 sec.verlängert.

Zahl der Zyklen	Zeit [sec.]	Temperatur	Prozeß
1	60	95°C	Initiale Denaturierung
25	45	95°C	Schmelzen
	15	65°C	<i>Annealing</i> (Temperaturrampe)
	30	65°C->50°C	
	15	50°C	
	110+10n (<1,2kbp) 230+10n (>1,2kbp)	72°C	Elongation
1	-	4°C	Lagerung

Tab. 4: Temperaturprogramm der präparativen PCR (n=Zyklenzahl)

**2.4.3 Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

Die Visualisierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Auftrennung der Proben in einer Flachbett-Agarosegelelektrophorese. Je nach Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden 0,8 bis 1,5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen bis zum Sieden gelöst und mit 0,1 µg/ml des interkalierenden Fluorophors Ethidiumbromid versetzt. Nach dem Gießen und Abkühlen des Gels wurden die Proben mit 1/10 Volumen 10xDNA Auftragspuffer gemischt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei 10 V/cm. Für präparative Zwecke wurden die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator

\* dNTP Mix: dATP, dTTP, dGTP, dCTP, je 10 mM, MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

† *Cloned PfuDNA Polymerase*: Stratagene (Heidelberg)

sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus den Agaroseblöckchen erfolgte mit Hilfe eines Gelextraktionskits\* nach Vorschrift des Herstellers.

#### **2.4.4 Klonierungstechniken**

Der Klonierungsvektor pcDNA3-FL wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten. Um eine Religation unvollständig geschnittener Vektor-DNA zu verhindern, wurde außerdem mit CIAP (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm) dephosphoryliert:

##### **Reaktionsansatz:**

3 µg pcDNA3-FL  
6 µl 10x *Eco*RI/*Not*I Puffer  
10U *Bam*HI  
5U *Eco*RI  
5U CIAP  
ad 60 µl bidest. H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde zwei Stunden bei 37°C inkubiert und über ein präparatives 0,8% Agarosegel aufgereinigt. Die IRAK PCR-Produkte wurden über ein 1,5% Agarosegel aufgereinigt und anschließend sequenziell mit den Restriktionsendonukleasen *Bcl*II und *Eco*RI geschnitten:

##### ***Bcl*II Restriktionsschnitt:**

60 µl aufgereinigtes PCR-Produkt  
16 µl 10x Universalpuffer Y+/Tango  
5U *Bcl*II  
ad 80 µl bidest. H<sub>2</sub>O

Der Reaktionsansatz wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet und 2h bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von 5U *Eco*RI wurde für weitere 2h bei 37°C inkubiert. Es folgte ein Aufreinigungsschritt über ein präparatives 1,5% Agarosegel. Schließlich wurde die DNA-Konzentration des geschnittenen Vektors und der IRAK PCR-Produkte auf einem analytischen 1,2% Agarosegel durch densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten und Vergleich mit einem DNA Standard bestimmt.

Die Ligation des Vektors mit den verschiedenen IRAK PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe eines Kits† nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden 50 ng des geschnittenen Vektors mit einem vierfachen molaren Überschuß des entsprechenden Inserts 10 min. bei Raumtemperatur ligiert. Als Religationskontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, in dem kein Insert enthalten war.

---

\* *QIAquick Gel Extraction Kit*, QIAGEN (Hilden)

† *Rapid DNA Ligation Kit*, Roche Diagnostics (Mannheim)

**DNA-Verdünnung:**

50 ng pcDNA3-FL (geschnitten, dephosphoryliert)  
x ng IRAK PCR-Produkt (geschnitten)  
2 µl 5x DNA Verdünnungspuffer  
ad 10 µl bidest. H<sub>2</sub>O

**Ligationsansatz:**

10 µl DNA-Verdünnung  
10 µl 2x Ligasepuffer  
1 µl T4 DNA Ligase

Kompetente XL1-blue wurden mit 5 µl des Ligationsansatzes transformiert (siehe 2.3.1) und auf Selektivagar ausplattiert. Am folgenden Tag wurden resistente Bakterienklone zur Präparation von Plasmid-DNA expandiert. Die Kontrolle der Plasmid-DNA erfolgte durch Restriktionsschnitte mit den Enzymen *EcoRI*, *EheI* und *BglII*, da diese Enzyme in den verschiedenen Vektorkonstrukten ein charakteristisches Restriktionsmuster erzeugen.

**2.4.5 Sequenzierung**

Die Identität und Integrität der klonierten Expressionsplasmide wurde durch Sequenzierung der Inserts verifiziert. Dazu wurde das *Big Dye Terminator Cycle Sequenzierkit*\* verwendet, das auf einer modifizierten Kettenabbruchmethode nach Sanger [141] beruht.

In einer Polymerasekettenreaktion mit einem *Vektorprimer* werden dabei statistisch Fluorophor-gekoppelte Didesoxy-Nucleosidtriphosphate (ddNTP's) eingefügt, die zum Kettenabbruch und zur gleichzeitigen Markierung der synthetisierten PCR-Fragmente führen. Da die vier verschiedenen ddNTP's mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, reicht ein Reaktionsansatz zur Sequenzierung aller vier Basen aus. Für Konstrukte, die auf dem Klonierungsvektor pcDNA3-FL beruhen, wurde jeweils eine Sequenzierreaktion mit dem 5'-*Vektorprimer* T7 und dem 3'-*Primer* Sp6 nach Angaben des Herstellers durchgeführt:

**Sequenzieransatz:**

8 µl Ready Reaction Premix  
0,2 µg Plasmid-DNA  
5 pmol *Primer* (T7 bzw. Sp6)  
ad 20 µl bidest. H<sub>2</sub>O, mit Mineralöl überschichten.

---

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

Die Sequenzierreaktion wurde im Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

Zahl der Zyklen	Zeit [sec.]	Temperatur	Prozeß
25	30	95°C	Schmelzen
	15	50°C	Annealing
	240	60°C	Elongation
1	-	4°C	Lagerung

Tab. 5: Temperaturprogramm für das *Taq Cycle Sequencing*

Anschließend wurde die DNA durch Ethanolfällung aufgereinigt, in Sequenzierpuffer aufgenommen und denaturiert (2 min., 95°C, Abschrecken auf Eis).

Die Analyse der entstehenden Fragmente erfolgte durch Kapillar-Gelelektrophorese im *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* und anschließende Auswertung des Elektropherogramms mit Hilfe der dazugehörigen Software\*.

## 2.5 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Für die transiente Transfektion eukaryotischer Zellen kamen zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz. Sowohl die DEAE-Dextran- [142], als auch die Calciumphosphat-Methode [143] beruhen auf dem gleichen Grundprinzip: Negativ geladene DNA wird durch ein positiv geladenes Agens komplexiert, kann dadurch an die Zellmembran adhären und wird in einem endocytoseartigen Vorgang in das Zellinnere aufgenommen.

### 2.5.1 Transfektion durch Calciumphosphat-Präzipitation

293 Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Präzipitation nach etablierten Protokollen [140] transfiziert. Dazu wurden am Vortag pro Ansatz  $2-3 \times 10^6$  293 Zellen in 10 cm Petrischalen mit 10 ml Vollmedium ausgesät.

Zur Transfektion wurde eine Lösung aus 10 µg Plasmid-DNA in 500 µl 250 mM Calciumchlorid hergestellt. Bei Ansätzen mit unterschiedlichen Mengen kodierender DNA wurde mit Kontrollvektor (Vektor ohne *Insert*) auf die gleiche Menge und anschließend mit pUC18 (Träger-DNA) auf 10 µg Gesamt-DNA aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde langsam unter Schütteln in 500 µl 2x HBS getropft und zur Ausbildung des Calciumphosphat/DNA Präzipitates 20 min. bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Transfektion erfolgte durch Mischen des Präzipitates mit dem Medium und Inkubation im Brutschrank für 8 Stunden. Anschließend wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und das Medium gewechselt. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 48 Stunden.

### **2.5.2 DEAE-Dextran Transfektion**

EL-4 Sublinien wurden mit der DEAE-Dextran-Methode nach einem modifizierten Standardprotokoll [140] transfiziert.

#### ***Testen der Transfektionseffizienz***

Da DEAE-Dextran zur Schädigung der Zellen führen kann, wurde zunächst eine Testtransfektion mit pEGFP-C1 durchgeführt. Erfolgreich transfizierte Zellen exprimierten cytosolisches GFP (grün-fluoreszierendes Protein), das über seine Eigenfluoreszenz direkt durchflußzytometrisch nachgewiesen werden konnte. EL-4 Zellen wurden mit verschiedenen Mengen pEGFP-C1 transfiziert (Vorgehensweise s.u.). Dabei wurde die DEAE-Dextran Konzentration und die Expressionsdauer variiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion wurde ein Aliquot der Zellen abzentrifugiert, mit PBS zentrifugierend gewaschen und in PBS/1% BSA im Durchflußcytometer analysiert. Auf Basis der Ergebnisse wurden für die weiteren Experimente die optimierten Parameter verwendet.

#### ***Optimiertes Transfektionsprotokoll***

Die Zellen wurden am Vortag in einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Vor der Transfektion wurden die Zellen einmal in PBS und einmal in TBS gewaschen. Für einen Standardansatz wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in 600  $\mu$ l Transfektionslösung resuspendiert und 30 min. bei Raumtemperatur unter langsamer Rotation der Röhrchen transfiziert.

#### **Standard-Transfektionslösung:**

250  $\mu$ g/ml DEAE-Dextran  
40  $\mu$ g/ml Chloroquin  
0,01 - 2  $\mu$ g kodierende DNA (mit Kontrollvektor aufgefüllt)  
in 600  $\mu$ l TBS

Anschließend wurden die Zellen zweimal zentrifugierend mit Medium gewaschen und in 5 ml RPMI 1640 mit 10%(v/v) FCS, 1 mM Pyruvat, 2 mM L-Glutamin, nicht-essentiellen Aminosäuren, 20 U/ml Penicillin und 20  $\mu$ g/ml Streptomycin ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen geerntet.

### 2.5.3 Verwendete Plasmide

Neben den unter 2.4.1 aufgeführten Expressionskonstrukten wurden folgende Plasmide verwendet:

Name	Beschreibung/Eigenschaften	Quelle/Zitat
pUC18	Prokaryotischer Klonierungsvektor	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
pEGFP-C1	Reportergenplasmid, Expression von EGFP (Mutante des grün-fluoreszierenden Proteins) unter Kontrolle des CMV Promotors.	Clontech (Heidelberg)
pcDNA3-FL	Eukaryotischer Klonierungsvektor, erzeugt aus pcDNA3 (Invitrogen, Leek, NL) durch Einklonieren eines Oligonukleotids, das für das FLAG-Epitop kodiert.	B.Lüscher (Molekularbiologie, MH Hannover)
5xNFκB-luc	Reportergenplasmid, Expression von <i>firefly</i> luciferase unter Kontrolle einer pentameren NFκB Consensus Sequenz. Erzeugt aus pGL3-Basic (Promega, Mannheim)	W.Falk (Medizinische Klinik I, Universität Regensburg)
pHA-JNK1	N-terminal HA-Epitop markierte cDNA für humane JNK1 im eukaryotischen Expressionsvektor pCMV5	M.Karin (Pharmacology, School of Medicine, La Jolla, USA) [144]
pRK5-IRAK	cDNA für humane IRAK im eukaryotischen Expressionsvektor pRK5	Z.Cao (Tularik Inc., San Francisco, USA) [122]
IRAK K->S	wie pRK5-IRAK, jedoch mit Punktmutation, die zum Aminosäureaustausch Lys239 zu Ser führt	Z.Cao (Tularik Inc., San Francisco, USA) [128]
FL-TRAF6	N-terminal FLAG-Epitop markierte cDNA für humanen TRAF6 im eukaryotischen Expressionsvektor pRK5	Z.Cao (Tularik Inc., San Francisco, USA) [126]
MyD88-FL	C-terminal FLAG-Epitop markierte cDNA für humanen MyD88 im eukaryotischen Expressionsvektor pRK5	H.Wesche (Tularik Inc., San Francisco, USA) [128]
pRK5*	Kontrollplasmid, erzeugt aus pRK5-IRAK durch Ausschneiden des Inserts und Religation	Eigenkonstruktion

Tab. 6: Verwendete Plasmide

## 2.6 Reportergenassays

Der Einfluß der Expression von IRAK und deren Mutanten auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB wurde mit Hilfe eines Reportergenassays nachgewiesen. Dazu wurde das Reporterplasmid 5xNFκB-luc, das die NFκB gesteuerte Expression von *firefly* Luciferase ermöglicht, kotransfiziert. Die Luciferaseaktivität in den Zellen ist proportional zur NFκB Aktivität und kann in den Zellysaten durch eine Lumineszenzreaktion nachgewiesen werden. Dabei wird D-Luciferin in Anwesenheit von ATP, Magnesiumionen und Luftsauerstoff unter Lichtemission dehydrogeniert. Die Reaktionsenergie wird zum größten Teil als Licht im sichtbaren Spektrum frei, das in einem Luminometer gemessen werden kann.

### 2.6.1 Stimulation und Lyse von Zellen

5x10<sup>6</sup> EL-4 Zellen pro Ansatz wurden mit den entsprechenden Expressionsplasmiden und 0,5 µg 5xNFκB-luc kotransfiziert. Vier Stunden nach der Transfektion wurden die Zellkulturen mit 10 ng/ml IL-1β oder 100 ng/ml TNFα für weitere 20 Stunden stimuliert oder als

Kontrolle unstimuliert gelassen. Anschließend wurden die Zellen zweimal zentrifugierend mit PBS gewaschen und in 150 µl Reporterlysepuffer\* für 10 min. auf Eis lysiert. Kerne und Zelldebris wurden abzentrifugiert (30 min., 10.000xg, 4°C) und die Überstände in frische Reaktionsgefäße überführt.

### **2.6.2 Luciferaseassay**

20 µl der Zellysate wurden in Reagenzröhrchen vorgelegt und im Luminometer durch automatische Injektion mit 100 µl Luciferin Substratpuffer versetzt. Die Lichtemission wurde über 10 sec. im Gerät integriert und als RLU (relative Lichteinheiten) ausgegeben. Es wurden Doppelwerte bestimmt, bei einer Standardabweichung von mehr als 5% wurde die Messung wiederholt.

### **2.6.3 Proteinbestimmung nach Bradford**

Zur Normierung der Luciferaseaktivitäten wurde die Proteinkonzentration der Zellysate nach Bradford [144] bestimmt. Dazu wurden die Lysate 1:100 in PBS verdünnt und in Mikrotiterplatten 1+1 mit Bradford Reagenz† versetzt. Als Standard dienten Verdünnungen von BSA (Rinderserumalbumin) in PBS, die Auswertung erfolgte am Mikrotiterplatten-Photometer bei 590 nm. Mit allen Proben wurden Vierfachbestimmungen durchgeführt.

## **2.7 Immunpräzipitation und Westernblot**

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen in Zellysaten und Immunpräzipitaten wurden Westernblot Techniken verwendet. Dazu wurden die Proteingemische zunächst in einer Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und im elektrischen Feld auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenflourid) übertragen. Auf dieser Membran erfolgte anschließend der immunochemische Nachweis.

---

\* *Reporter Lysis buffer*, Promega (Mannheim)

† *Protein Assay Dye Reagent*, (BioRAD, München)

### 2.7.1 *Verwendete Antikörper*

Name/Klon	Antigen	Typ, Organismus	Quelle	Verdünnung im Westernblot
$\alpha$ IRAK	IRAK, Mensch	polyklonales Serum, Kaninchen	Z.Cao (Tularik Inc., San Francisco, USA)	1:5000
$\alpha$ TRAF6	TRAF6, Mensch	polyklonales Serum, Kaninchen	Z.Cao (Tularik Inc., San Francisco, USA)	1:5000
$\alpha$ MyD88	MyD88, Mensch	polyklonales Serum, Kaninchen	H.Wesche (Tularik Inc., San Francisco, USA)	1:1000
$\alpha$ NFkB-p50 (NLS)	NLS-Region NFkB p50, Mensch/Maus	Kaninchen IgG's, polyklonal	Santa Cruz (Heidelberg))	1:500
$\alpha$ NFkB-p65 (C-20)	C-Terminus NFkB p65, Mensch/Maus	Kaninchen IgG's, polyklonal	Santa Cruz (Heidelberg)	1:2000
$\alpha$ JNK1	JNK1, Mensch	Kaninchen IgG's, polyklonal	Santa Cruz (Heidelberg)	1:1000
Bio-M2	FLAG-Oktapeptid	Maus IgG <sub>1</sub> , monoklonal	Sigma Aldrich (Deisenhofen)	1:500
M2-Agarose	FLAG-Oktapeptid	Maus IgG <sub>1</sub> , monoklonal, Agarose gekoppelt	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	Immunpräzipitation
IgG-Agarose	undefiniert	Mensch IgG's, polyklonal, Agarose gekoppelt	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	Immunpräzipitation
12CA5	HA-Nonapeptid	Maus IgG <sub>2b</sub> , monoklonal	B.Lüscher (Molekularbiologie, MH Hannover)	1:1000
12A6	IL-1R Typ I, Maus	Ratte IgG <sub>2a</sub> , monoklonal	BD-Pharmingen (Hamburg)	Immunpräzipitation
6B5	IL-1R Typ I, Mensch	Ratte IgG <sub>2a</sub> , monoklonal	BD-Pharmingen (Hamburg)	Immunpräzipitation
HRP- $\alpha$ rabbit	Ig's, Kaninchen	Ziege Ig's, Peroxidase gekoppelt	Dako (Hamburg)	1:25.000
HRP- $\alpha$ mouse	Ig's, Maus	Kaninchen Ig's, Peroxidase gekoppelt	Dako (Hamburg)	1:25.000
$\alpha$ rabbit, biotinylated	Ig's, Kaninchen	Ziege Ig's, biotinyliert	Dianova (Hamburg)	1:50.000

Tab. 7: Verwendete Antikörper und Verdünnungen für Westernblot

### 2.7.2 *Immunpräzipitation*

Die selektive Anreicherung und Aufreinigung von Proteinen aus Zellysaten erfolgte durch Verwendung spezifischer, immobilisierter Antikörper. Zur Präzipitation von FLAG-Epitop markierten Proteinen wurden die Lysate mit 25  $\mu$ l M2-Agarose inkubiert. Als Spezifitätskontrolle wurden in einigen Experimenten Präzipitationen mit IgG-Agarose durchgeführt. Andere Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern vorinkubiert (1h, auf Eis) und mit 25  $\mu$ l Protein-G-Sepharose\* präzipitiert (2h, 4°C, unter Schwenken). Anschließend wurden

\* Protein-G Sepharose: Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

die Sepharosekügelchen pelletiert (10.000xg, 30 sec.) und viermal mit eiskaltem Lysepuffer zentrifugierend gewaschen. Die Überstände wurden vollständig entfernt.

### **2.7.3 SDS Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die Trennung von Proteingemischen erfolgte in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [145]. Die Proben wurden zunächst durch Erhitzen in Laemmli-Puffer (10 min., 95°C) denaturiert und anschließend auf einem Polyacrylamidgel (7,5 – 12,5%) getrennt. Zur Größenbestimmung wurden Molekulargewichtsmarker verwendet.

In einer horizontalen Elektrophoresekammer wurde zunächst das Trenngel gegossen. Nach dem Auspolymerisieren wurde ein 5%iges Sammelgel überschichtet, das die Probenaschen enthielt. Die Elektrophorese erfolgte in Elektrodenpuffer bei Stromstärken von 15 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel.

Anschließend wurden die Gele entweder zum Westernblot verwendet oder angefärbt und getrocknet. Dazu wurden die Gele 10 min. in Coomassie Gebrauchslösung geschwenkt, in 7% Essigsäure/7% Methanol entfärbt (1-2 h) und 10 min. in 55% Methanol/2% Glycerol entwässert. Anschließend wurden die Gele auf einem Geltdrockner im Vakuum bei ca. 80°C getrocknet.

### **2.7.4 Proteintransfer auf PVDF-Membranen**

Da PVDF-Membranen hydrophob sind, mußten sie zunächst durch Schwenken in Methanol aktiviert werden. Anschließend wurden Acrylamidgel, Membran und vier Filterpapiere 10 min. in Blotpuffer äquilibriert und in die *semidry* Blotapparatur gestapelt:

**Kathode(-)**

2 Lagen Filterpapier\*

Acrylamidgel

PVDF-Membran†

2 Lagen Filterpapier

**Anode(+)**

Der Proteintransfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0,5 mA/cm<sup>2</sup> für zwei Stunden. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit 5% fettarmen Milchpulver in TBST blockiert (1 h, RT oder über Nacht, 4°C).

---

\* Filterpapier 1,5 mm: Schleicher&Schuell (Dassel)

† Immobilon P, Millipore (Eschborn)

### 2.7.5 Immunfärbung

Die Membran wurde 1–2h mit einer Primärantikörperverdünnung inkubiert, dreimal mit TBST gewaschen und mit einem HRP- (Meerrettich Peroxidase) gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (1h, RT). Zur Steigerung der Sensitivität wurden zum Teil biotinylierte Sekundärantikörper eingesetzt, die über HRP-gekoppeltes Streptavidin\* detektiert wurden. Im Anschluß wurde die Membran nochmals gewaschen und kurz zwischen Filterpapier getrocknet. Die Detektion der Peroxidaseaktivität erfolgte in einer Chemolumineszenzreaktion mit ECL Reagenzien† nach Angaben des Herstellers und Belichtung eines Röntgenfilmes für 10 sec. bis 60 min.

Soweit erforderlich wurden die Membranen anschließend für weitere Immunfärbungen verwendet. Dazu wurden sie in *Stipping* Puffer geschwenkt (30 min., RT), um die Antikörper abzuwaschen, gut mit TBST gespült und zur Absättigung unspezifischer Bindungsplätze erneut mit 5% Milchpulver in TBST inkubiert.

## 2.8 Nachweis der IRAK Aktivierung

Aktiviert IRAK phosphoryliert sich selbst und konnte daher direkt in einem *in vitro* Kinaseassay oder über die Veränderung des apparenten Molekulargewichtes im Westernblot sichtbar gemacht werden. Dazu wurden EL-4 Zellen ( $10^7$  pro Ansatz) in konditioniertem Medium 1–60 min. mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert gelassen. In 293 Zellen war die Kinaseaktivität überexprimierter IRAK konstitutiv und stimulusunabhängig.

### 2.8.1 Probenvorbereitung

293 oder EL-4 Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 500  $\mu$ l IP-Puffer 30 min. auf Eis lysiert. Zelldebris und Kerne wurden abzentrifugiert (30 min., 10.000xg, 4°C). Anschließend wurden die Totallysate zur Immunpräzipitation eingesetzt. Für FLAG-Epitop markierte Proteine wurde M2-Agarose verwendet, unmarkierte IRAK wurde mit polyklonalem  $\alpha$ IRAK Serum und Protein-G Sepharose präzipitiert (siehe 2.7.1).

### 2.8.2 *in vitro* Kinaseassay

Die immobilisierten Immunkomplexe wurden durch zweimaliges Waschen in Kinasepuffer umgepuffert und für 10 min. mit [ $^{32}$ P] $\gamma$ -ATP bei 30°C inkubiert:

---

\* Verdünnung 1:50.000, Dianova, Hamburg

† *Super Signal Substrate*, Pierce (KMF, Sankt Augustin)

**Reaktionsansatz:**

Protein-G Seharose oder M2-Agarose *beads*  
8  $\mu$ l 5x Kinasepuffer  
1  $\mu$ Ci [ $^{32}$ P] $\gamma$ -ATP  
1  $\mu$ M ATP (unmarkiert)  
ad 40  $\mu$ l bidest. H<sub>2</sub>O

Die Reaktion wurde durch Erhitzen mit 3x Laemmli-Puffer (10 min., 95°C) beendet. Anschließend wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel wurde gefärbt und getrocknet (siehe 2.7.3). Die Phosphoproteine wurden in einer Autoradiographie auf Röntgenfilm oder am Phosphoimager sichtbar gemacht.

**2.8.3 Nachweis der IL-1 stimulierten Proteolyse von IRAK**

Um zu überprüfen, ob IRAK nach Aktivierung und Phosphorylierung Proteasom-abhängiger Degradation unterliegt, wurde der reversible, membranpermeable Proteasominhibitor LLL\* verwendet. Die Zellen wurden 40 min. mit 25  $\mu$ M LLL vorinkubiert und anschließend wie oben beschrieben stimuliert und aufgearbeitet. Der Nachweis von IRAK erfolgte nach Immunpräzipitation im Westernblot.

**2.9 Nachweis der NF $\kappa$ B Translokation und Aktivierung**

Die IL-1 induzierte Translokation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B wurde im Westernblot nachgewiesen, indem Untereinheiten der NF $\kappa$ B Komplexe in Cytosol- und Kernpräparationen mit spezifischen Antikörpern detektiert wurden. Die DNA-bindende Aktivität von NF $\kappa$ B wurde durch Gelretardationsanalyse (EMSA) nachgewiesen.

**2.9.1 Fraktionierung von cytosolischen und nukleären Proteinen**

Zur Trennung von Cytosol und Kernprotein wurde eine einfache Zellfraktionierung nach Bomsztyk *et al.* [146] durchgeführt.

Dazu wurden  $2 \times 10^7$  Zellen pro Ansatz in konditioniertem Medium mit IL-1 $\beta$  bei 37°C inkubiert. Die Stimulation wurde durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem PBS beendet. Anschließend wurden die Zellen in 400  $\mu$ l Puffer A resuspendiert und 15 min. auf Eis inkubiert. Zur Zellyse wurden 25  $\mu$ l 10% Nonidet P-40 zugesetzt, kurz gemischt und sofort zentrifugiert (10.000xg, 30 sec., RT). Die Überstände wurden abgenommen (cytosolische Extrakte) und das Kernpellet wurde mit 50  $\mu$ l Puffer C extrahiert (15 min., auf Eis). Unlösliche Kernbestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (10.000xg, 5 min., 4°C). Cytosolische- und Kernextrakte wurden anschließend einer Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 2.6.3) unterzogen.

### 2.9.2 Nachweis von NFκB Untereinheiten im Westernblot

Von jedem Ansatz wurden 40 µg cytosolisches bzw. Kernprotein auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. NFκB Untereinheiten wurden durch Immunfärbung mit den spezifischen Antikörpern αNFκB-p50 und -p65 nachgewiesen (siehe 2.7.5).

### 2.9.3 Gelretardationsanalyse (EMSA)

Der Nachweis der NFκB Aktivierung beruhte auf der Bindung von NFκB Komplexen an eine spezifische Oligonukleotidsonde und der damit verbundenen Verminderung der Wanderungsgeschwindigkeit (*shift*) in einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel. Die Identität der NFκB Untereinheiten wurde dabei durch den Zusatz spezifischer Antikörper nachgewiesen (*supershift*, *Kompetition*).

#### Markierung von Oligonukleotid Sonden

Als Sonde wurde ein doppelsträngiges Oligonukleotid verwendet, das eine NFκB Consensussequenz [147] enthielt:

5' - TGA CAG AGG GGA CTT TCC AGA GA -3'

Zwei revers-komplementäre Oligonukleotide wurden dazu einzeln mit T4 Polynukleotidkinase und [<sup>32</sup>P]γ-ATP 3'-terminal markiert.

#### Markierungsansatz:

10,0 µl Oligonukleotid (1,0 µMol/l)  
 6,0 µl 5x Polynukleotidkinasepuffer  
 30 µCi [<sup>32</sup>P]γ-ATP  
 10U T4 Polynukleotidkinase  
 ad 30 µl bidest. H<sub>2</sub>O

Beide Ansätze wurden 30 min. bei 37°C inkubiert, vereinigt und durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert. Das Zusammenlagern zum Doppelstrang (*Annealing*) erfolgte durch langsames Abkühlen auf Raumtemperatur (über Nacht).

Freies [<sup>32</sup>P]γ-ATP wurde über Gelfiltrationssäulen<sup>†</sup> nach Angaben des Herstellers abgetrennt. Die spezifische Aktivität des markierten Oligonukleotids wurde im β-Szintillationszähler überprüft und betrug bei gelungener Markierung 0,5–1,0x10<sup>5</sup> dpm/µl.

\* Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal, MG-132, Calbiochem-Novabiochem (Schwalbach)

<sup>†</sup> S-200HR, Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

### ***Bindereaktion und DNA-PAGE***

Die Kernproteine wurden mit der markierten Sonde und einem Überschuß Kompetitor-DNA\* für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Für *superhift* Experimente wurden dem Reaktionsansatz außerdem 0,5 µg αNFκB-p50 oder 0,2 µg αNFκB-p65 zugesetzt:

#### **Reaktionsgemisch:**

1 µl 10x Hamburgpuffer  
2 µg poly(dIdC)  
x µg Antikörper  
1 µl markiertes Oligonukleotid  
ad 10 µl bidest. H<sub>2</sub>O

Im Anschluß wurden die Proben mit 2 µl DNA-Auftragspuffer versetzt und auf einem 4,5% Polyacrylamidgel in 0,25x TBE bei 10 V/cm getrennt. Das Gel wurde getrocknet und zur Autoradiographie verwendet.

## **2.10 Nachweis der JNK Aktivierung**

Die Aktivierung der cJun N-terminalen Proteinkinase (JNK) durch IL-1 wurde in einem *in vitro* Kinaseassay nachgewiesen. Als spezifisches Substrat diente ein rekombinantes Fusionsprotein aus GST und den Aminosäuren 1 bis 79 des Transkriptionsfaktors cJUN [148].

### **2.10.1 Probenvorbereitung**

Um in transienten Transfektionsstudien den Einfluß von IRAK und deren Mutanten auf die IL-1 stimulierte JNK Aktivierung untersuchen zu können, wurden 10<sup>7</sup> EL-4 Zellen mit 0,5 µg pHA-JNK1 kotransfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Ansätze mit IL-1β oder durch osmotischen Streß (0,5 M Sorbitol) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl IP-Puffer lysiert. HA-Epitop markierte JNK1 wurde mit dem monoklonalen Antikörper 12CA5 und Protein-G Sepharose immunpräzipitiert. Eine Hälfte der Präzipitate wurde zur Normierung der JNK Expression mit αJNK1 im Westernblot verwendet (siehe 2.7). Die andere Hälfte wurde durch zweimaliges Waschen mit 1x JNK-Kinasepuffer umgepuffert und in den *in vitro* Kinaseassay eingesetzt.

Wegen der hohen Spezifität der JNK für das Substrat cJun(1-79)<sup>†</sup> konnten grob gereinigte Zytosole von untransfizierten oder stabil transfizierten EL-4 Klonen direkt im *in vitro* Kinaseassay untersucht werden. Dazu wurden die Zellen nach der Stimulation in 100 µl JNK-Lysepuffer lysiert. Nach dem Abtrennen von Kernen und Zelldebris wurde die Proteinkonzentration der cytosolischen Extrakte bestimmt (siehe 2.6.3).

---

\* poly(dIdC), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

<sup>†</sup> GST-cJun(1-79): Stratagene (Heidelberg)

### 2.10.2 JNK *in vitro* Kinaseassay

Die JNK-Immunpräzipitate oder 1 µg cytosolisches Protein wurden bei 30°C mit GST-cJun(1-79) und [<sup>32</sup>P]γ-ATP inkubiert:

**Kinase Reaktionsansatz:**

1 µg cytosolisches Protein oder  
Protein-G-Sepharose-Beads  
4 µl 10x JNK-Kinasepuffer  
1 µg GST-cJUN(1-79)  
2 µCi [<sup>32</sup>P]γ-ATP  
25 µM ATP (unmarkiert)  
ad 40 µl bidest. H<sub>2</sub>O

Die Reaktion wurde durch Erhitzen mit 3xLaemmli-Puffer gestoppt (10 min., 95°C). Die Auftrennung und Detektion der phosphorylierten Proteine erfolgte in einer 12,5% SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie (siehe 2.7.3).

## 2.11 IL-2 ELISA

Die IL-1 abhängige IL-2 Sezernierung von EL-4 Zellen wurde mit Hilfe eines ELISA (Enzymgekoppelter Immunadsorptionsassay) nachgewiesen.

Dazu wurden die Zellen mit 10 ng/ml IL-1β für 20 Stunden im Brutschrank stimuliert. Der Nachweis von IL-2 in den Zellkulturüberständen erfolgte unter Verwendung eines ELISA Kit\*. Zunächst wurde der Erstantikörper auf adsorbierenden Mikrotiterplatten<sup>†</sup> immobilisiert. Die zellfreien Kulturüberstände wurden unverdünnt oder mit Medium verdünnt in den ELISA eingesetzt. Inkubation mit Zweitantikörper und Enzymnachweisreaktion wurden mit den entsprechenden Reagenzien nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm durch Vergleich mit einer IL-2 Standardreihe.

---

\* DuoSet mouse IL-2, Genzyme (Rüsselsheim)

† Maxisorb, Nunc (Wiesbaden)

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der Testsysteme

##### 3.1.1 Aktivierung humaner IRAK in der Mauszelllinie EL-4

Zur Untersuchung des Einflusses von IRAK auf die Interleukin-1 Signaltransduktion wurden stabil und transient transfizierte Sublinien der Maus T-Zelle EL-4 verwendet.

Bei den bereits beschriebenen und charakterisierten EL-4 Sublinien IRAK-11, -19 und -30 [139] handelt es sich um Zellklone, die humane IRAK exprimieren. Um klonale Artefakte auszuschließen, wurden alle hier beschriebenen Experimente mit mindestens zwei verschiedenen Klonen durchgeführt. Als Kontrolle diente die Mutterlinie EL-4 6.1, sowie EL-4 6-pc, die durch stabile Transfektion mit dem Kontrollplasmid pcDNA3 generiert wurde. Da sich weder IRAK Klone noch Kontrollzellen untereinander in den untersuchten Parametern qualitativ unterscheiden, ist zur besseren Übersicht jeweils nur ein repräsentativer Klon (IRAK-19) und eine Kontrolllinie (i.d.R. EL-4 6-pc, vereinfachter Name „EL-4“) dargestellt.

Cao *et al.* hatten in der humanen Zelllinie 293RI erstmals gezeigt, daß IRAK nach IL-1 Stimulation an den aktivierten Rezeptorkomplex rekrutiert wird und sich selbst phosphoryliert [122]. Da die stabil transfizierten IRAK Klone ein spezieübergreifendes System darstellen, wurde zunächst überprüft, ob sich humane IRAK in den murinen Klonen in vergleichbarer Weise an den IL-1 Rezeptorkomplex rekrutieren und aktivieren läßt.

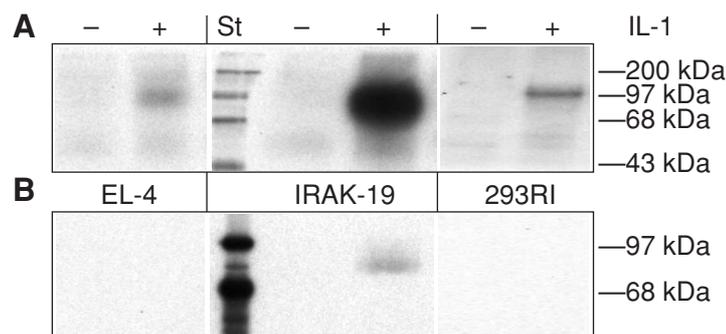


Abb. 4: Nachweis der IRAK Aktivierung.  $2 \times 10^7$  Zellen wurden 10 min. mit 10 ng/ml IL-1 stimuliert (+) oder unstimuliert gelassen. Rezeptorkomplexe wurden mit Antikörpern gegen IL-1 RI aus Zellextrakten präzipitiert. A: *In vitro* Kinaseassay. B:  $\alpha$ IRAK Westernblot.

Sowohl in Maus EL-4 als auch in humanen 293RI Zellen läßt sich nach IL-1 Stimulation in den IL-1RI Immunpräzipitaten eine Kinaseaktivität detektieren (Abb. 4A). Das *in vitro* phosphorylierte Protein hat ein apparentes Molekulargewicht von ca. 100 kDa. IRAK Überexpression in IRAK-19 führt zu einer deutlichen Verstärkung des kopräzipitierten Kinasesignals, das sich im Westernblot als humane IRAK identifizieren läßt (Abb. 4B). In

EL-4 mißlingt der immunochemische Nachweis von IRAK, obwohl das verwendete Antiserum mit muriner IRAK kreuzreagiert (siehe Abb. 13). Da in 293RI ebenfalls kein IRAK Protein nachgewiesen werden konnte, ist dieses am ehesten auf die geringe kopräzipitierte Proteinmenge zurückzuführen. Direkte Immunpräzipitation humaner IRAK liefert im *in vitro* Kinaseassay qualitativ das gleiche Ergebnis wie die Immunpräzipitation des Rezeptorkomplexes. Die Aktivierung von IRAK ist IL-1 abhängig und in diesem Fall läßt sich auch in 293RI das Kinasesignal im Westernblot als humane IRAK identifizieren (ohne Abb.).

Humane IRAK läßt sich im speziesübergreifenden System demnach IL-1 spezifisch an den Maus IL-1 Rezeptorkomplex rekrutieren und wird als Kinase aktiv. Ein qualitativer Unterschied zu endogener muriner IRAK in EL-4 oder zu humaner IRAK in 293RI ist nicht festzustellen. Da humane IRAK in IRAK-19 zusätzlich zur endogenen exprimiert wird, ist jedoch eine deutliche Verstärkung der Kinaseaktivität zu beobachten.

### 3.1.2 Transiente Expression cytosolischer Proteine in EL-4 Sublinien

Zur Untersuchung von IRAK in der IL-1 Signaltransduktion wurden EL-4 Sublinien mit der DEAE-Dextran Methode transfiziert. DEAE-Dextran führt zeit- und konzentrationsabhängig zu morphologischen Schäden, daher war es notwendig, die Transfektionsbedingungen zu optimieren. Um die Effizienz dieser Methode zur transienten Expression cytosolischer Proteine in EL-4 zu testen, wurden geringe Mengen eines Reportergenplasmides transfiziert, das GFP (grün-fluoreszierendes Protein) kodiert. GFP wurde anschließend direkt durchfluß-cytometrisch im FACS (*fluorescence activated cell scanner*) nachgewiesen. Über die Vorwärtsstreuung ließen sich zusätzlich Aussagen über die Schädigung der Zellen treffen.

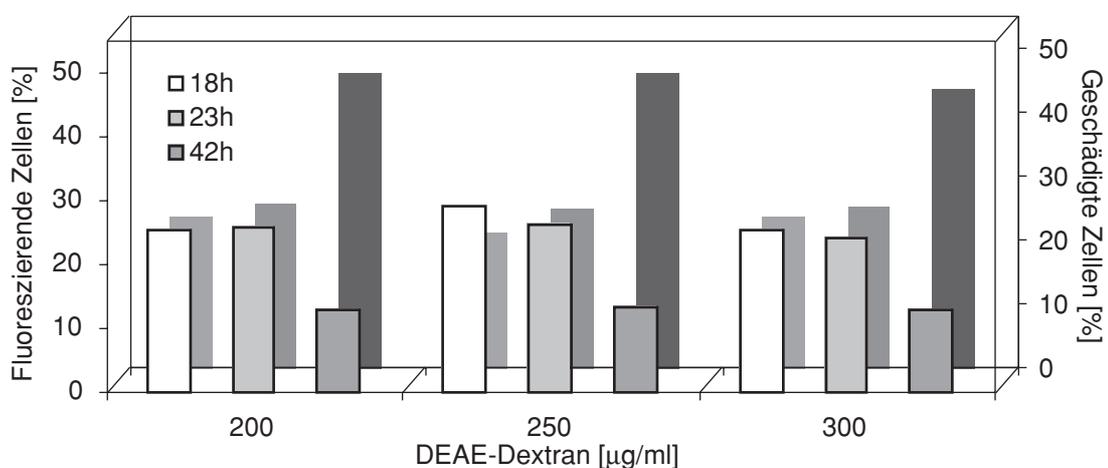


Abb. 5: Optimierung der Transfektionsbedingungen für EL-4 6.1 mit DEAE-Dextran. Zellen wurden mit 0,2 µg pEGFP-C1 transfiziert. Nach den angegebenen Zeiten wurde im FACS die Fluoreszenz und Vorwärtsstreuung gemessen. Durch Vergleich der Profile mit untransfizierten Zellen wurde der prozentuale Anteil fluoreszierender (vorne, linke Achse) und geschädigter Zellen (hinten, rechte Achse) ermittelt.

Die GFP Expression erreicht ihr Maximum bereits 18 Stunden nach der Transfektion und nimmt danach kontinuierlich ab (Abb. 5). Gleichzeitig steigt die Zahl der geschädigten Zellen von 20-25% nach 18 auf ca. 45% nach 42 Stunden an. Die DEAE-Dextran Konzentration wirkt sich im untersuchten Bereich nur geringfügig aus. Insgesamt ist das Verhältnis von fluoreszierenden zu geschädigten Zellen im Zeitbereich bis 23 Stunden bei einer DEAE-Dextran Konzentration von 250 µg/ml am günstigsten. Die Transfektionseffizienz erreicht dabei bis zu 30% transfizierte Zellen. In den folgenden Experimenten wurden daher 250 µg/ml DEAE-Dextran eingesetzt und die Zellen spätestens 24h nach Transfektion analysiert.

### **3.1.3 Domänenstruktur von IRAK, Mutagenesestrategie**

Für humane IRAK wurde ein Sequenz- und Mustervergleich gegen verschiedene Proteindatenbanken durchgeführt. Mit hoher Signifikanz läßt sich IRAK in die Klasse der eukaryotischen Proteinkinasen eingruppiert. Weiterhin finden sich im N-terminalen Bereich Homologien zur sogenannten „Todesdomäne“ (*death domain*), einem Interaktionsmotiv, das vorwiegend in Proteinen der Apoptose-Signaltransduktion zu finden ist.

Anschließend wurden die identifizierten Bereiche der IRAK Proteinsequenz in einem *multiple Alignment* mit den Aminosäuresequenzen homologer Proteine aus dem IL-1 System und ähnlichen Systemen (TNF, *Drosophila* Toll) verglichen. Die Ergebnisse sind im Anhang zusammengestellt und in Abb. 6A schematisiert zusammengefaßt. Im N-terminalen Bereich findet sich das Muster von sechs alphahelikalen Segmenten wieder, das als charakteristisch für „Todesdomänen“ gilt [130] und durch Kristallstrukturanalyse einiger Vertreter, wie der *Drosophila* Proteinkinase Pelle [149], belegt ist. Der zentrale Bereich von IRAK umspannt zwölf konservierte Subdomänen, die typisch für alle eukaryotischen Proteinkinasen sind [150, 151]. Hochkonserviert sind eine putative ATP Bindungsregion in den Subdomänen I/II sowie eine Homologieregion in Subdomäne VIb, die charakteristisch für Serin/Threoninspezifische Proteinkinasen ist. Zum C-terminalen Bereich von IRAK finden sich keinerlei Homologien in den Datenbanken.

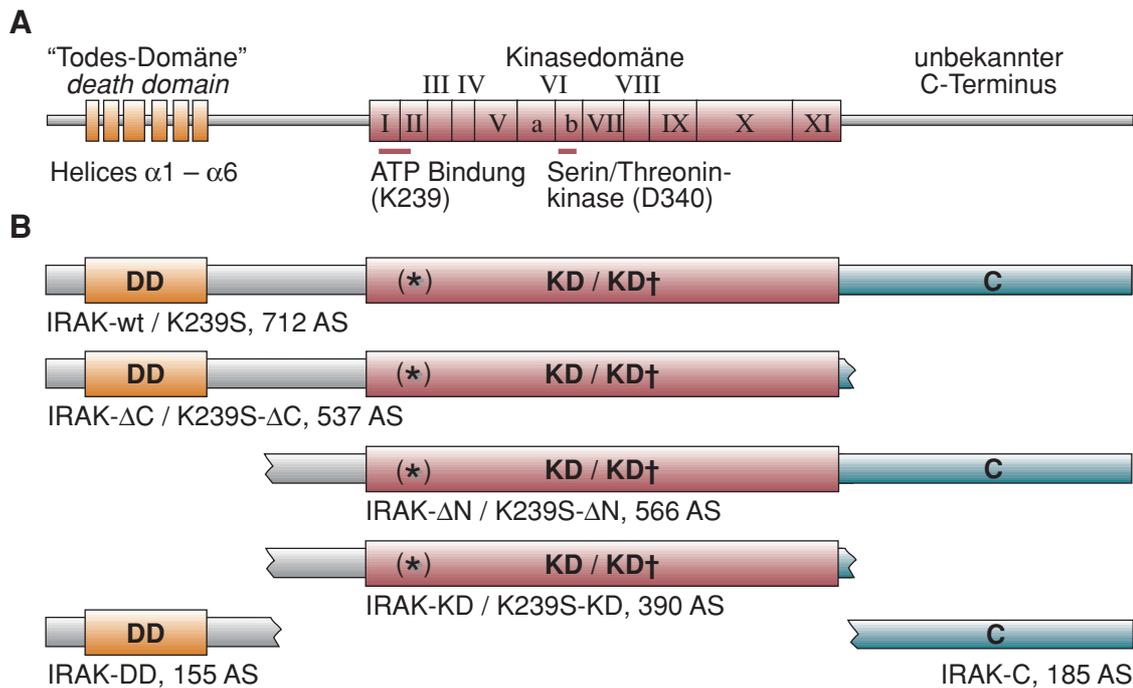


Abb. 6: Domänenstruktur von IRAK. A: Homologiebereiche aus Datenbankanalysen. B: Mutations- und Fragmentierungsstrategie zur Untersuchung von IRAK in der IL-1 Signaltransduktion. DD=*death domain*, KD=Kinasedomäne, C=C-terminaler Bereich. Die Kinasedomäne mit Punktmutation in der ATP-Bindungsstelle Lys239→Ser (K239S, gekennzeichnet mit \*) wird als KD† bezeichnet.

Auf Basis der Sequenzinformationen wurde eine Serie von eukaryotischen Expressionsplasmiden kloniert, die jeweils einzelne Strukturbereiche mit N-terminalem FLAG-Epitop unter Kontrolle des CMV-Promotors kodieren (Abb. 6B). IRAK-wt bezeichnet die vollständige humane IRAK, - $\Delta$ C eine Mutante ohne C-terminalen Bereich, und - $\Delta$ N ein Fragment, dem der N-Terminus mit der putativen „Todesdomäne“ fehlt. -DD, -KD und -C repräsentieren die Einzeldomänen. Konstrukte mit Punktmutation im konservierten Rest K239 der ATP-Bindungsstelle werden im Folgenden als „K239S-Fragmentname“ bezeichnet, ihre Kinasedomäne ist mit „KD†“ als kinaseinaktiv gekennzeichnet. Formen mit der Wildtyp-Kinasedomäne werden als „IRAK-Fragmentname“ bezeichnet. Die erhaltenen Plasmide wurden einer Restriktionskartierung unterzogen. Positive Klone wurden zusätzlich sequenziert.

Abb. 7A zeigt die Restriktionsanalyse je eines positiven Klons der pFL-IRAK Plasmide. Auf der linken Seite sind die *EheI/BglIII* Schnittstellen in Vektor und den verschiedenen *Inserts* markiert. daneben ist das Laufverhalten der entstehenden Fragmente in einer Gelsimulation wiedergegeben. Der rechte Teil zeigt die Auftrennung der Fragmente nach Doppelrestriktion mit *EheI/BglIII* auf einem 1,0% Agarosegel. Es ist deutlich zu erkennen, daß alle Plasmide das erwartete Schnittmuster aufweisen.

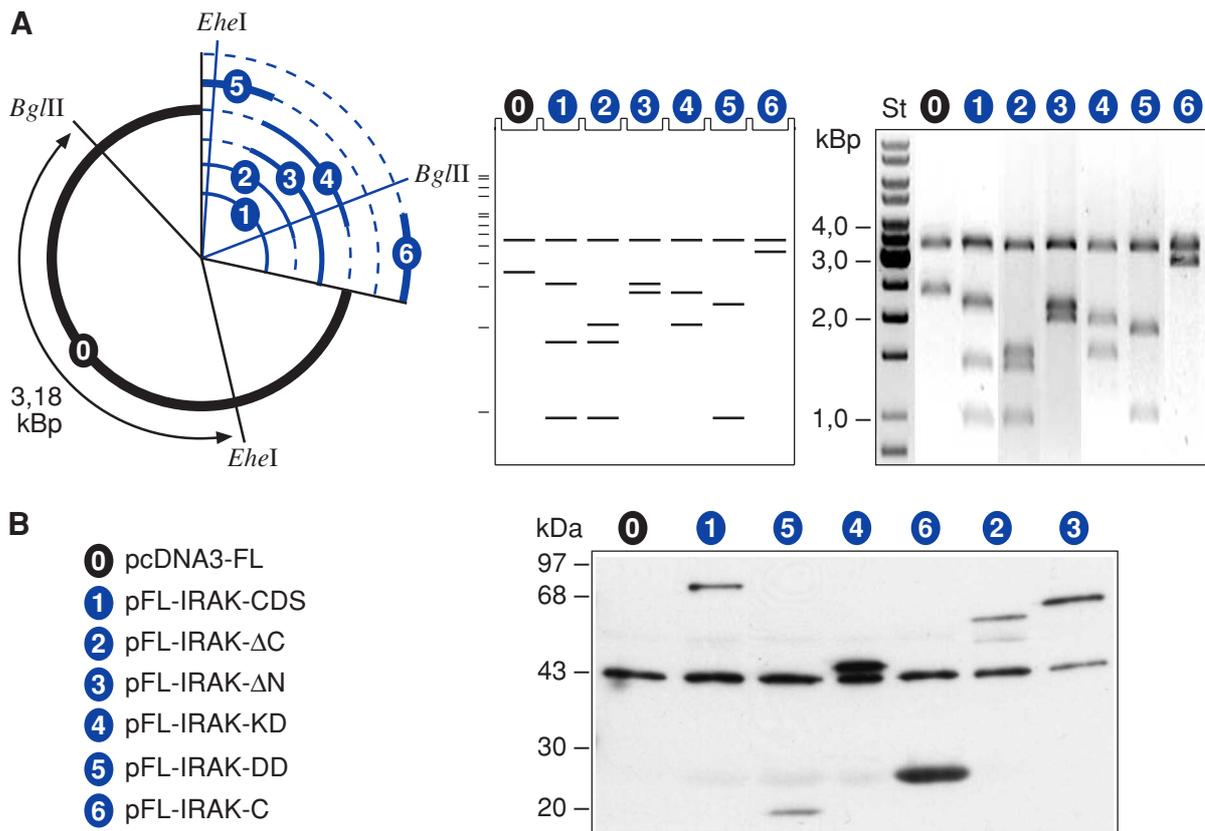


Abb. 7: Überprüfung der verschiedenen IRAK Expressionskonstrukte. A: Kartierung der „pFL-IRAK“ Plasmide durch *EheI*/*BglIII* Doppelrestriktion. B: Überprüfung der Expression im  $\alpha$ FLAG Westernblot.  $5 \times 10^6$  EL-4 6.1 wurden mit je 0,5  $\mu$ g der angegebenen Expressionsplasmide transfiziert. FLAG-Epitop markierte Proteine wurden 24h nach Transfektion aus Zellysaten mit M2-Agarose präzipitiert.

Zusätzlich wurde eine Probetransfektion von EL-4 6.1 Zellen durchgeführt (Abb. 7B). Die IRAK-Varianten wurden über das FLAG-Epitop präzipitiert und ihre Expression in einem  $\alpha$ FLAG Westernblot überprüft. Dabei zeigte sich, daß alle Konstrukte mit intaktem FLAG-Epitop exprimiert werden. Während in Kontrollvektor-transfizierten Zellen lediglich eine konstitutive Bande bei 43 kDa auftritt, wird von allen pFL-IRAK Konstrukten Protein mit einem apparenten Molekulargewicht exprimiert, das in etwa der berechneten Größe entspricht (CDS: 76, DD: 17, KD: 42, C: 20,  $\Delta$ C: 57,  $\Delta$ N: 60 kDa). Die Expression von IRAK-KD und -C ist gegenüber den anderen Produkten leicht erhöht. Entsprechende Kontrollexperimente wurden ebenfalls mit den kinaseinaktiven IRAK-Konstrukten durchgeführt (pFL-K239S, ohne Abb.). Westernblotanalysen zur Expressionskontrolle sind unter 3.4.3 wiedergegeben.

### 3.2 IRAK Expression und Aktivierung von NF $\kappa$ B

Vorergebnisse hatten gezeigt, daß die stabile Überexpression von IRAK in EL-4 zu einer Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve der IL-1 induzierten IL-2 Produktion führt. Dieses war mit einer erhöhten DNA-Bindekapazität des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B in Zusammenhang gebracht worden [139]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, auf welche Art und Weise Überexpression von IRAK die Aktivität von NF $\kappa$ B beeinflusst.

#### 3.2.1 Einfluß der IRAK Expression auf die transaktivierende Aktivität von NF $\kappa$ B

Der Einfluß von IRAK auf die transaktivierende Aktivität von NF $\kappa$ B wurde in einem NF $\kappa$ B-abhängigen Reporterassay untersucht.

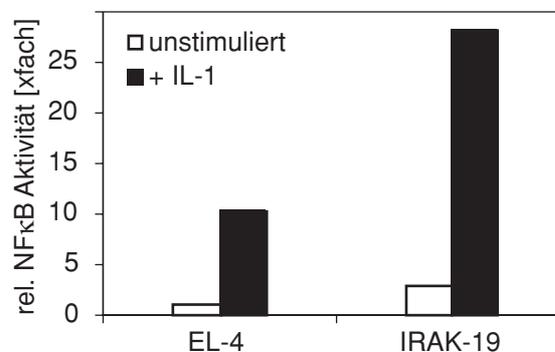


Abb. 8: NF $\kappa$ B Reporterassay.  $5 \times 10^6$  Zellen wurden mit  $0,5 \mu\text{g}$  5xNF $\kappa$ B-luc transfiziert und 20h mit 10 ng/ml IL-1 stimuliert (+IL-1) oder unstimuliert gelassen. Die NF $\kappa$ B abhängige Expression des Luciferase Reportergens wurde in cytosolischen Extrakten mit einer Lumineszenzreaktion bestimmt. Die Luciferaseaktivität wurde mit Hilfe der Proteinkonzentration normiert.

In Kontrollzellen führt Stimulation mit IL-1 zu einer etwa zehnfachen Induktion der Reporterexpression (Abb. 8). IRAK-19 zeigt neben einer leichten, konstitutiven Aktivität eine Verdreifachung der IL-1 stimulierten NF $\kappa$ B Reporterexpression im Vergleich zu stimulierten Kontrollzellen.

#### 3.2.2 Einfluß der IRAK Expression auf die Zusammensetzung und Translokation der NF $\kappa$ B Komplexe

NF $\kappa$ B besteht aus Homo- und Heterodimeren der *rel*-Familie, die in unstimulierten Zellen mit der inhibitorischen Untereinheit I $\kappa$ B komplexiert im Cytosol vorliegen. Nach der IL-1 stimulierten Dissoziation von I $\kappa$ B transloziert NF $\kappa$ B in den Kern und kann dort DNA Zielsequenzen binden.

