

**Identifizierung und funktionelle Charakterisierung
der regulatorischen ProST-Region in der
Interleukin-1 Rezeptor Assoziierten Kinase IRAK-1**

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

von

Dipl.-Biochem. Christian Kollewe
geboren am 4. Juni 1974 in Hildesheim

2002

Referent: Prof. Dr. W. Müller
Institut für Physiologische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. M. Martin
Institut für Pharmakologie
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 8. Juli 2002

Datum der Veröffentlichung: August 2002

Ein Wort des Dankes

Zuallererst möchte ich allen meine Dankbarkeit ausdrücken, die auf ganz unterschiedliche Weise dazu beigetragen haben, dass diese Dissertation entstehen konnte.

Bei Herrn Prof. Resch, dem Leiter des Instituts für Pharmakologie, möchte ich mich bedanken, dass er es mir ermöglicht hat, diese Arbeit in seinem Institut zu erstellen.

Besonderen Dank schulde ich Prof. Michael Martin für die hervorragende Betreuung. Sein engagiertes Interesse, seine fachliche Kompetenz und die ständige Gesprächsbereitschaft haben mir in allen Phasen der Planung und Durchführung des Projektes sehr geholfen.

Herrn Prof. Müller danke ich für die freundliche Übernahme des Referates.

Eine solche Arbeit würde ohne die Unterstützung durch die gesamte Arbeitsgruppe doch erheblich erschwert werden. Darum bedanke ich mich bei meinen z. T. ehemaligen Kollegen Stefan Lienenklaus, Detlef Neumann, Anne Mackensen, Renate Schottmann, Christa Urban, Olaf Rosati, Anna Bauer und Johannes Knop, die ein ausgesprochen angenehmes Arbeitsklima geschaffen haben und jederzeit mit experimentellem Rat und Hilfe zur Stelle waren.

Ferner möchte ich mich bei vielen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie, insbesondere bei Annette Garbe, für die Unterstützung durch Ratschläge und Reagenzien bedanken und bei allen Kooperationspartnern an anderen Institutionen.

Ein ganz besonderes Dankeschön, nicht nur für die Begleitung während der Doktorarbeit, geht schließlich an meine Eltern, meine Schwester und alle guten Freunde.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	VI
Abstract.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die TLR Familie.....	1
1.2 Die IL-1 Rezeptorfamilie	2
1.3 Der Toll/IL-1 Rezeptor Signalweg.....	3
1.3.1 Das Adapterprotein MyD88.....	3
1.3.2 Die Interleukin-1 Rezeptor Assoziierte Kinase	5
1.3.3 Rekrutierung von IRAK-1 an den Rezeptorkomplex	5
1.3.4 Phosphorylierung von IRAK-1	6
1.3.5 Interaktion mit TRAF6 und weitere Signaltransduktion	7
1.3.6 Abbau von IRAK-1	8
1.3.7 IRAK-1 <i>knock out</i>	8
1.4 Pharmakologische Relevanz des Toll/IL-1 Signalweges	8
1.5 Fragestellung	10
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Reagenzien und Materialien	11
2.2 Puffer und Lösungen	11
2.3 Gewinnung von Plasmid-DNA.....	13
2.3.1 Bakterienkultur.....	13
2.3.2 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation	13
2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA.....	14
2.4 Herstellung von Expressionsplasmiden.....	14
2.4.1 Polymerasekettenreaktion	16
2.4.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	17
2.4.3 Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung von DNA-Fragmenten	17
2.4.4 Ligation	18
2.4.5 Punktmutation	18
2.4.6 Sequenzierung	18
2.5 Zellkultur	19
2.5.1 Transfektion eukaryotischer Zellen.....	20
2.5.1.1 Transfektion von HEK293 mit Calciumphosphat.....	20
2.5.1.2 Transfektion von EL-4 6.1 mit DEAE/Dextran	20
2.5.1.3 Transfektion von Swiss 3T3 mit PolyFect.....	21
2.5.2 Vitalitätsbestimmung	21
2.5.3 Verwendete Plasmide	22
2.6 NFκB Reporterassay.....	23
2.6.1 Proteinbestimmung.....	23
2.7 ELISA.....	24
2.8 Immunpräzipitation und Westernblot.....	24
2.8.1 Zellyse.....	24
2.8.2 Verwendete Antikörper	25
2.8.3 Immunpräzipitation	25
2.8.4 SDS-PAGE.....	26
2.8.5 Proteintransfer auf PVDF-Membran	26
2.8.6 Immunfärbung.....	26

2.9	Enzymtests	27
2.9.1	<i>IRAK</i> -Kinaseassay	27
2.9.2	Kinaseassay mit ProST-Peptiden	27
2.9.2.1	<i>Tricin</i> -Gelelektrophorese	28
2.9.3	Proteolyse mit Carboxypeptidase-Y	28
2.9.4	Dephosphorylierung	28
2.10	Phosphoaminosäureanalyse.....	29
2.11	Herstellung von siRNA.....	29
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Phosphorylierung von <i>IRAK</i> -1	31
3.1.1	Identifizierung der ProST-Region	31
3.1.2	Phosphorylierung der ProST-Region.....	32
3.1.3	Identifizierung einzelner Phosphorylierungsstellen in der ProST-Region	38
3.1.4	Phosphoaminosäureanalyse von Punktmutanten	42
3.1.5	Dephosphorylierung von <i>IRAK</i> -1	45
3.2	Ubiquitinylierung von <i>IRAK</i> -1	46
3.3	Konsequenzen der Phosphorylierung in der ProST-Region	47
3.3.1	Stabilität von <i>IRAK</i> -1	47
3.3.2	Bedeutung der Phosphorylierung für die Signaltransduktion	49
3.3.3	Wechselwirkung mit MyD88 und TRAF6	50
3.4	Tollip im Toll/IL-1R Signalweg	52
3.4.1	Wechselwirkung von <i>IRAK</i> und Tollip.....	52
3.4.2	Phosphorylierung von Tollip durch <i>IRAK</i> -1	59
3.4.3	Funktion von Tollip im Toll/IL-1R Signalweg	60
3.4.3.1	<i>Überexpression von Tollip</i>	60
3.4.3.2	<i>Ausschaltung der Tollip-Expression durch RNA Interferenz</i>	61
4	Diskussion.....	65
4.1	Phosphorylierungen in der ProST-Region	65
4.2	Identifikation einzelner phosphorylierter Aminosäuren	68
4.3	Biologische Konsequenzen der Phosphorylierungen	70
4.3.1	NFκB Aktivierung.....	70
4.3.2	Wechselwirkung mit MyD88 und TRAF6	71
4.3.3	Stabilität von <i>IRAK</i> -1	71
4.4	Weitere Modifikationen	73
4.5	Tollip im Toll/IL-1R Signalweg	74
4.5.1	Interaktion mit <i>IRAK</i> -1	74
4.5.2	Funktion von Tollip.....	75
4.6	Die ProST-Region als molekularer Schalter	77
4.7	Ausblick	77
5	Literaturverzeichnis	79

Zusammenfassung

Die Mitglieder der Toll/IL-1 Rezeptor Familie spielen eine bedeutende Rolle in der angeborenen Immunabwehr, indem sie Strukturen eindringender Pathogene oder proinflammatorische Zytokine wie IL-1 oder IL-18 erkennen. Alle verschiedenen Familienmitglieder bedienen sich dabei eines gemeinsamen intrazellulären Signalweges, um durch die Induktion der Expression von Effektorgenen eine Entzündungsreaktion hervorzurufen, durch die die Ausbreitung der Infektion eingedämmt werden soll.

Ein zentrales Element dieses Signalweges ist die Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase IRAK-1, die durch Tollip an den Rezeptorkomplex rekrutiert wird. Im Zuge ihrer Aktivierung kommt es dort zu mehrfachen Autophosphorylierungen, die die Wechselwirkung mit den direkten Interaktionspartnern beeinflussen und die Mobilität von IRAK-1 in der SDS-PAGE stark verringern. Zusätzlich wird durch die Phosphorylierungen der Abbau von IRAK-1 am Proteasom initiiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die ProST-Region als Hauptziel der zahlreichen Phosphorylierungsereignisse identifiziert. Die ProST-Region verbindet die N-terminale Todesdomäne und die zentrale Kinasedomäne von IRAK-1 und enthält neben vielen Prolinen zahlreiche phosphorylierbare Serin- und Threoninreste, von denen einzelne als tatsächliche Phosphorylierungsstellen bestätigt werden konnten.

Es wurde gezeigt, dass nicht nur die Phosphorylierungen in der ProST-Region für die Signaltransduktion entbehrlich sind, sondern dass die gesamte ProST-Region auch strukturell für die Signalweiterleitung nicht erforderlich ist. Auch die Wechselwirkung von IRAK-1 mit ihren für die Toll/IL-1 Signaltransduktion essentiellen Interaktionspartnern MyD88 und TRAF6 erfolgt nicht über die ProST-Region. Allerdings führen die Phosphorylierungen in der ProST-Region zur Dissoziation von IRAK-1 und MyD88, woraufhin IRAK-1 den Rezeptorkomplex verlässt. Des Weiteren wurde die Interaktion von IRAK-1 mit Tollip kartiert und der Kinasedomäne von IRAK-1 zugewiesen. In diesem Zusammenhang wurde Tollip als erstes Molekül außer IRAK-1 selbst identifiziert, das als Substrat für IRAK-1 dient. Die Phosphorylierung von Tollip bewirkt zusammen mit den Phosphorylierungen in der ProST-Region von IRAK-1 auch in diesem Fall die Dissoziation der beiden Moleküle.

IRAK-1 wird in Abhängigkeit von der Phosphorylierung am Proteasom abgebaut. Bisher wurde angenommen, dass die Ubiquitylierung von IRAK-1 eine Voraussetzung für die Erkennung durch das 26S Proteasom sei. In dieser Arbeit konnte jedoch klar nachgewiesen werden, dass IRAK-1 nicht ubiquityliert wird und dass Phosphorylierung die einzige Modifikation ist, die zur apparenten Molekulargewichtsänderung von IRAK-1 führt.

Die ProST-Region dient also als regulatorisches Element, das die Wechselwirkung von IRAK-1 mit MyD88 und Tollip beeinflusst. Gleichzeitig reguliert sie den proteolytischen Abbau von IRAK-1 am Proteasom und damit die Verfügbarkeit der Kinase als Signalelement.

Schlagerwörter: Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase (IRAK-1), Signaltransduktion, Tollip

Abstract

The members of the Toll/IL-1 receptor family play an important role in innate immunity by recognizing proinflammatory cytokines like IL-1 or IL-18 or structures of invading pathogens. Each family member uses the same intracellular signaling pathway, to induce the expression of effector genes and thus promote inflammation, preventing the expansion of infection.

A central element of this signaling pathway is the Interleukin-1 receptor associated kinase IRAK-1, which is recruited to the receptor complex via Tollip. In the course of its activation IRAK-1 undergoes heavily autophosphorylation which influences the interaction with its direct binding partners and strongly reduces electrophoretic mobility of IRAK-1. This phosphorylation ultimately leads to degradation of IRAK-1 at the proteasome.

In this thesis the ProST region was identified as the main target of these numerous phosphorylation events. The ProST region connects the N-terminal death domain and the central kinase domain of IRAK-1. It contains many prolines and numerous phosphorylatable serine and threonine residues, some of which could be confirmed to be indeed phosphorylation sites.

It could be shown that these phosphorylations and even the entire ProST region are not necessary for signaling. Additionally, interaction of IRAK-1 with its binding partners MyD88 and TRAF6, that are essential for Toll/IL-1 signaling, does not occur via the ProST region. However, the phosphorylations in the ProST region lead to dissociation of IRAK-1 and MyD88, whereupon IRAK-1 leaves the receptor complex.

The interaction of IRAK-1 with Tollip was mapped and assigned to the kinase domain of IRAK-1. Moreover, Tollip was identified as the first substrate for IRAK-1 besides IRAK-1 itself. Phosphorylation of Tollip together with the phosphorylations in the ProST region results in dissociation of these molecules.

Phosphorylation dependent degradation of IRAK-1 occurs at the proteasome and ubiquitination of IRAK-1 was thought to be a prerequisite for recognition by the 26S proteasome. However, work from this thesis clearly demonstrates that IRAK-1 is not being ubiquitinated, and that phosphorylation is the only modification that leads to electrophoretic retardation of IRAK-1.

In summary, the ProST region serves as a regulatory element that influences the interaction of IRAK-1 with MyD88 and Tollip. At the same time, it regulates the proteolytical degradation of IRAK-1 at the proteasome and therefore its availability as a signaling element.

Key words: Interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK-1), signal transduction, Tollip

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	aktivierendes Protein 1
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure[n]
ATP	Adenosintriophosphat
CIAP	Alkalische Phosphatase aus Kalbsdarm (<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>)
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (cDNA: <i>copy DNA</i>)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>)
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
h	human
Hepes	4-(2-Hydroxymethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Ig	Immunglobulin
IκB	Inhibitor κB
IKK	IκB Kinase
IL-1	Interleukin-1
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
IP	Immunpräzipitation
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kD	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
m	murin
Mal	<i>MyD88-adaptor-like</i>
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
mPLK	<i>mouse Pelle-like kinase</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFκB	Kernfaktor κB (<i>nuclear factor κB</i>)
NIK	NFκB induzierende Kinase
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAP	Saure Phosphatase aus Kartoffeln (<i>potatoe acid phosphatase</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
PP-1	Proteinphosphatase-1
PP-2A	Proteinphosphatase-2A

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (mRNA: <i>messenger RNA</i>)
RNAi	Ribonukleinsäure Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TAB	TAK1 bindendes Protein
TAK1	TGF- β aktivierte Kinase 1
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor Homologiedomäne
TIRAP	<i>TIR domain-containing adapter protein</i>
TLR	Toll-artiger Rezeptor (<i>Toll like receptor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tollip	mit Toll interagierendes Protein
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
TRIKA	TRAF6 regulierter IKK Aktivator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
WB	Westernblot

1 Einleitung

Das menschliche Immunsystem ist ständig einer Vielzahl unterschiedlichster Pathogene ausgesetzt. Im Rahmen der angeborenen Immunität müssen die Fremdstoffe zunächst einmal erkannt und so lange in ihrer Ausbreitung behindert werden, bis sie durch das adaptive Immunsystem spezifisch bekämpft werden können. Eine wichtige Rolle spielen dabei die in der Peripherie ansässigen Dendritischen Zellen und Makrophagen, die über spezielle Rezeptoren molekulare Strukturen der eindringenden Mikroorganismen, sogenannte *pathogen-associated molecular patterns*, erkennen und dadurch aktiviert werden. Die Aktivierung führt zur direkten Phagozytose der erkannten Pathogene und zu einer lokalen Entzündung, die durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine gesteuert wird. In erster Linie handelt es sich dabei um Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor α (TNF α), aber auch IL-12 und IL-18 spielen eine regulatorische Rolle.

Ein Charakteristikum der Toll-artigen Rezeptoren (*Toll like receptors*, TLR), die für die Erkennung der pathogenen Strukturen verantwortlich sind, ist ihre intrazelluläre TIR (Toll/IL-1 Rezeptor) Domäne. Dieses Strukturmotiv haben sie mit den Rezeptoren für IL-1 und IL-18 gemeinsam und bilden mit ihnen die Familie der Toll/IL-1 Rezeptoren (TIR Familie) (Abb. 1, Übersicht in [1]). Über ihre intrazelluläre TIR-Domäne aktivieren all diese Rezeptoren eine gemeinsame Signalkaskade, die weiter unten im Detail beschrieben wird. Abgesehen von der strukturellen Gemeinsamkeit der TIR-Domäne ist die Zusammenfassung der Rezeptoren in einer Familie aufgrund ihrer Funktion sinnvoll. Alle Mitglieder der Toll/IL-1 Rezeptorfamilie sind an der Abwehr von Viren, Bakterien oder Pilzen beteiligt und können als Alarmrezeptoren des Immunsystems bezeichnet werden (Übersicht in [2]).

Die TIR Familie kann anhand der strukturellen Eigenschaften in zwei Gruppen aufgeteilt werden: Die IL-1 Rezeptor Subfamilie und die Subfamilie der Toll-artigen Rezeptoren.

1.1 Die TLR Familie

Die Moleküle der TLR Familie zeichnen sich durch Leucin reiche Regionen aus (Übersicht in [2-4]), die bei Tieren den extrazellulären Teil der Transmembranmoleküle darstellen. Intrazellulär befindet sich die allen Familienmitgliedern gemeinsame TIR Domäne. Toll, das namensgebende Molekül dieser Familie, stammt aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und spielt während der Ontogenese eine Rolle bei der dorsoventralen Ausrichtung [5]. In der erwachsenen Fliege übernimmt Toll eine Funktion bei der Pilzabwehr [6]. Mittlerweile sind in der Fliege neun Toll-artige Rezeptoren bekannt [7], die alle an der Ontogenese und zum Teil an der Immunabwehr beteiligt sind.