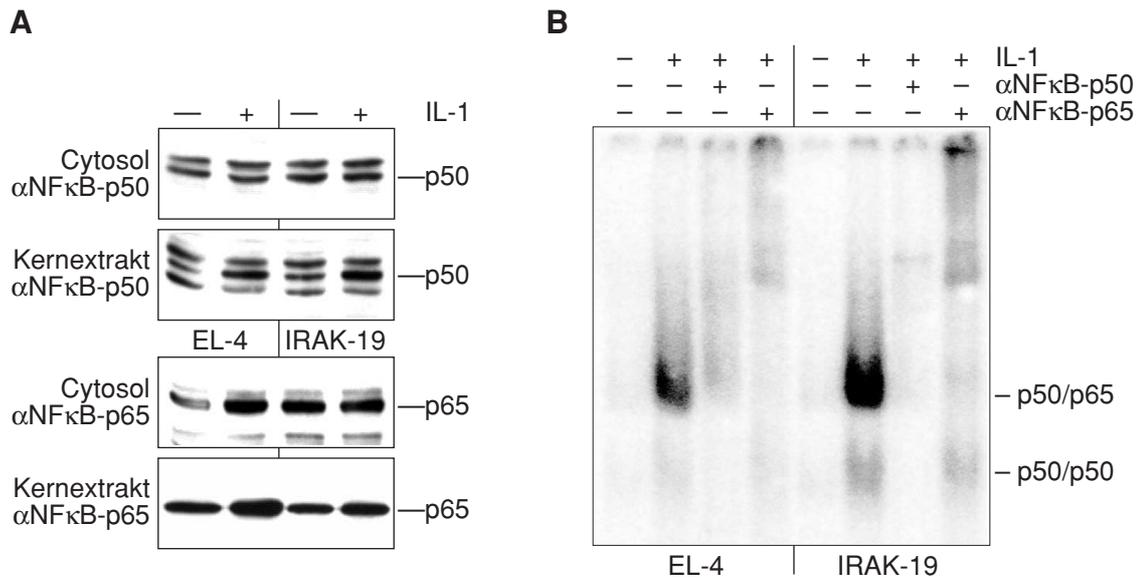


Abb. 9: IL-1 aktivierte Translokation und DNA Bindung von NFκB.  $10^7$  Zellen wurden 15 min. mit 10 ng/ml IL-1 stimuliert (+) oder unstimuliert gelassen (-). Anschließend wurden Cytosole und Kernextrakte präpariert.

A: Westernblotanalyse der NFκB Untereinheiten mit αNFκB-p50 und -p65. B: EMSA mit Kernextrakten, *supershift* mit αNFκB-p50 und -p65 (Autoradiographie).

Die Expression und Translokation der NFκB Untereinheiten wurde im Westernblot unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen p50 und p65 untersucht. Kurze Stimulation mit IL-1 führt nicht zu einer sichtbaren Reduktion des cytosolischen Pools der NFκB Untereinheiten (Abb. 9A, Reihe 1,3). In den Kernextrakten ist dagegen sowohl für p50 als auch für p65 eine Zunahme der Bandenintensität nach IL-1 Stimulation zu erkennen (Abb. 9A, Reihe 2,4). Da die Kerne nach Abtrennung des Cytosols nicht weiter gereinigt wurden, sind bereits in Kernextrakten unstimulierter Zellen deutliche Signale für beide NFκB Untereinheiten detektierbar. Weder das Expressionsmuster von NFκB-p50 und -p65, noch das Muster der IL-1 stimulierten Translokation beider Untereinheiten in den Kern ist in IRAK-19 gegenüber Kontrollzellen verändert.

Die Bindung des aktivierten Transkriptionsfaktors an seine DNA Zielsequenz kann mit Hilfe der Gelretardation solcher DNA-Protein Komplexe (*shift*) nachgewiesen werden. Zusätzlich kann durch Verwendung spezifischer Antikörper gegen NFκB Untereinheiten die Identität der Komplexe nachgewiesen werden (*supershift*, *Kompetition*). Die verwendeten Antikörper gegen NFκB-p50 und -p65 führen hauptsächlich zu einer Reduktion der *shift* Banden, da sie die DNA Bindung sterisch behindern, *supershift* Banden sind nur sehr schwach ausgeprägt (Abb. 9B). Nach Stimulation mit IL-1 lassen sich zwei unterschiedliche, DNA-bindende Komplexe in den Kernextrakten nachweisen. Der größere Komplex läßt sich sowohl mit αNFκB-p50 als auch mit αNFκB-p65 verdrängen, es handelt sich demnach um p50/p65

Heterodimere. Der kleinere, schwächer ausgeprägte Komplex besteht wahrscheinlich aus p50/p50 Homodimeren, da er sich nur durch  $\alpha$ NF $\kappa$ B-p50 verdrängen läßt. Während die Gesamtintensität des IL-1 stimulierten Signals bei IRAK-19 stärker ausfällt, läßt weder die qualitative Zusammensetzung der NF $\kappa$ B Komplexe noch das Verhältnis der DNA-bindenden NF $\kappa$ B Dimere einen Unterschied zu den Kontrollzellen erkennen (Abb. 9B).

### 3.2.3 Einfluß der IRAK Expression auf die Dosis- und Zeitabhängigkeit der NF $\kappa$ B Aktivierung

Die Dosis- und Zeitabhängigkeit der IL-1 stimulierten NF $\kappa$ B Aktivierung wurde mit Kernextrakten stimulierter Zellen in einem EMSA untersucht.

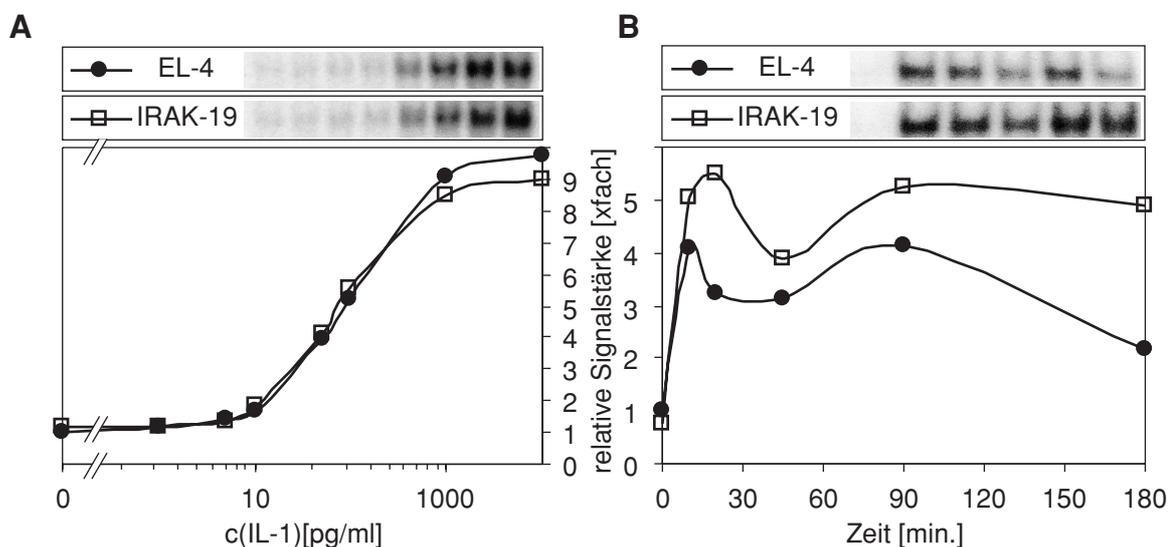


Abb. 10: Semiquantitativer NF $\kappa$ B EMSA. Aus IL-1 stimulierten Zellen wurden Kernproteine extrahiert und im EMSA untersucht. Die Signalintensitäten der Autoradiographien (obere Reihe) wurden densitometrisch ausgewertet und auf die Proteinkonzentration der Kernextraktverdünnungen normiert. A. IL-1 Konzentrationsreihe (Stimulation 60 min.) B. Kinetik (Stimulation mit 1,0 ng/ml IL-1)

Die IL-1 stimulierte DNA Bindeaktivität von NF $\kappa$ B zeigt eine sigmoide Dosis-Wirkungsabhängigkeit. IRAK-19 läßt weder eine veränderte Potenz noch Unterschiede in der Effizienz der IL-1 Wirkung im Vergleich zu Kontrollzellen erkennen (Abb. 10A). Sowohl in EL-4 als auch in IRAK-19 wird eine Maximalwirkung der gleichen Größenordnung bei einer halbmaximalen Wirkung ( $ED_{50}$ ) von ca. 100 pg/ml IL-1 erreicht.

Die Zeitabhängigkeit der NF $\kappa$ B Bindeaktivität verläuft sowohl in Kontrollzellen als auch in IRAK-19 in zwei Phasen. Ein erstes Maximum wird bereits nach 10 bis 15 min. durchlaufen, es folgt ein zweites Maximum bei ca. 90 min., danach läßt die NF $\kappa$ B Aktivität kontinuierlich nach (Abb. 10B). Bis zum ersten Maximum verlaufen die Kurven von IRAK-19 und Kontrollzellen mit einer ähnlichen Zeitabhängigkeit, anschließend ist die Signalintensität bei IRAK-19 insgesamt höher und die Deaktivierung verläuft deutlich verlangsamt. Während die

Signalstärke der EL-4 Kontrollzellen nach 180 min. auf unter 40% ihres Maximum abge-sunken ist, zeigen IRAK-19 zu diesem Zeitpunkt noch etwa 90% ihrer maximal erreichten NFκB Bindeaktivität.

IRAK-19 reagiert auf IL-1 mit einer verstärkten NFκB abhängigen Reporter-genaktivität. Ein Unterschied im Expressions-, Translokations- und DNA Bindungsmuster von NFκB ist im Vergleich zu Kontrollzellen nicht zu beobachten. Während die Dosis- Wirkungsbeziehung unverändert bleibt, zeigt IRAK-19 eine verlängerte Kinetik der IL-1 stimulierten NFκB Aktivierung im Vergleich zu Kontrollzellen.

### 3.2.4 IRAK Expression und Aktivierung der cJun N-terminalen Kinase (JNK)

Stress-aktivierte Proteinkinasen, z.B. die cJun N-terminale Kinase (JNK), sind neben ihrer Rolle in der zellulären Stressantwort in vielen Zelltypen an der Regulation der IL-1 induzierten Genexpression beteiligt. Um den Einfluß der IRAK Expression auf diesen Signalweg zu untersuchen, wurde die IL-1 stimulierte Aktivierung der JNK in einem *in vitro* Kinase-assay mit dem hochspezifischen Substrat cJun(1-79) gemessen. Um die Signalstärken verschiedener Autoradiographien miteinander vergleichen zu können, wurde auf allen Gelen eine Referenzprobe bekannter Aktivität mitgeführt. Diese wurde zur Normierung der verschiedenen Versuchsreihen herangezogen.

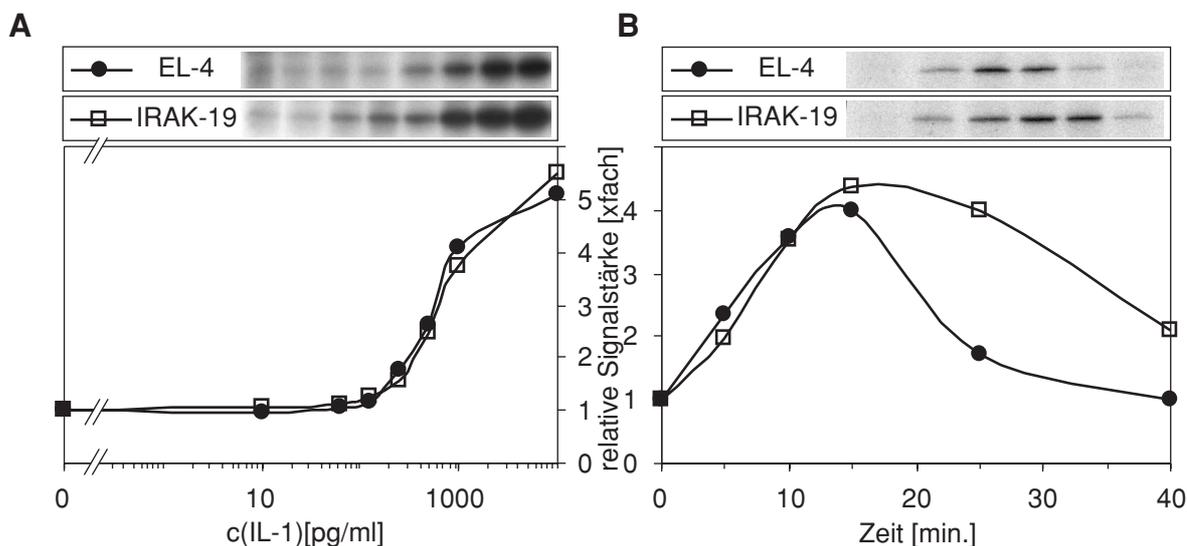


Abb. 11: Semiquantitativer *in vitro* JNK Assay. Zellen wurden mit IL-1 stimuliert und cytosolische Proteine extrahiert. 1 µg Gesamtprotein wurde in einen *in vitro* Kinaseassay mit dem Substrat GST-cJun(1-79) eingesetzt. Die Signalintensitäten der Autoradiographien (obere Reihe) wurden densitometrisch ausgewertet und mit Hilfe einer Referenzprobe normiert. A. IL-1 Konzentrationsreihe (Stimulation 15 min.).

B. Kinetik (Stimulation mit 10 ng/ml IL-1).

Die Dosisabhängigkeit der IL-1 stimulierten cJun Phosphorylierung zeigt einen sigmoiden Verlauf. Sowohl in Kontrollzellen, als auch in IRAK-19 liegt die halbmaximale Wirkung ( $ED_{50}$ ) bei etwa 500 pg/ml IL-1, der erreichte Maximalwert liegt ebenfalls in derselben Größenordnung (Abb. 11A). Die Aktivierung der JNK durch IL-1 ist schnell und transient, sie erreicht ihr Maximum nach ca. 15 min. und nimmt dann wieder ab (Abb. 11B). Während IRAK-19 in der Aktivierungsphase keinen Unterschied zu Kontrollzellen zeigt, verläuft die Deaktivierung verzögert. EL-4 erreichen nach 40 min. wieder den Basalwert unstimulierter Zellen. Zu diesem Zeitpunkt ist in IRAK-19 noch ein Drittel der maximalen JNK Aktivität nachzuweisen.

### **3.3 Die Rolle der verschiedenen IRAK Domänen in der IL-1 Signaltransduktion**

#### **3.3.1 Einfluß von IRAK-Fragmenten auf die IL-1 stimulierte NF $\kappa$ B Aktivierung**

Um der Frage nachzugehen, welche Bereiche im IRAK Molekül für die biologische Wirkung verantwortlich sind, wurden verschiedene Expressionskonstrukte eingesetzt, die verkürzte Formen von IRAK mit N-terminalem FLAG-Epitop kodieren. Nachdem die plasmidkodierte Proteinexpression in transient transfizierten EL-4 6.1 bereits überprüft worden war (siehe Abb. 7B), konnte der Einfluß dieser Mutanten auf die IL-1 stimulierte NF $\kappa$ B Aktivierung in einem Reporterassay untersucht werden.

In Leervektor-transfizierten Zellen („Kontrolle“) induziert IL-1 eine 15-20fache Expression des NF $\kappa$ B abhängigen Reportergens. Der Kontrollstimulus TNF führt zu einer 5-8fachen Induktion des NF $\kappa$ B Reportergens. Neben einer leichten konstitutiven Aktivierung führt die Expression von IRAK-wt in Abhängigkeit von der transfizierten DNA Menge zu einer dramatischen Erhöhung der IL-1 stimulierten Reporteraktivität. Die TNF induzierte NF $\kappa$ B Aktivierung bleibt dagegen unbeeinflusst (Abb. 12A). Diese Beobachtung deckt sich qualitativ mit der erhöhten transaktivierenden Aktivität von NF $\kappa$ B in IRAK-19 (siehe Abb. 8). Im Gegensatz dazu läßt sich die IL-1 stimulierte Reporteraktivierung durch Expression des N-terminalen Fragmentes (IRAK-DD) abhängig von der Plasmidmenge nahezu vollständig inhibieren (Abb. 12B). Ähnlich wie bei IRAK-wt ist eine leichte konstitutive NF $\kappa$ B Aktivität zu beobachten, bei der höchsten transfizierten DNA Menge geht das Reporterensignal nach Stimulation mit IL-1 jedoch auf den Wert unstimulierter Zellen zurück, während das TNF Signal durch die Expression von IRAK-DD unbeeinflusst bleibt.

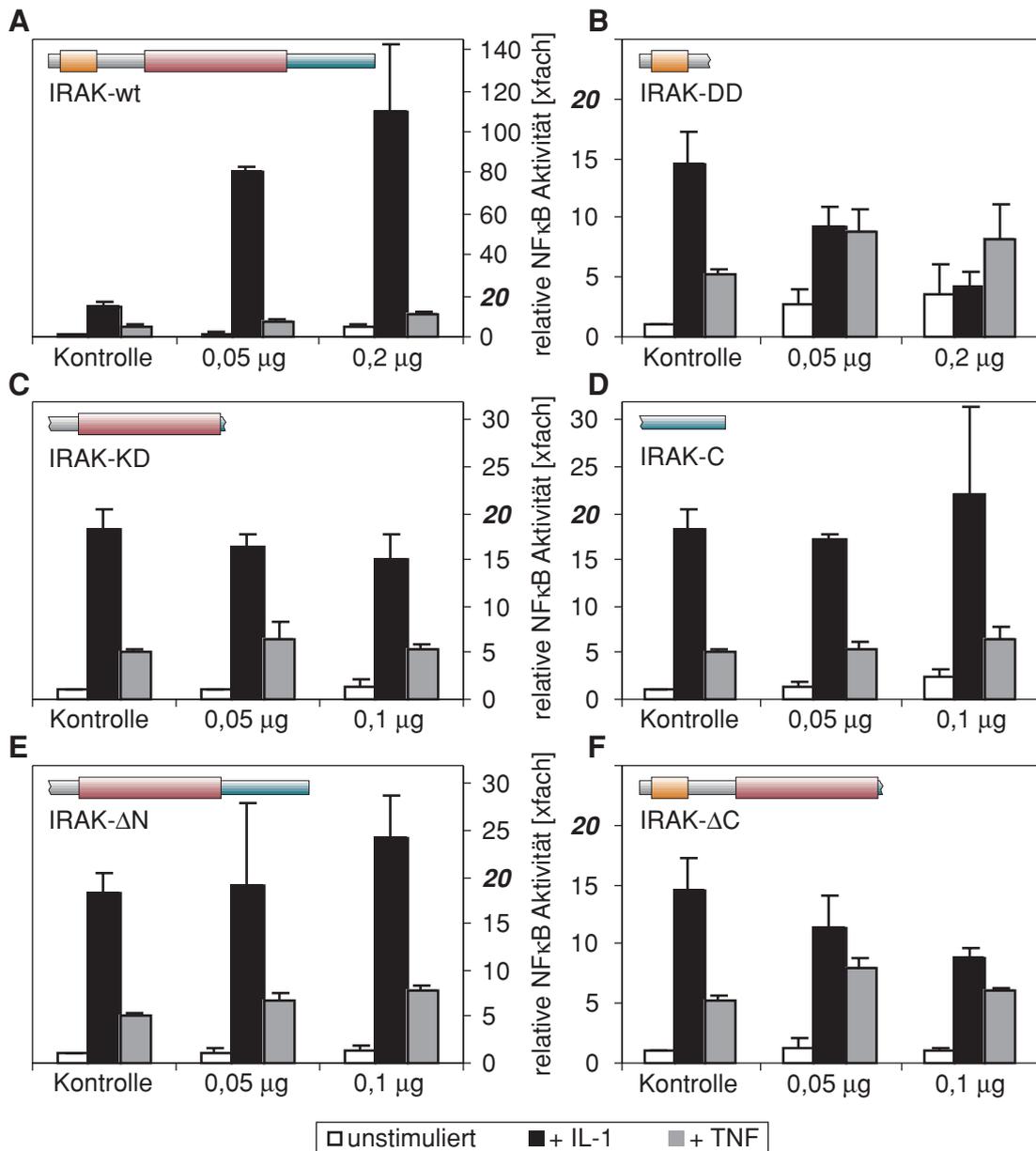


Abb. 12: NFκB Reporterassay.  $5 \times 10^6$  EL-4 6.1 pro Ansatz wurden mit den verschiedenen Plasmiden und  $0,5 \mu\text{g}$  5xNFκB-luc kotransfiziert. Die Ansätze wurden mit  $10 \text{ ng/ml}$  IL-1 (+IL-1),  $100 \text{ ng/ml}$  TNF (+TNF) oder ohne Stimulus (unstimuliert) für 20h inkubiert. Die NFκB abhängige Expression des Luciferase Reportergens wurde in cytosolischen Extrakten mit einer Lumineszenzreaktion bestimmt und mit Hilfe der Proteinkonzentration normiert.

Expression der Kinasedomäne (IRAK-KD), des C-Terminus (IRAK-C) oder einer N-terminal trunkeierten Form von IRAK (IRAK-ΔN) führt dagegen zu keiner Veränderung der Reporter-genaktivität, sowohl das IL-1 als auch das TNF stimulierte Signal entsprechen dem von kontrolltransfizierten Zellen (Abb. 12C,D,E). Wird das C-terminal verkürzte Fragment (IRAK-ΔC, Abb. 12F) in steigender Menge exprimiert, läßt sich die IL-1 abhängige Reporter-genaktivität inhibieren, während kein Effekt auf den TNF Signalweg festzustellen ist. Damit verhält sich IRAK-ΔC qualitativ wie IRAK-DD, wenn auch die Inhibition mit den verwendeten Plasmidmengen nicht vollständig ist.

Aus den beschriebenen Experimenten lassen sich mehrere Befunde ableiten. Zunächst führt die transiente Überexpression von IRAK-wt, wie die stabile Expression in IRAK-19, zu einer erhöhten, IL-1 spezifischen NFκB Aktivierung. Diese tritt nur mit dem intakten Molekül auf, trunkierte Formen zeigen diesen Effekt nicht mehr. Weiterhin wirken IRAK-Fragmente, die die N-terminale *death domain* enthalten, dominant negativ auf die IL-1 induzierte NFκB Aktivität. Fragmente, denen der N-Terminus fehlt, sind dagegen nicht in der Lage, das IL-1 Signal zu beeinflussen.

### 3.3.2 Einfluß kinaseinaktiver IRAK (K239S) auf die IL-1 Signaltransduktion

Um Aussagen über die Rolle der IRAK Kinaseaktivität in der Signalweiterleitung machen zu können, wurden Zellen mit einem Expressionskonstrukt transfiziert, das eine Punktmutation in der putativen ATP-Bindungsregion aufweist. In der mutierten IRAK (K239S) ist das konservierte Lysin239 durch Serin ersetzt (siehe 3.1.3). Der Einfluß transient exprimierter IRAK-wt und K239S auf die IL-1 stimulierte IRAK Aktivierung wurde in einem *in vitro* Kinaseassay untersucht.

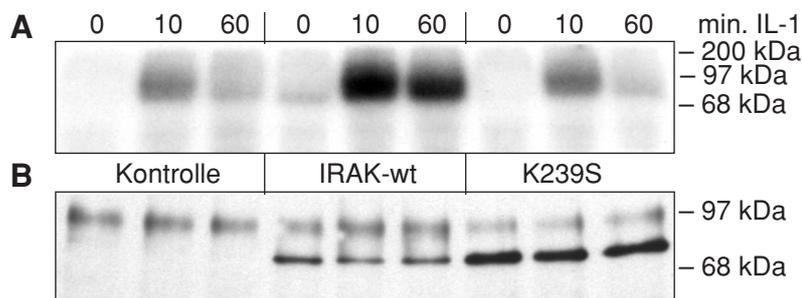


Abb. 13: IL-1 stimulierte IRAK Aktivierung bei transienter Expression von IRAK-wt und K239S.  $10^7$  EL-4 6.1 wurden mit 0,1  $\mu$ g (A) oder 0,5  $\mu$ g (B) pRK5-IRAK (IRAK-wt), IRAK K->S (K239S) oder Leervektor (Kontrolle) transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit 10 ng/ml IL-1 stimuliert. IRAK wurde aus den Zelllysaten immunpräzipitiert. A: *in vitro* Kinaseassay (Autoradiographie). B:  $\alpha$ IRAK Westernblot.

In Leervektor-transfizierten Zellen ist nach 10 min. Stimulation mit IL-1 die Autophosphorylierung endogener, muriner IRAK zu erkennen, die sich über die Kreuzreaktivität des Antikörpers präzipitieren läßt und nach 60 min. wieder abgeklungen ist (Abb. 13A, Kontrolle). Überexpression von IRAK-wt führt zu einer Verstärkung der IL-1 stimulierten Kinaseaktivität nach 10 und 60 min. Autophosphorylierte IRAK liefert eine breite, ca. 100 kDa große Phosphoproteinbande (Abb. 13A, IRAK-wt). Dagegen zeigt die Expression von K239S keinen Einfluß, es ist lediglich die Phosphorylierung endogener, muriner IRAK zu erkennen. Eine zusätzliche Kinaseaktivität oder Kreuzphosphorylierung von K239S ist *in vitro* nicht zu beobachten (Abb. 13A, K239S). Die Expression von IRAK Protein wurde im Westernblot überprüft. Während endogene, murine IRAK in EL-4 unterhalb der Nachweis-

grenze liegt, lassen sich sowohl IRAK-wt als auch K239S als spezifisches Signal bei ca. 80 kDa nachweisen (Abb. 13B). Obwohl gleiche Plasmidmengen transfiziert wurden und sich die Expressionskonstrukte lediglich durch die Punktmutation unterscheiden, läßt sich für K239S durchgehend mehr Protein nachweisen als bei Expression von IRAK-wt.

### ***Einfluß von kinaseinaktiver IRAK (K239S) auf die NFκB Aktivierung***

Mit Hilfe eines Reporterassays wurde der Effekt von K239S auf die IL-1 stimulierte NFκB Aktivierung überprüft. Wie bereits in Abb. 12 gezeigt, führt Überexpression von IRAK-wt abhängig von der transfizierten DNA Menge zur Verstärkung der IL-1 stimulierten NFκB Aktivität, während kein Einfluß auf die TNF stimulierte Reporterexpression zu beobachten ist (Abb. 14, IRAK-wt).

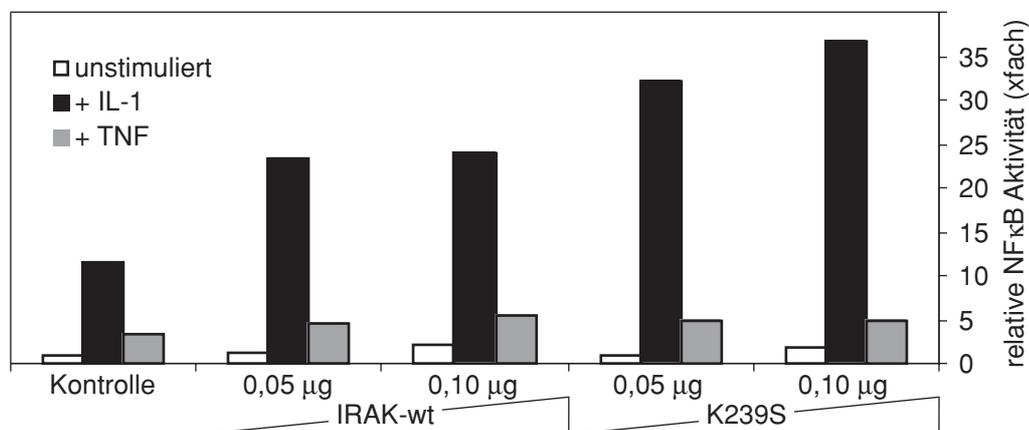


Abb. 14: NFκB Reporterassay. Durchführung wie für Abb. 12 beschrieben.

Erstaunlicherweise führt die Expression von K239S qualitativ zum gleichen Ergebnis. Im Gegensatz zu den verkürzten Formen IRAK-DD und -ΔC (siehe Abb. 12) wird die IL-1 induzierte NFκB Aktivierung nicht inhibiert, sondern deutlich gesteigert. Auch dieser Effekt ist spezifisch für IL-1, da das TNF Signal unbeeinflusst bleibt (Abb. 14, K239S).