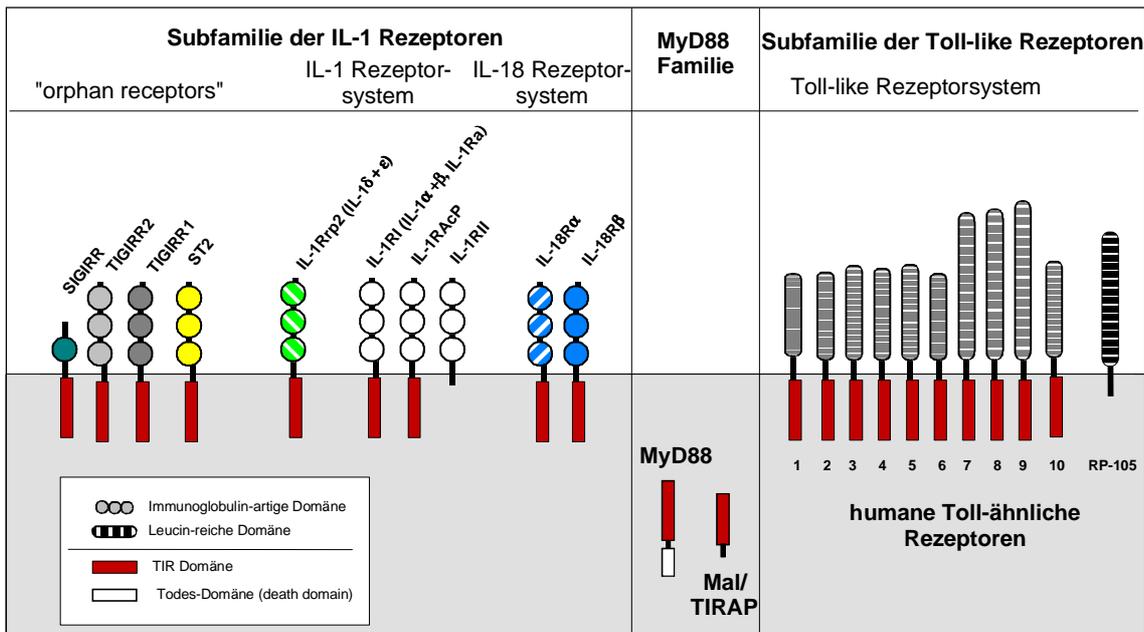


Abb. 1: Die Toll/IL-1 Rezeptorfamilie.

Durch Sequenzvergleiche in EST Datenbanken wurde ein humanes Homolog zu Toll entdeckt, das bei Überexpression NF κ B aktivierte [8] und mittlerweile als Lipopolysaccharid (LPS) Rezeptor gilt [9, 10]. Bisher wurden insgesamt zehn humane TLRs beschrieben (zusammengefasst in [11]) [12], die eine Vielzahl bakterieller Bestandteile, aber auch eukaryotische Proteine erkennen, die im Zuge einer Infektion durch Zell- und Gewebeschäden entstehen können. So wurden die TLR 1, 2, 4 und 6 als Rezeptoren für bakterielle Zellwandbestandteile [9, 13-16], Hitzeschockproteine [17-19] und Fibrinogen [20] beschrieben. Flagellin wird von TLR5 erkannt [21, 22], virale doppelsträngige RNA und polyI:C von TLR3 [23], kleine antivirale Substanzen von TLR7 [24] und CpG-DNA von TLR9 [25].

Dass einzelne TLR z. T. sehr verschiedene Moleküle erkennen können, lässt sich durch die Beteiligung von verschiedenen Corezeptoren erklären. Außerdem bestehen manche Rezeptorkomplexe der TLRs aus Hetero- oder Homodimeren, an denen noch weitere Moleküle beteiligt sein können (z. B. TLR4 Homodimer mit MD-2 [26] und CD14 [27] bei der LPS-Erkennung). Insgesamt stellen die Toll-artigen Rezeptoren also ein breites Repertoire von Sensoren dar, die das Immunsystem beim Eindringen gefährlicher Fremdstoffe alarmieren.

1.2 Die IL-1 Rezeptorfamilie

Die Mitglieder der IL-1 Rezeptor Familie sind Transmembranmoleküle, die drei extrazelluläre Immunglobulin (Ig)-artige Domänen aufweisen. Dazu gehören die IL-1 Rezeptoren Typ I (IL-1RI) [28] und Typ II (IL-1RII) [29] mit ihrem Corezeptor, dem IL-1 Rezeptor Akzessorischen Protein (IL-1RAcP) [30], sowie die α - und β -Kette des IL-18

Rezeptors (IL-18R α [31], IL-18R β [32]). Zudem gibt es eine Reihe von sogenannten *orphan* (Waisen) Rezeptoren, die ebenfalls drei extrazelluläre Ig-artige Domänen und eine intrazelluläre TIR Domäne tragen [33]. Für diese Rezeptoren sind bislang keine Liganden bekannt, aber möglicherweise handelt es sich um Rezeptoren und Corezeptoren für kürzlich entdeckte Moleküle der IL-1 Familie [34-36].

Sowohl im IL-1 als auch im IL-18 System bindet zunächst der Rezeptor den Liganden. Im Fall von IL-1 kann das einer der beiden funktionell sehr ähnlichen Agonisten IL-1 α oder IL-1 β oder der Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (IL-1Ra) sein (zusammengefasst in [37]). Die Bindung von IL-1 β bzw. IL-1Ra an den extrazellulären Teil des Typ I IL-1 Rezeptors wurde röntgenkristallographisch aufgeklärt [38, 39]. Erst nachdem der Rezeptor mit dem Liganden beladen ist, wird er vom Corezeptor erkannt, woraufhin es zur Signaltransduktion kommt [40, 41]. Die intrazellulären TIR Domänen beider Rezeptorkomponenten sind dabei unbedingt erforderlich [42, 43]. Die Corezeptoren IL-1RAcP und IL-18R β sind beide nicht in der Lage, den jeweiligen freien Rezeptor oder den freien Liganden zu binden.

Eine Ausnahme bildet in der IL-1 Rezeptor Familie der Typ II IL-1 Rezeptor, der auch ein Transmembranprotein ist, im Gegensatz zu allen anderen Familienmitgliedern aber keine intrazelluläre TIR Domäne trägt. Als Konsequenz kann er zwar IL-1 binden, aber keine Signaltransduktion auslösen [44]. Der IL-1RII erfüllt eine wichtige regulatorische Rolle, indem er den Liganden bindet und so die wirksame IL-1 Konzentration verringert [45, 46]. Zusätzlich kann der ligandenbeladene IL-1RII auch den Corezeptor binden und damit die Ausbildung funktioneller IL-1 Rezeptorkomplexe verhindern (sog. Corezeptor-Kompetition [47]). Sowohl IL-1RI als auch IL-1RII können von membranständigen Metalloproteinasen von der Zelloberfläche abgespalten werden [48]. Die entstehenden löslichen Rezeptoren können weiterhin IL-1 binden und als Ligandenfalle fungieren. Eine Interaktion mit dem Corezeptor findet nicht mehr statt [49].

1.3 Der Toll/IL-1 Rezeptor Signalweg

Im Folgenden sollen die intrazellulären Schritte der Toll/IL-1 Rezeptor Signaltransduktion am Beispiel von IL-1 erläutert werden. In Abb. 2 sind sie schematisch zusammengefasst.

1.3.1 Das Adapterprotein MyD88

Durch die Assoziation der extrazellulären Rezeptorkomponenten werden die intrazellulären TIR Domänen in unmittelbare Nähe gebracht. Das ist die Voraussetzung für die Assoziation des Adapterproteins MyD88. MyD88 besteht aus einer C-terminalen TIR Domäne und einer N-terminalen Todesdomäne [50, 51], bei der es sich ebenfalls um eine Protein-Interaktionsdomäne handelt. Aufgrund seiner TIR Domäne wurde MyD88 der

Toll/IL-1 Rezeptor Familie zugeordnet [52], obwohl es sich nicht um einen transmembranen Rezeptor, sondern um ein cytosolisches Adapterprotein handelt.

Kürzlich wurde ein weiteres cytosolisches Protein entdeckt, das eine TIR Domäne enthält, bei dem es sich aber ebenfalls nicht um einen Rezeptor handelt. Es wurde unabhängig von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben, die es Mal (*MyD88-adapter-like*) [53] bzw. TIRAP (*TIR domain containing adapter protein*) [54] nannten. Im Gegensatz zu MyD88 enthält Mal/TIRAP keine Todesdomäne. Es wurde als Interaktionspartner von TLR4 beschrieben [53, 54].

MyD88 ist für die Toll/IL-1 Rezeptor Signaltransduktion unbedingt erforderlich. MyD88 defiziente Mäuse oder Zellen sind nicht mehr in der Lage, auf die Stimulation mit IL-1 oder IL-18 [55] zu reagieren. Für die Signaltransduktion nach LPS Stimulation scheint es einen Nebenweg zu geben, der sich möglicherweise Mal/TIRAP parallel zu MyD88 bedient [56]. MyD88 assoziiert an die TIR Domänen des Rezeptorkomplexes vermutlich als Dimer [57] und führt als weitere Protein Interaktionsmodule Todesdomänen in den Rezeptorkomplex ein.

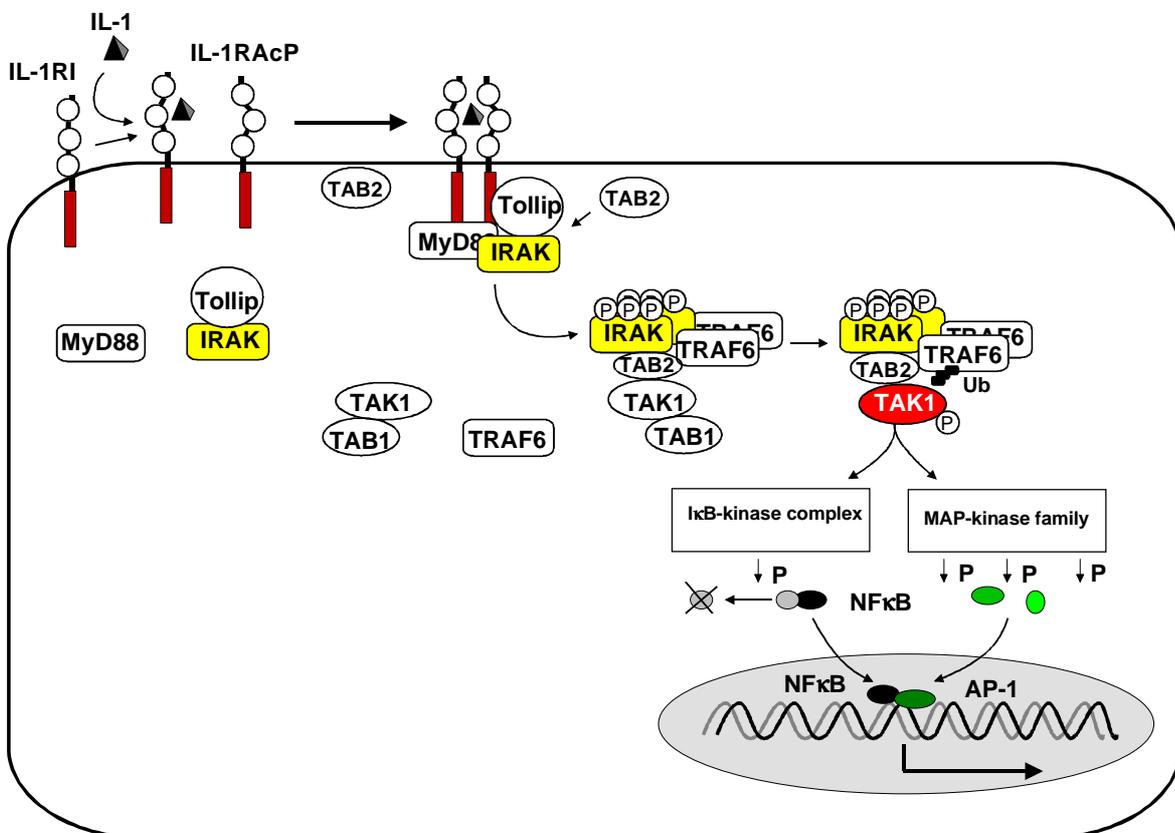


Abb. 2: Vereinfachtes Schema des zentralen Interleukin-1 Signalweges.

1.3.2 Die Interleukin-1 Rezeptor Assoziierte Kinase

Diese Todesdomänen im Rezeptorkomplex eröffnen die Möglichkeit der Rekrutierung der Interleukin-1 Rezeptor assoziierten Kinase (IRAK). IRAK wurde als Kinaseaktivität identifiziert, die nach IL-1 Stimulation mit dem Typ I IL-1 Rezeptor copräzipitiert werden konnte [58]. Es zeigte sich, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B von IRAK abhängig ist [59]. Schließlich wurde IRAK kloniert und als Serin/Threonin spezifische Proteinkinase bestätigt, die innerhalb weniger Sekunden nach IL-1 Stimulation an den Interleukin-1 Rezeptor rekrutiert wird [60].

IRAK weist eine enge Homologie zur *Drosophila* Proteinkinase Pelle auf, die im Signalweg vom Toll Rezeptor zum Insekten Transkriptionsfaktor Dorsal vorkommt und damit an der dorsoventralen Ausrichtung während der Entwicklung der Fruchtfliege beteiligt ist [61, 62]. Kurze Zeit später wurde in der Maus ein Homolog zur humanen IRAK identifiziert und mPLK (*mouse Pelle-like kinase*) genannt [63]. Mittlerweile wurden mit IRAK-2 [64], IRAK-M [65] und IRAK-4 [66] noch weitere humane Homologe der Kinase beschrieben, weshalb die zuerst klonierte IRAK heute als IRAK-1 bezeichnet wird. Alle vier humanen IRAK Moleküle weisen eine starke Sequenz- und Strukturhomologie auf. So besitzen alle eine N-terminale Todesdomäne und eine zentrale Kinasedomäne. Trotz der starken Homologie bestehen Unterschiede in der Kinaseaktivität. IRAK-1 und IRAK-4 sind kinaseaktiv und durchlaufen im Zuge der Aktivierung eine Autophosphorylierung. IRAK-2 und IRAK-M dagegen phosphorylieren sich nicht selbst, und auch ein exogenes Substrat konnte bislang nicht identifiziert werden. Weitere strukturelle Unterschiede zeigen sich im C-Terminus, der bei IRAK-1 essentiell ist für die Wechselwirkung mit dem im Signalweg unterhalb angeordneten Adaptermolekül TRAF6 (s. u.) [67, 68]. Der C-Terminus von IRAK-2 und IRAK-M ist deutlich kürzer, IRAK-4 besitzt praktisch überhaupt keinen C-Terminus. Damit ist IRAK-4 das Molekül mit der stärksten Homologie zu *Drosophila* Pelle.

Kürzlich wurde mit IRAK-1b eine alternative Splicevariante von IRAK-1 beschrieben, der im C-terminalen Bereich der Kinasedomäne 30 Aminosäuren fehlen (Δ 514–543). Diese Deletion führt zwar zum Verlust der Kinaseaktivität, so dass sich das Molekül nicht mehr autophosphorylieren kann, die Funktion in der IL-1 Signaltransduktion bleibt jedoch unbeeinflusst [69].

1.3.3 Rekrutierung von IRAK-1 an den Rezeptorkomplex

IRAK-1 liegt vor Aktivierung im Cytosol als Komplex mit Tollip (*Toll interacting protein*) vor. Nach Stimulation mit IL-1 bindet Tollip an IL-1RAcP und rekrutiert auf diese Weise IRAK-1 an den Rezeptorkomplex [70]. Dort kann die Todesdomäne von IRAK-1 mit der Todesdomäne von MyD88 interagieren [50]. Eine solche Wechselwirkung zwischen zwei Todesdomänen wurde bei den homologen Molekülen aus *Drosophila* durch Röntgenkristallographie aufgeklärt [71] und dürfte im humanen System ähnlich aussehen.

Auch für IRAK-2 und IRAK-M wurde die Wechselwirkung über ihre Todesdomänen mit MyD88 beschrieben [57, 64]. IRAK-1 bildet über die Todesdomäne Homodi- oder -oligomere, die auch durch Phosphorylierung nicht getrennt werden. Man geht daher davon aus, dass IRAK-1 auch im IL-1 Rezeptorkomplex mindestens als Dimer vorliegt. Insgesamt erfolgt die Assoziation von IRAK an den IL-1 Rezeptorkomplex über eine Abfolge nichtenzymatischer Protein-Protein Interaktionen der TIR- und Todesdomänen.

1.3.4 Phosphorylierung von IRAK-1

Nach der Assoziation von IRAK-1 an den Rezeptorkomplex kommt es zur schnellen (*cis*- und/oder *trans*-) Autophosphorylierung zunächst in der Kinasedomäne. Darauf folgend findet noch eine Vielzahl von Phosphorylierungsereignissen in IRAK-1 statt, die zu einem deutlich veränderten Laufverhalten in der Gelelektrophorese führt. Der Molekulargewichtsshift von ~80 auf etwa 100 kD ist ein prägnantes Merkmal für die IRAK-1 Aktivierung [60].

Für die initiale Phosphorylierung von IRAK-1 in der Kinasedomäne ist möglicherweise IRAK-4 verantwortlich. Es wurde gezeigt, dass IRAK-4 mit IRAK-1 und MyD88 wechselwirken kann und dass IRAK-4 den *activation loop* der IRAK-1 Kinasedomäne *in vitro* phosphorylieren kann [66]. Weiterhin ist für die NFκB Aktivierung durch Überexpression von IRAK-4 deren Kinaseaktivität erforderlich, was im Gegensatz zum Verhalten der anderen IRAK Moleküle steht. Die IL-1 Signaltransduktion einer IRAK-1 defizienten Zelllinie kann durch Transfektion mit IRAK-4 cDNA nicht wiederhergestellt werden [66], und IRAK-4 *knock out* Mäuse reagieren weder auf IL-1 noch auf LPS [72], was darauf schließen lässt, dass IRAK-4 im Signalweg oberhalb von IRAK-1 angeordnet ist und durch IRAK-1 nicht ersetzt werden kann.

Durch die mehrfachen Phosphorylierungen von IRAK-1 werden negative Ladungen in das Molekül eingeführt, die möglicherweise für die nachfolgende Abdissoziation aus dem Rezeptorkomplex verantwortlich sind. Mehrere Gruppen haben gezeigt, dass hyperphosphorylierte IRAK-1 nicht mehr mit MyD88 interagieren kann [65, 73, 74]. Auch die Wechselwirkung mit Tollip geht verloren [70]. Da die Homooligomerisierung von IRAK-1 durch Phosphorylierung nicht beeinträchtigt wird, verlässt IRAK-1 den Rezeptorkomplex wahrscheinlich als Di- oder Oligomer.

Wie mehrere Arbeitsgruppen gezeigt haben, ist die Kinaseaktivität von IRAK-1 für die Signaltransduktion entbehrlich [65, 69, 75, 76]. Sogar die vollständige Deletion der Kinasedomäne verhindert die IL-1 stimulierte NFκB oder JNK Aktivierung nicht [68]. Das weist darauf hin, dass IRAK-1 im Toll/IL-1 Signalweg in erster Linie eine Adapterfunktion einnimmt, die den Rezeptorkomplex mit den späteren Signaltransduktionsereignissen verknüpft.

1.3.5 Interaktion mit TRAF6 und weitere Signaltransduktion

Nach dem Verlassen des Rezeptorkomplexes interagiert die aktivierte IRAK-1 mit TRAF6 (TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6). Diese Wechselwirkung wird durch die Abdissoziation vom Rezeptorkomplex offenbar erst ermöglicht, da TRAF6 zwar gut mit phosphorylierter IRAK-1, aber nicht mit dem IL-1 Rezeptorkomplex copräzipitiert werden konnte [74]. Die Interaktion geschieht über den C-Terminus von IRAK-1. Deletiert man den C-Terminus, so wird das Signal vom Toll/IL-1 Rezeptor nicht mehr bis zur Aktivierung von NFκB oder Stress aktivierter Proteinkinasen weitergeleitet [65, 74, 77]. Deletionsmutanten, denen der C-Terminus fehlt oder nur ein Teil davon, wirken dominant negativ auf die Signaltransduktion [67, 68]. Wie oben angemerkt, liegt aktivierte IRAK-1 wahrscheinlich als Di- oder Oligomer vor. Folglich besteht die Interaktionsfläche zu TRAF6 möglicherweise aus mehr als einem C-Terminus, was erklären würde, warum nicht aktivierte monomere IRAK-1 nicht mit TRAF6 wechselwirken kann. Interessanterweise wurde im TNF Signalweg die Trimerisierung des eng verwandten TRAF2 beschrieben [78], und die künstlich herbeigeführte Oligomerisierung von TRAF2 und TRAF6 war ausreichend, um Signaltransduktion auszulösen [79].

TRAF6 ist in der Signaltransduktion der Toll/IL-1 Rezeptor Familie unverzichtbar. Die Deletion des TRAF6 Gens führt zur Unterbrechung der Signalkaskade, die schließlich zur Aktivierung von NFκB führt [80, 81].

Die weitere Signaltransduktion von TRAF6 bis zur Aktivierung von NFκB führt über MAP Kinasekaskaden [82]. TRAF6 interagiert zunächst mit einem Komplex aus der MAPKKK TAK1 und deren Adapterproteinen TAB1 [83] und TAB2 [84], der als TRIKA2 (*TRAF6 regulated IKK activator 2*) bezeichnet wird. IRAK-1 wird dabei die Aufgabe zugeschrieben, das membranständige TAB2 in diesen Komplex einzuführen [85, 86]. In diesem Multiproteinkomplex aus IRAK-1, TRAF6, TAK1/TAB1 und TAB2 kommt es zur Autophosphorylierung von TAK1 im *activation loop* [87, 88]. Zusätzlich wird der Ubiquitin konjugierende Enzymkomplex TRIKA1 benötigt, der aus Ubc13 und Uev1A besteht und zusammen mit TRAF6 für die Ubiquitinylierung von TAK1 verantwortlich ist. Durch diese Ubiquitinylierung, bei der TRAF6 als Ubiquitin-Ligase fungiert, erreicht TAK1 ihre vollständige Aktivität, die für die nachfolgende Aktivierung von IKK (IκB Kinase) durch Phosphorylierung notwendig ist [89].

Durch MAPKKK aktivierte IKK Komplexe phosphorylieren IκB, das als inhibitorische Komponente mit NFκB assoziiert ist. Nach der Phosphorylierung wird IκB ubiquitinyliert und am Proteasom abgebaut. Auf diese Weise wird NFκB frei, transloziert in den Zellkern und kann dort die Transkription von Genen initiieren, die unter der Kontrolle eines NFκB-Promoters stehen (zusammengefasst in [90]). Darunter befinden sich proinflammatorische Zytokine, Zytokinrezeptoren, Chemokine und Adhäsionsmoleküle, die bei der Entzündungsreaktion eine Rolle spielen.

Ubiquitinylierte TAK1 kann außerdem MAPKK phosphorylieren und damit aktivieren [91], die ihrerseits MAPK (*mitogen activated protein kinases*) aktivieren. Zu den MAPK zählen die ERK (*extracellular signal-related kinases*), die JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) und die p38 Proteine. Insbesondere die beiden letzteren sind an der Regulation von AP-1 (*activator protein 1*) beteiligt. Sie phosphorylieren c-Jun und ATF-2 und induzieren die Expression von *jun* und *fos* Genen (zusammengefasst in [92]).

1.3.6 Abbau von IRAK-1

Nachdem IRAK ihre Adapteraufgabe im Toll/IL-1 Signalweg erfüllt hat, wird sie proteolytisch abgebaut. Die Proteolyse findet am Proteasom statt und ist abhängig vom Phosphorylierungsgrad von IRAK [67, 73]. So wurde in unstimulierten HepG2 Zellen eine Proteinhalbwertszeit für IRAK-1 von 7 Stunden gemessen, die nach IL-1 Stimulation nur noch ~6 Minuten betrug. Die Lebensdauer von kinaseinaktiver IRAK-1, die sich nicht autophosphorylieren kann, wurde durch IL-1 Stimulation nicht beeinflusst [69]. Dass IRAK-1 für die Adressierung zum Proteasom ubiquitinyliert wird, wurde bisher nur vermutet, aber nicht nachgewiesen [68, 93]. Man kann annehmen, dass der Multiproteinkomplex um TRAF6 durch die proteolytische Degradation von IRAK-1 zerfällt und das Toll/IL-1 Rezeptor Signal dadurch abgeschaltet wird.

1.3.7 IRAK-1 knock out

Mäuse, in deren Genom das zu humaner IRAK-1 homologe Molekül mPLK deletiert wurde, reagieren deutlich schwächer auf die Stimulation mit IL-1 und IL-18, zeigen aber immer noch eine schwache Antwort [94-96]. Kürzlich wurden die murinen Homologen zu IRAK-2 (Rosati & Martin, Manuskript in Vorbereitung) und IRAK-M (Rosati, 2002, im Druck) kloniert. Es ist zu vermuten, dass diese beiden Moleküle die Adapterfunktion von IRAK-1 übernehmen können, so dass die Toll/IL-1 Rezeptor Signaltransduktion in der IRAK-1 *knock out* Situation weiterhin möglich ist. Die These wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Überexpression von IRAK-2 zur NFκB Aktivierung führt [64]. Außerdem konnte in einer IRAK-1 defizienten Zelllinie die Responsivität für IL-1 [93] und LPS [65] durch Transfektion mit IRAK-2 oder IRAK-M wiederhergestellt werden.

1.4 Pharmakologische Relevanz des Toll/IL-1 Signalweges

Die Mitglieder der Toll/IL-1 Rezeptor Familie und die von ihnen ausgehende Signaltransduktion spielen bei der Abwehr von Krankheitserregern durch das angeborene Immunsystem eine bedeutende Rolle, da sie eine akute Entzündungsreaktion auslösen. Normalerweise wird die Aktivierung dieser Alarmrezeptoren, und damit die Entzündung, durch eine Vielzahl von Regulationsmechanismen kontrolliert und zeitlich strikt begrenzt, um die insgesamt katabolen Effekte auf das eigene Gewebe auf ein Minimum zu reduzieren. Im Falle der Fehlregulation kann es aber auch zu massiven Schädigungen

durch das aktivierte Immunsystems kommen. So sind z. B. die Sepsis, chronische Entzündungen oder Autoimmunerkrankungen, an deren Verlauf diese Rezeptorfamilie maßgeblich beteiligt ist, schwerwiegende Krankheiten, die nicht selten zum Tode führen. Es ist daher erstrebenswert, möglichst spezifisch in dieses Rezeptorsystem einzugreifen. In der Therapie werden lösliche IL-1 Rezeptoren und der IL-1 Rezeptorantagonist, die beide auf der Außenseite der Zielzelle wirken, bereits erfolgreich eingesetzt. Neben diesen gentechnisch hergestellten Proteinen möchte man jedoch auch niedermolekulare Substanzen zur Verfügung haben, die möglichst rezeptornah und damit spezifisch in die Signalwege der Toll/IL-1 Rezeptorfamilie inhibitorisch eingreifen. Diese Substanzen sind in der Regel einfacher zu produzieren und damit billiger. Außerdem sind sie häufig einfacher zu applizieren. Die moderne Methodik des sogenannten „rational drug design“, also der Entwicklung von Pharmaka basierend auf der Kenntnis der Strukturen und Wirkmechanismen, erfordert jedoch detailliertes Wissen über das molekulare Zusammenspiel der beteiligten Moleküle.

Da die Familie der IRAK-Moleküle exklusiv von der Toll/IL-1 Rezeptorfamilie benutzt wird, stellt sie eine geeignete Zielstruktur dar, um Inhibitoren zu entwickeln. Obwohl IRAK-1 bereits 1996 kloniert worden ist, sind noch viele Fragen zur Funktionsweise und Regulation dieses Schlüssel-moleküls der IL-1 Signaltransduktion vollkommen ungeklärt.

1.5 Fragestellung

In dieser Arbeit sollten die molekularen Mechanismen aufgeklärt werden, welche die Interaktionen von IRAK-1 mit den anderen Komponenten des Rezeptorkomplexes beeinflussen sowie die eigene Stabilität und damit die Verfügbarkeit als Signalelement regulieren.

Erstes Ziel der Arbeit war es, die Strukturbereiche einzugrenzen, die einer Phosphorylierung unterliegen. Es sollten individuelle Aminosäuren identifiziert werden, die im Rahmen der IRAK-1 Aktivierung modifiziert werden.

Zweites Ziel war es, durch gezielte Mutagenese der verantwortlichen Aminosäuren die Phosphorylierungen zu verhindern, um die biologischen Konsequenzen zu untersuchen. Ein Schwerpunkt sollte hierbei der Einfluss der Mutagenese auf die Proteinstabilität im Vergleich mit dem Wildtyp Molekül sein, um direkte Struktur-Funktionsbeziehungen herstellen zu können. Zudem sollten auf diese Weise die Protein-Protein Interaktionen von IRAK-1 mit den direkten Wechselwirkungspartnern untersucht werden.

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollten die für die Wechselwirkung mit Tollip wichtigen strukturellen Bereiche von IRAK-1 kartiert und der Einfluss der Hyperphosphorylierung von IRAK-1 auf diese Interaktion erforscht werden. Um weitere Hinweise auf die Funktion von Tollip im Toll/IL-1 Signalweg zu erhalten, wurden einerseits die Auswirkungen der Überexpression, andererseits die Konsequenzen des Fehlens von Tollip mittels RNA Interferenz untersucht.

Drittes Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob neben der Phosphorylierung von IRAK-1 andere posttranslationale Modifikationen stattfinden, die unter Umständen das stark veränderte Laufverhalten des Moleküls in der SDS-PAGE erklären könnten. Die Frage einer möglichen Ubiquitylierung der IRAK-1 stand im Vordergrund, da sie für die Regulation der Proteinstabilität wichtig sein könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Materialien

DNA modifizierende Enzyme	MBI Fermentas
Einweg Labormaterialien	Sarstedt
FCS	PAA
Feinchemikalien	Sigma-Aldrich, Biomol
IL-1: rekombinantes humanes IL-1 β	D. Boraschi, Dompé (L'Aquila, Italien)
Kunststoffmaterial für Zellkultur	Falcon, Greiner, NUNC
Lösemittel	Mallinckrodt Baker, Merck
LPS (<i>E. coli</i> 055:B5)	Difco Laboratories
Medienbestandteile für Bakterienkultur	Difco Laboratories
Molekulargewichtsstandards	MBI Fermentas
Oligonukleotide	MWG-Biotech
Proteaseinhibitoren	Roche
Radioaktive Substanzen	NEN Life Sciences
TNF: rekombinantes humanes TNF α	BASF AG
Zellkulturmedien und -zusätze	GibcoBRL

2.2 Puffer und Lösungen

AA/BisAA (30 %)

- 30 % (w/v) Acrylamid
- 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
- 25 % (v/v) Glycerol

Blotpuffer

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

CIAP Puffer

- 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5
- 0,1 M Magnesiumchlorid

DNA-Auftragspuffer (6 \times)

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

HBS (2 \times)

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

IP-Puffer

- 50 mM Hepes, pH 7,9
- 250 mM Natriumchlorid
- 10 % (v/v) Glycerol
- 0,5 % (v/v) Nonidet P-40
- 20 mM β -Glycerophosphat
- 5 mM p-Nitrophenylphosphat
- 1 mM EDTA

Vor Versuchsbeginn frisch zugesetzt:

- 5 mM DTT
- 1 mM Natriumorthovanadat
- 1 \times Proteaseinhibitoren

IRAK-Kinasepuffer (5 \times)

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

Laemmli-Puffer (3 \times)

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

Luciferin Substratpuffer

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

Luria Bertani (LB) Medium

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

LB Agar

15 g/l Agar in LB Medium

PAA-Puffer (1. Dimension)

2,2 % (v/v) Ameisensäure
 7,8 % (v/v) Essigsäure
 pH 1,9

PAA-Puffer (2. Dimension)

5 % (v/v) Essigsäure
 0,5 % (v/v) Pyridin
 pH 3,5

PBS

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

PP-1 Puffer

50 mM Tris-HCl
 0,1 mM Na₂EDTA
 5 mM DTT
 0,01 % Brij 35
 1 mM Manganchlorid
 pH 7,0

PP-2A Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 8,5
 20 mM Magnesiumchlorid
 1 mM DTT

SDS-Elektrodenpuffer

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

SDS-Sammelgel (5 %)

125 mM Tris-HCl, pH 6,8
 17 % (v/v) AA/BisAA (30 %)
 0,1 % (w/v) SDS
 0,25 % (v/v) TEMED
 0,1 % (w/v) APS

SDS-Trenngel (7,5–15 %)

375 mM Tris-HCl, pH 8,8
 25–50 % (v/v) AA/BisAA (30 %)
 0,1 % (w/v) SDS
 0,15 % (v/v) TEMED
 0,05 % (w/v) APS

TAE-Puffer

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

TBS

25 mM Tris-HCl, pH 7,4
 123 mM Natriumchlorid
 5 mM Kaliumchlorid
 2,7 mM Calciumchlorid
 0,6 mM Dinatriumhydrogenphosphat
 0,5 mM Magnesiumchlorid

TBST

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

Tricin-Kathodenpuffer

0,1 M Tris
 0,1 M Tricin
 0,1 % SDS
 pH ~8,25

Tricin-Probenpuffer (3×)

150 mM Tris-HCl, pH 6,8
 12 % (w/v) SDS
 36 % (w/v) Glycerol
 6 % (v/v) β-Mercaptoethanol
 0,03 % (w/v) Serva Blue G

Tricin-Sammelgel (4 % T, 3 % C)

3,88 % (w/v) Acrylamid
 0,12 % (w/v) Bisacrylamid
 0,75 M Tris-HCl, pH 8,45
 0,075 % (w/v) SDS
 0,1 % (v/v) TEMED
 0,1 % (w/v) APS

Tricin-Spacergel (10 % T, 3 % C)

9,7 % (w/v) Acrylamid
 0,3 % (w/v) Bisacrylamid
 1 M Tris-HCl, pH 8,45
 0,1 % (w/v) SDS
 0,04 % (v/v) TEMED
 0,04 % (w/v) APS

Tricin-Trenngel (16,5 % T, 6 % C)

15,5 % (w/v) Acrylamid
 1 % (w/v) Bisacrylamid
 1 M Tris-HCl, pH 8,45
 0,1 % (w/v) SDS
 0,03 % (v/v) TEMED
 0,03 % (w/v) APS

Trypsin/EDTA

0,5 g/l Trypsin
 0,2 g/l EDTA
 in PBS

TSS

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

2.3 Gewinnung von Plasmid-DNA

2.3.1 Bakterienkultur

Zur Klonierung und Vermehrung von Plasmid-DNA wurden die *E. coli* K12 Stämme XL1-blue und LK111(λ) verwendet.

XL1-blue: [F' *proAB lacI^q lacZ* Δ M15 Tn10 (Tet^r)] *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac*

LK111(λ): $r_k^- m_k^- thi-1 thr-1 leuB6 tonA21 supE44 lacI^qYZ Δ M15 Hfr $\lambda^+$$

Flüssigkulturen wurden in LB-Medium im Schüttelinkubator bei 37 °C kultiviert. Die Klonierung von Bakterien erfolgte auf LB-Agarplatten im Wärmeschrank, ebenfalls bei 37 °C. Zur Selektion von transformierten Bakterienklonen wurden dem Medium geeignete Antibiotika zugesetzt. Je nach Resistenz kamen 50 μ g/ml Ampicillin, 12,5 μ g/ml Tetracyclin oder 30 μ g/ml Kanamycin zum Einsatz.

2.3.2 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

50 ml LB-Medium wurden mit 500 μ l einer über Nacht gewachsenen Kultur des gewählten Bakterienstammes angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4–0,6 bei 37 °C geschüttelt (160 rpm). Die Zellen wurden 10 min bei 4 °C und 5.000 \times g abzentrifugiert und in 5 ml eiskaltem TSS resuspendiert. Danach wurden sie sofort zu je 100 μ l aliquotiert in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei –80 °C gelagert.