### ***Einfluß von kinaseinaktiver IRAK (K239S) auf die Aktivierung von JNK***

Um zu überprüfen, ob der Einfluß von IRAK auf die IL-1 stimulierte Aktivierung der cJun N-terminalen Kinase (JNK) von einer intakten Kinasedomäne abhängt, wurden EL-4 Zellen, die IRAK-wt oder K239S und HA-Epitop markierte JNK1 koexpressieren, mit IL-1 oder osmotischem Schock stimuliert. Die Aktivierung der JNK wurde mit HA-JNK1 Immunpräzipitaten im *in vitro* Kinaseassay untersucht.

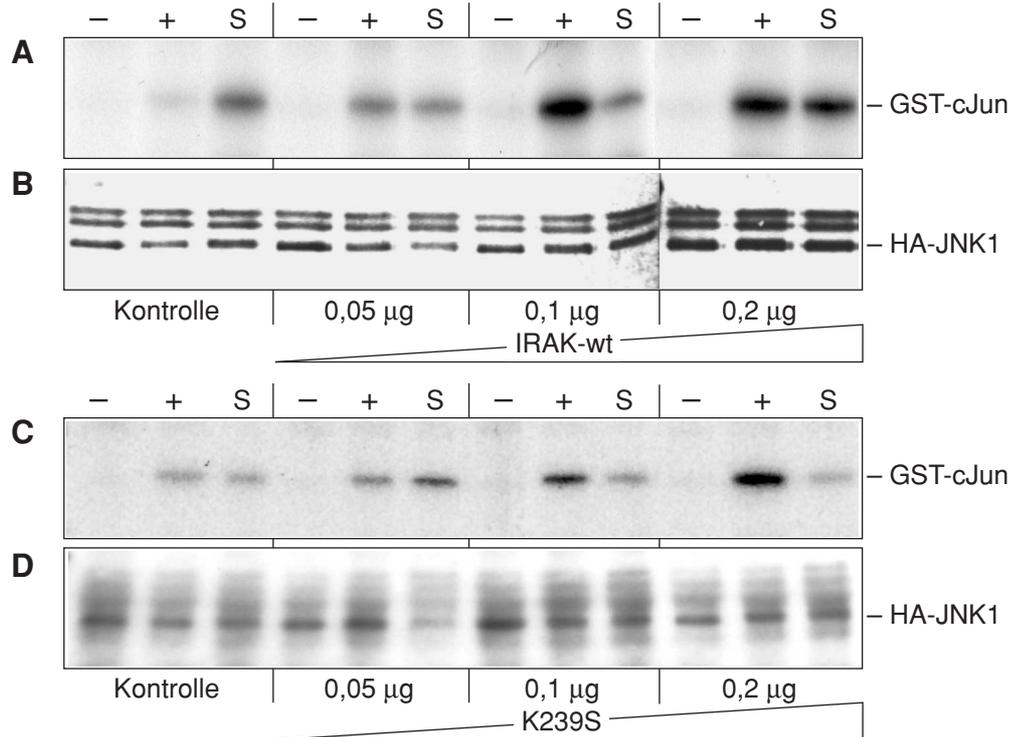


Abb. 15: *In vitro* JNK Assay.  $5 \times 10^6$  EL-4 6.1 wurden mit den angegebenen Mengen pRK5-IRAK (IRAK-wt) oder IRAK K->S (K239S) und 0,5 µg pHA-JNK1 kotransfiziert und nach 24h mit 10 ng/ml IL-1 (+) bzw. 0,5 M Sorbitol (S) für 15 min. stimuliert oder unstimuliert gelassen (-). JNK1 wurde über das HA-Epitop aus cytosolischen Extrakten präzipitiert und in einen *in vitro* Kinaseassay mit GST-cJun(1-79) eingesetzt (A,C) oder im  $\alpha$ JNK Westernblot untersucht (B,D).

In unstimulierten Zellen ist keine Phosphorylierung von GST-cJun zu beobachten (Abb. 15A,C[-]). Leervektor-transfizierte EL-4 zeigen eine schwache, IL-1 stimulierte JNK Aktivität. Expression von IRAK-wt führt in Abhängigkeit von der transfizierten Plasmidmenge zu einer deutlichen Steigerung der JNK Aktivität nach IL-1 Stimulation (Abb. 15A[+]). Auch hier liefert die Expression kinaseinaktiver IRAK (K239S) das qualitativ gleiche Ergebnis. Transfektion mit steigenden Plasmidmengen für K239S führt nicht zur Inhibition, sondern zur erhöhten Aktivität von JNK (Abb. 15C[+]). Um sicherzustellen, daß die beobachteten Effekte spezifisch für den IL-1 Signalweg sind, wurden transfizierte Zellen außerdem osmotischem Streß ausgesetzt. Das streßinduzierte JNK Signal schwankt zwar wegen der erschwerten Handhabung von hochprozentigen Sorbitollösungen, zeigt jedoch keine systematische Abhängigkeit von der IRAK-wt bzw. K239S Expression (Abb. 15A,C[S]).

Die Expressions- und Präzipitationseffizienz koexprimierter HA-JNK1 wurde im Westernblot überprüft (Abb. 15B,D). Da das verwendete Antiserum mehrere Banden detektiert, wurde die spezifische, ca. 50 kDa große JNK1 Bande durch Vergleich mit untransfizierten Zellen identifiziert (ohne Abbildung). In allen untersuchten Präzipitaten ist JNK1 nachzu-

weisen und die Signalstärke bewegt sich innerhalb eines Experimentes im selben Größenordnungsbereich.

### ***Einfluß von kinaseinaktiver IRAK (K239S) auf die IL-2 Produktion***

IL-1 induziert die Expression und Freisetzung des Cytokins IL-2 in EL-4 Zellen. Die IL-2 Produktion unstimulierter Zellen liegt unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten ELISA (15,6 pg/ml). Im Kulturmedium Leervektor-transfizierter Zellen ist nach IL-1 Stimulation ohne Kostimulus lediglich eine geringe IL-2 Konzentration von ca. 50 pg/ml nachweisbar (Abb. 16, Kontrolle).

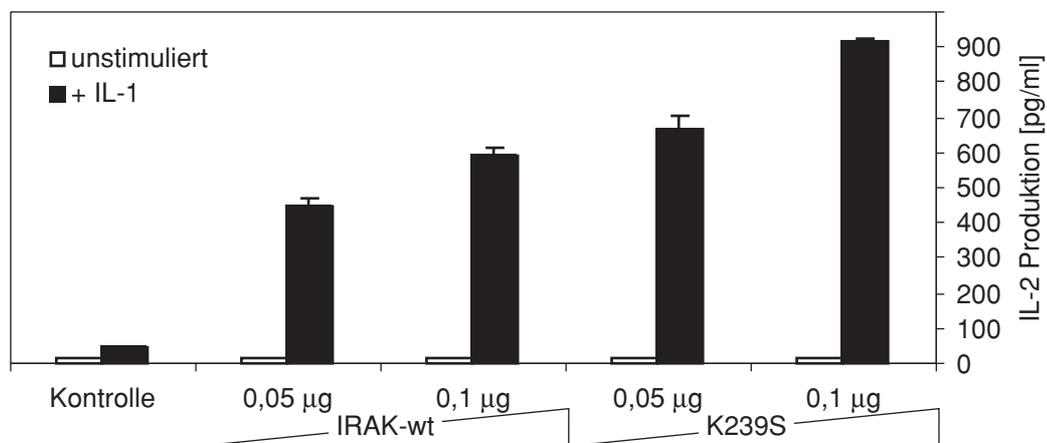


Abb. 16: IL-2 ELISA.  $5 \times 10^6$  EL-4 6.1 wurden mit den angegebenen Mengen pRK5-IRAK (IRAK-wt) oder IRAK K→S (K239S) transfiziert und in 5 ml Vollmedium 20h mit 10 ng/ml IL-1 stimuliert (+IL-1) oder unstimuliert belassen. Die IL-2 Konzentration der zellfreien Kulturüberstände wurde im IL-2 ELISA bestimmt.

Auch diese komplexe, biologische Antwort läßt sich durch Überexpression von IRAK-wt erheblich steigern. Die IL-2 Produktion IL-1 stimulierter Zellen steigt in Abhängigkeit von der transfizierten Plasmidmenge auf mehr als das zehnfache an (Abb. 16, IRAK-wt). Expression von K239S zeigt wie schon bei den zuvor beschriebenen Parametern den gleichen Effekt, die maximale IL-2 Produktion erreicht sogar bis zu 900 pg/ml (Abb. 16, K239S).

Mutierte IRAK (K239S) ist selbst nicht als Kinase aktiv. Alle gemessenen IL-1 Effekte lassen sich durch Überexpression von IRAK erheblich steigern, und zwar unabhängig davon, ob es sich um IRAK-wt oder kinaseinaktive K239S handelt. K239S ist also nicht dominant negativ für die betrachteten IL-1 Signaltransduktionsvorgänge. Betrachtet man die Quantität der IL-1 Effekte, so übersteigt bei gleicher transfizierter Plasmidmenge K239S sogar die agonistische Wirkung von IRAK-wt. Dieses mag mit den Unterschieden in der Proteinmenge zusammenhängen, die zwischen IRAK-wt und K239S im Westernblot festgestellt wurden (siehe Abb. 13).

### 3.4 Charakterisierung der Rolle und Spezifität der IRAK Autophosphorylierung

#### 3.4.1 IRAK Phosphorylierung und proteolytischer Abbau

Nach Stimulation mit IL-1 wird IRAK am Rezeptorkomplex als Kinase aktiv und phosphoryliert sich selbst. Dabei verändert sich ihr Molekulargewicht. In unstimulierten Zellen zeigt IRAK eine Größe von ca. 80 kDa und keine Kinaseaktivität. Kurze Stimulation mit IL-1 führt zu einer Vergrößerung des apparenten Molekulargewichtes, im Westernblot erscheint IRAK als breite Bande zwischen 80 und etwa 100 kDa (Abb. 17A). Dieser Effekt geht mit der Autophosphorylierung einher, IRAK Immunpräzipitate zeigen im *in vitro* Kinaseassay die gleiche Bandenform und Größe.

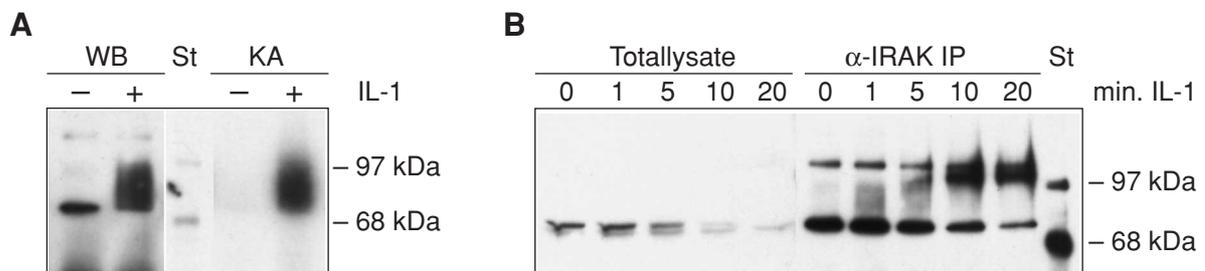


Abb. 17: IL-1 stimulierte Phosphorylierung von IRAK.  $10^7$  IRAK-19 wurden für die angegebenen Zeiten mit 10 ng/ml IL-1 stimuliert. A:  $\alpha$ IRAK Westernblot und *in vitro* Kinaseassay mit Immunpräzipitaten aus Zellen, die 10 min. mit IL-1 stimuliert (+) oder unstimuliert belassen wurden. B:  $\alpha$ IRAK Westernblot mit Totallysaten und Immunpräzipitaten aus Zellen, die für verschiedene Zeiten mit IL-1 stimuliert wurden.

Ein weiterer Effekt, der nach IL-1 Stimulation auftritt, ist die zeitabhängige Verminderung des IRAK Signals im Westernblot. In Totallysaten stimulierter Zellen verschwindet die IRAK Bande nach 20 min. fast vollständig. Wegen der geringen Proteinmenge ist in den Totallysaten nur die niedrigmolekulare Form zu detektieren. Reichert man IRAK durch Immunpräzipitation an, erkennt man, daß der stimulusabhängige Molekulargewichtsshift und das Verschwinden von IRAK Protein parallel verlaufen. Zwischen 1 und 10 min. bildet sich die hochmolekulare IRAK-Bande aus, die Intensität der 80 kDa Form nimmt dabei ab. Während die 100 kDa Bande bis 20 min. etwa konstant bleibt, nimmt die Signalstärke der niedrigmolekularen Bande weiter ab.

IL-1 stimulierte Kinaseaktivität und Molekulargewichtsshift gehen also mit einer Verminderung der detektierbaren IRAK Proteinmenge einher. Für einige, an Signaltransduktionsvorgängen beteiligte Proteine konnte gezeigt werden, daß die stimulusabhängige Phosphorylierung mit einer Polyubiquitinylierung des Proteins und anschließendem proteolytischem Abbau am Proteasom korreliert. Um zu überprüfen, ob das „Verschwinden“ von

IRAK ebenfalls mit Proteasom-abhängiger Degradation zusammenhängt, wurde ein Proteasominhibitor eingesetzt.

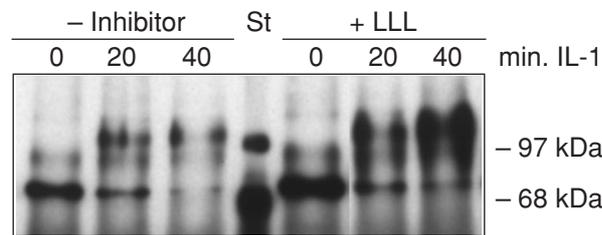


Abb. 18: Einfluß des Proteasominhibitors LLL im  $\alpha$ IRAK Westernblot.  $10^7$  IRAK-19 Zellen wurden 40 min. mit dem Proteasominhibitor LLL (MG-132, 25  $\mu$ M, rechte Seite) oder ohne Inhibitor (linke Seite) vorinkubiert und für die angegebenen Zeiten mit 10 ng/ml IL-1 stimuliert. Nach der Lyse wurde IRAK immunpräzipitiert.

Ohne Proteasominhibitor verschwindet das 80 kDa IRAK Signal nach 40 min. praktisch vollständig, während für die hochmolekulare Form noch ein Restsignal zu beobachten ist (Abb. 18, linke Seite). Werden die Zellen mit dem Proteasominhibitor LLL vorbehandelt, verschwindet das niedermolekulare Signal mit der gleichen Zeitabhängigkeit. Nach 20 und 40 min. ist jedoch eine deutliche Akkumulation der hochmolekularen Form von IRAK zu beobachten. Die Inhibition der Proteasomaktivität verhindert demnach nicht den IL-1 stimulierten Molekulargewichtss $h$ ift, verzögert jedoch das Verschwinden von IRAK Protein.

### 3.4.2 Einfluß der Phosphorylierung auf die Interaktion mit MyD88 und TRAF6

IRAK wird über das Adaptermolekül MyD88 an den aktivierten IL-1 Rezeptorkomplex rekrutiert. Anschließend interagiert IRAK mit TRAF6, ein Schritt, der essentiell für die Signalweiterleitung ist. Um den Einfluß des Phosphorylierungsstatus von IRAK auf die Fähigkeit zur Interaktion mit seinen Wechselwirkungspartnern zu untersuchen, kann man sich den Umstand zunutze machen, daß IRAK-wt, in 293 Zellen überexprimiert, konstitutiv aktiv und voll phosphoryliert ist, während K239S unphosphoryliert vorliegt. Die Interaktion von IRAK mit MyD88 und TRAF6 wurde in Koimmunpräzipitationsstudien untersucht. FLAG markierter MyD88 oder TRAF6 wurden mit unmarkierter IRAK koexprimiert und das Auftreten kopräzipitierten IRAK Proteins in  $\alpha$ FLAG Immunpräzipitaten im Westernblot nachgewiesen.

Während in Totallysaten kontrolltransfizierter Zellen keine IRAK nachzuweisen ist, liefert überexprimierte IRAK-wt ein Signal von 100 kDa (Abb. 19A). In  $\alpha$ FLAG Präzipitaten läßt sich MyD88 bei ca. 35 kDa, TRAF6 bei ca. 60 kDa detektieren, während in Kontrollpräzipitationen (K) keine Proteinbanden auftreten. Die Expression beider Proteine ist in Zellen, die IRAK-wt koexprimieren, leicht vermindert (Abb. 19B). Im  $\alpha$ IRAK Westernblot mit MyD88-FLAG Immunpräzipitaten ist keine IRAK-wt nachweisbar. Im Gegensatz dazu

wird IRAK-wt mit FLAG-TRAF6 kopräzipitiert und ist als 100 kDa Signal im  $\alpha$ IRAK Westernblot zu erkennen (Abb. 19C).

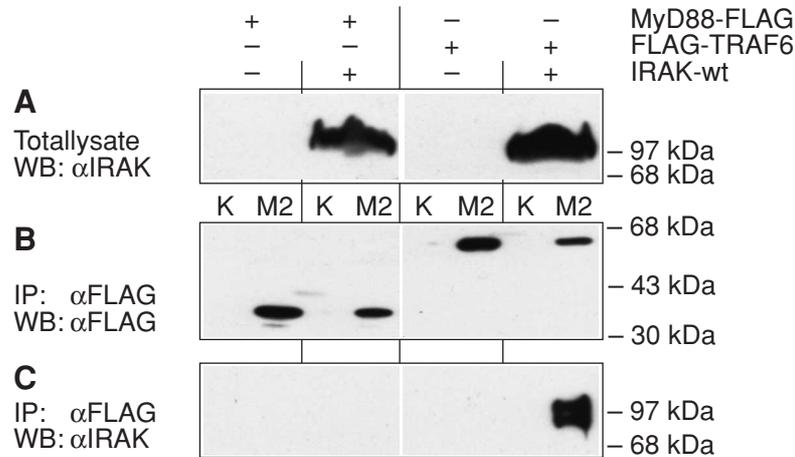


Abb. 19: Kopräzipitation von IRAK-wt mit MyD88 und TRAF6.  $3 \times 10^6$  293 Zellen wurden mit  $3 \mu\text{g}$  MyD88-FLAG bzw. FLAG-TRAF6 und ohne oder mit  $3 \mu\text{g}$  pRK5-IRAK (+ IRAK-wt) transfiziert. FLAG-Epitop markierte Proteine wurden mit M2-Agarose (M2) aus Totallysaten präzipitiert. Als Kontrolle diente die Präzipitation mit IgG-Agarose (K). A:  $\alpha$ IRAK Westernblot mit Totallysaten. B:  $\alpha$ FLAG Westernblot mit  $\alpha$ FLAG und IgG Präzipitaten. C:  $\alpha$ IRAK Westernblot mit M2 und IgG Präzipitaten.

In einem ähnlichen Experiment wurde die Wechselwirkung von MyD88 und TRAF6 mit unphosphorylierter, kinaseinaktiver IRAK (K239S) untersucht.

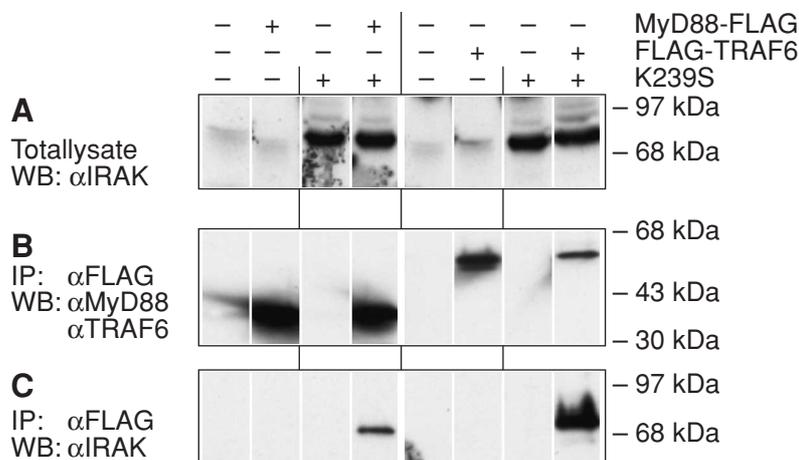


Abb. 20: Kopräzipitation von K239S mit MyD88 und TRAF6.  $3 \times 10^6$  293 Zellen wurden ohne (-) und mit  $3 \mu\text{g}$  MyD88-FLAG bzw. FLAG-TRAF6 (+) und ohne oder mit  $3 \mu\text{g}$  IRAK K $\rightarrow$ S (+ K239S) transfiziert. FLAG-Epitop markierte Proteine wurden mit M2-Agarose aus Totallysaten präzipitiert. A:  $\alpha$ IRAK Westernblot mit Totallysaten. B:  $\alpha$ MyD88 (linke Hälfte) bzw.  $\alpha$ TRAF6 (rechte Hälfte) Westernblot mit  $\alpha$ FLAG Präzipitaten. C:  $\alpha$ IRAK Westernblot mit  $\alpha$ FLAG Präzipitaten.

Im  $\alpha$ IRAK Westernblot mit Totallysaten transfizierter 293 ist K239S als Bande bei 80 kDa nachweisbar (Abb. 20A). Abb. 20B zeigt den Nachweis von MyD88-FLAG und FLAG-TRAF6 in  $\alpha$ FLAG Präzipitaten mit spezifischen Antiseren. Die Expression von FLAG-TRAF6 ist in Zellen, die K239S koexpressieren, wiederum vermindert, für MyD88-FLAG



IRAK-wt zu einer sichtbaren Steigerung des apparenten Molekulargewichtes, bei IRAK-DD ist die Expression leicht reprimiert. Abb. 21C zeigt die M2 Präzipitate im  $\alpha$ IRAK Westernblot. Lediglich K239S- $\Delta$ C und IRAK-DD sind in der Lage, IRAK-wt kopräzzipitieren. Während die Kontrollbahnen leer sind, läßt sich in Immunpräzipitaten dieser Fragmente die ca. 100 kDa Bande phosphorylierter IRAK-wt detektieren. Da das verwendete Antiserum den C-Terminus von IRAK detektiert, werden Fragmente, die diesen besitzen, ebenfalls detektiert. Daher liefert K239S- $\Delta$ N in Totallysaten und Immunpräzipitaten zusätzliche Banden bei ca. 60 kDa.

Der N-Terminus mit der putativen „Todesdomäne“ ist demnach notwendig und ausreichend, um mit IRAK-wt in Wechselwirkung zu treten. Weiterhin wurde untersucht, in welchen Bereichen die Phosphorylierung von IRAK stattfindet. Dazu wurden Immunpräzipitate kinaseaktiver IRAK-Fragmente in einen *in vitro* Kinaseassay eingesetzt. In 293 über-exprimierte IRAK- $\Delta$ C, - $\Delta$ N und -KD zeigen konstitutive Kinaseaktivität und sind in der Autoradiographie als Phosphoproteinbanden zu erkennen (Abb. 22A, obere Reihe). Banden entsprechender Größe finden sich auch im  $\alpha$ FLAG Kontrollwesternblot (Abb. 22A, untere Reihe).

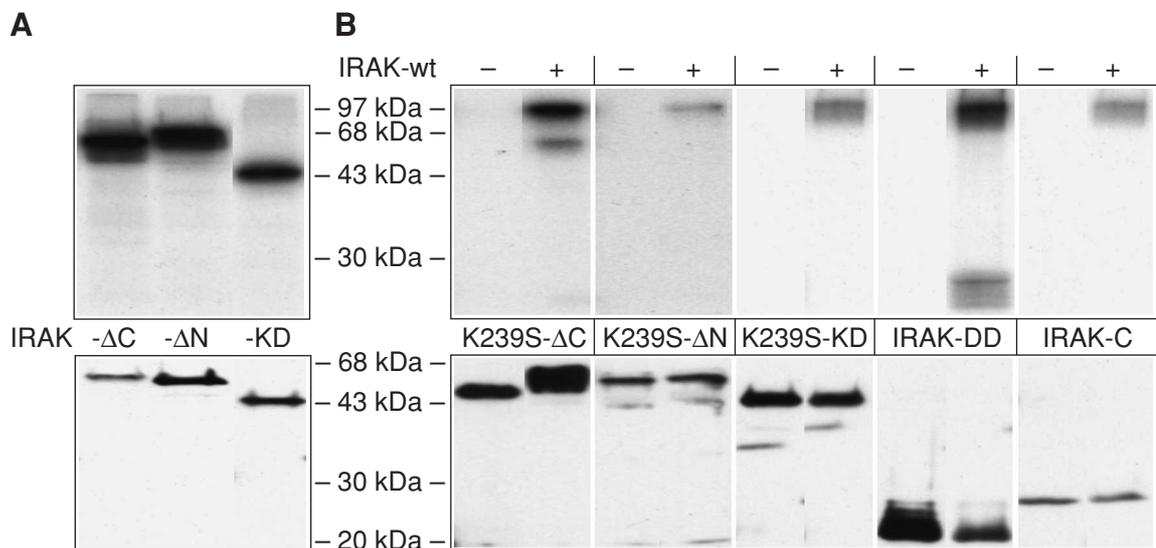


Abb. 22: Auto- und Kreuzphosphorylierung von IRAK-Fragmenten.  $3 \times 10^6$  293 wurden mit  $3 \mu\text{g}$  der angegebenen Plasmide und ohne oder mit  $3 \mu\text{g}$  pFL-IRAK-CDS (+ IRAK-wt) transfiziert. Mit den Zellysaten wurde eine  $\alpha$ Flag Immunpräzipitation durchgeführt. Ein Teil der Präzipitate wurde im *in vitro* Kinaseassay (obere Reihe), der Rest im  $\alpha$ FLAG Westernblot (untere Reihe) untersucht. A: Expression von kinaseaktiven, FLAG-IRAK-Fragmenten. B: Koexpression von FLAG markierten, kinaseinaktiven Fragmenten mit FLAG markierter IRAK-wt, erzwungene Koimmunpräzipitation.

Ob es sich bei dieser Phosphorylierung um eine intramolekulare Autophosphorylierung oder eine intermolekulare „Kreuzphosphorylierung“ handelt, wurde in einem weiteren Experiment

durch Koexpression von kinaseinaktiven IRAK-Fragmenten mit kinaseaktiver IRAK-wt untersucht. Wie gezeigt, sind nur solche Proteinvarianten in der Lage, mit IRAK in Wechselwirkung zu treten, die den N-terminalen Bereich enthalten. Um sicherzustellen, daß alle Fragmente mit der Kinase in räumliche Nähe treten können, auch wenn sie aufgrund der Mutation nicht mehr als „natürliches“ Substrat dienen können, wurde eine erzwungene Koimmunpräzipitation durchgeführt. Sowohl die verkürzten Varianten, als auch IRAK-wt wurden dazu mit FLAG-Epitop exprimiert, um sie am gleichen Antikörper immobilisieren zu können.

Abb. 22B (obere Reihe) zeigt die Autoradiographie des *in vitro* Kinaseassays. Während in Kontrollbahnen keine Phosphoproteine auftreten, zeigen  $\alpha$ FLAG Immunpräzipitate aus Zellen, die IRAK-wt exprimieren, das Kinasesignal bei 100 kDa. Wird K239S- $\Delta$ C koexpressiert, so erhält man zusätzlich ein Phosphoprotein von ca. 60 kDa. Koexpression und Kopräzipitation von IRAK-DD führt ebenfalls zu einem Phosphorylierungssignal, das sich als breite Bande zwischen 20 und 30 kDa in der Autoradiographie detektieren läßt. Die anderen Fragmente lassen sich dagegen nicht durch IRAK-wt phosphorylieren, obwohl sie in den Immunpräzipitaten mit  $\alpha$ FLAG Antikörper nachzuweisen sind (Abb. 22B, untere Reihe). Auch bei längerer Belichtung der Autoradiographien treten keine zusätzlichen Phosphoproteinbanden auf (ohne Abb.). Dieses ist insbesondere im Fall von K239S- $\Delta$ N und -KD erstaunlich, da die entsprechenden kinaseaktiven Fragmente in der Lage sind, sich selbst zu phosphorylieren (siehe Abb. 22A). Wie bereits in Abb. 21 zu sehen, nimmt auch in diesem Experiment das apparente Molekulargewicht von K239S- $\Delta$ C bei Koexpression mit IRAK-wt zu, die Bande im Westernblot „shiftet“. Auch im Fall von IRAK-DD sieht man im *in vitro* Kinaseassay, daß eine Größenveränderung eintritt. Höherauflösende Gele zeigen, daß die breite Bande aus mehreren Phosphoproteinbanden besteht (ohne Abb.). Im Westernblot ist dagegen dieser Größenshift nicht ohne weiteres zu erkennen, wahrscheinlich, weil die Proteinmenge in den verschiedenen Phosphorylierungsstufen zu gering ist. Kinaseaktive IRAK- $\Delta$ C liefert im Westernblot ebenfalls eine Bande, die größer ist als das rechnerische Molekulargewicht (Abb. 22A, untere Reihe). Die Größenveränderung beruht demnach auf dem Phosphorylierungsstatus und entspricht dem Größenshift, der auch bei IRAK-wt während der Aktivierung zu beobachten ist. Bei - $\Delta$ N und -KD ist dagegen kein Unterschied in der Größe zwischen kinaseinaktiver (K239S) und kinaseaktiver, phosphorylierter Form zu erkennen.

Zwei Arten der Phosphorylierung lassen sich aus dem beschriebenen Experiment ableiten. Die Kinasedomäne allein phosphoryliert sich selbst ohne detektierbare Größenveränderung, läßt sich als kinaseinaktive Form jedoch nicht durch erzwungen kopräzipitierte IRAK-wt phosphorylieren. IRAK-Fragmente, die die N-terminale *death domain* enthalten, werden dagegen von IRAK-wt phosphoryliert und unterliegen dabei einer sichtbaren Vergrößerung des apparenten Molekulargewichtes. Da diese Formen auch in der Lage sind, direkt mit IRAK-wt zu interagieren (siehe Abb. 21), liefern Kinaseassays mit „echten“ Koimmunpräzipitaten das gleiche Bild wie mit erzwungenen Koimmunpräzipitationen (ohne Abb.). Dieser Umstand mag erklären, warum in allen durchgeführten Experimenten das Kinase-signal von IRAK-wt in Präzipitaten mit K239S- $\Delta$ C und IRAK-DD deutlich stärker ist als bei anderen Fragmenten. Wahrscheinlich wird ein Teil der IRAK-wt nicht über die Bindung an den Antikörper präzipitiert, sondern durch direkte Interaktion mit dem N-Terminus koex-primierter Fragmente.

## 4 Diskussion

Für die Untersuchung der Rolle von IRAK in der IL-1 Signaltransduktion wurde ein Modellsystem benötigt, das über alle molekularen Komponenten für die wichtigsten IL-1 stimulierbaren Signalwege verfügt und eine physiologisch relevante, biologische Antwort liefert. Die gut charakterisierte T-Zelllinie EL-4 exprimiert eine vergleichsweise hohe Anzahl von Typ I IL-1 Rezeptoren auf der Oberfläche [138]. In Subklonen wurde die IL-1 stimulierte Aktivierung von IRAK, NFκB, MAP-Kinasen, Sphingomyelinasen und die Produktion von Interleukin-2 (IL-2) in Abhängigkeit von IL-1RAcP nachgewiesen [45, 46, 111]. Des Weiteren war bekannt, daß sich EL-4 Zellen mit der DEAE-Dextran Methode transient transfizieren lassen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf die bereits beschriebenen EL-4 Sublinien IRAK-11, -19 und -30 zurückgegriffen, die humane IRAK exprimieren [139]. Der hohe Konservierungsgrad von Signalkomponenten in phylogenetisch so unterschiedlichen Systemen, wie dem humanen IL-1 Rezeptor und *Drosophila* Toll, ließen erwarten, daß humane IRAK in Mauszellen die gleichen Effekte hervorruft wie das murine Analog. Tatsächlich weist murine IRAK, die zunächst unter dem Namen *pelle like kinase* (mPLK [123]) kloniert worden war, eine Homologie von fast 80% zum humanen Molekül auf. Zudem wurden viele Kernaussagen zur Funktion von IRAK, die aus den hier beschriebenen Daten hervorgehen, in der Folge von anderen Gruppen im Maussystem bestätigt oder reproduziert [152-154]. Dennoch wurde zunächst sichergestellt, daß im speziesübergreifenden System humane IRAK an den endogenen, murinen IL-1 Rezeptor rekrutiert und als Kinase aktiviert werden kann. Wie erwartet ergaben sich dabei keine qualitativen Unterschiede zwischen den IRAK Transfektanten und Kontrollzellen aus Maus und Mensch.

### 4.1 Bedeutung und hierarchische Stellung von IRAK in IL-1 stimulierten Signalwegen

Wie in der Einleitung erwähnt, ist NFκB ein zentraler Transkriptionsfaktor für die Regulation proinflammatorischer und immunmodulatorischer Gene durch IL-1 (Übersicht in [20, 89]). Die Aktivierung von NFκB durch IL-1 erfordert die Ausbildung des Heterokomplexes aus IL-1RI und IL-1RAcP. Dabei ist die Integrität der cytoplasmatischen Toll/IL-1RI Homologiebereiche beider Rezeptorketten für die Auslösung des intrazellulären Signals essentiell (Übersicht in [94]). Dieser Befund wurde bereits früh mit der Rekrutierung und Aktivierung der IL-1 Rezeptor assoziierten Kinase (IRAK) in Zusammenhang gebracht, die sich bereits nach kurzer IL-1 Stimulation mit dem IL-1 Rezeptor kopräzipitieren läßt [121, 122]. Croston

*et al.* stellten fest, daß Deletionen und Punktmutationen in konservierten Bereichen der TIR-Domäne des IL-1RI nicht nur die NF $\kappa$ B Aktivierung inhibieren, sondern auch die Kopräzipitation und Autophosphorylierung von IRAK verhindern [125]. Wie sich später herausstellte, beruht diese Beobachtung auf der Unfähigkeit des mutierten Rezeptors, MyD88 zu binden, der essentiell für die Rekrutierung von IRAK und die IL-1 stimulierte NF $\kappa$ B Aktivierung ist [127, 128, 131]. TRAF6, ein Homolog der TNF Rezeptor assoziierten Faktoren, interagiert IL-1 abhängig mit IRAK und aktiviert bei Überexpression stimulusunabhängig NF $\kappa$ B. Die Beobachtung, daß eine N-terminal verkürzte Mutante dominant negativ auf die IL-1 stimulierte NF $\kappa$ B Aktivierung wirkt, ohne die Autophosphorylierung von IRAK am Rezeptorkomplex zu beeinträchtigen, etablierte TRAF6 als hierarchisch unterhalb von IRAK gelegenes Signalmolekül für diesen Signalweg [126]. Diese Befunde begründeten die Hypothese, daß IRAK die NF $\kappa$ B Aktivierung von MyD88 über TRAF6 vermittelt, ohne jedoch einen direkten Beweis zu liefern.

### ***IRAK und NF $\kappa$ B Aktivierung***

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, daß die stabile Überexpression humaner IRAK in EL-4 Zellen zu einer erhöhten Potenz und Effizienz der IL-1 induzierten IL-2 Produktion führt [139]. Verschiedene Gruppen haben durch Promoterstudien nachgewiesen, daß die IL-2 Genaktivität maßgeblich über NF $\kappa$ B reguliert wird. Dabei spielt das Verhältnis von bindenden, nicht aktivierenden p50/p50 NF $\kappa$ B Homodimeren zu transaktivierenden p50/p65 Heterodimeren eine wichtige Rolle [155]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Bedeutung der IRAK für die NF $\kappa$ B Aktivierung näher untersucht.

Stabile Überexpression von IRAK in EL-4 bedingt die verstärkte, IL-1 abhängige Aktivierung eines NF $\kappa$ B Reportergens. Um eine qualitative Veränderung des NF $\kappa$ B Systems durch klonale Effekte auszuschließen, wurden die NF $\kappa$ B Komplexe biochemisch charakterisiert. Weder die basale Expression, noch die Translokation der *rel* Proteine p50 und p65 ist in IRAK Klonen verändert. Die Zusammensetzung der Komplexe im Kern stimulierter Zellen und das Verhältnis von p50/p50 Homodimeren zu den prädominanten p50/p65 Heterokomplexen läßt ebenfalls keinen Einfluß der IRAK Überexpression erkennen. Es kann demnach davon ausgegangen werden, daß die erhöhte transkriptionelle Aktivität des NF $\kappa$ B Reportergens auf einem direkten Einfluß von IRAK auf das IL-1 Signal beruht. Dieser Befund wurde in transienten Experimenten bestätigt. Transiente Überexpression von IRAK in EL-4 führt ebenfalls zur Verstärkung der IL-1 induzierten NF $\kappa$ B Reporter genaktivität.

Selbst auf dem Hintergrund von etwa 70% untransfizierten Zellen korreliert dieser Effekt mit einer deutlich gesteigerten IL-2 Produktion. Im Gegensatz dazu wirken C-terminal trunkierte Formen von IRAK als dominant negative Inhibitoren der IL-1 stimulierten NFκB Aktivierung. Diese Effekte sind abhängig von der Menge transfizierter cDNA und spezifisch für IL-1. Damit konnte die Beteiligung von IRAK an der IL-1 stimulierten NFκB Aktivierung erstmals klar nachgewiesen werden.

### ***IRAK und JNK Aktivierung***

Stressaktivierte Proteinkinasen, p38 MAPK und vor allem JNK, spielen für die effiziente Expression IL-1 induzierter Gene eine bedeutende Rolle, da sie sowohl die Aktivität von AP-1, als auch die Stabilität von mRNA Transkripten regulieren können. Prominente Beispiele sind die IL-1 induzierte Expression von IL-2 [156-158], IL-6 und IL-8 [159-161]. Über welche molekularen Komponenten die Aktivierung der JNK vom IL-1 Rezeptorkomplex signalisiert wird, blieb jedoch unklar. Aus dem TNF System war bekannt, daß die Aktivierung von NFκB und JNK durch unterschiedliche Rezeptor assoziierte Proteine reguliert wird. *In vivo* konnte nachgewiesen werden, daß die Serin/Threoninkinase RIP für die TNF stimulierte NFκB Aktivierung essentiell ist, für die Aktivierung von JNK jedoch nicht benötigt wird [162]. Mäuse, die ein Transgen für dominant negativen TRAF2 exprimieren oder TRAF2 defizient sind, können dagegen TNF abhängig NFκB, nicht jedoch JNK aktivieren [163, 164].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob IRAK an der Aktivierung der JNK beteiligt ist. Transiente Überexpression von IRAK führt zu einer Verstärkung der IL-1 stimulierten Kinaseaktivität der JNK. Diese ist abhängig von der Menge transfizierter IRAK cDNA und spezifisch für IL-1, da die JNK Aktivierung durch osmotischen Streß von der IRAK Expression unbeeinflusst bleibt. Stabile IRAK Überexpression zeigte außerdem eine klare Verlängerung der transienten JNK Aktivität. Damit wurden erstmals Hinweise geliefert, daß IRAK an der IL-1 stimulierten Aktivierung von JNK beteiligt ist.

Inzwischen haben Ergebnisse verschiedener Gruppen bestätigt, daß die IL-1 stimulierte Aktivierung von NFκB und den streßaktivierten Proteinkinasen maßgeblich durch das Zusammenwirken von MyD88 [127, 128, 131], IRAK [61, 165, 166] und TRAF6 [61, 126, 165] signalisiert wird. Der Verzweigungspunkt der Signalwege scheint demnach im IL-1 System unterhalb von IRAK/TRAF6 zu liegen. Es wurde eine Reihe von Molekülen identifiziert, die zu den MAP-Kinase Kinase Kinasen (MAP3K) gehören und durch TRAF6

aktiviert werden können. Dazu gehören NIK (NF $\kappa$ B induzierende Kinase [104]), TAK1 (TGF- $\beta$  aktivierte Kinase [167]), die im Zusammenspiel mit dem regulatorischen Protein TAB1 [168] agiert, MEKK1 [169] und ASK1 (Apoptose Signal regulierende Kinase [170]). ASK1 kann mit TRAF6 interagieren und die Aktivierung von JNK und p38 signalisieren [171, 172]. TAK1 bindet IL-1 abhängig an TRAF6 und einen Komplex aus NIK und den IKK's, die dadurch aktiviert werden [173]. Die Aktivierung der IKK's durch MEKK1 scheint dagegen unabhängig von NIK zu sein [174-176] und durch ein kürzlich identifiziertes Molekül (ECSIT, *evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways* [177]) reguliert zu werden, das die Kopplung an TRAF6 übernimmt. Sowohl TAK1/TAB1 [173, 178, 179] als auch MEKK1 [180, 181] sind außerdem potente Aktivatoren des JNK Signalweges. Eine schematische Übersicht der molekularen Komponenten früher IL-1 Signaltransduktionsereignisse ist in Abb. 23 zusammengestellt.

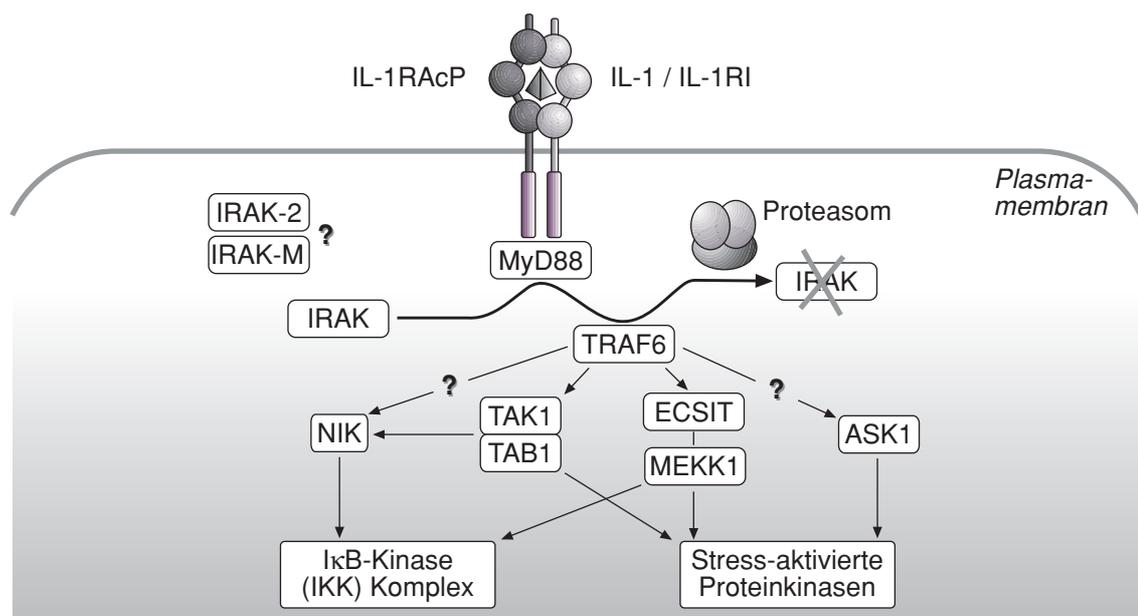


Abb. 23: Schematische Darstellung der frühen IL-1 Signaltransduktionsvorgänge

Das molekulare Gespann MyD88/IRAK/TRAF6 überträgt also das Signal vom IL-1 Rezeptor auf ein Netzwerk von MAP3Kinasen, welche ihrerseits die Koordination der Signalwege zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und AP-1 übernehmen. Die Bedeutung von IRAK innerhalb dieser Signalkopplergruppe konnte inzwischen *in vivo* bestätigt werden. IRAK *knock out* Mäuse weisen eine gestörte IL-1 Antwort auf, die sich im Vergleich mit Wildtyp Mäusen beispielsweise in reduzierten IL-6 und TNF- $\alpha$  Serumspiegeln nach systemischer IL-1 $\beta$  Injektion manifestiert. Zellen aus IRAK defizienten Tieren zeigen eine deutliche Verminderung der IL-1 stimulierten NF $\kappa$ B- und JNK-Aktivierung [152, 153]. Während

jedoch MyD88 oder TRAF6 defiziente Mäuse eine vollständige Blockade von IL-1 Signalen zeigen [134, 182, 183], besitzen IRAK<sup>-/-</sup> Tiere eine Restresponsivität gegenüber IL-1.

Auf Ebene von IRAK muß daher eine gewisse funktionelle Redundanz herrschen. Im Gegensatz zur genetischen Defizienz führt die Überexpression N-terminaler IRAK-Fragmente zu einer vollständigen Blockade der IL-1 stimulierten NFκB Aktivität. Ideale Kandidaten für die Übernahme von IRAK Funktionen wären demnach Moleküle, die den gleichen Kopplungsmechanismus an den IL-1 Rezeptorkomplex verwenden. Tatsächlich sind im Menschen zwei IRAK Homologe beschrieben worden, IRAK-2 und IRAK-M [127, 184]. In Überexpressionsexperimenten wurde gezeigt, daß beide Proteine mit MyD88 und TRAF6 interagieren und stimulusunabhängig NFκB aktivieren können, während ihre N-terminalen Bereiche dominant negativ auf den NFκB Signalweg wirken. Während IRAK-M Transkripte exklusiv in Zellen monomyeloischen Ursprungs auftreten [184], läßt sich mRNA für IRAK-2, ähnlich wie für IRAK beschrieben, in praktisch allen Geweben nachweisen [122, 127]. Besonders IRAK-2 kommt daher als Molekül in Frage, das die IL-1 Restaktivität in IRAK defizienten Tieren und Zellen erklären könnte. Welche Rolle IRAK-2 und IRAK-M dagegen in physiologischen Situationen spielen, ist bislang unklar.

#### **4.2 Einfluß der IRAK Expression auf die IL-1 Signaltransduktion**

Semiquantitative Untersuchungen ergaben, daß die stabile Überexpression von IRAK nicht die Dosisabhängigkeit der JNK Aktivierung von IL-1 verändert, sondern die Kinetik des transienten Signals. Während die schnelle Aktivierungsphase unabhängig von der IRAK Überexpression ist, verläuft die Deaktivierung der JNK deutlich verzögert. Im Fall der MAP-Kinasen wird eine Regulation der Aktivität über das sequenzielle Zusammenwirken von Kinasen und Phosphatasen angenommen. Solche Regulationszyklen sind für Kinasekaskaden verschiedenster physiologischer Bedeutung beschrieben worden. Die Wirkung der IRAK Expression auf die JNK Aktivität könnte demnach entweder auf der verlängerten Aktivierung einer hierarchisch oberhalb gelegenen Kinase-Kinase und/oder der Inhibition einer entsprechenden Phosphatase beruhen. Zwar sind die Hierarchien innerhalb der verschiedenen Aktivierungs-/Phosphorylierungsebenen der MAP-Kinasekaskaden detailliert untersucht worden (Übersicht in [92]), genaue Mechanismen der kinetischen Regulation sind jedoch nicht bekannt. Daher können keine konkreten Aussagen getroffen werden, über welchen Mechanismus die IRAK Expression zur Verlängerung der JNK Aktivität führt.

Bei Bestimmungen der IL-1 induzierten NFκB Reportergenaktivität oder IL-2 Produktion handelt es sich um kumulative Langzeitmessungen, die keinen Aufschluß über den direkten, qualitativen Einfluß der IRAK Expression auf die NFκB Aktivierung zulassen. Semiquantitative Messungen der nukleären DNA Bindekapazität von NFκB zeigen dagegen, daß der IRAK Einfluß, wie für die JNK Aktivierung beschrieben, nicht auf einer veränderten IL-1 Dosis-Wirkungsbeziehung, sondern auf kinetischen Effekten beruht.

Die Zeitabhängigkeit der IL-1 stimulierten NFκB Aktivität ist von einer schnellen, transienten Phase und einer persistenten Phase geprägt, die nach etwa einer Stunde einsetzt und dann über mehrere Stunden anhält. Dieser biphasische Verlauf ist in der Literatur für verschiedene Zelltypen und Stimuli beschrieben worden und läßt sich über die Selbstregulation des NFκB Systems erklären [185-188]. Die frühe Phase beruht auf der Translokation präformierter Komplexe, die konstitutiv exprimiertes p65 (RelA) enthalten, und durch schnelle IκB Degradation aktiviert werden. Durch die NFκB induzierte Expression des Inhibitors IκB wird anschließend die Deaktivierung eingeleitet [189]. Gleichzeitig werden jedoch auch *rel* Komponenten (RelB [190], c-Rel [191]) induziert, die bei anhaltender Stimulation die NFκB abhängige Genaktivierung aufrecht erhalten können.

Die erste Aktivierungsphase wird durch IRAK Überexpression offensichtlich nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu verläuft sowohl die Deaktivierung der schnellen, als auch der zweiten, persistenten Phase deutlich verlangsamt. Da IRAK über TRAF6 die Aktivierung des IκB-Kinase Komplexes vermittelt, läßt sich der IRAK Überexpressionseffekt durch eine verstärkte IκB Degradation in der frühen Phase der IL-1 Stimulation erklären. Die resultierende Erhöhung der NFκB Aktivität im Kern sollte über den Selbstregulationszyklus auch die späte Phase der NFκB Aktivierung beeinflussen.

Zusammenfassend beruht der Effekt der IRAK Überexpression auf einer verzögerten Deaktivierung der IL-1 stimulierten NFκB und JNK Aktivität. Ein Modell für den zugrundeliegenden Mechanismus wäre eine funktionelle „Stabilisierung“ des aktiven Rezeptorkomplexes durch IRAK. Verzögerte Deaktivierung des Rezeptorkomplexes verlängert transiente Signalereignisse und die Integration kinetischer Effekte führt zur Signalverstärkung kumulativer Wirkungen, etwa der Expression von Ziel- oder Reporter genen. Eine Veränderung der Dosisabhängigkeit von IL-1 zu einem frühen Zeitpunkt der Stimulation würde dagegen voraussetzen, daß IRAK Überexpression bei gleicher IL-1 Konzentration eine größere Anzahl von signaltransduzierenden Rezeptorkomplexen bedingt. Diese Situation

könnte auftreten, wenn in untransfizierten Zellen die IRAK Expression im Vergleich zu den Rezeptorkomponenten limitierend wirkt. Der Umstand, daß in EL-4, wie auch in anderen Zelltypen, eher das Gegenteil der Fall ist, mag erklären, warum eine Veränderung der Dosis-/Wirkungsbeziehung IL-1 stimulierter, intermediärer Signaltransduktionseffekte durch IRAK Überexpression nicht zu beobachten ist.

Einen wichtigen Hinweis, daß IRAK tatsächlich über die Proteinmenge das IL-1 Signal regulieren kann, liefert die Beobachtung, daß IRAK Protein stimulationsabhängig am Proteasom abgebaut wird. IL-1 Stimulation führt neben der Rekrutierung an den IL-1 Rezeptorkomplex zur Vergrößerung des apparenten Molekulargewichtes von IRAK. Durch Verwendung von Phosphatase PP-2A konnte nachgewiesen werden, daß dieser Effekt auf einer multiplen Serin/Threonin Phosphorylierung beruht [192, 193]. In EL-4 Zellen, die stabil IRAK exprimieren, beobachtet man daneben eine stimulationsabhängige Verminderung der IRAK Proteinmenge, die sich durch den Einsatz eines Proteasominhibitors deutlich verzögern läßt. Der Proteasominhibitor zeigt dabei keinen Einfluß auf die Phosphorylierung von IRAK, sondern führt zur Akkumulation von polyphosphoryliertem Protein. Dieser Effekt wurde von Yamin und Miller in humanen Fibroblasten näher untersucht. IRAK wird während der IL-1 Stimulation mit einer ähnlichen Zeitabhängigkeit wie der NF $\kappa$ B Inhibitor I $\kappa$ B am Proteasom abgebaut. Zudem wurde durch Verwendung unspezifischer Kinaseinhibitoren nachgewiesen, daß die Phosphorylierung von IRAK mit der Degradation zusammenhängt, ein Umstand, der für I $\kappa$ B ebenfalls beschrieben ist [194]. Während IL-1 jedoch die I $\kappa$ B Resynthese induziert, scheint die IRAK Expression IL-1 unabhängig zu sein. Dieses führt bei Langzeitstimulation zum Verlust cytosolischer IRAK und hat einen Responsivitätsverlust bei IL-1 Restimulation zur Folge [192].

Weiterhin wurde gezeigt, daß zwar die initiale Rekrutierung von MyD88 und IRAK an den IL-1 Rezeptorkomplex zeitlich parallel verläuft, die Assoziation von MyD88 jedoch wesentlich länger nachweisbar bleibt als bei IRAK [128]. Die Kinetik der Signalgenerierung wird demnach nicht durch die Verweildauer des essentiellen Adaptermoleküls MyD88 im Rezeptorkomplex limitiert. Die erläuterten Befunde lassen sich in einem zyklischen Aktivierungsmodell zusammenfassen, bei dem sukzessive IRAK an MyD88 bindet, als Kinase aktiviert wird, das Signal an TRAF6 weiterleitet und nach Dissoziation vom Rezeptorkomplex proteolytisch „verbraucht“ wird. Wenn eine sukzessive IRAK Rekrutierung stabilisierend auf den Rezeptorkomplex wirkt, so könnte die IRAK Überexpression auch andere Mechanismen beeinflussen, die direkt am IL-1 Rezeptorkomplex ansetzen. Ein möglicher Kandidat wäre

die PI3-Kinase, von der gezeigt wurde, daß sie IL-1 abhängig an den Typ I IL-1 Rezeptor bindet [114, 115] und sowohl an der IL-1 stimulierten NFκB als auch AP-1 Aktivierung beteiligt ist [114].

### 4.3 Molekulare Mechanismen der frühen IL-1 Signaltransduktion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten funktionelle Aspekte verschiedener Bereiche im IRAK Molekül untersucht werden. Erste Hinweise auf mögliche Struktur-/Funktionsbeziehungen lieferten Homologieuntersuchungen. Der zentrale Bereich von IRAK umspannt die konservierte Subdomänenstruktur eukaryotischer Proteinkinasen mit hochkonservierten Aminosäuren in Subdomäne VIb, die charakteristisch für Serin-/Threoninkinasen sind [150, 151]. C-terminal schließt sich ein fast 200 AS langer Bereich an, der keine Homologien zu bekannten Aminosäuremustern aufweist. Im N-terminalen Bereich befindet sich eine Aminosäuresequenz, die deutliche Ähnlichkeit zur  $\alpha$ -helicalen Struktur sogenannter „Todesdomänen“ (*death domains*, DD) zeigt. *Death domains* wurden zuerst in der TNF Rezeptor Superfamilie identifiziert. Beispiele sind neben dem p55 TNF Rezeptor [195] die „TNFR assoziierte *death domain*“ (TRADD [196]) und die Serin-/Threoninkinase RIP (TNFR interagierendes Protein [197]). In diesen Molekülen befindet sich die *death domain* direkt am C-Terminus und wurde als Bereich identifiziert, der essentiell für die Signalisierung des programmierten Zelltodes (Apoptose) ist. Eine Reihe weiterer Moleküle, die N-terminale *death domains* aufweisen und offensichtlich kein Apoptosesignal vermitteln, sind MyD88, *Drosophila* Pelle und Tube. In vielen Fällen konnte gezeigt werden, daß *death domains* als Protein-Protein Interaktionsmotiv an der Ausbildung von Homo- und Heterodimeren beteiligt sind (Übersicht in [130]).

Um Hinweise auf die funktionelle Bedeutung dieser Domänen in der IL-1 Signaltransduktion zu erhalten, wurde verschiedene IRAK Mutanten auf ihre Fähigkeit überprüft, mit der IL-1 Signaltransduktion zu interferieren. In Phosphorylierungs- und Kopräzipitationsstudien sollten Erkenntnisse über die Wechselwirkung von IRAK mit seinen molekularen Partnern und die Bedeutung der Kinaseaktivität und Phosphorylierung gewonnen werden.