Zur Transformation wurde ein Aliquot kompetenter Bakterienzellen noch in gefrorenem Zustand mit 5 ng Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz (Kap. 2.4.4) versetzt, 30 min auf Eis stehengelassen und währenddessen gelegentlich gemischt. Anschließend wurden die Zellen 45 sec. lang im Wasserbad auf 42 °C erhitzt (Hitzeschock) und dann auf Eis

abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen 45 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Ein Teil der Zellsuspension (50–200 µl) wurde auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen, die geeignete Antibiotika enthielt. Die transformierten Zellen wuchsen im Wärmeschrank bei 37 °C über Nacht zu Kolonien heran.

2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Analyse von Plasmiden während einer Klonierung wurde die DNA aus Bakterienkulturen im 2 ml Maßstab mit dem GFX Micro Plasmid Kit (Amersham Pharmacia Biotech) gewonnen. Die Präparation größerer DNA-Mengen, die z. B. zur Transfektion eukaryotischer Zellen verwendet wurden, erfolgte aus 50–250 ml Flüssigkultur, die über Nacht herangezogen wurden. Dazu wurde je nach Ansatzgröße das Plasmid Midi oder Maxi Kit (Qiagen) benutzt. Die Aufreinigung erfolgte jeweils nach Herstellerangaben. Die präparierte Plasmid-DNA wurde in 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, gelöst und bei –20 °C gelagert. Zur Abschätzung der Konzentration wurde ein UV-Spektrum aufgenommen ($1 \text{ OD}_{260} \approx 50 \text{ µg/ml}$ bei 1 cm Schichtdicke).

2.4 Herstellung von Expressionsplasmiden

Die in dieser Arbeit verwendeten C-terminalen Deletionsmutanten von IRAK-1 wurden durch PCR-Klonierung hergestellt. Mit dem Plasmid pRK5-IRAK cds als Template, das die cDNA für die vollständige IRAK-1 enthält, und jeweils zwei spezifischen Primern wurden in einer PCR die gewünschten Genfragmente amplifiziert. Durch die Gestaltung der Primer wurden am 5'-Ende eine *Bam*HI Schnittstelle und am 3'-Ende ein Stopp-Codon sowie eine *Eco*RI Schnittstelle angehängt. Die Genfragmente wurden aus einem Agarosegel aufgereinigt und über die beiden Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor pcDNA3-Flag eingefügt, der Fusionsproteine mit N-terminalem FLAG-Epitoptag erzeugt. Chemisch kompetente Bakterien wurden mit den Ligationsansätzen transformiert und positive Klone über die auf dem Plasmid codierte Ampicillin-Resistenz selektiert. Aus den positiven Klonen wurde schließlich Plasmid-DNA gewonnen und der Erfolg der Klonierung durch Sequenzierung verifiziert.

Das Plasmid zur Expression der ProST-Region wurde mit der gleichen Technik hergestellt, über den *antisense* Primer wurde hier vor dem Stopp-Codon jedoch noch zusätzlich die cDNA für das HA-Epitoptag eingefügt.

Das Plasmid für C-terminal FLAG-getagtes humanes Tollip pRK5-hTollip C-Flag wurde ebenfalls durch PCR-Klonierung erzeugt. Als Template diente das Plasmid pF1-hTollip. Über die Primer wurden 5'-terminal eine *Eco*RI und 3'-terminal eine *Xba*I Schnittstelle angehängt, über die die Tollip cDNA in den Vektor pRK5 C-FLAG eingesetzt wurde.

Die Klonierung eines Plasmids hTollip noTag, das für humanes Tollip ohne Epitoptag codiert, war zweistufig. Zunächst wurde die Tollip cDNA in einer PCR vom Template

pGEM-hTollip amplifiziert, wobei 5'-terminal eine *EcoRI* Schnittstelle angehängt wurde. Das PCR-Produkt wurde ohne Restriktionsschnitt zunächst in den Vektor pGEM-T Easy (Promega) eingefügt nach den experimentellen Vorschriften des gleichnamigen Kits. Die *Multiple Cloning Site* dieses Vektors lieferte die zweite *EcoRI* Schnittstelle. Aus diesem Vektor wurde die Tollip cDNA dann über die beiden *EcoRI* Schnittstellen ausgeschnitten und in den Vektor pcDNA3 eingefügt. Zuletzt wurde das Gen auf *sense* Orientierung im Vektor überprüft.

Tab. 1 beschreibt die einzelnen Expressionsplasmide und deren Genprodukte sowie die zur Herstellung verwendeten Primer, die in Tab. 2 aufgelistet sind.

Plasmidname	Genprodukt	AS von IRAK-1	<i>sense</i> Primer	<i>antisense</i> Primer
pFI-IRAK-N118	FLAG-IRAK-N118	Ala2-Pro118	IRAK-83-S(Bam)	IRAK433as
pFI-IRAK-N127	FLAG-IRAK-N127	Ala2-Ala127	IRAK-83-S(Bam)	IRAK460as
pFI-IRAK-N136	FLAG-IRAK-N136	Ala2-Pro136	IRAK-83-S(Bam)	IRAK487as
pFI-IRAK-N139	FLAG-IRAK-N139	Ala2-Ala139	IRAK-83-S(Bam)	IRAK496as
pFI-IRAK-N143	FLAG-IRAK-N143	Ala2-Leu143	IRAK-83-S(Bam)	IRAK508as
pFI-IRAK-N151	FLAG-IRAK-N151	Ala2-Gln151	IRAK-83-S(Bam)	IRAK532as
pFI-IRAK-N168	FLAG-IRAK-N168	Ala2-Trp168	IRAK-83-S(Bam)	IRAK583as
pFI-IRAK-N176	FLAG-IRAK-N176	Ala2-Pro176	IRAK-83-S(Bam)	IRAK607as
pFI-IRAK-N184	FLAG-IRAK-N184	Ala2-Glu184	IRAK-83-S(Bam)	IRAK631as
pFI-IRAK-N195	FLAG-IRAK-N195	Ala2-Pro195	IRAK-83-S(Bam)	IRAK664as
pFI-IRAK-N208	FLAG-IRAK-N208	Ala2-Gly208	IRAK-83-S(Bam)	IRAK703as
pFI-IRAK-N211	FLAG-IRAK-N211	Ala2-Asn211	IRAK-83-S(Bam)	IRAK712as
pFI-ProST-HA	FLAG-ProST-HA	Ala101-Asn211	STR-BamHI-S	IRAK712HAas
pRK5-hTollip C-Flag	humanes Tollip mit C-terminalem FLAG-tag		EcoRI-Tollip s	hTollip935Xba as
hTollip noTag	Humanes Tollip ohne Epitoptag		EcoRI-Tollip s	h-Tollip-as

Tab. 1: Hergestellte Expressionsplasmide.

Primername	Sequenz (5' → 3')	Annealing-temperatur
IRAK-83-S(Bam)	CG <u>GGA TCC</u> GCC GGG GGG CCG GGC CCG	
IRAK433as	ACG <u>AAT TCA</u> GGG CCT CGG GGC AGT GGT GC	60 °C
IRAK460as	ACG <u>AAT TCA</u> GGC CTC GGC GGG TGC AGG G	60 °C
IRAK487as	ACG <u>AAT TCA</u> TGG CAA CTT CCG GGG GCT CC	60 °C
IRAK496as	ACG <u>AAT TCA</u> GGC TGA GGA TGG CAA CTT CCG	60 °C
IRAK508as	ACG <u>AAT TCA</u> GAG GAA GGT GGA GGC TGA GG	60 °C
IRAK532as	ACG <u>AAT TCA</u> CTG GGA GCC TGG AAA AGC TGG	60 °C
IRAK583as	ACG <u>AAT TCA</u> CCA CAG GGA AGC AGG GCT TGG	60 °C
IRAK607as	ACG <u>AAT TCA</u> AGG GGC TGG AGA TGG CCG TGG	60 °C
IRAK631as	ACG <u>AAT TCA</u> CTC TGG GCC TGG CTT GG	55 °C
IRAK664as	ACG <u>AAT TCA</u> GGG GCG GGC TCC CTG CAG G	60 °C
IRAK703as	ACG <u>AAT TCA</u> GCC CCG GGA AAT CTC ACA GAG G	60 °C
IRAK712as	ACG <u>AAT TCA</u> GTT GTG GGT GCC CCG GG	55 °C
STR-BamHI-S	AC ATC <u>GGA TCC</u> GCC TGG CAC CCT CCC GCC CC	
IRAK712HAas	GGG <u>AAT TCA</u> TGC ATA GTC TGG TAC GTC ATA TGG GTA <u>GTT GTG</u> GGT GCC CCG GG	65 °C
EcoRI-Tollip s	GC <u>GAA TTC</u> ATG GCG ACC ACC GTC AGC	
hTollip935Xba as	AG <u>TCT AGA</u> TGG CTC CTC CCC CAT CTG C	60 °C
h-Tollip-as	<u>CTA TGG CTC CTC</u> CCC CAT	50 °C

Tab. 2: Klonierungsprimer. Zum Template komplementäre Sequenzen sind durch Fettdruck hervorgehoben, Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

2.4.1 Polymerasekettenreaktion

Für die Amplifikation von Genfragmenten wurde *Pfu* DNA-Polymerase verwendet, die über eine Exonukleaseaktivität verfügt und daher eine geringe Fehlerrate aufweist.

PCR-Ansatz

5 µl 10× Cloned *Pfu* Puffer (Stratagene)
 10 ng Template-DNA
 0,2 mM dNTP Mix (je 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP, MBI Fermentas)
 5 % (v/v) DMSO
 0,5 µM sense-Primer
 0,5 µM antisense-Primer
 1 U Cloned *Pfu* DNA-Polymerase (Stratagene)
 ad 50 µl ddH₂O
 mit Mineralöl überschichten

Um dem Nachlassen der Prozessivität des Enzyms entgegenzuwirken, wurde die Elongationsphase ab dem 9. Zyklus um jeweils 5 sec. verlängert. Die Annealingtemperatur wurde etwa 5 °C unter der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer gewählt.

Temperatur-Programm im Landgraf Thermocycler

60 sec.	95 °C	<i>initiale Strangtrennung</i>	
45 sec.	95 °C	<i>Strangtrennung</i>	} 8×
45 sec.	x °C	<i>Primerannealing</i>	
90 sec.	68 °C	<i>Elongation</i>	
45 sec.	95 °C	<i>Strangtrennung</i>	} 17×
45 sec.	x °C	<i>Primerannealing</i>	
95+5 sec.	68 °C	<i>Elongation</i>	
	4 °C	<i>Aufbewahrung</i>	

Die auf diese Weise erhaltenen PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgereinigt (Kap. 2.4.3), bevor sie mit Restriktionsendonukleasen geschnitten wurden (Kap. 2.4.2).

2.4.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Vektoren und PCR-Produkte zur Klonierung von Expressionsplasmiden sowie präparierte Plasmid-DNA, deren Restriktionsmuster kontrolliert werden sollte, wurden mit Restriktionsendonukleasen von MBI Fermentas geschnitten. Dabei wurden die empfohlenen Puffer und Reaktionsbedingungen des Herstellers verwendet.

Die für die Insertion der PCR-Produkte aufgeschnittenen Vektoren wurden nach der Restriktionsspaltung unmittelbar im selben Ansatz mit Alkalischer Phosphatase aus Kalbsdarm (CIAP) inkubiert, um die 5'-Enden zu dephosphorylieren und dadurch eine spätere Religation unvollständig geschnittener Vektoren zu verhindern.

2.4.3 Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in einer Flachbett-Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden je nach Länge der zu trennenden DNA 0,7–1,2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen wurde die handwarme Lösung mit final 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelträger gegossen. Das erstarrte Gel wurde in der Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer überschichtet und mit den Proben beladen, die mit einem fünftel ihres Volumens an 6× DNA-Auftragspuffer versetzt worden waren. Die Elektrophorese wurde schließlich bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt.

Die DNA-Banden konnten anschließend auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und dokumentiert werden. PCR-Produkte und Vektoren, die ligiert werden sollten, wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) aus dem Gel extrahiert.

2.4.4 Ligation

Mit Restriktionsendonukleasen (Kap. 2.4.2) geschnittene Vektoren und PCR-Produkte wurden nach der Gelaufreinigung in folgendem Ansatz ligiert. Die Insert-DNA wurde dabei im 3fachen molaren Überschuss gegenüber dem Vektor eingesetzt. Grundsätzlich wurde ein Kontrollansatz mitgeführt, der kein Insert enthielt und Aufschluss darüber gab, ob ein Teil der Vektormoleküle ohne Insertion religierte.

Ligationsansatz

50 ng Vektor
 x ng Insert
 1 µl 10× Ligasepuffer (MBI Fermentas)
 2,5 U T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas)
 ad 10 µl ddH₂O

Die Ligation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz in die Transformation von Bakterienzellen eingesetzt (Kap. 2.3.2).

2.4.5 Punktmutation

Zum Einführen von Punktmutationen in Expressionsplasmide wurde Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwendet. Die Mutagenese erfolgte nach Herstellerangaben mit den in Tab. 3 abgedruckten Primern.

Primername	Sequenz (5' → 3')
IRAK T100A s	GCG CGG GAC ATC ATC GCA GCC TGG CAC CC
IRAK T113A s	CCG TCC CCA GGC GCC ACT GCC CCG AGG CCC
IRAK T114A s	CCG TCC CCA GGC ACC GCT GCC CCG AGG CCC
IRAK T113A T114A s	CCG TCC CCA GGC GCC GCT GCC CCG AGG CCC
IRAK S137A s	CC CGG AAG TTG CCA GCC TCA GCC TCC ACC
IRAK S138A s	GG AAG TTG CCA TCC GCA GCC TCC ACC TTC C
IRAK S137/138A s	CCC CGG AAG TTG CCA GCC GCA GCC TCC ACC
IRAK S140A s	G CCA TCC TCA GCC GCC ACC TTC CTC TCC C
IRAK T141A s	CCA TCC TCA GCC TCC GCC TTC CTC TCC CC
IRAK S140A T141A s	G CCA TCC TCA GCC GCC GCC TTC CTC TCC CC

Tab. 3: Mutageneseprimer. Die zu mutierende Aminosäure von IRAK-1 geht aus dem Primernamen hervor. Die veränderten Basen sind durch Fettdruck hervorgehoben, die zugehörigen Codons unterstrichen. Es ist jeweils nur der *sense* Primer angegeben, der jeweilige *antisense* Primer ist revers komplementär.

2.4.6 Sequenzierung

Die Expressionsplasmide, die durch PCR-Klonierung oder Punktmutation hergestellt wurden, wurden durch Sequenzierung auf die korrekte cDNA-Sequenz überprüft. Zum Einsatz kam das Big Dye Terminator Cycle Sequenzierkit (Perkin Elmer), das auf einer modifizierten Kettenabbruchmethode nach Sanger [97] beruht. Als Primer wurden die

Standard-Sequenzierprimer T7 und Sp6 eingesetzt, die auf den verwendeten Vektoren annealen.

Sequenzieransatz

200 ng Plasmid-DNA
4 pmol Primer (T7 oder Sp6)
4 µl Ready Reaction Premix (Perkin Elmer)
ad 10µl ddH₂O

Die Sequenzierreaktion wurde im Robocycler (Stratagene) mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

Temperatur-Programm

30 sec.	96 °C	<i>Strangtrennung</i>	} 25×
15 sec.	52 °C	<i>Primerannealing</i>	
240 sec.	60 °C	<i>Elongation</i>	
	4 °C	<i>Aufbewahrung</i>	

Anschließend wurde die DNA zur Aufreinigung mit Ethanol gefällt und in 15 µl Template Suppression Reagent (Perkin Elmer) aufgenommen. Die Analyse der entstandenen DNA-Fragmente erfolgte im Sequenzierautomaten.

2.5 Zellkultur

Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 wurde für die Proteinexpression verwendet. Für Experimente, bei denen die Stimulation mit IL-1 erforderlich war, war diese Zelllinie ungeeignet, weil sie keinen Typ I IL-1 Rezeptor exprimiert. In diesem Fall wurde die stabil mit dem IL-1 Rezeptor transfizierte Sublinie HEK293RI verwendet [60]. Bei den Transfektionsexperimenten mit siRNA wurde die murine Fibroblastenzelllinie Swiss 3T3 eingesetzt, für NFκB Reporterassays die murine Thymomalinie EL-4 6.1, die gut auf IL-1 reagiert.

Die adhären Zellen HEK293, HEK293RI und Swiss 3T3 wurden in DMEM mit 10 % (v/v) FCS und 2 mM L-Glutamin bei 37 °C, 10 % CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei Transfektionsexperimenten wurden dem Medium 20 U/ml Penicillin und 20 ng/ml Streptomycin zugesetzt. Die Zellen wurden zweimal in der Woche passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen, der Zellrasen mit PBS gewaschen und die Zellen durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst. Nach Zugabe von 8 ml Medium wurden die Zellen gezählt und mit einer Zellzahl von 1–2·10⁶ Zellen pro 80 cm²-Zellkulturflasche in 20 ml frischem Medium neu ausgesät.

Die Suspensionszelllinie EL-4 6.1 wurde in RPMI 1640 mit 5 % (v/v) FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin und nicht essentiellen Aminosäuren bei 37 °C, 5 % CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen werden alle 2–3 Tage passagiert. Bei

zwei (drei) Tagen bis zur nächsten Passage wurde die Zellzahl auf $1 \cdot 10^5$ ($5 \cdot 10^4$) Zellen/ml eingestellt. Dazu wurden die Zellen gezählt, 5 min bei Raumtemperatur und 1.200 rpm abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension 1+1 mit einer 0,8 %igen Trypanblaulösung in PBS gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Trypanblau passiert die Zellmembran und kann nur von lebenden Zellen aktiv ausgeschleust werden. Tote Zellen werden dadurch blau angefärbt.

Eukaryotische Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Einfrieren wurden $5 \cdot 10^6$ Zellen in 0,5 ml eiskaltem FCS resuspendiert, mit 0,5 ml eiskaltem FCS, das 20 % DMSO enthielt, gemischt und in Kryoröhrchen gefüllt. Die Kryoröhrchen wurden in einer mit Isopropanol gefüllten, auf 4 °C vorgekühlten Einfrierbox über Nacht bei -80 °C gelagert und somit langsam auf -80 °C abgekühlt. Danach wurden die Kryoröhrchen in einen Stickstofftank überführt. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen ins 37 °C warme Wasserbad gehalten. Die Zellen wurden dann sofort mit 20 ml Medium verdünnt, abzentrifugiert (5 min., 1.200 rpm) und in frischem Medium resuspendiert.

2.5.1 Transfektion eukaryotischer Zellen

2.5.1.1 Transfektion von HEK293 mit Calciumphosphat

HEK293 und HEK293RI Zellen wurden mit der Calciumphosphat-Methode [98] transfiziert nach einem gängigen Protokoll [99], das für diese Zelllinien noch weiter optimiert worden war. Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen mit einer Dichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen pro 56 cm^2 -Schale in 10 ml Medium ausgesät. Pro Transfektionsansatz wurden 5–10 µg DNA je Plasmid eingesetzt. Die Gesamt-DNA-Menge wurde durch Zusatz des Leervektors pUC18 auf 10–20 µg eingestellt. Das DNA-Gemisch wurde mit Wasser auf 450 µl aufgefüllt und mit 50 µl einer 2,5 M Calciumchloridlösung gemischt. Diese Lösung wurde schließlich langsam unter vortexen zu 500 µl $2 \times$ HBS zugetropft und zur Ausbildung der Präzipitate 20 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Transfektionslösung gleichmäßig in der Zellkulturschale verteilt und für 6–18 Stunden auf dem Zellrasen belassen, bevor das Medium erneuert wurde.

2.5.1.2 Transfektion von EL-4 6.1 mit DEAE/Dextran

EL-4 6.1 Zellen wurden, einem gängigen Protokoll [99] folgend, nach der DEAE/Dextran-Methode [100] transfiziert. Damit sich die Zellen zur Transfektion in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, werden sie am Vortag mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml ausgesät.

Die Zellen wurden je einmal in PBS und TBS gewaschen. $5 \cdot 10^6$ Zellen pro Ansatz wurden in 600 µl Transfektionslösung resuspendiert und 30 min bei Raumtemperatur langsam über Kopf geschüttelt. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 3.500 rpm), der

Überstand abgesaugt und die Zellen zweimal mit je 1 ml Medium gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in RPMI mit 10 % (v/v) FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, nicht essentiellen Aminosäuren sowie 20 U/ml Penicillin und 20 ng/ml Streptomycin ausgesät.

Transfektionslösung

250 µg/ml DEAE/Dextran
40 µg/ml Chloroquin
max. 2 µg Plasmid-DNA (pro $5 \cdot 10^6$ Zellen)
in TBS

Die Gesamt-DNA-Menge wird durch Zusatz von Leervektoren erreicht.

2.5.1.3 Transfektion von Swiss 3T3 mit PolyFect

Die Transfektion von Swiss 3T3 Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz PolyFect der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Bei Transfektion der Zellen in einer 96 well Platte wurden pro well 50 µl der siRNA-Lösung in Medium ohne Zusätze mit 1 µl Transfektionsreagenz versetzt und zur Komplexbildung 10 min stehen gelassen. Danach wurde der Ansatz mit 100 µl Medium inklusive FCS und Antibiotika gemischt und auf die mit PBS gewaschenen Zellen pipettiert.

Für die Transfektion in einer 56 cm² Schale wurden 300 µl siRNA-Lösung in Medium ohne Zusätze mit 25 µl Transfektionsreagenz versetzt und 10 min stehen gelassen. Währenddessen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 7 ml frischem Medium versetzt. Der Transfektionsansatz wurde schließlich mit 700 µl Medium inklusive FCS und Antibiotika gemischt und in das Zellkulturmedium pipettiert.

2.5.2 Vitalitätsbestimmung

Um zu überprüfen, ob die Zellen durch die Transfektion mit siRNA in Abhängigkeit von der siRNA Konzentration geschädigt werden, wurde die Vitalität der Zellen in den verschiedenen wells in einem MTT-Assay [101] miteinander verglichen. MTT ist ein gelber wasserlöslicher Farbstoff, der von mitochondrialen Dehydrogenasen in einen violetten wasserunlöslichen Farbstoff umgesetzt wird.

Die Zellen in einer 96 well Platte wurden mit 0,5 mg/ml MTT in 100 µl Medium pro well für 2–4 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die violetten Farbstoffkristalle in Isopropanol mit 5 % Ameisensäure aufgelöst. Die Farbintensität wurde im Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen 630 nm als Referenzwellenlänge quantifiziert. Da MTT nur von lebenden Zellen umgesetzt wird, korreliert die gemessene optische Dichte mit der Anzahl lebender Zellen.

2.5.3 Verwendete Plasmide

Neben den selbst hergestellten Expressionsplasmiden (Kap. 2.4) wurden folgende Plasmide eingesetzt:

Name	Beschreibung/Genprodukt	Herkunft
pUC18	prokaryotischer Klonierungsvektor	Amersham Pharmacia Biotech
pcDNA3-Flag	eukaryotischer Klonierungsvektor für N-terminale FLAG-Fusionsproteine	B. Lüscher, Aachen
pFI-IRAK cds	vollständige humane IRAK-1 mit N-term. FLAG-tag	J. Knop, Med. Hochschule Hannover [67]
pFI-K239S cds	kinaseinaktive vollständige humane IRAK-1 mit N-term. FLAG-tag	J. Knop, Med. Hochschule Hannover [67]
pFI-T387A cds	vollständige humane IRAK-1 mit Punktmutation und N-term. FLAG-tag	A. Mackensen, Med. Hochschule Hannover
pFI-T66A cds	vollständige humane IRAK-1 mit Punktmutation und N-term. FLAG-tag	D. Neumann, Med. Hochschule Hannover
pFI-IRAK-ΔKD	humane IRAK-1 mit HA-tag an Stelle der Kinasedomäne (AS 212–537) mit N-term. FLAG-tag	D. Neumann, Med. Hochschule Hannover
pFI-IRAK-ΔProST	humane IRAK-1 mit HA-tag an Stelle der ProST-Region (AS 110–211) mit N-term. FLAG-tag	D. Neumann, Med. Hochschule Hannover
pFI-IRAK-N109	Todesdomäne der humanen IRAK-1 (Ala2–Pro109) mit N-term. FLAG-tag	J. Knop, Med. Hochschule Hannover
pFI-IRAK-N109 T66A	pFI-IRAK-N109 mit Punktmutation	D. Neumann, Med. Hochschule Hannover
pFI-IRAK-N155 = pFI-IRAK-DD	humane IRAK-1 Ala2–Gly155 mit N-term. FLAG-tag	J. Knop, Med. Hochschule Hannover [67]
pFI-IRAK-KD	Kinasedomäne der humanen IRAK-1 (Gly149–Cys537) mit N-term. FLAG-tag	J. Knop, Med. Hochschule Hannover [67]
pFI-K239S-KD	kinaseinaktive Kinasedomäne der humanen IRAK-1 (Gly149–Cys537) mit N-term. FLAG-tag	J. Knop, Med. Hochschule Hannover [67]
pFI-IRAK-C	C-Terminus der humanen IRAK-1 (Gly530–Ser713) mit N-term. FLAG-tag	J. Knop, Med. Hochschule Hannover [67]
pFI-IRAK-ΔN	humane IRAK-1 ohne N-Terminus (Gly149–Ser713) mit N-term. FLAG-tag	J. Knop, Med. Hochschule Hannover [67]
pFI-IRAK-ΔC	humane IRAK-1 ohne C-Terminus (Ala2–Cys537) mit N-term. FLAG-tag	J. Knop, Med. Hochschule Hannover [67]
pFI-K239S-ΔC	kinaseinaktive humane IRAK-1 ohne C-Terminus (Ala2–Cys537) mit N-term. FLAG-tag	J. Knop, Med. Hochschule Hannover [67]
pFI-IRAK-2	humane IRAK-2 mit N-term. FLAG-tag	J. Knop, Med. Hochschule Hannover
pFI-IRAK-M	humane IRAK-M mit N-term. FLAG-tag	J. Knop, Med. Hochschule Hannover

MyD88-Fl	humanes MyD88 mit C-term. FLAG-tag	H. Wesche, Tularik, San Francisco [50]
pFl-TRAF6	humanes TRAF6 mit N-term. FLAG-tag	Z. Cao, Tularik, San Francisco [74]
pFl-hTollip	humanes Tollip mit N-term. FLAG-tag	J. Knop, Med. Hochschule Hannover
pFl-mTollip	murines Tollip mit N-term. FLAG-tag	J. Knop, Med. Hochschule Hannover
5×NFκB-luc	<i>firefly</i> Luciferase unter Kontrolle einer pentameren NFκB Consensussequenz	W. Falk, Universität Regensburg
pMT123	8×(Ubiquitin-C mit N-term. HA-tag)	H. Wesche, Tularik, San Francisco

Tab. 4: Verwendete Plasmide, die nicht selbst hergestellt wurden.

2.6 NFκB Reporterassay

Um den Einfluss verschiedener IRAK-1 Mutanten auf die IL-1 abhängige NFκB Aktivität in Zellen zu messen, wurden diese mit dem Plasmid 5×NFκB-luc cotransfiziert. Nach Aktivierung bindet der Transkriptionsfaktor NFκB an die fünffach vorhandene NFκB Consensussequenz im Promotorbereich des Plasmides und initiiert so die Expression des Reportergens, das für Luciferase codiert. Die Luciferaseaktivität der Zelllysate wird in einer enzymatischen Reaktion gemessen.

5·10⁶ EL-4 6.1 Zellen pro Ansatz wurden mit 0,5 µg 5×NFκB-luc und Plasmiden für die zu untersuchenden IRAK-1 Mutanten cotransfiziert. 4 Stunden später wurden die Zellen mit 10 ng/ml IL-1β oder 100 ng/ml TNFα stimuliert oder unstimuliert gelassen. Nach weiteren 20 Stunden wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 100 µl Lysepuffer (*Reporter Lysis Buffer*, Promega) auf Eis lysiert. Nach dem Abzentrifugieren von DNA und Zelltrümmern (13.000 rpm, 30 min., 4°C) wurde in den Lysaten die Luciferaseaktivität gemessen. Das geschah im Luminometer durch automatische Injektion von 100 µl Luciferin Substratpuffer zu 20 µl Lysat. Luciferase setzt das Substrat Luciferin unter Emission sichtbaren Lichtes frei. Die Lichtemission wurde im Gerät über einen Zeitraum von 10 sec. gemessen und integriert. Die Messgröße waren relative Lichteinheiten (RLU). Es wurden Doppelwerte aufgenommen. Bei einer Abweichung >5 % zwischen den Doppelwerten wurde die Messung wiederholt.

2.6.1 Proteinbestimmung

Um die Luciferaseaktivität in den verschiedenen Proben vergleichen zu können, wurde sie auf die Proteinkonzentration der jeweiligen Lysate normiert. Zur Proteinbestimmung nach Bradford [102] wurden 100 µl/well einer 1:100-Verdünnung der Lysate in eine 96-well-Platte pipettiert (4fach Ansätze). Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von BSA in PBS. In jedes well wurden 100 µl 40 %iges *Protein Assay Dye Reagent* (Biorad) zugefügt

und die Intensität des entstehenden Farbkomplexes im Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen.

2.7 ELISA

Die Konzentration von murinem IL-2 oder IL-6 im Zellkulturüberstand wurde im ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*) gemessen. Dabei fanden zwei kommerzielle Kits Verwendung: Murine IL-2 Eli-pair der Firma Diaclone und DuoSet Mouse IL-6 der Firma R&D Systems. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben der Hersteller.

2.8 Immunpräzipitation und Westernblot

2.8.1 Zelllyse

Die Immunpräzipitation in HEK293, HEK293RI oder Swiss 3T3 Zellen überexprimierter Proteine erfolgte aus Zelllysaten, die folgendermaßen hergestellt wurden: Die Zellen wurde zunächst einmal mit PBS gewaschen, bevor 1 ml IP-Puffer in die 56 cm² Zellkulturschale gegeben wurde. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Die zerstörten Zellen wurden vom Plastik abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem sie bis zur vollständigen Lyse 15 min. geschwenkt wurden. Beim Einsatz von mehr als einer Zellkulturschale pro Ansatz wurde der IP-Puffer nacheinander von Schale zu Schale pipettiert, so dass alle Zellen in einem kleinen Puffervolumen lysiert werden konnten. Nach der vollständigen Zelllyse wurden DNA und Zelltrümmer abzentrifugiert (13.000 rpm, 20 min.) und die Lysate entweder in eine Immunpräzipitation eingesetzt oder direkt aufs Gel aufgetragen.

Da der IP-Puffer verschiedene Phosphataseinhibitoren enthielt, war er zur Herstellung solcher Lysate nicht geeignet, die mit Proteinphosphatase-1 (PP-1) inkubiert werden sollten. In diesem Fall wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Plastik abgelöst. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1.200 rpm, 5 min.), in 250 µl pro 2 Schalen PP-1 Puffer, dem 10 mM Iodoacetamid und 1× Proteaseinhibitoren zugesetzt wurden, resuspendiert und durch Ultraschall lysiert. Schließlich wurden auch hier DNA und Zelltrümmer abzentrifugiert.

2.8.2 Verwendete Antikörper

Folgende Antikörper wurden zur Immunpräzipitation oder Immunfärbung in den angegebenen Verdünnungen eingesetzt:

Bezeichnung	Antigen	Quelle, Typ	Herkunft	IP	WB
2A9	C-Terminus von hIRAK-1	Maus IgG, monoklonal	H. Wesche, Tularik, San Francisco	1:1.000	1:10.000
anti IRAK-1	hIRAK-1	Kaninchen, polyklonales Serum	Z. Cao, Tularik, San Francisco	1:1.000	
anti IRAK-2	hIRAK-2	Kaninchen, polyklonales Serum	H. Wesche, Tularik, San Francisco	1:1.000	
anti IRAK-M	hIRAK-M	Kaninchen, polyklonales Serum	H. Wesche, Tularik, San Francisco	1:1.000	
anti MyD88	hMyD88	Kaninchen, polyklonales Serum	H. Wesche, Tularik, San Francisco		1:500
anti TRAF6	hTRAF6	Kaninchen, polyklonales Serum	H. Wesche, Tularik, San Francisco	1:1.000	
bioM2	FLAG-Epitop	Maus IgG, biotinyliert, monokl.	Sigma-Aldrich		1:500
M2-Agarose	FLAG-Epitop	Maus IgG, Agarose gekoppelt	Sigma-Aldrich		
3F10	HA-Epitop	Ratten IgG, monoklonal	Roche		1:1.000
Kimmy-1	h/m Tollip	Ratten IgG, monoklonal	Alexis		1:10.000
anti Ubiquitin	Ubiquitin	Kaninchen, polyklonales Serum	Sigma-Aldrich		1:100
anti mouse HRP	Maus Ig	Kaninchen IgG, Peroxidase gekoppelt	Dako		1:5.000
anti rabbit HRP	Kaninchen Ig	Ziegen IgG, Peroxidase gekoppelt	Dako		1:5.000
anti rat biotin	Ratten Ig	Ziegen IgG, biotinyliert	Dianova		1:50.000

Tab. 5: Verwendete Antikörper.

Biotinylierte Antikörper wurden mit HRP gekoppeltem Streptavidin (Dianova, 1:50.000) detektiert.

2.8.3 Immunpräzipitation

Zur spezifischen Anreicherung von Proteinen aus Zelllysaten wurden Antikörper eingesetzt, die an Protein G-Sepharose immobilisiert wurden. FLAG-Epitop markierte Proteine wurden mit M2-Agarose präzipitiert. Die Immunpräzipitation erfolgte für 4 Stunden oder über Nacht bei 4 °C unter Rotieren der Reaktionsgefäße. Anschließend wurden die Agarose- oder Sepharose-Kügelchen abzentrifugiert (13.000 rpm, 1 min.) und mit geeigneten Puffern gewaschen. Soweit nicht anders vermerkt, wurde viermal mit

IP-Puffer (ohne Proteaseinhibitoren, DTT und Natriumorthovanadat) und zweimal mit PBS / 0,5 % Nonidet P-40 gewaschen.

2.8.4 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteingemischen nach den Molekulargewichten erfolgte in einer denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [103]. Die Acrylamidkonzentration im Trenngel wurde je nach Molekulargewicht der zu trennenden Proteine zwischen 7,5 und 15 % variiert. Um die Proteine vor der Trennung zu fokussieren, wurde das Trenngel mit einem 5 %igen Sammelgel überschichtet.

Die Proteinproben wurden zur Denaturierung mit der Hälfte ihres Volumens an 3× Laemmli-Puffer versetzt und 10 min. auf 95 °C erhitzt. Agarose- oder Sepharosepellets aus Immunpräzipitationen wurden mit dem Doppelten ihres Volumens an 3× Laemmli-Puffer erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Elektrodenpuffer bei 15–20 mA pro Gel (Mini Protean II, BioRad) oder, bei größeren Gelabmessungen (14×10×0,15 cm), bei 7 mA pro Gel über Nacht.