#### ***Assoziation an den IL-1 Rezeptorkomplex: IRAK und MyD88***

Für die agonistische Wirkung von IRAK, die bei Überexpression auf die IL-1 stimulierte NFκB Aktivierung beobachtet wird, ist offensichtlich das gesamte Molekül notwendig. Trunkierte Mutanten zeigen diese Eigenschaft nicht mehr. Während jedoch Proteinvarianten mit N-terminaler *death domain* als dominant negative Inhibitoren der IL-1 stimulierten NFκB

Aktivierung agieren, sind Mutanten, denen dieser Bereich fehlt, nicht in der Lage, mit dem IL-1 Signal zu interferieren. Die IRAK *death domain* ist demnach notwendig und ausreichend, um den aktiven IL-1 Rezeptorkomplex von nachgeordneten Signalelementen zu entkoppeln. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß „Todesdomänen“ typische Proteininteraktionsmuster darstellen, weist dieser Effekt auf eine Blockierung der *death domain* des Partners MyD88 hin. Die *death domains* von IRAK und MyD88 sind demnach zentrale Interaktionsmotive bei der Rekrutierung von IRAK in den Rezeptorkomplex. Dieser Befund wurde durch die Beobachtung gestützt, daß die Überexpression einer MyD88 Variante, der die *death domain* fehlt, als dominant negativer Inhibitor des IL-1 Signals wirkt, während die MyD88 *death domain* allein stimulusunabhängig NFκB aktivieren kann [127, 128]. Da MyD88 bei Überexpression dimerisiert [131], ist offensichtlich die Dimerisierung der *death domains*, die *in vivo* durch die Interaktion der TIR Domänen von MyD88 und den Rezeptorketten vermittelt wird, das auslösende Signal für die Rekrutierung von IRAK.

Interessanterweise läßt sich eine Interaktion mit MyD88 nur für kinaseinaktive IRAK nachweisen, nicht jedoch für Wildtyp IRAK, die bei Überexpression phosphoryliert vorliegt. Bereits Wesche *et al.* haben postuliert, daß phosphorylierte IRAK ihre Affinität zu MyD88 verliert [128]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die IRAK *death domain in vitro* von IRAK phosphoryliert wird und dabei eine Vergrößerung des apparenten Molekulargewichtes zeigt, während andere Molekülbereiche nicht als Substrat dienen können. Wie für das intakte Molekül beschrieben, unterliegt die *death domain* also einer multiplen Phosphorylierung. Die Einführung negativer Partialladungen in die Interaktionsdomäne für MyD88 liefert ein mechanistisches Modell, wie die Dissoziation phosphorylierter IRAK vom Rezeptorkomplex eingeleitet wird und unterstreicht so die Bedeutung der *death domain* Interaktion zwischen IRAK und MyD88.

Im *Drosophila* Toll System sind ähnliche Beobachtungen beschrieben worden. Durch Mutagenese- und Kopräzipitationsstudien ist die direkte Interaktion der *death domains* des IRAK Homologs Pelle und des MyD88 Analogs Tube nachgewiesen worden [198] und konnte in Röntgenstrukturanalysen mit Kokristallen beider Moleküle eindrucksvoll belegt werden [149]. Zusätzlich wurde beschrieben, daß Pelle sich in der N-terminalen *death domain* phosphorylieren kann und dadurch eine Interaktion mit Tube unterbunden wird [199]. Im gleichen Bericht findet sich zusätzlich ein Hinweis darauf, daß Pelle nicht ausschließlich mit Tube interagiert, sondern eine weitere Bindungsstelle am Toll Rezeptor besitzt.

Entsprechend gibt es eine Reihe von Hinweisen, die auch im IL-1 Rezeptorsystem eine weitere Bindungsstelle für IRAK vermuten lassen:

1. Während selbst bei starker Überexpression keine Interaktion von MyD88 mit kinaseaktiver, phosphorylierter IRAK nachzuweisen ist, läßt sich mit dem IL-1 Rezeptorkomplex stimulusabhängig sehr wohl kinaseaktive und voll phosphorylierte IRAK kopräzipitieren [122].
2. Mehrere Gruppen haben berichtet, daß IRAK mit IL-1RAcP interagiert. Diese Untersuchungen wurden in verschiedenen zellulären Systemen durchgeführt, unter anderem in Hefe [200, 201]. IRAK-2 ließ sich dagegen bevorzugt mit dem IL-1RI kopräzipitieren [127].

Letztere Beobachtung schließt natürlich nicht aus, daß die Interaktion zwischen IL-1RAcP und IRAK letztendlich durch MyD88 bzw. ein putatives Homolog in Hefe vermittelt sein könnte. Dagegen spricht allerdings, daß in diesen Assays kinaseaktive IRAK verwendet wurde, die *in vitro* nicht mit MyD88 interagiert. Weiterhin bindet MyD88 offenbar bevorzugt an den IL-1 Rezeptorkomplex, während eine Interaktion mit IL-1RI oder IL-1RAcP allein nur bei starker Überexpression zu beobachten ist [127, 128, 131]. Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß die Interaktion mit MyD88 zwar notwendig, nicht aber hinreichend für die Rekrutierung von IRAK an den Rezeptorkomplex ist. Im Rückschluß ist bisher nicht sichergestellt, daß die Phosphorylierung der IRAK *death domain*, die zum Verlust der Interaktion mit MyD88 führt, auch als Dissoziationssignal ausreicht. Welche Bereiche des IRAK Moleküls eine solche Interaktion mit IL-1RAcP vermitteln und welche Bedeutung diese *in vivo* besitzt, ist jedoch bislang unklar.

#### ***Aktivierung von Phosphorylierungsschritten***

Aus dem TNF System ist bekannt, daß die Trimerisierung der intrazellulären Domäne des TNF Rezeptors notwendig und hinreichend ist, um Signale auszulösen [202, 203]. *In vivo* wird dieser Prozeß durch den Liganden eingeleitet, der selbst als Trimer vorliegt. Die symmetrische Oligomerisierung als Aktivierungssignal für den Signalkoppler TRAF2 ist eindrucksvoll belegt worden. Röntgenstrukturanalysen zeigen, daß die Interaktionsdomäne von TRAF2 (TRAF-C Domäne) im Komplex mit dem Rezeptor ein symmetrisches Trimer bildet [204]. Eine erzwungene Oligomerisierung der regulatorischen „RING/Zinkfinger“-Domäne von TRAF2 ist zudem ausreichend, um die Aktivierung von TNF stimulierten Signalwegen nachzuahmen [165].

Im IL-1 System legt die heterologe Zusammensetzung des Rezeptorkomplexes eine mindestens zweifache Symmetrie nahe. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß über die tatsächliche Stöchiometrie der Komplexe keine Erkenntnisse vorliegen. Im Folgenden wird daher der Einfachheit halber von einer Dimerisierung ausgegangen. Für MyD88 ist bereits auf die Bedeutung der Dimerisierung im Zusammenhang mit der Signalweiterleitung hingewiesen worden. Besonders im Hinblick auf den bislang unbekannt Mechanismus, durch den IRAK im IL-1 Rezeptorkomplex aktiviert wird, drängt sich die Frage auf, ob IRAK ebenfalls durch Dimerisierung aktiviert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß IRAK exklusiv über die *death domain* mit sich selbst interagiert. Im Gegensatz zur Wechselwirkung mit MyD88 scheint dieser Effekt jedoch unabhängig vom Phosphorylierungsstatus zu sein. Die Aktivierung von IRAK durch Dimerisierung liefert eine geeignete Erklärung für die Beobachtung, daß Überexpression der *death domain*, wie auch von Wildtyp IRAK, zu konstitutiver NF $\kappa$ B Aktivierung führt. Überexprimierte *death domain* ist offensichtlich in der Lage, endogene IRAK durch Aggregation zu aktivieren. Einen Hinweis, daß die Dimerisierung auch die IRAK Kinaseaktivität induziert, liefert die Beobachtung, daß die IRAK *death domain* auch in Abwesenheit koexprimierter IRAK schwach, aber nachweisbar, von endogener IRAK phosphoryliert werden kann. Da endogene IRAK in unstimulierten Zellen inaktiv vorliegt, muß sie in diesem Fall durch die Interaktion mit überexprimierten *death domains* aktiviert worden sein. Überexpression von Wildtyp IRAK in 293 Zellen liefert kinaseaktives und voll phosphoryliertes IRAK Protein. Kinasen in anderen Signalwegen, die durch Phosphorylierung reguliert werden, liegen dagegen in der Regel selbst bei hoher Überexpression inaktiv vor. Ein gutes Beispiel stellen in diesem Zusammenhang viele MAP-Kinasen dar.

Andererseits beobachtet man, daß IRAK-Fragmente, die eine intakte Kinasedomäne, jedoch keine *death domain* besitzen, *in vitro* ebenfalls phosphoryliert werden, allerdings ohne Veränderung des Molekulargewichtes. Da die Experimente mit Immunpräzipitaten durchgeführt wurden, ist die Kinaseaktivität solcher Fragmente mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Aggregation am immobilisierten Antikörper zurückzuführen. In dieser *in vitro* Situation ist daher eine Dimerisierung über die *death domains* wahrscheinlich nicht erforderlich. Möglich ist weiterhin, daß es sich nicht um eine Autophosphorylierung, sondern um die Reaktion einer unbekannt, kopräzipitierten Kinase handelt. Dagegen spricht allerdings, daß eine kinaseinaktive Variante der Kinasedomäne keine Phosphorylierung mehr zeigt. Es läßt sich ein Modell formulieren, das auf einer Kinaseaktivierung in zwei Stufen basiert. Zunächst

führt die Rekrutierung und damit verbundene Dimerisierung zu einer intramolekularen Phosphorylierung der Kinasedomäne. Als weiterer Schritt folgt die intermolekulare Phosphorylierung der IRAK *death domains*, die zum Verlust der Interaktion mit MyD88 führt. Belegbare Aussagen über den kausalen und zeitlichen Zusammenhang der beiden qualitativ unterschiedlichen Phosphorylierungsereignisse lassen sich derzeit jedoch nicht treffen.

### ***Rolle der IRAK Kinaseaktivität für die Signalweiterleitung***

Obwohl außer Frage steht, daß IRAK im Verlauf der IL-1 Signaltransduktion als Kinase aktiviert und phosphoryliert wird, lassen die bisher diskutierten Daten keine Rückschlüsse auf die Bedeutung der IRAK Kinaseaktivität für die Weiterleitung von IL-1 Signalen zu. Aus vielen Cytokin- und Wachstumsfaktor Systemen ist bekannt, daß die stimulusabhängige Homo- oder Heterooligomerisierung von Rezeptorketten zur Aktivierung intrinsischer Kinaseaktivitäten oder zur Rekrutierung von rezeptorassoziierten Kinasen, wie den Tyrosinkinasen der JAK (Janus Kinase) oder *src* Familie, führt. Diese phosphorylieren sich selbst, die Rezeptorketten oder nachgeordnete Signalkoppler. In den meisten Fällen sind diese Phosphorylierungsschritte essentiell für die Signalweiterleitung.

Nach heutigem Kenntnisstand wird in IL-1 stimulierten Zellen weder eine der Rezeptorketten, noch MyD88, TRAF6 oder irgend ein anderer bekannter Signalkoppler durch IRAK phosphoryliert. Um der Frage nachzugehen, welche Rolle die Kinaseaktivität in der IL-1 Signaltransduktion spielt, wurde eine kinaseinaktive Mutante (K239S) eingesetzt, die einen einzelnen Aminosäureaustausch in der ATP-Bindungsstelle (Lys239) aufweist. Wenn die IRAK Kinaseaktivität essentiell für die Signalweiterleitung ist, sollte die Überexpression einer solchen Mutante zur Inhibition des IL-1 Signals führen. Weder die IL-1 stimulierte NFκB und JNK Aktivierung, noch die IL-2 Produktion werden jedoch durch Überexpression kinaseinaktiver IRAK inhibiert. Im Gegenteil, wie bei der Expression von Wildtyp IRAK ist der Einfluß auf die beschriebenen Signale agonistisch. Ein ähnlicher Effekt ist inzwischen für eine IRAK Mutante beschrieben worden, die einen Aminosäureaustausch in der Serin/Threonin Kinaseaktivierungsregion (Asn 340) aufweist. Überexpression dieser kinaseinaktiven Variante führt in 293 Zellen zur stimulusunabhängigen NFκB Aktivierung [193].

Die beschriebenen Experimente wurden in EL-4 Zellen auf dem Hintergrund endogener IRAK durchgeführt. Kinaseinaktive IRAK könnte also von endogener IRAK phosphoryliert werden, deren Aktivierung durch die K239S Überexpression nicht inhibiert wird. Tatsächlich läßt sich C-terminal verkürzte (siehe Abb. 22), aber auch vollständige K239S (ohne Abb.) *in*

*in vitro* durch Wildtyp IRAK phosphorylieren. Die fehlende Kinaseaktivität beweist im verwendeten System daher nicht stringent das Ausbleiben der Phosphorylierung. Andererseits wurde kürzlich über ähnliche Experimente in einer IRAK defizienten 293 Sublinie berichtet. Wie mit Wildtyp IRAK ließ sich die Responsivität dieser Zelle durch Expression von K239S wiederherstellen [166]. Ähnliche Beobachtungen wurden auch mit IRAK-2 und IRAK-M gemacht [184]. Ein Vergleich der Sequenzen zeigt, daß beide Moleküle Abweichungen in hochkonservierten Aminosäuren der ATP Bindungsstelle und Serin-/Threoninkinase Aktivierungsregion aufweisen. Dementsprechend stellte sich heraus, daß sie bestenfalls über marginale Kinaseaktivität verfügen. Ungeachtet dessen sind sie jedoch in der Lage, die Responsivität IRAK-defizienter Zellen wiederherzustellen. Diese Ergebnisse müssen als Hinweis gewertet werden, daß Kinaseaktivierung und Phosphorylierung von IRAK keine essentiellen Schritte der Weiterleitung von IL-1 Signalen sind.

Auch aus anderen Systemen ist bekannt, daß die Kinaseaktivität von Rezeptor-assoziierten Kinasen nicht zwangsläufig an der Signalweiterleitung beteiligt sein muß. Vergleiche von IL-1 und TNF Rezeptorsystem weisen deutliche Analogien in der initialen Signaltransduktion auf. Der p55 TNF Rezeptor rekrutiert nach Ligandenbindung die Serin/Threoninkinase RIP über das Adapterprotein TRADD. Auch hier scheint die Interaktion über die *death domains* beider Moleküle vermittelt zu sein. Während die Überexpression der RIP *death domain* dominant negativ auf die TNF stimulierte NF $\kappa$ B Aktivierung wirkt, gilt dieses nicht für kinaseinaktive RIP [205]. Das kürzlich klonierte RIP Homolog (RIP-2) lieferte ein entsprechendes Ergebnis [206].

Unter Berücksichtigung der Beobachtung, daß die Phosphorylierung von IRAK in IL-1 stimulierten Zellen mit der proteolytischen Degradation am Proteasom im Zusammenhang steht, ergibt sich ein neuer Aspekt für die Bedeutung der IRAK Kinaseaktivität. Möglicherweise ist die Autophosphorylierung ein negativ regulatorisches Signal, das IRAK für den Abbau markiert und damit die IL-1 Signaldauer begrenzt. Unter diesem Gesichtspunkt würde man erwarten, daß kinaseinaktive IRAK nicht mit der gleichen Effizienz wie die Wildtyp Form proteolytisch reguliert wird. Interessanterweise findet man in transient transfizierten EL-4 Zellen konsistent mehr Protein für K239S als für Wildtyp IRAK, wenn die gleichen Mengen cDNA transfiziert werden. Da sich die Expressionsplasmide lediglich durch eine punktmutierte Base unterscheiden, ist es unwahrscheinlich, daß dieser Effekt auf Unterschieden in der Transkriptions- und Translationseffizienz beruht. In EL-4 Zellen liegt überexprimierte Wildtyp IRAK als unphosphoryliertes Protein vor, das erst durch IL-1

Stimulation kinaseaktiv wird. Bedenkt man, daß eine hohe Überexpression, z.B. in 293 Zellen, zur konstitutiven Aktivierung und Phosphorylierung von Wildtyp IRAK führt, so ist es möglich, daß in EL-4 Zellen ein geringer Anteil transient exprimierter IRAK ebenfalls präaktiviert vorliegt und einer proteolytischen Regulation unterliegt. Dieser Umstand könnte erklären, warum bei identischen Bedingungen die exprimierte Proteinmenge von Wildtyp IRAK wesentlich niedriger ist als bei K239S. In Übereinstimmung mit den Unterschieden in der Proteinmenge wurde außerdem festgestellt, daß die Überexpressionseffekte von K239S auf die IL-1 stimulierte NFκB Aktivierung und IL-2 Produktion stärker ausfallen als für Wildtyp IRAK. Diese Beobachtungen unterstützen demnach die Hypothese, daß die IL-1 stimulierte IRAK Phosphorylierung ein negativ regulatorisches Signal darstellt.

#### ***Aktivierung von TRAF6 und proteolytische Deaktivierung von IRAK***

Die Aktivierung von TRAF6 wird ebenfalls auf Homooligomerisierung zurückgeführt. Wie TRAF2 weist TRAF6 eine TRAF-C Domäne auf, über die es mit sich selbst und IRAK interagiert [126]. Die Aktivierung der nachgeordneten Signalwege findet dagegen über die N-terminale „RING/Zinkfinger“-Domäne statt, die selbst nicht oligomerisieren kann. Baud *et al.* haben jedoch gezeigt, daß eine erzwungene Oligomerisierung dieser Domäne ausreichend für die Nachahmung von IL-1 Signalen ist [165]. Auch für die Aktivierung von TRAF6 durch IRAK kann demzufolge ein Oligomerisierungsschritt postuliert werden. Wenn die IRAK vermittelte Oligomerisierung das Signal für die Aktivierung von TRAF6 ist, so besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß TRAF6 über ein IRAK Dimer aktiviert wird. Welche Bereiche im IRAK Molekül die Interaktion mit TRAF6 vermitteln, ist bislang unklar. Die Beobachtung, daß C-terminale Deletion von IRAK zum Verlust der agonistische Wirkung auf die IL-1 stimulierte NFκB Aktivierung führt, legt die Vermutung nahe, daß der C-Terminus an der TRAF6 Interaktion beteiligt ist. Mutanten, die nicht mehr an den Rezeptorkomplex koppeln, jedoch über die C-terminale Domäne verfügen, sollten in diesem Fall durch kompetitive Blockierung von TRAF6 dominant negativ auf das IL-1 Signal wirken. Tatsächlich läßt sich dieser Effekt jedoch nicht beobachten. Beruht die Aktivierung von TRAF6 allerdings auf der Bindung von IRAK-Dimeren, so sind die entsprechenden Mutanten nicht dominant negativ, weil sie wegen der fehlenden *death domain* nicht dimerisieren können. Wenn die Erkennung durch TRAF6 die Dimerisierung über die *death domain* und den C-Terminus von IRAK benötigen, so bedeutet das im Umkehrschluß, daß nur das intakte IRAK Molekül in der Lage ist, TRAF6 zu aktivieren.

Wenn kinaseinaktive, unphosphorylierte IRAK das IL-1 Signal weiterleiten kann, so sollte sie in der Lage sein, mit dem nachgeordneten Wechselwirkungspartner TRAF6 zu interagieren. Koimmunpräzipitationsstudien zeigen tatsächlich, daß TRAF6 sowohl an phosphorylierte, als auch unphosphorylierte IRAK binden kann. Das gleiche gilt auch für IRAK-2 und IRAK-M [184]. Die Frage, wie kinaseaktive IRAK das IL-1 Signal weiterleiten kann, ist nicht allein von theoretischem Interesse. Wie bereits erläutert, liegt auf Ebene der IRAK eine gewisse funktionelle Redundanz im IL-1 Signalweg vor. IRAK-M und vor allem IRAK-2 sind die naheliegendsten Kandidaten für die Übernahme IRAK-artiger Funktionen, beide sind jedoch offensichtlich nicht als Kinasen aktiv. K239S stellt daher ein geeignetes Diskussionsmodell dar, wie die Signalweiterleitung über diese Moleküle verlaufen könnte. Da kinaseinaktive IRAK wahrscheinlich nicht in der Lage ist, ohne weiteres den Rezeptorkomplex zu verlassen, ist die Frage zu stellen, ob die Aktivierung von TRAF6 im Rezeptorkomplex stattfinden kann, oder ob die Interaktion von IRAK und TRAF6 ausschließlich nach Dissoziation im Cytosol stattfindet.

Aus der Beobachtung, daß TRAF6 sich zwar IL-1 abhängig mit IRAK, nicht jedoch mit dem IL-1 Rezeptorkomplex präzipitieren läßt, wurde geschlossen, daß TRAF6 nicht an den IL-1 Rezeptorkomplex rekrutiert wird [126]. Dieser Umstand beweist jedoch weder, daß IRAK phosphoryliert sein muß, noch daß eine Dissoziation vom Rezeptorkomplex notwendig für die Interaktion mit TRAF6 ist. *In vitro* ist der Phosphorylierungsstatus von IRAK unerheblich für die Bindung an TRAF6. Es läßt sich daher vermuten, daß IRAK Phosphorylierung und Dissoziation vom Rezeptorkomplex *in vivo* zwar parallel mit der TRAF6 Interaktion verlaufen, nicht aber unabdingbare Voraussetzung dafür sind. Wie bereits erwähnt, ist zudem nicht abschließend geklärt, ob die Phosphorylierung von IRAK und der damit verbundene Verlust der Affinität zu MyD88 ausreichend für die IRAK Dissoziation vom Rezeptorkomplex ist. Im Gegensatz dazu ist die Phosphorylierung offenbar notwendig für die proteolytische Deaktivierung von IRAK. Interessanterweise führt der Einsatz von Proteasominhibitoren zur Kumulation von phosphorylierter IRAK am IL-1 Rezeptorkomplex [192]. Obwohl phosphorylierte IRAK nicht mehr mit MyD88 wechselwirken kann, scheint die Inhibition der Proteasomaktivität zu einer Blockade der IRAK Dissoziation zu führen. Dieser Umstand ließe sich mit der modellhaften Vorstellung erklären, daß IRAK von TRAF6 aus dem Rezeptorkomplex „abgeholt“ und anschließend zum Proteasom „gebracht“ wird. Dort zerfällt der Komplex durch IRAK Degradation und das Signal wird unterbrochen. TRAF6 steht wieder zur Verfügung, um mit weiteren IRAK-Dimeren zu interagieren. Ist das

Proteasom blockiert, bleibt der IRAK/TRAF6 Komplex bestehen und IRAK kann den Rezeptorkomplex nicht mehr verlassen. Dieses Modell schließt eine mindestens transiente Assoziation von TRAF6 an den IL-1 Rezeptorkomplex ein. Es genügt daher auch der Aktivierung von TRAF6 durch Rezeptorkomplex assoziierte, kinaseinaktive IRAK-Varianten.

Wie die Deaktivierung im Fall von kinaseinaktiver IRAK oder IRAK-2 und IRAK-M verläuft, ist unklar. Es ist durchaus denkbar, daß die kinaseinaktiven IRAK Homologe überhaupt nicht Proteasom-abhängig reguliert werden. Unter Umständen liegt darin sogar der biologische Sinn einer solchen funktionellen Redundanz. Durch differentielle Expression verschiedener IRAK Formen könnte eine Zielzelle die Kinetik IRAK abhängiger IL-1 Signale steuern. Kinaseaktive IRAK würde dabei transient agieren, während IRAK-2 oder IRAK-M eine persistente Weiterleitung von IRAK-artigen Signalen bei langanhaltender Stimulation gewährleisten könnten. Eine diesbezügliche Spezialisierung ist besonders für IRAK-M naheliegend, da es praktisch ausschließlich in Zellen monomyeloischen Ursprungs exprimiert wird [184].

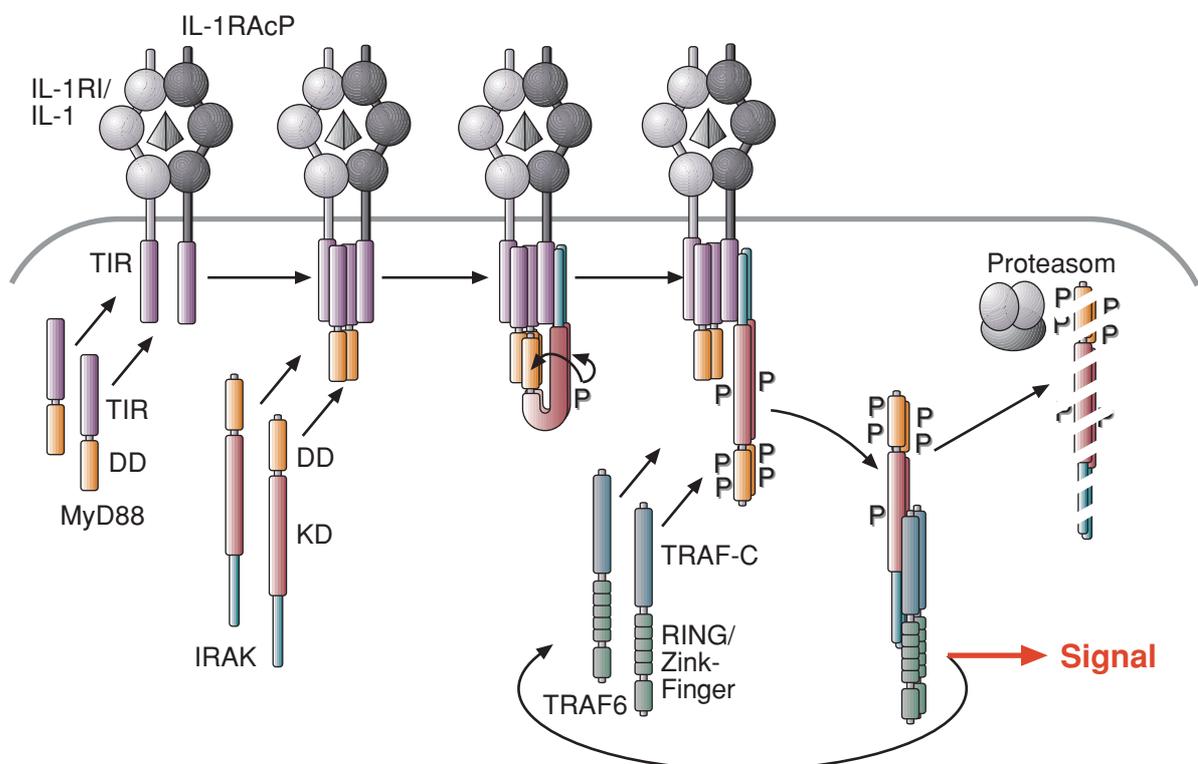


Abb. 24: Modell der initialen Signaltransduktionsereignisse am IL-1 Rezeptorkomplex

Andererseits ist auf die Möglichkeit der Kreuzphosphorylierung durch Wildtyp IRAK hingewiesen worden. Daher kann eine proteolytische Regulation von kinaseinaktiven IRAK Formen zumindest in gemischt exprimierenden Zellen nicht ausgeschlossen werden. Eine

weitere Möglichkeit stellt die Beteiligung anderer Rezeptor-assoziiierter Kinasen dar. So wird kinaseinaktive IRAK wahrscheinlich auch in IRAK-defizienten Zellen schwach phosphoryliert [166]. Mit der intrazellulären Domäne des IL-1 Rezeptors lassen sich verschiedene Kinaseaktivitäten aus Zellysaten präzipitieren. Einige können, wie für IRAK beschrieben [207], MBP *in vitro* phosphorylieren und weisen daher möglicherweise eine ähnliche Substratspezifität auf [208]. Schließlich sind auch Inaktivierungsmechanismen nicht ausgeschlossen, die unabhängig von der IRAK Phosphorylierung sind. Ein Beispiel wäre die Internalisierung von IL-1 Rezeptorkomplexen. Dieser regulatorische Vorgang verläuft zwar in untransfizierten Zellen deutlich langsamer als die IRAK Proteolyse, ist jedoch wahrscheinlich von der IRAK Kinaseaktivität unbeeinflusst und könnte so das Signal begrenzen.

Die diskutierten Modellvorstellungen zu den frühen Ereignissen in der Signaltransduktion des IL-1 Rezeptors sind in Abb. 24 schematisch dargestellt.

Wegen der destruktiven Effekte von IL-1 in chronisch entzündlichen Erkrankungen ist die Aufklärung der am IL-1 System beteiligten Signaltransduktionsmechanismen von großem pharmakologischen Interesse. In jüngster Zeit stellte sich heraus, daß die Signalmoleküle MyD88, IRAK und TRAF6 zusätzlich vom Interleukin-18 Rezeptorsystem und den Tollartigen Rezeptoren verwendet werden. Letztere sind als Rezeptoren der angeborenen Immunität identifiziert worden und wegen ihrer Fähigkeit, Immunreaktionen auf Pathogenbestandteile wie LPS auszulösen, prädestinierte Zielsysteme für die pharmakologische Intervention bei schweren Krankheitsbildern wie der Sepsis. Da IRAK das einzige, IL-1 Rezeptor assoziierte Protein ist, das über intrinsische Enzymaktivität verfügt und spezifisch für die Toll/IL-1 Signaltransduktion ist, stellt es ein wichtiges, potentiell Zielmolekül für klassische *drug screenings* dar, mit denen üblicherweise spezifische Enzyminhibitoren identifiziert werden.

Die vorliegenden Arbeiten dürften dazu beitragen, ein besseres Verständnis über die komplexen, molekularen Zusammenhänge in der frühen Signaltransduktion der Toll/IL-1 Rezeptorfamilie zu entwickeln. Zusätzlich wird deutlich, wie wichtig die Kenntnis der Mechanismen solcher „*Target*“ Moleküle für die Entwicklung pharmakologischer Interventionsstrategien ist. Im Fall der IRAK lassen die gewonnenen Erkenntnisse es jedenfalls fraglich erscheinen, ob die Evaluation eines klassischen Kinaseinhibitors den gewünschten Effekt hätte.

## 5 Literaturverzeichnis

- [1] Aarden, L.A., Brunner, T.K., Cerrottini, J.C., Dayer, J.M., De Weck, A.L., Dinarello, C.A., Di Sabato, G., Farrar, J.J., Gery, I., Gillis, S., *et al.* (1979) *Revised nomenclature for antigen-non specific T cell proliferation helper factors (letter)*. *J. Immunol.*, **123**: 2928.
- [2] Gery, I., Gershon, R.K., Waksman, B.H. (1972) *Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens*. *J. Exp. Med.*, **136**(1): 128-155.
- [3] Webb, A.C., Collins, K.L., Auron, P.E., Eddy, R.L., Nakai, H., Byers, M.G., Haley, L.L., Henry, W.M., Shows, T.B. (1986) *Interleukin-1 gene (IL1) assigned to long arm of human chromosome 2*. *Lymphokine Res.*, **5**(2): 77-85.
- [4] Roux-Lombard, P. (1998) *The interleukin-1 family*. *Eur. Cytokine Netw.*, **9**(4): 565-576.
- [5] Auron, P.E., Webb, A.C., Rosenwasser, L.J., Mucci, S.F., Rich, A., Wolff, S.M., Dinarello, C.A. (1984) *Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**(24): 7907-7911.
- [6] March, C.J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D.P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C.S., Kronheim, S.R., Grabstein, K., *et al.* (1985) *Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs*. *Nature*, **315**(6021): 641-647.
- [7] Wakabayashi, G., Gelfand, J.A., Jung, W.K., Connolly, R.J., Burke, J.F., Dinarello, C.A. (1991) *Staphylococcus epidermidis induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. Comparison to Escherichia coli*. *J. Clin. Invest.*, **87**(6): 1925-1935.
- [8] Brody, D.T., Durum, S.K. (1989) *Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction*. *J. Immunol.*, **143**(4): 1183-1187.
- [9] Stevenson, F.T., Bursten, S.L., Fanton, C., Locksley, R.M., Lovett, D.H. (1993) *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*, **90**(15): 7245-7249.
- [10] Kobayashi, Y., Yamamoto, K., Saido, T., Kawasaki, H., Oppenheim, J.J., Matsushima, K. (1990) *Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**(14): 5548-5552.
- [11] Kavita, U., Mizel, S.B. (1995) *Differential sensitivity of interleukin-1 alpha and -beta precursor proteins to cleavage by calpain, a calcium-dependent protease*. *J. Biol. Chem.*, **270**(46): 27758-27765.
- [12] Dinarello, C.A. (1991) *Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism*. *Blood*, **77**(8): 1627-1652.
- [13] Black, R.A., Kronheim, S.R., Cantrell, M., Deeley, M.C., March, C.J., Prickett, K.S., Wignall, J., Conlon, P.J., Cosman, D., Hopp, T.P., *et al.* (1988) *Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor*. *J. Biol. Chem.*, **263**(19): 9437-9442.
- [14] Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T., Cannizzaro, L.A., *et al.* (1992) *Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme*. *Science*, **256**(5053): 97-100.
- [15] Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., *et al.* (1992) *A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes*. *Nature*, **356**(6372): 768-774.
- [16] Dinarello, C.A., Thompson, R.C. (1991) *Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro*. *Immunol. Today*, **12**(11): 404-410.
- [17] Eisenberg, S.P., Evans, R.J., Arend, W.P., Verderber, E., Brewer, M.T., Hannum, C.H., Thompson, R.C. (1990) *Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist*. *Nature*, **343**(6256): 341-346.
- [18] Carter, D.B., Deibel, M.R., Jr., Dunn, C.J., Tomich, C.S., Laborde, A.L., Slightom, J.L., Berger, A.E., Bienkowski, M.J., Sun, F.F., McEwan, R.N., *et al.* (1990) *Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein [see comments]*. *Nature*, **344**(6267): 633-638.

- [19] Hannum, C.H., Wilcox, C.J., Arend, W.P., Joslin, F.G., Dripps, D.J., Heimdal, P.L., Armes, L.G., Sommer, A., Eisenberg, S.P., Thompson, R.C. (1990) *Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor*. *Nature*, **343**(6256): 336-340.
- [20] Dinarello, C.A. (1996) *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. *Blood*, **87**(6): 2095-2147.
- [21] Nashan, D., Luger, T.A. (1999) *Interleukin 1 (Teil 2: Wirkungsmechanismen und therapeutische Möglichkeiten)*. *Hautarzt*, **50**(10): 756-763.
- [22] Mukaida, N., Morita, M., Ishikawa, Y., Rice, N., Okamoto, S., Kasahara, T., Matsushima, K. (1994) *Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression*. *J. Biol. Chem.*, **269**(18): 13289-13295.
- [23] Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Majeau, G.R., Cotran, R.S., Gimbrone, M.A., Jr. (1984) *Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells*. *J. Exp. Med.*, **160**(2): 618-623.
- [24] Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Wheeler, M.E., Cotran, R.S., Gimbrone, M.A., Jr. (1985) *Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines*. *J. Clin. Invest.*, **76**(5): 2003-2011.
- [25] Schmidt, J.A., Mizel, S.B., Cohen, D., Green, I. (1982) *Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation*. *J. Immunol.*, **128**(5): 2177-2182.
- [26] Bernheim, H.A., Gilbert, T.M., Stitt, J.T. (1980) *Prostaglandin E levels in third ventricular cerebrospinal fluid of rabbits during fever and changes in body temperature*. *J Physiol (Lond)*, **301**: 69-78.
- [27] Baracos, V., Rodemann, H.P., Dinarello, C.A., Goldberg, A.L. (1983) *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.*, **308**(10): 553-558.
- [28] Ramadori, G., Sipe, J.D., Dinarello, C.A., Mizel, S.B., Colten, H.R. (1985) *Pretranslational modulation of acute phase hepatic protein synthesis by murine recombinant interleukin 1 (IL-1) and purified human IL-1*. *J. Exp. Med.*, **162**(3): 930-942.
- [29] Dinarello, C.A. (1994) *The biological properties of interleukin-1*. *Eur. Cytokine Netw.*, **5**(6): 517-531.
- [30] Hoffmann, M.K., Gilbert, K.M., Hirst, J.A., Scheid, M. (1987) *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*, **3**(1): 29-36.
- [31] Bagby, G.C., Jr. (1989) *Interleukin-1 and hematopoiesis*. *Blood Rev.*, **3**(3): 152-161.
- [32] Hestdal, K., Ruscetti, F.W., Chizzonite, R., Ortiz, M., Gooya, J.M., Longo, D.L., Keller, J.R. (1994) *Interleukin-1 (IL-1) directly and indirectly promotes hematopoietic cell growth through type I IL-1 receptor*. *Blood*, **84**(1): 125-132.
- [33] Arend, W.P., Dayer, J.M. (1990) *Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum.*, **33**(3): 305-315.
- [34] Krane, S.M., Conca, W., Stephenson, M.L., Amento, E.P., Goldring, M.B. (1990) *Mechanisms of matrix degradation in rheumatoid arthritis*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **580**: 340-354.
- [35] Dower, S.K., Kronheim, S.R., March, C.J., Conlon, P.J., Hopp, T.P., Gillis, S., Urdal, D.L. (1985) *Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1*. *J. Exp. Med.*, **162**(2): 501-515.
- [36] Sims, J.E., Acres, R.B., Grubin, C.E., McMahan, C.J., Wignall, J.M., March, C.J., Dower, S.K. (1989) *Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(22): 8946-8950.
- [37] McMahan, C.J., Slack, J.L., Mosley, B., Cosman, D., Lupton, S.D., Brunton, L.L., Grubin, C.E., Wignall, J.M., Jenkins, N.A., Brannan, C.I., et al. (1991) *A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types*. *EMBO J.*, **10**(10): 2821-2832.
- [38] Heguy, A., Baldari, C.T., Censini, S., Ghiara, P., Telford, J.L. (1993) *A chimeric type II/type I interleukin-1 receptor can mediate interleukin-1 induction of gene expression in T cells*. *J. Biol. Chem.*, **268**(14): 10490-10494.

- [39] Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarutti, N., Sironi, M., Giri, J.G., Dower, S.K., Sims, J.E., Mantovani, A. (1993) *Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4*. *Science*, **261**(5120): 472-475.
- [40] Sims, J.E., Dower, S.K. (1994) *Interleukin-1 receptors*. *Eur. Cytokine Netw.*, **5**(6): 539-546.
- [41] Orlando, S., Sironi, M., Bianchi, G., Drummond, A.H., Boraschi, D., Yabes, D., Mantovani, A. (1997) *Role of metalloproteases in the release of the IL-1 type II decoy receptor*. *J. Biol. Chem.*, **272**(50): 31764-31769.
- [42] Kuno, K., Okamoto, S., Hirose, K., Murakami, S., Matsushima, K. (1993) *Structure and function of the intracellular portion of the mouse interleukin 1 receptor (type I). Determining the essential region for transducing signals to activate the interleukin 8 gene*. *J. Biol. Chem.*, **268**(18): 13510-13518.
- [43] Greenfeder, S.A., Nunes, P., Kwee, L., Labow, M., Chizzonite, R.A., Ju, G. (1995) *Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex*. *J. Biol. Chem.*, **270**(23): 13757-13765.
- [44] Wesche, H., Resch, K., Martin, M.U. (1998) *Effects of IL-1 receptor accessory protein on IL-1 binding*. *FEBS Lett.*, **429**(3): 303-306.
- [45] Korherr, C., Hofmeister, R., Wesche, H., Falk, W. (1997) *A critical role for interleukin-1 receptor accessory protein in interleukin-1 signaling*. *Eur. J. Immunol.*, **27**(1): 262-267.
- [46] Wesche, H., Korherr, C., Kracht, M., Falk, W., Resch, K., Martin, M.U. (1997) *The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases)*. *J. Biol. Chem.*, **272**(12): 7727-7731.
- [47] Evans, R.J., Bray, J., Childs, J.D., Vigers, G.P., Brandhuber, B.J., Skalicky, J.J., Thompson, R.C., Eisenberg, S.P. (1995) *Mapping receptor binding sites in interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1 beta by site-directed mutagenesis. Identification of a single site in IL-1ra and two sites in IL-1 beta*. *J. Biol. Chem.*, **270**(19): 11477-11483.
- [48] Vigers, G.P., Anderson, L.J., Caffes, P., Brandhuber, B.J. (1997) *Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta*. *Nature*, **386**(6621): 190-194.
- [49] Schreuder, H., Tardif, C., Trump-Kallmeyer, S., Soffientini, A., Sarubbi, E., Akesson, A., Bowlin, T., Yanofsky, S., Barrett, R.W. (1997) *A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist*. *Nature*, **386**(6621): 194-200.
- [50] Bossu, P., Visconti, U., Ruggiero, P., Macchia, G., Muda, M., Bertini, R., Bizzarri, C., Colagrande, A., Sabbatini, V., Maurizi, G., et al. (1995) *Transfected type II interleukin-1 receptor impairs responsiveness of human keratinocytes to interleukin-1*. *Am. J. Pathol.*, **147**(6): 1852-1861.
- [51] Re, F., Sironi, M., Muzio, M., Matteucci, C., Introna, M., Orlando, S., Penton-Rol, G., Dower, S.K., Sims, J.E., Colotta, F., et al. (1996) *Inhibition of interleukin-1 responsiveness by type II receptor gene transfer: a surface "receptor" with anti-interleukin-1 function*. *J. Exp. Med.*, **183**(4): 1841-1850.
- [52] Lang, D., Knop, J., Wesche, H., Raffetseder, U., Kurrle, R., Boraschi, D., Martin, M.U. (1998) *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.*, **161**(12): 6871-6877.
- [53] Malinowsky, D., Lundkvist, J., Laye, S., Bartfai, T. (1998) *Interleukin-1 receptor accessory protein interacts with the type II interleukin-1 receptor*. *FEBS Lett.*, **429**(3): 299-302.
- [54] Giri, J.G., Wells, J., Dower, S.K., McCall, C.E., Guzman, R.N., Slack, J., Bird, T.A., Shanebeck, K., Grabstein, K.H., Sims, J.E., et al. (1994) *Elevated levels of shed type II IL-1 receptor in sepsis. Potential role for type II receptor in regulation of IL-1 responses*. *J. Immunol.*, **153**(12): 5802-5809.
- [55] Kollwe, C., Raffetseder, U., Martin, M.U. (1999) *Different roles for membrane-bound and soluble forms of the type II Interleukin-1 receptor in regulating IL-1 responses*. *Immunobiology*, **200**(3-5): (Abstract G.16) 419.
- [56] Gay, N.J., Keith, F.J. (1991) *Drosophila Toll and IL-1 receptor*. *Nature*, **351**(6325): 355-356.
- [57] Hardiman, G., Rock, F.L., Balasubramanian, S., Kastelein, R.A., Bazan, J.F. (1996) *Molecular characterization and modular analysis of human MyD88*. *Oncogene*, **13**(11): 2467-2475.

- [58] Bonnert, T.P., Garka, K.E., Parnet, P., Sonoda, G., Testa, J.R., Sims, J.E. (1997) *The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family*. FEBS Lett., **402**(1): 81-84.
- [59] Mitcham, J.L., Parnet, P., Bonnert, T.P., Garka, K.E., Gerhart, M.J., Slack, J.L., Gayle, M.A., Dower, S.K., Sims, J.E. (1996) *T1/ST2 signaling establishes it as a member of an expanding interleukin-1 receptor family*. J. Biol. Chem., **271**(10): 5777-5783.
- [60] Lovenberg, T.W., Crowe, P.D., Liu, C., Chalmers, D.T., Liu, X.J., Liaw, C., Clevenger, W., Oltersdorf, T., De Souza, E.B., Maki, R.A. (1996) *Cloning of a cDNA encoding a novel interleukin-1 receptor related protein (IL 1R-rp2)*. J. Neuroimmunol., **70**(2): 113-122.
- [61] O'Neill, L.A., Greene, C. (1998) *Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants*. J. Leukoc. Biol., **63**(6): 650-657.
- [62] Parnet, P., Garka, K.E., Bonnert, T.P., Dower, S.K., Sims, J.E. (1996) *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., **271**(8): 3967-3970.
- [63] Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Kobayashi, S., Taniai, M., Kunikata, T., Murakami, T., Sanou, O., Kojima, H., Fujii, M., et al. (1997) *Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor*. J. Biol. Chem., **272**(41): 25737-25742.
- [64] Nakamura, K., Okamura, H., Wada, M., Nagata, K., Tamura, T. (1989) *Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production*. Infect. Immun., **57**(2): 590-595.
- [65] Okamura, H., Tsutsi, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K., et al. (1995) *Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells [see comments]*. Nature, **378**(6552): 88-91.
- [66] Ushio, S., Namba, M., Okura, T., Hattori, K., Nukada, Y., Akita, K., Tanabe, F., Konishi, K., Micallef, M., Fujii, M., et al. (1996) *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., **156**(11): 4274-4279.
- [67] Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., Quintal, L., Sekut, L., Talanian, R., Paskind, M., et al. (1997) *Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production*. Nature, **386**(6625): 619-623.
- [68] Dinarello, C.A., Novick, D., Puren, A.J., Fantuzzi, G., Shapiro, L., Muhl, H., Yoon, D.Y., Reznikov, L.L., Kim, S.H., Rubinstein, M. (1998) *Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor*. J. Leukoc. Biol., **63**(6): 658-664.
- [69] Dinarello, C.A. (1999) *IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family*. J. Allergy Clin. Immunol., **103**(1 Pt 1): 11-24.
- [70] Born, T.L., Thomassen, E., Bird, T.A., Sims, J.E. (1998) *Cloning of a Novel Receptor Subunit, AcPL, Required for Interleukin-18 Signaling*. J. Biol. Chem., **273**(45): 29445-29450.
- [71] Morisato, D., Anderson, K.V. (1994) *The spatzle gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo*. Cell, **76**(4): 677-688.
- [72] Hashimoto, C., Hudson, K.L., Anderson, K.V. (1988) *The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein*. Cell, **52**(2): 269-279.
- [73] Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. (1996) *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, **86**(6): 973-983.
- [74] Williams, M.J., Rodriguez, A., Kimbrell, D.A., Eldon, E.D. (1997) *The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in Drosophila host defense*. EMBO J., **16**(20): 6120-6130.
- [75] Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., Dinesh-Kumar, S.P. (1997) *Signaling in plant-microbe interactions*. Science, **276**(5313): 726-733.
- [76] Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A., Jr. (1997) *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature, **388**(6640): 394-397.

- [77] Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., Bazan, J.F. (1998) *A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll*. Proc Natl Acad Sci U S A, **95**(2): 588-593.
- [78] Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Takeda, K., Akira, S. (1999) *TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family*. Gene, **231**(1-2): 59-65.
- [79] Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Huffel, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998) *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, **282**(5396): 2085-2088.
- [80] Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S. (1999) *Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product*. J. Immunol., **162**(7): 3749-3752.
- [81] Kirschning, C.J., Wesche, H., Merrill Ayres, T., Rothe, M. (1998) *Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide*. J. Exp. Med., **188**(11): 2091-2097.
- [82] Yang, R.B., Mark, M.R., Gray, A., Huang, A., Xie, M.H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W.I., Gurney, A.L., Godowski, P.J. (1998) *Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling [see comments]*. Nature, **395**(6699): 284-288.
- [83] Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. (1999) *Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components*. Immunity, **11**(4): 443-451.
- [84] Chow, J.C., Young, D.W., Golenbock, D.T., Christ, W.J., Gusovsky, F. (1999) *Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction*. J. Biol. Chem., **274**(16): 10689-10692.
- [85] Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R.R., Tuomanen, E., Dziarski, R., Golenbock, D. (1999) *Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2*. J. Immunol., **163**(1): 1-5.
- [86] Heine, H., Kirschning, C.J., Lien, E., Monks, B.G., Rothe, M., Golenbock, D.T. (1999) *Cutting edge: cells that carry a null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin*. J. Immunol., **162**(12): 6971-6975.
- [87] Means, T.K., Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A., Golenbock, D.T., Fenton, M.J. (1999) *Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis*. J. Immunol., **163**(7): 3920-3927.
- [88] Hirschfeld, M., Kirschning, C.J., Schwandner, R., Wesche, H., Weis, J.H., Wooten, R.M., Weis, J.J. (1999) *Cutting edge: inflammatory signaling by Borrelia burgdorferi lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2*. J. Immunol., **163**(5): 2382-2386.
- [89] Bankers-Fulbright, J.L., Kalli, K.R., McKean, D.J. (1996) *Interleukin-1 signal transduction*. Life Sci., **59**(2): 61-83.
- [90] Karin, M. (1995) *The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases*. J. Biol. Chem., **270**(28): 16483-16486.
- [91] Karin, M., Liu, Z., Zandi, E. (1997) *AP-1 function and regulation*. Curr. Opin. Cell Biol., **9**(2): 240-246.
- [92] Minden, A., Karin, M. (1997) *Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases*. Biochim. Biophys. Acta, **1333**(2): F85-104.
- [93] Eder, J. (1997) *Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 signalling: do MAPKK kinases connect it all?* Trends Pharmacol. Sci., **18**(9): 319-322.
- [94] Martin, M.U., Falk, W. (1997) *The interleukin-1 receptor complex and interleukin-1 signal transduction*. Eur. Cytokine Netw., **8**(1): 5-17.
- [95] Baeuerle, P.A., Baltimore, D. (1996) *NF-kappa B: ten years after*. Cell, **87**(1): 13-20.
- [96] Thanos, D., Maniatis, T. (1995) *NF-kappa B: a lesson in family values*. Cell, **80**(4): 529-532.
- [97] Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D., Miyamoto, S. (1995) *Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation*. Genes Dev., **9**(22): 2723-2735.
- [98] DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E., Karin, M. (1997) *A cytokine-responsive I kappa B kinase that activates the transcription factor NF-kappa B*. Nature, **388**(6642): 548-554.

- [99] Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Li, J., Young, D.B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., *et al.* (1997) *IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation [see comments]*. *Science*, **278**(5339): 860-866.
- [100] Regnier, C.H., Song, H.Y., Gao, X., Goeddel, D.V., Cao, Z., Rothe, M. (1997) *Identification and characterization of an IkappaB kinase*. *Cell*, **90**(2): 373-383.
- [101] Cohen, L., Henzel, W.J., Baeuerle, P.A. (1998) *IKAP is a scaffold protein of the IkappaB kinase complex [see comments]*. *Nature*, **395**(6699): 292-296.
- [102] Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G., Karin, M. (1998) *IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex [see comments]*. *Nature*, **395**(6699): 297-300.
- [103] Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J., Israel, A. (1998) *Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation*. *Cell*, **93**(7): 1231-1240.
- [104] Malinin, N.L., Boldin, M.P., Kovalenko, A.V., Wallach, D. (1997) *MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1*. *Nature*, **385**(6616): 540-544.
- [105] Woronicz, J.D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M., Goeddel, D.V. (1997) *IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK [see comments]*. *Science*, **278**(5339): 866-869.
- [106] Bird, T.A., Schooley, K., Dower, S.K., Hagen, H., Virca, G.D. (1997) *Activation of nuclear transcription factor NF-kappaB by interleukin-1 is accompanied by casein kinase II-mediated phosphorylation of the p65 subunit*. *J. Biol. Chem.*, **272**(51): 32606-32612.
- [107] Guesdon, F., Knight, C.G., Rawlinson, L.M., Saklatvala, J. (1997) *Dual specificity of the interleukin 1- and tumor necrosis factor- activated beta casein kinase*. *J. Biol. Chem.*, **272**(48): 30017-30024.
- [108] Machleidt, T., Wiegmann, K., Henkel, T., Schütze, S., Baeuerle, P., Krönke, M. (1994) *Sphingomyelinase activates proteolytic I kappa B-alpha degradation in a cell-free system*. *J. Biol. Chem.*, **269**(19): 13760-13765.
- [109] Kolesnick, R., Golde, D.W. (1994) *The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling*. *Cell*, **77**(3): 325-328.
- [110] Schütze, S., Machleidt, T., Krönke, M. (1994) *The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin-1 signal transduction*. *J. Leukoc. Biol.*, **56**(5): 533-541.
- [111] Hofmeister, R., Wiegmann, K., Korherr, C., Bernardo, K., Krönke, M., Falk, W. (1997) *Activation of acid sphingomyelinase by interleukin-1 (IL-1) requires the IL-1 receptor accessory protein*. *J. Biol. Chem.*, **272**(44): 27730-27736.
- [112] Huang, C., Ma, W.Y., Dong, Z. (1996) *Requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor-induced AP-1 transactivation and transformation in JB6 P+ cells*. *Mol. Cell. Biol.*, **16**(11): 6427-6435.
- [113] Klippel, A., Reinhard, C., Kavanaugh, W.M., Apell, G., Escobedo, M.A., Williams, L.T. (1996) *Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways*. *Mol. Cell. Biol.*, **16**(8): 4117-4127.
- [114] Reddy, S.A., Huang, J.H., Liao, W.S. (1997) *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.*, **272**(46): 29167-29173.
- [115] Marmiroli, S., Bavelloni, A., Faenza, I., Sirri, A., Ognibene, A., Cenni, V., Tsukada, J., Koyama, Y., Ruzzene, M., Ferri, A., *et al.* (1998) *Phosphatidylinositol 3-kinase is recruited to a specific site in the activated IL-1 receptor I*. *FEBS Lett.*, **438**(1-2): 49-54.
- [116] Belvin, M.P., Anderson, K.V. (1996) *A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**: 393-416.
- [117] Letsou, A., Alexander, S., Orth, K., Wasserman, S.A. (1991) *Genetic and molecular characterization of tube, a Drosophila gene maternally required for embryonic dorsoventral polarity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(3): 810-814.

- [118] Shelton, C.A., Wasserman, S.A. (1993) *pelle* encodes a protein kinase required to establish dorsoventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell*, **72**(4): 515-525.
- [119] Grosshans, J., Bergmann, A., Haffter, P., Nusslein-Volhard, C. (1994) Activation of the kinase *Pelle* by *Tube* in the dorsoventral signal transduction pathway of *Drosophila* embryo. *Nature*, **372**(6506): 563-566.
- [120] Galindo, R.L., Edwards, D.N., Gillespie, S.K., Wasserman, S.A. (1995) Interaction of the *pelle* kinase with the membrane-associated protein *tube* is required for transduction of the dorsoventral signal in *Drosophila* embryos. *Development*, **121**(7): 2209-2218.
- [121] Martin, M., Bol, G.F., Eriksson, A., Resch, K., Brigelius-Flohe, R. (1994) Interleukin-1-induced activation of a protein kinase co-precipitating with the type I interleukin-1 receptor in T cells. *Eur. J. Immunol.*, **24**(7): 1566-1571.
- [122] Cao, Z., Henzel, W.J., Gao, X. (1996) *IRAK*: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science*, **271**(5252): 1128-1131.
- [123] Trofimova, M., Sprenkle, A.B., Green, M., Sturgill, T.W., Goebel, M.G., Harrington, M.A. (1996) Developmental and tissue-specific expression of mouse *pelle*-like protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **271**(30): 17609-17612.
- [124] Heguy, A., Baldari, C.T., Macchia, G., Telford, J.L., Melli, M. (1992) Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (*IL-1Rs*) and the *Drosophila* toll protein are essential for *IL-1R* signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **267**(4): 2605-2609.
- [125] Croston, G.E., Cao, Z., Goeddel, D.V. (1995) *NF-kappa B* activation by interleukin-1 (*IL-1*) requires an *IL-1* receptor-associated protein kinase activity. *J. Biol. Chem.*, **270**(28): 16514-16517.
- [126] Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., Goeddel, D.V. (1996) *TRAF6* is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*, **383**(6599): 443-446.
- [127] Muzio, M., Ni, J., Feng, P., Dixit, V.M. (1997) *IRAK* (*Pelle*) family member *IRAK-2* and *MyD88* as proximal mediators of *IL-1* signaling. *Science*, **278**(5343): 1612-1615.
- [128] Wesche, H., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Li, S., Cao, Z. (1997) *MyD88*: an adapter that recruits *IRAK* to the *IL-1* receptor complex. *Immunity*, **7**(6): 837-847.
- [129] Lord, K.A., Hoffman-Liebermann, B., Liebermann, D.A. (1990) Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding *MyD88*, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by *IL6*. *Oncogene*, **5**(7): 1095-1097.
- [130] Feinstein, E., Kimchi, A., Wallach, D., Boldin, M., Varfolomeev, E. (1995) The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends Biochem. Sci.*, **20**(9): 342-344.
- [131] Burns, K., Martinon, F., Esslinger, C., Pahl, H., Schneider, P., Bodmer, J.L., Di Marco, F., French, L., Tschopp, J. (1998) *MyD88*, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.*, **273**(20): 12203-12209.
- [132] Thomassen, E., Bird, T.A., Renshaw, B.R., Kennedy, M.K., Sims, J.E. (1998) Binding of interleukin-18 to the interleukin-1 receptor homologous receptor *IL-1Rrp1* leads to activation of signaling pathways similar to those used by interleukin-1. *J. Interferon Cytokine Res.*, **18**(12): 1077-1088.
- [133] Kanakaraj, P., Ngo, K., Wu, Y., Angulo, A., Ghazal, P., Harris, C.A., Siekierka, J.J., Peterson, P.A., Fung-Leung, W.P. (1999) 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.*, **189**(7): 1129-1138.
- [134] Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., Akira, S. (1998) Targeted disruption of the *MyD88* gene results in loss of *IL-1*- and *IL-18*-mediated function. *Immunity*, **9**(1): 143-150.
- [135] Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., Janeway, C.A., Jr. (1998) *MyD88* is an adaptor protein in the *hToll/IL-1* receptor family signaling pathways. *Mol Cell*, **2**(2): 253-258.
- [136] Muzio, M., Natoli, G., Saccani, S., Levrero, M., Mantovani, A. (1998) The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor *kappaB* and *JNK/SAPK* activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (*TRAF6*). *J. Exp. Med.*, **187**(12): 2097-2101.