Gele mit radioaktiven Proben wurden anschließend getrocknet und einer Autoradiographie unterzogen, Gele für die Immunfärbung wurden auf PVDF-Membran geblottet.

2.8.5 Proteintransfer auf PVDF-Membran

Proteine, die mit spezifischen Antikörpern angefärbt werden sollten, wurden nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf PVDF-Membranen übertragen. Die PVDF-Membran wurde durch Schwenken in Methanol für einige Minuten aktiviert, bevor sie zusammen mit dem Acrylamidgel und 4 Whatman Filterpapieren in Gelgröße 10 min. in Blotpuffer äquilibriert wurde. Die einzelnen Komponenten wurden dann in folgender Reihenfolge in der *semidry* Blotapparatur luftblasenfrei gestapelt:

Kathode (–)
2 Lagen Filterpapier
Acrylamidgel
PVDF-Membran
2 Lagen Filterpapier
Anode (+)

Der Proteintransfer erfolgte für 1,5 Stunden mit einer Stromstärke von 0,5 mA/cm². Anschließend wurden freie Proteinbindungsplätze auf der Membran abgesättigt, indem diese mindestens 3 Stunden in TBST mit 5 % Magermilchpulver geschwenkt wurde.

2.8.6 Immunfärbung

Die Westernblotmembran wurde 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit einer Verdünnung des Primärantikörpers in TBST inkubiert. Die Membran wurde danach

dreimal mit TBST gewaschen und mit einer Verdünnung des an Peroxidase gekoppelten oder biotinylierten Sekundärantikörpers in TBST mit 1 % Magermilchpulver für eine weitere Stunde inkubiert. Biotinylierte Primär- oder Sekundärantikörper wurden mit an Streptavidin gekoppelter Peroxidase angefärbt. Die Membran wurde erneut dreimal mit TBST gewaschen und die mit Antikörpern markierten Proteinbanden in einer Chemolumineszenzreaktion durch Belichtung eines Röntgenfilms (Biomax MR, Kodak) sichtbar gemacht. Die ECL-Substratlösung *Super Signal West Pico* der Firma Pierce wurde dazu nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.9 Enzymtests

2.9.1 IRAK-Kinaseassay

Da sich IRAK-1 nach Aktivierung selbst phosphoryliert, konnte die IRAK-Aktivität in einem *in vitro* Kinaseassay nachgewiesen werden. An Agarose oder Sepharose immobilisierte IRAK-Mutanten wurden dazu zweimal mit IRAK-Kinasepuffer gewaschen und dann in folgendem Ansatz für 10 min. bei 30 °C inkubiert:

10 µl Agarose- oder Sepharosebeads
6 µl 5× IRAK-Kinasepuffer
0,5µM ATP
1 µCi [³²P]γ-ATP
ad 30 µl ddH₂O

Die Reaktionslösung wurde von den *beads* abgenommen, welche dann in 30 µl 3× Laemmli-Puffer für 10 min. auf 95 °C erhitzt wurden. Danach wurde die gesamte Probe in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel getrocknet und phosphorylierte Proteine durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Wenn die IRAK-Moleküle nach dem Kinaseassay in eine Phosphoaminosäureanalyse (Kap. 0) eingesetzt werden sollten, wurde die zehnfache Menge an [³²P]γ-ATP verwendet.

2.9.2 Kinaseassay mit ProST-Peptiden

Für den Test der ProST-Peptide auf Phosphorylierung durch IRAK-1 wurde folgender Ansatz verwendet:

0,5 µg rekombinante Kinase (IRAK-1, K239S oder NIK)
10 µg Peptid
6 µl 5× IRAK-Kinasepuffer
0,5µM ATP
1 µCi [³²P]γ-ATP
ad 30 µl ddH₂O

Nach 30 min bei 37 °C wurden 15 µl 3× Tricin-Probenpuffer zugegeben und 20 min. bei 37 °C inkubiert.

2.9.2.1 Tricin-Gelelektrophorese

Weil die Peptide zu klein für eine Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel waren, kam zur Trennung der Peptide von den Kinasen und von radioaktivem ATP die Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Schägger und v. Jagow [104] zum Einsatz, die die Proteintrennung auch im kleinen Molekulargewichtsbereich bis zu 1 kD erlaubt. Es handelt sich dabei um ein diskontinuierliches System mit drei übereinandergeschichteten Gelen: ein 7,5 cm langes Trenngel mit 16,5 % T (Gesamtanteil von Acrylamid und Bisacrylamid), 6 % C (Anteil von Bisacrylamid gegenüber Gesamtacrylamid) und 6 M Harnstoff, ein 2 cm langes Spacergel mit 10 % T und 3 % C sowie ein 1 cm langes Trenngel mit 4 % T und 3 % C. Für die Elektrophorese wurden ein Tricin-haltiger Kathodenpuffer und 0,2 M Tris-HCl, pH 8,9, als Anodenpuffer verwendet. Zunächst wurden die Proben 1 h bei 30 V in das Gel einlaufen gelassen, dann wurde die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 50 V über Nacht fortgesetzt.

Am Ende wurde das Gel in Frischhaltefolie eingeschlagen und zur Visualisierung der phosphorylierten Peptide auf einen Röntgenfilm (Biomax MR, Kodak) aufgelegt.

2.9.3 Proteolyse mit Carboxypeptidase-Y

Nach Immunpräzipitation an M2-Agarose oder Protein G-Sepharose immobilisierte IRAK-Mutanten, die mit Carboxypeptidase-Y vom C-Terminus her proteolytisch abgebaut werden sollten, wurden nach dem IRAK-Kinaseassay (Kap. 2.9.1) dreimal mit 5 mM p-Nitrophenylphosphat in PBS, pH 6,4, gewaschen. Danach wurden die *beads* in 40 µl desselben Puffers resuspendiert und mit der angegebenen Menge an Carboxypeptidase-Y bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde schließlich durch Zugabe von 20 µl 3× Laemmli-Puffer und Erhitzen auf 95 °C gestoppt.

2.9.4 Dephosphorylierung

Nach Immunpräzipitation mit M2-Agarose immobilisierte IRAK-N139 wurde à 10 µl *beads* aliquotiert und dreimal mit 1 ml des jeweiligen Reaktionspuffers gewaschen. Danach wurden die *beads* in 50 µl Reaktionspuffer aufgenommen und mit der angegebenen Phosphatasemenge versetzt. Die Reaktion lief 2 h bei 30 oder 37 °C ab. Danach wurde der Puffer abgenommen und die *beads* in 30 µl 3× Laemmli-Puffer für 10 min. auf 95 °C erhitzt.

Enzym	Menge	Temp.	Reaktionspuffer
–	–	37 °C	50 mM Tris-HCl, pH 7,0
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	1U	37 °C	CIAP Puffer
Saure Phosphatase aus Kartoffeln	1 U	37 °C	40 mM Citrat-HCl, pH 4,8
Proteinphosphatase-1	2,5 U	30 °C	PP-1 Puffer
Proteinphosphatase-2A	1 U	30 °C	PP-2A Puffer

Tab. 6: Reaktionsbedingungen der eingesetzten Phosphatasen.

2.10 Phosphoaminosäureanalyse

IRAK-1 Deletionsmutanten wurden immunpräzipitiert und in einem IRAK-Kinaseassay mit 10 μCi [^{32}P] γ -ATP radioaktiv phosphoryliert. Die Proben wurden im Acrylamidgel aufgetrennt, das Gel getrocknet und die phosphorylierten IRAK-Mutanten mit einem Skalpell getrennt aus dem getrockneten Gel ausgeschnitten. Nachdem die Gelstückchen mit 6 N Salzsäure benetzt worden waren, konnte das Filterpapier, auf dem das Gel getrocknet worden war, abgezogen werden. Zu jedem Gelstückchen wurden noch einmal 50 μl 6 N Salzsäure zugegeben und 25 μl AS-Standard-Mix aus 5,5 mg/ml Phosphotyrosin, 2,2 mg/ml Phosphoserin und 2,2 mg/ml Phosphothreonin. Die IRAK-Mutante wurde dann 2 Stunden bei 110 °C hydrolysiert und aus dem Gel eluiert (zwischen durch an zentrifugiert). Die Gelreste wurden entfernt und die Salzsäure bei 110 °C abgedampft. Um noch verbliebene Salzsäure zu entfernen, wurde der Rückstand in 100 μl Wasser gelöst und erneut bei 110 °C zur Trockene eingedampft. Schließlich wurde das Hydrolysat in 20 μl Wasser gelöst und bei -20 °C eingefroren oder direkt in die Dünnschicht-Elektrophorese eingesetzt.

Auf eine 20×20 cm Dünnschichtkarte (Cellulose auf Plastik) wurden 5×0,5 μl AS-Standard-Mix und 8×0,5 μl Hydrolysat aufgetropft. Die 1. Dimension der Hochspannungs-Dünnschichtchromatographie erfolgte in PAA-Puffer (1. Dimension) mit einer Spannung von 1.000 V für 1,5 Stunden. Die Dünnschichtkarte wurde getrocknet, bevor die Elektrophorese in der 2. Dimension mit PAA-Puffer (2. Dimension) für 45 min. bei 1.000 V fortgesetzt wurde. Die Dünnschichtkarte wurde erneut getrocknet und mit 0,1 % Ninhydrin in Ethanol besprüht, um die Aminosäurestandards anzufärben. Die radioaktiv phosphorylierten Aminosäuren der IRAK-Mutanten wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und durch Vergleich mit der Ninhydrinfärbung zugeordnet.

2.11 Herstellung von siRNA

Die siRNA gegen IRAK-4 und Tollip wurde mit dem *Silencer siRNA Construction Kit* der Firma Ambion hergestellt. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils ein *sense* und ein *antisense* DNA Oligonukleotid, deren Sequenzen in Tab. 7 angegeben sind. Die Auswahl der Zielsequenzen für die RNA Interferenz ist in Kap. 3.4.3.2 beschrieben. Die experimentelle Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

DNA Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
siRNA mTollip141s	AACGACCCACGGTACCAACTGCCTGTCTC
siRNA mTollip141as	AACAGTTGGTACCGTGGGTGCGCTGTCTC
siRNA mTollip570s	AAACACCCTGCTGGTACACAGCCTGTCTC
siRNA mTollip570as	AACTGTGTACCAGCAGGGTGTCTGTCTC
siRNA mTollip778s	AAGGAATTGATGGCAGCATCTCCTGTCTC
siRNA mTollip778as	AAAGATGCTGCCATCAATTCCCCTGTCTC
siRNA mIRAK4 321s	AAAGTAAGGCTTCGAATCTCCCCTGTCTC
siRNA mIRAK4 321as	AAGGAGATTGGAAGCCTTACTCCTGTCTC
siRNA mIRAK4 630s	AAGTGTCGCTGGACTCTACACCCTGTCTC
siRNA mIRAK4 630as	AAGTGTCGCTGGACTCTACACCCTGTCTC
siRNA mIRAK4 1337s	AATATCCAGCAGTAGTTGAGGCCTGTCTC
siRNA mIRAK4 1337as	AACCTCAACTACTGCTGGATAACCTGTCTC

Tab. 7: Zur siRNA Herstellung verwendete DNA-Oligonukleotide. Die Zahl im Namen des Oligonukleotids bezeichnet die erste Base der Zielsequenz im Gen für murine IRAK-4 (Accession# AX196262) oder murines Tollip (Accession# NM_023764). Die zur cDNA komplementären Basen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

3 Ergebnisse

3.1 Phosphorylierung von IRAK-1

3.1.1 Identifizierung der ProST-Region

Wildtyp IRAK-1 durchläuft nach Aktivierung einen bemerkenswerten Molekulargewichtsshift [60]. In einem Westernblot von Lysaten mit pFl-IRAK cds transfizierter Zellen wird IRAK-1 als eine Leiter von Banden sichtbar, die sich über einen Molekulargewichtsbereich von 80 bis über 100 kD erstreckt (Abb. 3). Dabei beträgt das aus der Aminosäuresequenz FLAG-getagter IRAK-1 errechnete Molekulargewicht 77,5 kD. Dass IRAK-1 während der Aktivierung phosphoryliert wird, ist bekannt [60]. Aber kann Phosphorylierung allein für diese deutliche Änderung des Laufverhaltens in der Gelelektrophorese verantwortlich sein, oder spielen noch weitere Modifikationen eine Rolle?

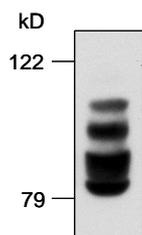


Abb. 3: Laufverhalten von Wildtyp IRAK-1 in der Gelelektrophorese. HEK293 Zellen wurden mit 0,3 µg pFl-IRAK cds transfiziert. Nach 40 h wurden die Zellen lysiert. Das Lysat wurde in einem 7,5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblottet und mit dem anti IRAK-1 Antikörper 2A9 angefärbt.

Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, wo im IRAK-1 Molekül die Phosphorylierung stattfindet. Bei der Suche nach möglichen Phosphorylierungsstellen in der Aminosäuresequenz fiel der Bereich zwischen Todes- und Kinasedomäne besonders auf. In diesem Abschnitt von 112 Aminosäuren (AS 100–211) finden sich 27 Proline, 20 Serine und 7 Threonine (Abb. 4). Somit besteht praktisch die Hälfte dieses Bereichs aus Prolin-, Serin- oder Threoninresten, was uns zu der Namensgebung „ProST-Region“ veranlasste.

Die Suche mit dem von Rechsteiner *et al.* entwickelten Computerprogramm PEST-FIND (<http://at.embnnet.org/embnnet/tools/bio/PESTfind>) identifizierte zwei wahrscheinliche PEST-Sequenzen in der ProST-Region (Abb. 4). PEST-Sequenzen sind hydrophile Bereiche von mindestens 12 Aminosäuren, die mindestens ein Prolin, ein Glutamat oder Aspartat und ein Serin oder Threonin enthalten und von Lysin-, Arginin- oder Histidinresten flankiert werden. Positiv geladene Aminosäuren dürfen innerhalb der Sequenz nicht vorkommen [105]. In vielen Proteinen führt die Anwesenheit von PEST-Sequenzen zur deutlichen Reduktion der Proteinstabilität. So kann z. B. die Phosphorylierung von Serin- oder Threoninresten zur „Freilegung“ einer PEST-Sequenz führen, die als Signal für Ubiquitylierung und nachfolgende Proteolyse am 26S Proteasom dient [105].

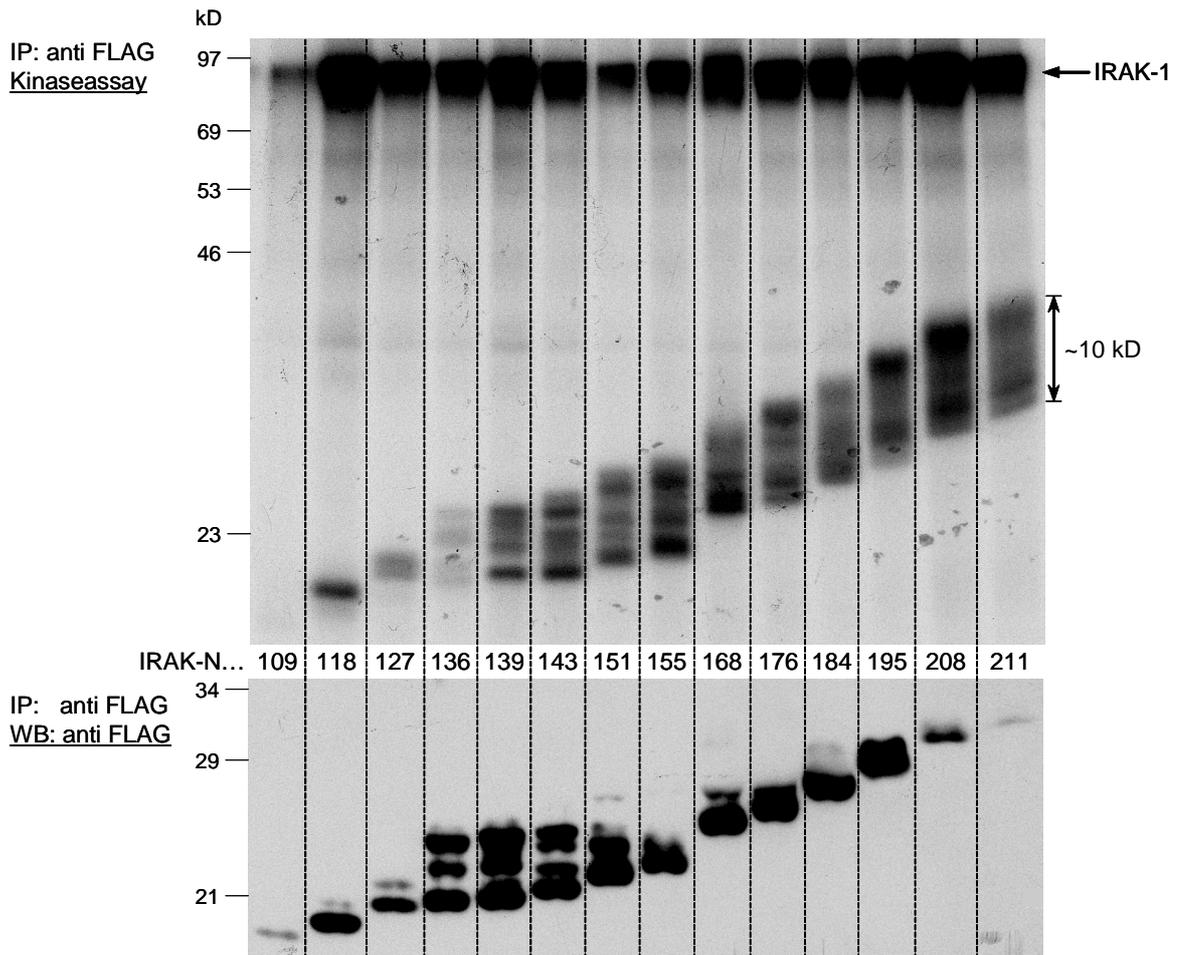


Abb. 6: Kinaseassay C-terminaler Deletionsmutanten von IRAK-1. $2 \cdot 10^6$ HEK293 Zellen pro Ansatz wurden mit Plasmiden für IRAK cds und eine Reihe von Deletionsmutanten von IRAK-1, die die N-terminale Todesdomäne und unterschiedlich lange Bereiche der C-terminal anschließenden ProST-Region umfassen, cotransfiziert. Die C-terminale Aminosäure ist dabei durch die Zahl im Molekülnamen angegeben. Nach 40 Stunden Expression wurden die Zellen lysiert und die IRAK-Moleküle mit anti FLAG M2-Agarose aus den Lysaten forciert coimmunpräzipitiert. Eine Hälfte der Präzipitate wurde in einen *in vitro* Kinaseassay eingesetzt (oben), während mit der anderen Hälfte im anti FLAG Westernblot die erfolgreiche Präzipitation der IRAK-Mutanten kontrolliert wurde (unten).

Die kürzeste IRAK-Mutante IRAK-N109, die praktisch nur aus der Todesdomäne besteht, wurde durch IRAK cds nicht phosphoryliert. IRAK-N118 als nächst größeres Molekül zeigt ein deutliches Phosphorylierungssignal, wobei es sich um eine einzige Bande handelt. Bei der Phosphorylierung von IRAK-N127 sind bereits zwei Banden zu erkennen, während bei IRAK-N136 und allen längeren IRAK-Mutanten breite Phosphorylierungsmuster aus zahlreichen Banden entstanden sind, die sich von Molekül zu Molekül unterscheiden.

Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass in der ProST-Region zahlreiche Aminosäuren phosphoryliert werden und ebendiese Phosphorylierungsereignisse den starken Molekulargewichtsshift hervorrufen, der bei IRAK-1 in der Gelelektrophorese zu beobachten ist (vergl. Abb. 3).

Dieses Phosphorylierungsexperiment der Deletionsmutanten ließ die Möglichkeit offen, dass die beobachteten Phosphorylierungen nicht direkt in der ProST-Region stattfinden, sondern in der Todesdomäne, und dass Teile der ProST-Region nur strukturell erforderlich sind, um die Phosphorylierungen zu ermöglichen. Daher wurde ein Plasmid hergestellt, das zur Expression der isolierten ProST-Region, versehen mit einem N-terminalen FLAG- und einem C-terminalen HA-Epitoptag, geeignet ist. Zunächst wurden die Expression dieses Moleküls und sein Laufverhalten in der Gelelektrophorese kontrolliert, um später eine genaue Identifikation zu ermöglichen. Nach der Expression in HEK293 Zellen wurde die rekombinante ProST-Region über das FLAG-tag aus dem Zelllysate präzipitiert und im Westernblot über die beiden Epitoptags angefärbt. Die spezifische Bande ist im Gel auf der Höhe des 21 kD Standards zu finden (Abb. 7).

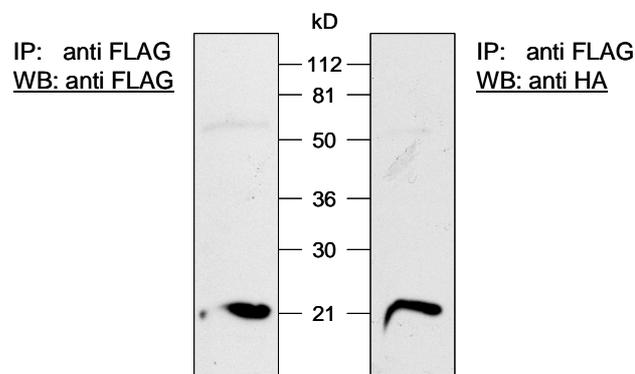


Abb. 7: Identifikation der rekombinanten ProST-Region im Westernblot. $4 \cdot 10^6$ HEK293 Zellen wurden mit pF1-ProST-HA transfiziert. Nach 40 Stunden Expression wurden die Zellen lysiert und die ProST-Region mit anti FLAG M2-Agarose aus dem Lysat immunpräzipitiert. Je die Hälfte des Präzipitates wurde in zwei Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Eine Blotmembran wurde mit anti FLAG bioM2 Antikörper (links), die andere mit anti HA Antikörper 3F10 (rechts) angefärbt.

Im zweiten Schritt wurde die in HEK293 Zellen rekombinant hergestellte ProST-Region mit dem Lysat IRAK cds exprimierender Zellen gemischt. Nach forcierter Coimmunpräzipitation über die jeweiligen FLAG-Epitoptags wurden die beiden Moleküle in einen *in vitro* Kinaseassay eingesetzt. Im Autoradiogramm findet sich auf Höhe der rekombinanten ProST-Region ein deutliches Phosphorylierungssignal (Abb. 8), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die oben beschriebenen Phosphorylierungsereignisse tatsächlich in der ProST-Region stattfinden.

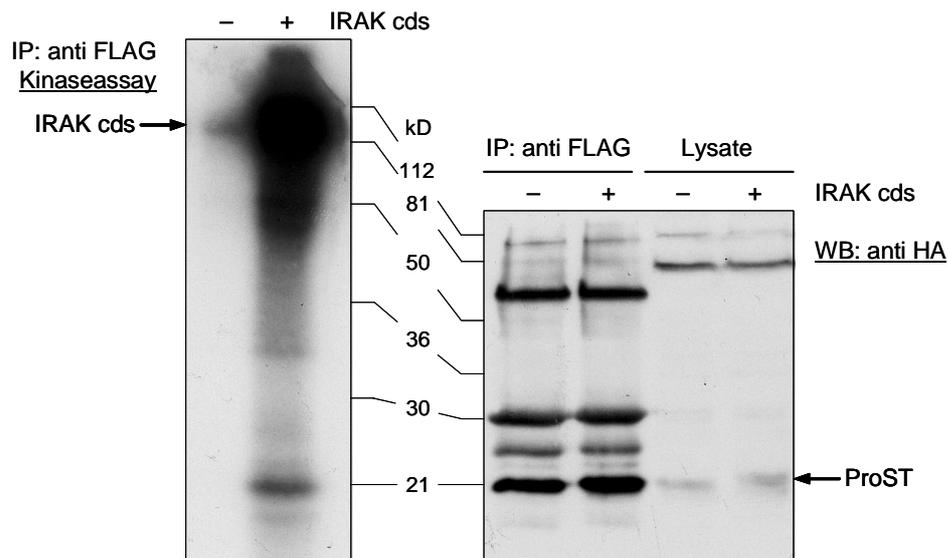


Abb. 8: Kinaseassay der rekombinanten ProST-Region. In zwei Ansätzen wurden je $4 \cdot 10^6$ HEK293 Zellen mit pF1-ProST-HA transfiziert. Nach 40 Stunden Expression wurden die Zellen lysiert und das Lysat eines Ansatzes mit dem Lysat IRAK cds exprimierender Zellen gemischt. Nach der Immunpräzipitation mit anti FLAG M2-Agarose wurden die Präzipitate beider Ansätze jeweils halbiert. Eine Hälfte wurde in einen *in vitro* Kinaseassay eingesetzt (links), während mit der anderen Hälfte im anti HA Westernblot die erfolgreiche Expression und Präzipitation der ProST-Region kontrolliert wurde (rechts). IRAK cds wurde im Westernblot nicht angefärbt, weil sie kein HA-tag trägt, ist jedoch im Autoradiogramm in autophosphorylierter Form bei ~120 kD deutlich erkennbar.

Ein weiterer experimenteller Ansatz sollte belegen, dass in der Todesdomäne keine Phosphorylierung stattfindet: Wildtyp IRAK-1 wurde nach Überexpression in HEK293 Zellen mit dem anti IRAK-1 Antikörper 2A9 präzipitiert und einem *in vitro* Kinaseassay unterzogen. Anschließend wurde die Kinetik einer Inkubation mit Carboxypeptidase-Y aufgenommen. Der fortschreitende C-terminale Abbau von IRAK-1 wurde in einer Autoradiographie und im anti FLAG Westernblot verfolgt (Abb. 9).

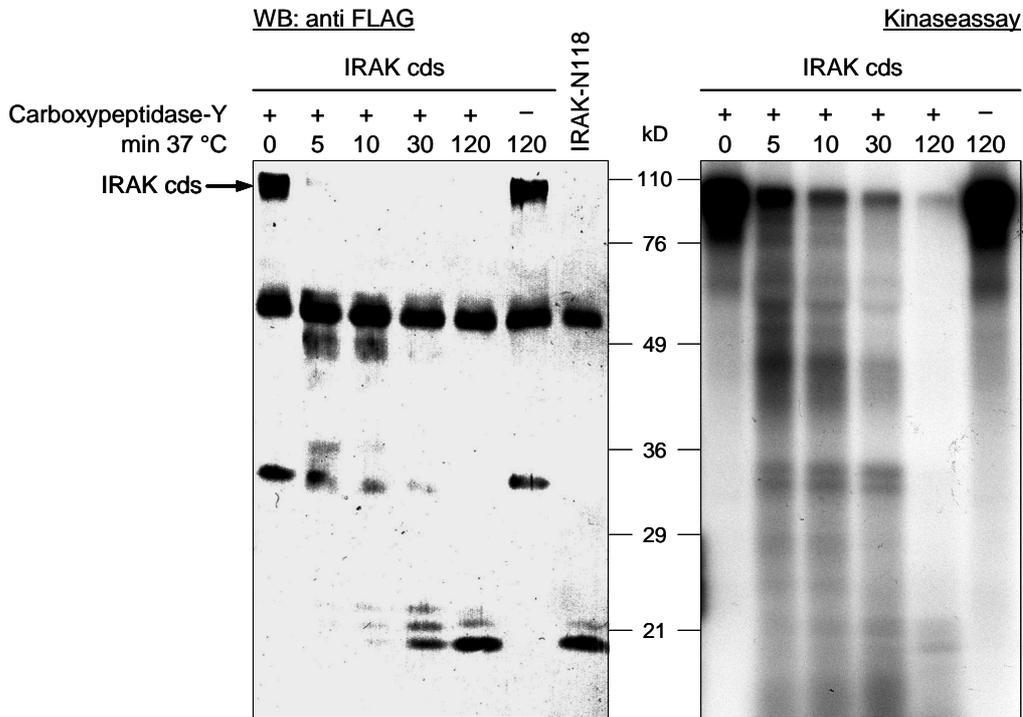


Abb. 9: Carboxypeptidase-Y Verdau von Wildtyp IRAK-1. Aus dem Lysat von $6 \cdot 10^6$ mit pFI-IRAK cds transfizierten HEK293 Zellen wurde die Kinase mit dem anti IRAK-1 Antikörper 2A9 immunpräzipitiert und einem *in vitro* Kinaseassay unterzogen. Die Sepharosebeads wurden danach mit p-Nitrophenylphosphat-haltigem PBS gewaschen, auf 6 Ansätze aufgeteilt und mit 2 μ g Carboxypeptidase-Y unterschiedlich lange bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Enzym mitgeführt. Die Proben wurden auf zwei Polyacrylamidgele aufgeteilt, wovon eins getrocknet und einer Autoradiographie unterzogen wurde (rechts), während das andere auf PVDF-Membran geblottet und mit anti FLAG bioM2 Antikörper angefärbt wurde (links). Zum Größenvergleich wurde für den Westernblot präzipitierte IRAK-N118 mit aufgetragen.

Schon nach fünf Minuten ist die vollständige IRAK-1 im Westernblot nicht mehr detektierbar. Nach einer halben Stunde akkumuliert ein Molekül, das in etwa das gleiche Molekulargewicht aufweist wie IRAK-N118. Es kann sich dabei nur um den N-Terminus von IRAK handeln, weil es ein FLAG-tag trägt. IRAK wird durch Carboxypeptidase-Y also soweit abgebaut, dass nur noch die Todesdomäne (evtl. mit einem Teil der ProST-Region) übrig bleibt. Das deutet auf eine relativ kompakte Struktur der Todesdomäne hin. In der Autoradiographie sieht man noch ein schwaches Phosphorylierungssignal dieses Moleküls.

Weil aus diesem Experiment nicht eindeutig klar wurde, ob das Molekül, das durch den Abbau mit Carboxypeptidase-Y entstanden ist, neben der Todesdomäne noch einen geringen Teil der ProST-Region enthält, wurde im nächsten Experiment getestet, ob IRAK-N118 oder IRAK-N139 durch Carboxypeptidase-Y noch weiter abgebaut werden. Dazu wurde jedes der beiden Moleküle mit IRAK cds in HEK293 Zellen coexprimiert und aus den Zelllysaten über anti FLAG M2-Agarose forciert copräzipitiert. Wie beim letzten Experiment wurden die Präzipitate in einen *in vitro* Kinaseassay eingesetzt und danach mit Carboxypeptidase-Y inkubiert. Autoradiographie und Westernblot sind in Abb. 10 dargestellt.

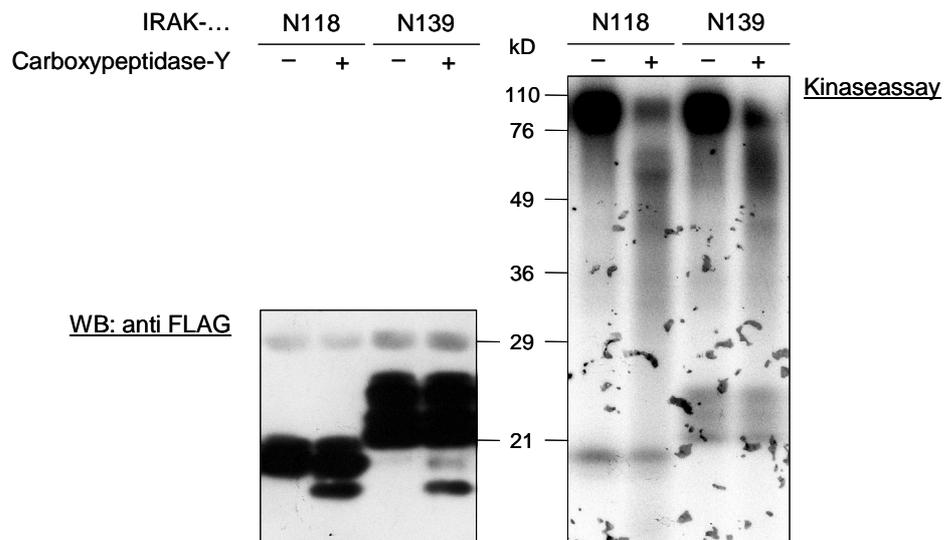


Abb. 10: Carboxypeptidase-Y Verdau von IRAK-N118 und -N139. Aus dem Lysat von $2 \cdot 10^6$ mit pFI-IRAK cds und IRAK-N118 bzw. IRAK-N139 cotransfizierten HEK293 Zellen wurden die IRAK-Moleküle mit anti FLAG M2-Agarose forciert coimmunpräzipitiert und einem *in vitro* Kinaseassay unterzogen. Die Agarosebeads wurden danach mit p-Nitrophenylphosphat-haltigem PBS gewaschen, auf 2 Ansätze aufgeteilt und ohne bzw. mit $10 \mu\text{g}$ Carboxypeptidase-Y 30 min bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden auf zwei Polyacrylamidgele aufgeteilt, wovon eins getrocknet und einer Autoradiographie unterzogen wurde (rechts), während das andere auf PVDF-Membran geblottet und mit anti FLAG bioM2 Antikörper angefärbt wurde (links).

Offenbar sind IRAK-N118 und IRAK-N139 beide sehr stabil gegenüber Carboxypeptidase-Y. Dennoch entsteht ein geringfügig kleineres Molekül, das in beiden Fällen gleich groß ist. Da es im anti FLAG Westernblot angefärbt wurde, trägt es das N-terminale FLAG-tag. Es muss sich folglich um die Todesdomäne handeln. Ob das Abbauprodukt aus den Deletionsmutanten hervorgegangen ist oder aus der Wildtyp Kinase, die ebenfalls im Präzipitat vorhanden ist, kann nicht unterschieden werden. Im Kinaseassay ist kein zusätzliches Molekül dieser Größe zu erkennen. Man kann also schlussfolgern, dass die Todesdomäne von IRAK-1 nicht phosphoryliert wird, sondern alle Phosphorylierungen, die zum Molekulargewichtsshift der Kinase führen, allein in der ProST-Region stattfinden.

3.1.3 Identifizierung einzelner Phosphorylierungsstellen in der ProST-Region

Nachdem die Phosphorylierungen, die zum Molekulargewichtsshift von IRAK-1 führen, der ProST-Region zugeordnet werden konnten, sollten die Zielsequenzen weiter eingegrenzt werden. Zu diesem Zweck wurde die Aminosäuresequenz der ProST-Region in sieben nicht überlappende Peptide zerlegt, die zusammen mit Wildtyp IRAK-1, kinaseinaktiver K239S oder NIK als Kontrollkinase in einen *in vitro* Kinaseassay eingesetzt wurden. K239S diente dabei als Negativ-, NIK als Spezifitätskontrolle. Die Peptide und rekombinanten Kinasen wurden freundlicherweise von Holger Wesche, Tularik, San Francisco, zur Verfügung gestellt. Die Trennung der Peptide von den Kinasen und nicht umgesetzttem Phosphat erfolgte in einem Tricin-Polyacrylamidgel (Abb. 11).