- [137] Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. (1999) *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. *Immunity*, **11**(1): 115-122.
- [138] Wesche, H. "Der Interleukin-1 Rezeptorkomplex", Dissertation, Universität Hannover, 1997.
- [139] Knop, J. "Die Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Proteinkinase IRAK", Diplomarbeit, Universität Hannover, 1997.
- [140] Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, G.A., Struhl, K., *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates/Wiley&Sons: New York, 1994.
- [141] Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**: 5463-5467.
- [142] Graham, F.L., van der Eb, A.J. (1973) *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA*. *Virology*, **52**: 456.
- [143] Sussman, D.J., Milman, G. (1984) *Short-term, high -efficiency expression of transfected DNA*. *Mol. Cell. Biol.*, **4**: 1641-1643.
- [144] Bradford, M.M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- [145] Laemmli, U.K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, **227**(259): 680-685.
- [146] Bomszyk, K., Toivola, B., Emery, D.W., Rooney, J.W., Dower, S.K., Rachie, N.A., Hopkins-Sibley, C. (1990) *Role of cAMP in Interleukin-1 induced kappa Light Chain gene expression in murine B Cell Lines*. *J. Biol. Chem.*, **265**: 9413-9417.
- [147] Iwasaki, T., Sims, J.E., Grabstein, K., Dower, S.K., Rachie, N., Bomszyk, K. (1993) *Comparison of IL-1 alpha effectiveness in activating murine pre-B and T cell lines*. *Cytokine*, **5**(5): 416-426.
- [148] Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., Karin, M. (1993) *Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the cJun activation domain*. *Genes Dev.*, **7**(2135-2148).
- [149] Xiao, T., Towb, P., Wasserman, S.A., Sprang, S.R. (1999) *Three-dimensional structure of a complex between the death domains of Pelle and Tube*. *Cell*, **99**(5): 545-555.
- [150] Hanks, S.K., Quinn, A.M. (1991) *Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members*. *Methods Enzymol.*, **200**: 38-62.
- [151] Hanks, S.K., Hunter, T. (1995) *Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification*. *FASEB J.*, **9**(8): 576-596.
- [152] Kanakaraj, P., Schafer, P.H., Cavender, D.E., Wu, Y., Ngo, K., Grealish, P.F., Wadsworth, S.A., Peterson, P.A., Siekierka, J.J., Harris, C.A., *et al.* (1998) *Interleukin (IL)-1 receptor-associated kinase (IRAK) requirement for optimal induction of multiple IL-1 signaling pathways and IL-6 production*. *J. Exp. Med.*, **187**(12): 2073-2079.
- [153] Thomas, J.A., Allen, J.L., Tsen, M., Dubnicoff, T., Danao, J., Liao, X.C., Cao, Z., Wasserman, S.A. (1999) *Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase*. *J. Immunol.*, **163**(2): 978-984.
- [154] Vig, E., Green, M., Liu, Y., Donner, D.B., Mukaida, N., Goebel, M.G., Harrington, M.A. (1999) *Modulation of tumor necrosis factor and interleukin-1-dependent NF- kappaB activity by mPLK/IRAK*. *J. Biol. Chem.*, **274**(19): 13077-13084.
- [155] Brigelius-Flohe, R., Bilgin, B., Eickemeier, S., Hipskind, R., Singh, M., Szamel, M., Resch, K. (1995) *The NF kappa B heterodimer/homodimer balance and IL-1-stimulated IL-2 production in murine T lymphocytes*. *Biofactors*, **5**(4): 169-174.
- [156] Chen, C.Y., Del Gatto-Konczak, F., Wu, Z., Karin, M. (1998) *Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway*. *Science*, **280**(5371): 1945-1949.
- [157] Varga, G., Dreikhausen, U., Kracht, M., Appel, A., Resch, K., Szamel, M. (1999) *Molecular mechanisms of T lymphocyte activation: convergence of T cell antigen receptor and IL-1 receptor-induced signaling at the level of IL-2 gene transcription*. *Int. Immunol.*, **11**(11): 1851-1862.

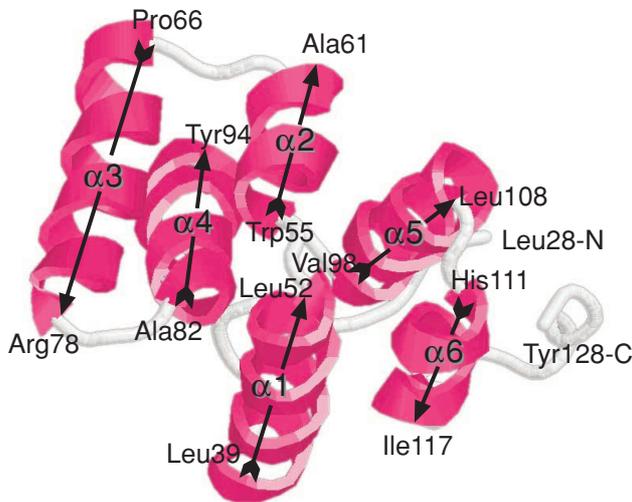
- [158] Greene, C., O'Neill, L. (1999) *Interleukin-1 receptor-associated kinase and TRAF-6 mediate the transcriptional regulation of interleukin-2 by interleukin-1 via NF-kappaB but unlike interleukin-1 are unable to stabilise interleukin-2 mRNA*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1451**(1): 109-121.
- [159] Krause, A., Holtmann, H., Eickemeier, S., Winzen, R., Szamel, M., Resch, K., Saklatvala, J., Kracht, M. (1998) *Stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase is required for interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB*. *J. Biol. Chem.*, **273**(37): 23681-23689.
- [160] Holtmann, H., Winzen, R., Holland, P., Eickemeier, S., Hoffmann, E., Wallach, D., Malinin, N.L., Cooper, J.A., Resch, K., Kracht, M. (1999) *Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways [In Process Citation]*. *Mol. Cell. Biol.*, **19**(10): 6742-6753.
- [161] Winzen, R., Kracht, M., Ritter, B., Wilhelm, A., Chen, C.Y., Shyu, A.B., Muller, M., Gaestel, M., Resch, K., Holtmann, H. (1999) *The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism*. *EMBO J.*, **18**(18): 4969-4980.
- [162] Kelliher, M.A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B.Z., Leder, P. (1998) *The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal*. *Immunity*, **8**(3): 297-303.
- [163] Lee, S.Y., Reichlin, A., Santana, A., Sokol, K.A., Nussenzweig, M.C., Choi, Y. (1997) *TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival*. *Immunity*, **7**(5): 703-713.
- [164] Yeh, W.C., Shahinian, A., Speiser, D., Kraunus, J., Billia, F., Wakeham, A., de la Pompa, J.L., Ferrick, D., Hum, B., Iscove, N., et al. (1997) *Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice*. *Immunity*, **7**(5): 715-725.
- [165] Baud, V., Liu, Z.G., Bennett, B., Suzuki, N., Xia, Y., Karin, M. (1999) *Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain*. *Genes Dev.*, **13**(10): 1297-1308.
- [166] Li, X., Commane, M., Burns, C., Vithalani, K., Cao, Z., Stark, G.R. (1999) *Mutant cells that do not respond to interleukin-1 (IL-1) reveal a novel role for IL-1 receptor-associated kinase*. *Mol. Cell. Biol.*, **19**(7): 4643-4652.
- [167] Sakurai, H., Shigemori, N., Hasegawa, K., Sugita, T. (1998) *TGF-beta-activated kinase 1 stimulates NF-kappa B activation by an NF-kappa B-inducing kinase-independent mechanism*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **243**(2): 545-549.
- [168] Shibuya, H., Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Tonegawa, A., Gotoh, Y., Ueno, N., Irie, K., Nishida, E., Matsumoto, K. (1996) *TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction*. *Science*, **272**(5265): 1179-1182.
- [169] Lange-Carter, C.A., Pleiman, C.M., Gardner, A.M., Blumer, K.J., Johnson, G.L. (1993) *A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf*. *Science*, **260**(5106): 315-319.
- [170] Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., Gotoh, Y. (1997) *Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways*. *Science*, **275**(5296): 90-94.
- [171] Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K., Ichijo, H. (1998) *ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2*. *Mol Cell*, **2**(3): 389-395.
- [172] Hoeflich, K.P., Yeh, W.C., Yao, Z., Mak, T.W., Woodgett, J.R. (1999) *Mediation of TNF receptor-associated factor effector functions by apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK1)*. *Oncogene*, **18**(42): 5814-5820.
- [173] Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., Matsumoto, K. (1999) *The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway*. *Nature*, **398**(6724): 252-256.
- [174] Lee, F.S., Peters, R.T., Dang, L.C., Maniatis, T. (1998) *MEKK1 activates both IkappaB kinase alpha and IkappaB kinase beta*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(16): 9319-9324.

- [175] Nemoto, S., DiDonato, J.A., Lin, A. (1998) *Coordinate regulation of IkappaB kinases by mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 and NF-kappaB-inducing kinase*. Mol. Cell. Biol., **18**(12): 7336-7343.
- [176] Nakano, H., Shindo, M., Sakon, S., Nishinaka, S., Mihara, M., Yagita, H., Okumura, K. (1998) *Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, **95**(7): 3537-3542.
- [177] Kopp, E., Medzhitov, R., Carothers, J., Xiao, C., Douglas, I., Janeway, C.A., Ghosh, S. (1999) *ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway*. Genes Dev., **13**(16): 2059-2071.
- [178] Moriguchi, T., Kuroyanagi, N., Yamaguchi, K., Gotoh, Y., Irie, K., Kano, T., Shirakabe, K., Muro, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., et al. (1996) *A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3*. J. Biol. Chem., **271**(23): 13675-13679.
- [179] Shirakabe, K., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Matsuda, S., Moriguchi, T., Gotoh, Y., Matsumoto, K., Nishida, E. (1997) *TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase*. J. Biol. Chem., **272**(13): 8141-8144.
- [180] Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F.X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G.L., Karin, M. (1995) *Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2*. Science, **268**(5208): 286-290.
- [181] Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Derijard, B., Davis, R.J., Johnson, G.L., Karin, M. (1994) *Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK*. Science, **266**(5191): 1719-1723.
- [182] Lomaga, M.A., Yeh, W.C., Sarosi, I., Duncan, G.S., Furlonger, C., Ho, A., Morony, S., Capparelli, C., Van, G., Kaufman, S., et al. (1999) *TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling*. Genes Dev., **13**(8): 1015-1024.
- [183] Naito, A., Azuma, S., Tanaka, S., Miyazaki, T., Takaki, S., Takatsu, K., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Yamamoto, T., et al. (1999) *Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice*. Genes Cells, **4**(6): 353-362.
- [184] Wesche, H., Gao, X., Li, X., Kirschning, C.J., Stark, G.R., Cao, Z. (1999) *IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family*. J. Biol. Chem., **274**(27): 19403-19410.
- [185] Lai, J.H., Tan, T.H. (1994) *CD28 signaling causes a sustained down-regulation of I kappa B alpha which can be prevented by the immunosuppressant rapamycin*. J. Biol. Chem., **269**(48): 30077-30080.
- [186] Pimentel-Muinós, F.X., Mazana, J., Fresno, M. (1995) *Biphasic control of nuclear factor-kappa B activation by the T cell receptor complex: role of tumor necrosis factor alpha*. Eur. J. Immunol., **25**(1): 179-186.
- [187] Harhaj, E.W., Maggirwar, S.B., Good, L., Sun, S.C. (1996) *CD28 mediates a potent costimulatory signal for rapid degradation of IkappaBbeta which is associated with accelerated activation of various NF-kappaB/Rel heterodimers*. Mol. Cell. Biol., **16**(12): 6736-6743.
- [188] Kalli, K., Huntoon, C., Bell, M., McKean, D.J. (1998) *Mechanism responsible for T-cell antigen receptor- and CD28- or interleukin 1 (IL-1) receptor-initiated regulation of IL-2 gene expression by NF-kappaB*. Mol. Cell. Biol., **18**(6): 3140-3148.
- [189] Brown, K., Park, S., Kanno, T., Franzoso, G., Siebenlist, U. (1993) *Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, **90**(6): 2532-2536.
- [190] Ryseck, R.P., Bull, P., Takamiya, M., Bours, V., Siebenlist, U., Dobrzanski, P., Bravo, R. (1992) *RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B*. Mol. Cell. Biol., **12**(2): 674-684.
- [191] Venkataraman, L., Burakoff, S.J., Sen, R. (1995) *FK506 inhibits antigen receptor-mediated induction of c-rel in B and T lymphoid cells*. J. Exp. Med., **181**(3): 1091-1099.
- [192] Yamin, T.T., Miller, D.K. (1997) *The interleukin-1 receptor-associated kinase is degraded by proteasomes following its phosphorylation*. J. Biol. Chem., **272**(34): 21540-21547.

- [193] Maschera, B., Ray, K., Burns, K., Volpe, F. (1999) *Overexpression of an enzymically inactive interleukin-1-receptor- associated kinase activates nuclear factor-kappaB*. *Biochem. J.*, **339**(Pt 2): 227-231.
- [194] Traenckner, E.B., Pahl, H.L., Henkel, T., Schmidt, K.N., Wilk, S., Baeuerle, P.A. (1995) *Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli*. *EMBO J.*, **14**(12): 2876-2883.
- [195] Brakebusch, C., Nophar, Y., Kemper, O., Engelmann, H., Wallach, D. (1992) *Cytoplasmic truncation of the p55 tumour necrosis factor (TNF) receptor abolishes signalling, but not induced shedding of the receptor*. *EMBO J.*, **11**(3): 943-950.
- [196] Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D.V. (1995) *The TNF receptor I-associated protein TRADD signals cell death and NF- kappa B activation*. *Cell*, **81**(4): 495-504.
- [197] Stanger, B.Z., Leder, P., Lee, T.H., Kim, E., Seed, B. (1995) *RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death*. *Cell*, **81**(4): 513-523.
- [198] Schiffrmann, D.A., White, J.H., Cooper, A., Nutley, M.A., Harding, S.E., Jumel, K., Solari, R., Ray, K.P., Gay, N.J. (1999) *Formation and biochemical characterization of tube/pelle death domain complexes: critical regulators of postreceptor signaling by the Drosophila toll receptor*. *Biochemistry*, **38**(36): 11722-11733.
- [199] Shen, B., Manley, J.L. (1998) *Phosphorylation modulates direct interactions between the Toll receptor, Pelle kinase and Tube*. *Development*, **125**(23): 4719-4728.
- [200] Huang, J., Gao, X., Li, S., Cao, Z. (1997) *Recruitment of IRAK to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(24): 12829-12832.
- [201] Volpe, F., Clatworthy, J., Kaptein, A., Maschera, B., Griffin, A.M., Ray, K. (1997) *The IL1 receptor accessory protein is responsible for the recruitment of the interleukin-1 receptor associated kinase to the IL1/IL1 receptor I complex*. *FEBS Lett.*, **419**(1): 41-44.
- [202] Song, H.Y., Dunbar, J.D., Donner, D.B. (1994) *Aggregation of the intracellular domain of the type I tumor necrosis factor receptor defined by the two-hybrid system*. *J. Biol. Chem.*, **269**(36): 22492-22495.
- [203] Boldin, M.P., Mett, I.L., Varfolomeev, E.E., Chumakov, I., Shemer-Avni, Y., Camonis, J.H., Wallach, D. (1995) *Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects*. *J. Biol. Chem.*, **270**(1): 387-391.
- [204] Park, Y.C., Burkitt, V., Villa, A.R., Tong, L., Wu, H. (1999) *Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2*. *Nature*, **398**(6727): 533-538.
- [205] Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V., Goeddel, D.V. (1996) *TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor- I signaling complex*. *Immunity*, **4**(4): 387-396.
- [206] McCarthy, J.V., Ni, J., Dixit, V.M. (1998) *RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase*. *J. Biol. Chem.*, **273**(27): 16968-16975.
- [207] Knop, J., Martin, M.U. (1999) *Effects of IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) expression on IL-1 signaling are independent of its kinase activity*. *FEBS Lett.*, **448**(1): 81-85.
- [208] Singh, R., Huang, S., Guth, T., Konieczkowski, M., Sedor, J.R. (1997) *Cytosolic domain of the type I interleukin-1 receptor spontaneously recruits signaling molecules to activate a proinflammatory gene*. *J. Clin. Invest.*, **100**(2): 419-428.

## Anhang 1: Alphahelicale Struktur von "Todesdomänen" (death domains)

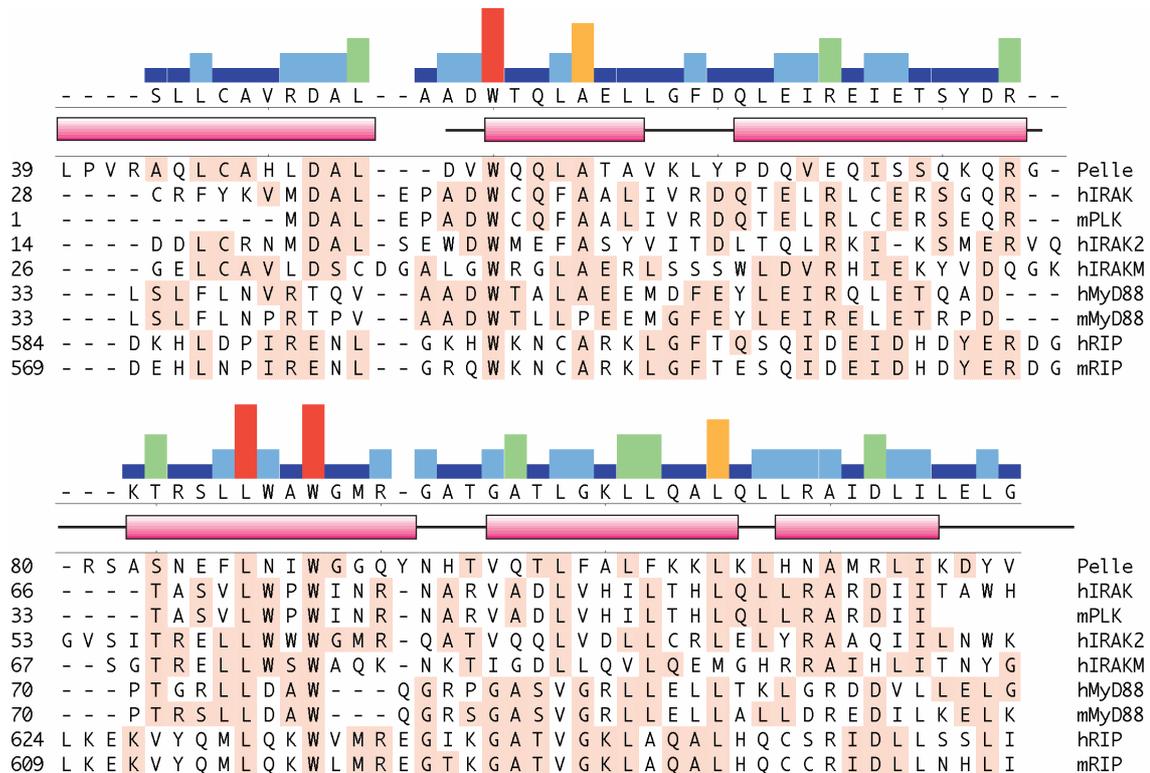
### A: Dreidimensionale Struktur der *Drosophila* Pelle death domain



Die Abbildung zeigt Kette A der Kristallstruktur des Komplexes aus Pelle und Tube death domains (Xiao *et al.*, 1999, Protein Data Bank ID Code 1dz2).

Strukturdaten wurden mit Hilfe des Netscape-Plugins Chemscape Chime 2.0a (MDL Information Systems Inc.) visualisiert. Die Pfeile markieren die 6 alphahelicale Regionen, die typisch für death domains sind. Anfang und Ende der Helices sind mit den Aminosäurepositionen eingezeichnet.

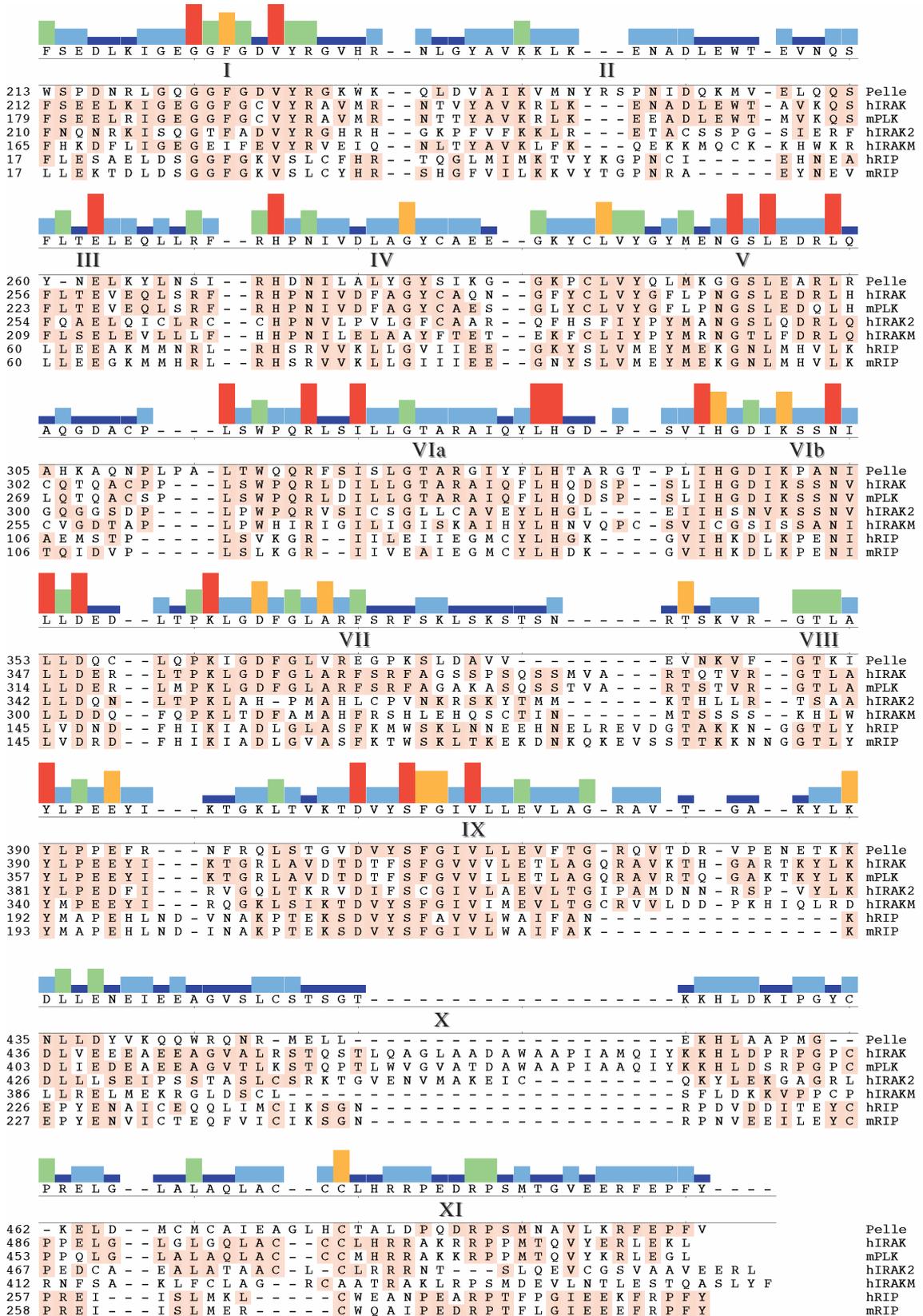
### B: CLUSTALW Alignment von death domains aus Signalproteinen der IL-1, TNF und *Drosophila* Toll Rezeptorsysteme



Die Aminosäuresequenzen der gezeigten Proteine wurden mit Hilfe des ISREC Bioinformatics server (Swiss Institute of Bioinformatics, www.isrec.isb-sib.ch) einem Mustervergleich gegen die Proteindatenbanken PFAM (Proteinfamilien) und PROSITE Patterns (Proteinmuster) unterzogen.

Identifizierte death domain Homologiebereiche wurden mit Hilfe des Programms MegAlign 3.06 (DNASTAR Inc.) einem Alignment nach der CLUSTALW Methode unterzogen. Die 6 alphahelicale Bereiche von *Drosophila* Pelle sind unterhalb der Consensus Sequenz als Zylinder markiert.

## Anhang 2: Subdomänenstruktur von Proteinkinasen aus Signalproteinen der IL-1, TNF und *Drosophila* Toll Rezeptorsysteme



Die putativen Kinasedomänen der gezeigten Proteine wurden wie in Anhang 1 beschrieben identifiziert. In der Abbildung ist ein CLUSTALW Alignment der gefundenen Homologiebereiche dargestellt. Die 12 konservierten Proteinkinase Subdomänen sind nach Hanks *et al.* (1991,1995) unterhalb der *Consensus* Sequenz markiert.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

**Name:** Johannes Knop  
**geboren am:** 02.04.1971  
**in:** Hannover  
**Familienstand:** ledig  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch

### **Schulbildung**

September 1977 - Juni 1981 Grundschule I, Sarstedt  
August 1981 – Juni 1983 Orientierungsstufe der St.-Augustinus-Schule, Hildesheim  
August 1983 –Mai 1990 Bischöfliches Gymnasium Josephinum, Hildesheim  
09.05. 1990 Abitur am Gymnasium Josephinum

### **Zivildienst**

01.08. 1990 – 31.10. 1991 Zivildienst im St.-Bernward-Krankenhauses, Hildesheim

### **Hochschulstudium**

01.10. 1991 – 31.05. 1997 Studium der Biochemie mit Studienziel Diplom am  
Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
26.11. 1993 Abschluß der Diplomvorprüfungen  
29.11. 1996 Abschluß der Diplomprüfungen  
09.12. – Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie der  
31.05. 1997 Medizinischen Hochschule Hannover  
Betreuung durch Prof.Dr.rer.nat. M.Martin  
Juni 1997 – März 2000 Dissertationsarbeit am Institut für Pharmakologie der  
Medizinischen Hochschule Hannover unter Anleitung von  
Prof.Dr. Michael Martin.

***Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:***

Knop, J., Wesche, H., Lang, D., Martin, M.U. (1998) *Effects of overexpression of IL-1 receptor-associated kinase on NFkappaB activation, IL-2 production and stress-activated protein kinases in the murine T cell line EL4.* Eur. J. Immunol., **28**(10): 3100-3109.

Knop, J., Martin, M.U. (1999) *Effects of IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) expression on IL-1 signaling are independent of its kinase activity.* FEBS Lett., **448**(1): 81-85.