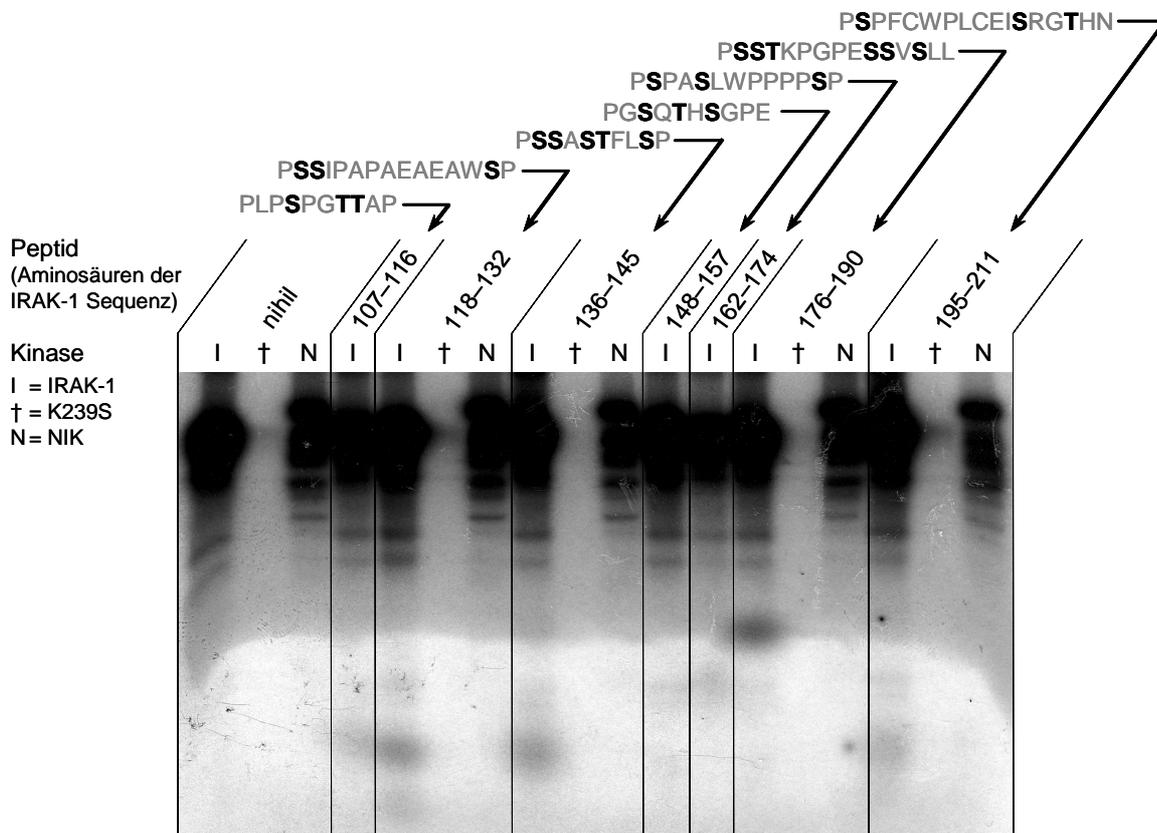


Abb. 11: Kinaseassay mit Peptiden aus der ProST-Region. 7 synthetische Peptide aus der ProST-Region wurden zusammen mit rekombinanter Wildtyp IRAK-1 (I), kinaseinaktiver K239S (†) oder NIK (N) in einen *in vitro* Kinaseassay eingesetzt. Nach der Auftrennung in einem Tricin-Polyacrylamidgel wurden die Moleküle durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Die Peptide 118–132, 136–145, 176–190 und 195–211 wurden durch IRAK-1, nicht aber durch NIK phosphoryliert. Das Peptid 162–174 zeigt nur ein sehr schwaches Phosphorylierungssignal.

Um Aussagen über die Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren der ProST-Region treffen zu können, wurden mit dem Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) zahlreiche Punktmutanten verschiedener IRAK-1 Deletionsmutanten

hergestellt. Dabei wurden Serin- oder Threoninreste zu Alanin ausgetauscht. Nach *in vitro* Kinaseassays wurden die Phosphorylierungsmuster der mutierten IRAK-Moleküle, in denen einzelne potentielle Phosphorylierungsstellen entfernt wurden, mit den Mustern der jeweiligen Deletionsmutanten ohne Punktmutation verglichen.

In einem ersten Experiment wurden neben IRAK-N118 in der Wildtypform die Einzelmutanten S110A, T113A und T114A sowie die Doppelmutante T113A T114A jeweils mit IRAK cds coexprimiert. Aus den Zellysaten wurden die IRAK-Moleküle über ihre jeweiligen FLAG-tags forciert copräzipitiert und dann in einen *in vitro* Kinaseassay eingesetzt. Abb. 12 zeigt, dass das Phosphorylierungsmuster von IRAK-N118 aus drei Banden besteht, von denen die obere deutlich intensiver ist als die anderen beiden. Durch den Austausch von T113 oder T114 nach Alanin nimmt die Intensität der oberen Bande ab. Nach der Doppelmutation ist diese Bande kaum mehr vorhanden. Die Mutation S110A hat dagegen keine Auswirkung auf das Phosphorylierungsmuster. Die schwache Intensität der beiden unteren Banden bleibt durch die Mutationen unbeeinflusst. Das Phosphorylierungsmuster, das nach der Doppelmutation übrig bleibt, entspricht dem der Deletionsmutante IRAK-N109, in der T113 und T114 nicht enthalten sind. Die Aminosäuren T113 und T114 werden folglich *in vitro* durch IRAK-1 beide phosphoryliert, im Gegensatz zu S110, das nicht phosphoryliert wird.

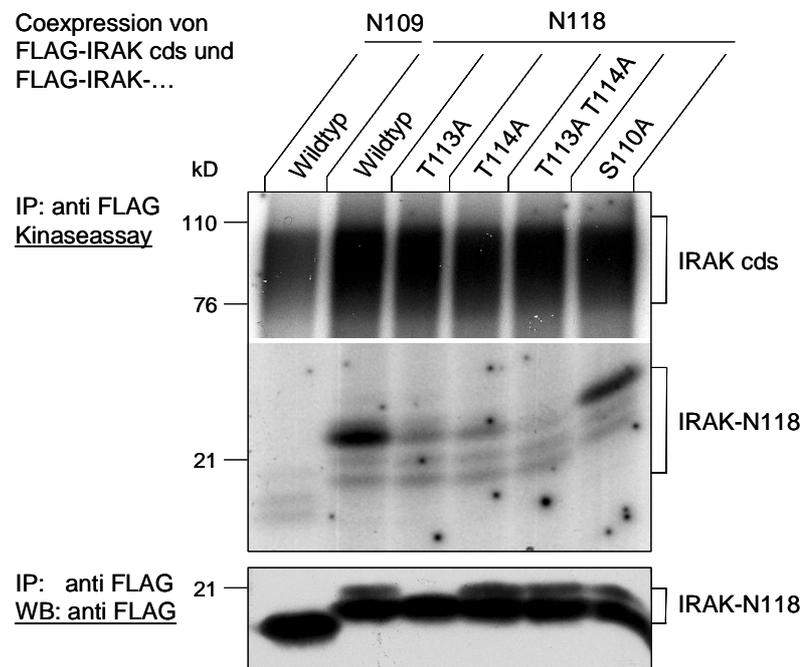


Abb. 12: Kinaseassay mit Punktmutanten von IRAK-N118. In $2 \cdot 10^6$ HEK293 Zellen je Ansatz wurden FLAG-getagte IRAK-N109 oder verschiedene Punktmutanten von IRAK-N118 mit FLAG-IRAK cds coexprimiert. Nach 40 Stunden wurden die Zellen lysiert und die IRAK-Moleküle mit anti FLAG M2-Agarose aus den Lysaten forciert copräzipitiert. Eine Hälfte der Präzipitate wurde in einen *in vitro* Kinaseassay eingesetzt (oben), während mit der anderen Hälfte im anti FLAG Westernblot die erfolgreiche Präzipitation der IRAK-Mutanten kontrolliert wurde (unten).

Da die Todesdomäne von IRAK-1 (IRAK-N109) in diesem Versuch eine schwache Phosphorylierung zeigte, die in vorherigen Experimenten nicht beobachtet worden war (vergl. Abb. P7), wurde anschließend überprüft, ob diese Phosphorylierung bestimmten Aminosäuren zugeordnet werden kann. Dazu wurden Punktmutanten der Todesdomäne in einen *in vitro* Kinaseassay eingesetzt, in denen alle Serin- und Threoninreste jeweils einzeln durch Alanin ersetzt worden waren. Zusätzlich kam eine Doppelmutante zum Einsatz. Alle diese Punktmutanten der Todesdomäne wurden von Detlef Neumann hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Alle Punktmutanten der Todesdomäne zeigen dasselbe Phosphorylierungsmuster (Abb. 13). Die schwache Phosphorylierung, die in der Todesdomäne von IRAK-1 stattfindet, kann also keinem der Serine oder Threonine zugeordnet werden. Es handelt sich um eine schwache, sequenzunspezifische Hintergrundphosphorylierung.

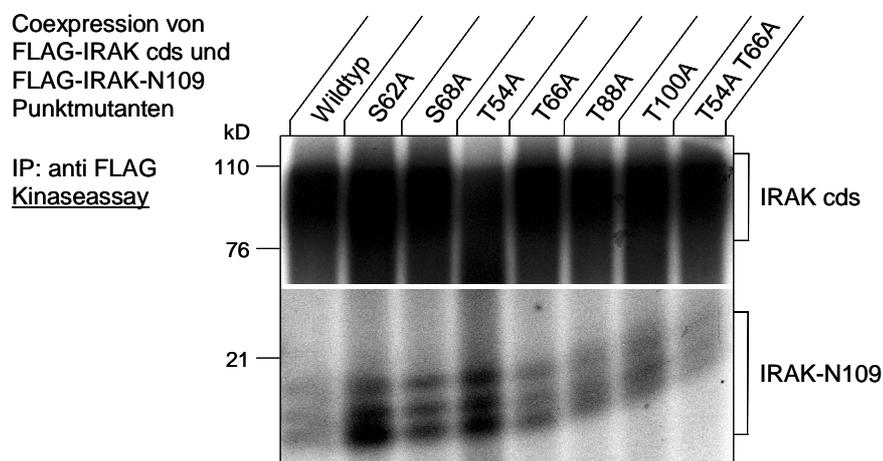


Abb. 13: Kinaseassay mit Punktmutanten von IRAK-N109. In $2 \cdot 10^6$ HEK293 Zellen je Ansatz wurden verschiedene FLAG-getagte Punktmutanten von IRAK-N109 mit FLAG-IRAK cds coexprimiert. Nach 40 Stunden wurden die Zellen lysiert. Die IRAK-Moleküle wurden mit anti FLAG M2-Agarose aus den Lysaten forciert copräzipitiert und in einen *in vitro* Kinaseassay eingesetzt. Die phosphorylierten Proteine wurden im Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Als nächstes wurden mit entsprechenden Punktmutanten von IRAK-N155 die Aminosäuren S119, S120, S131 und S144 auf ihre Phosphorylierung untersucht (Abb. 14). Der experimentelle Ansatz war dabei derselbe wie in den beiden vorangegangenen Experimenten. Diese Punktmutanten wurden von Anne Mackensen kloniert und zur Verfügung gestellt.

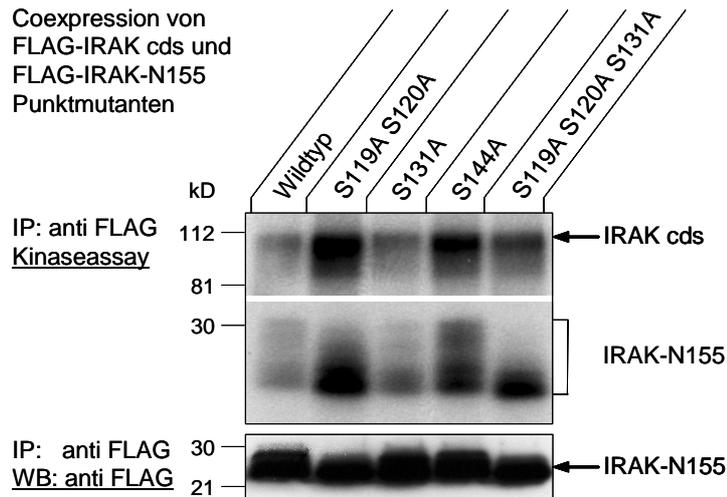


Abb. 14: Kinaseassay mit Punktmutanten von IRAK-N155. In $2 \cdot 10^6$ HEK293 Zellen je Ansatz wurden verschiedene FLAG-getagte Punktmutanten von IRAK-N155 jeweils mit FLAG-IRAK cds coexprimiert. Nach 40 Stunden wurden die Zellen lysiert und die IRAK-Moleküle mit anti FLAG M2-Agarose aus den Lysaten forciert copräzipitiert. Eine Hälfte der Präzipitate wurde in einen *in vitro* Kinaseassay eingesetzt (oben), während mit der anderen Hälfte im anti FLAG Westernblot die erfolgreiche Präzipitation der IRAK-Mutanten kontrolliert wurde (unten).

Trotz der gleichmäßigen Präzipitation der IRAK-N155 Mutanten wurde IRAK cds unterschiedlich gut präzipitiert, was sich in der unterschiedlichen Kinaseaktivität niederschlägt. Als Folge davon ist die Phosphorylierung der IRAK-N155 Moleküle nicht gleichmäßig. Dennoch lässt sich aussagen, dass durch die Einzelmutationen S131A oder S144A das Phosphorylierungsmuster nicht verändert wurde. Nach den Mehrfachmutationen S119A S120A bzw. S119A S120A S131A sind die oberen Banden deutlich schwächer im Vergleich zur untersten Bande. Die Dreifachmutante zeigt, verglichen mit der recht schwachen Aktivität von IRAK cds, eine sehr starke untere Bande, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass in diesem Fall alle phosphorylierten Moleküle in dieser Bande fokussiert sind und das Phosphorylierungssignal nicht auf mehrere Banden verteilt wurde. Insgesamt lässt sich aus diesem Experiment ableiten, dass die Aminosäuren S119 oder S120 oder beide durch IRAK cds *in vitro* phosphoryliert werden, S131 und S144 dagegen nicht.

Ein Sequenzmotiv fiel auf der Suche nach potentiellen Phosphorylierungsstellen besonders ins Auge: Mit den Aminosäuren S137, S138, S140 und T141 liegen vier phosphorylierbare Reste dicht beieinander, die zudem eine der beiden PEST-Sequenzen (Aminosäuren 117–133) flankieren. Der Einsatz von entsprechenden Punktmutanten des Moleküls IRAK-N155 sollte auch hier Klarheit schaffen, welche dieser Aminosäuren tatsächlich durch IRAK-1 phosphoryliert werden können. Der Kinaseassay wurde nach dem gleichen experimentellen Ansatz durchgeführt wie zuvor (Abb. 15).

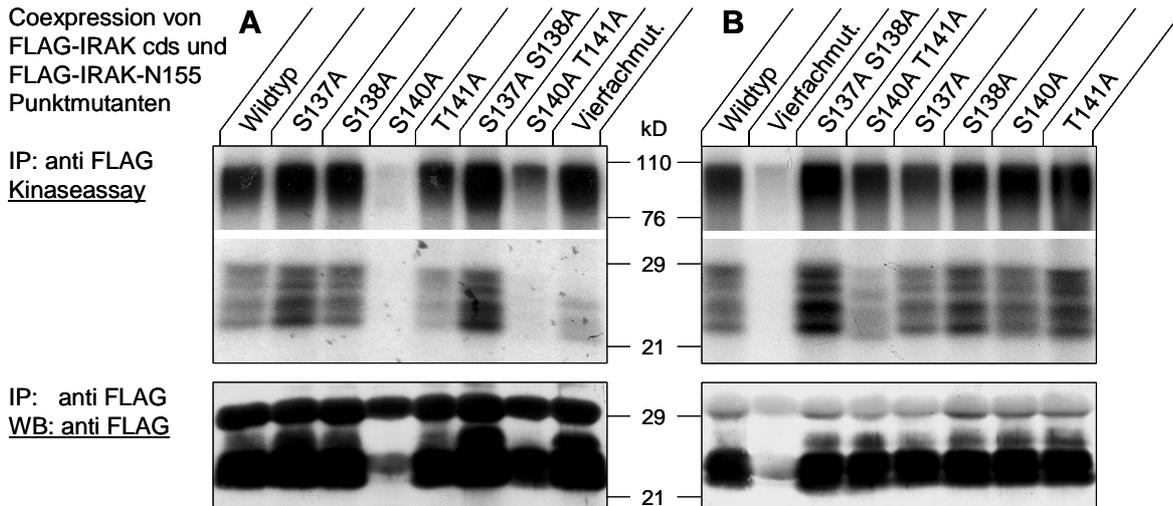


Abb. 15: Kinaseassay mit Punktmutanten von IRAK-N155. In $2 \cdot 10^6$ HEK293 Zellen je Ansatz wurden verschiedene FLAG-getagte Punktmutanten von IRAK-N155 mit FLAG-IRAK cds coexprimiert. Nach 40 Stunden wurden die Zellen lysiert und die IRAK-Moleküle mit anti FLAG M2-Agarose aus den Lysaten forciert copräzipitiert. Eine Hälfte der Präzipitate wurde in einen *in vitro* Kinaseassay eingesetzt (oben), während mit der anderen Hälfte im anti FLAG Westernblot die erfolgreiche Präzipitation der IRAK-Mutanten kontrolliert wurde (unten). Da im ersten Ansatz nicht alle Mutanten exprimiert bzw. aufgrund zu geringer IRAK cds Aktivität nicht phosphoryliert wurden (A), wurde das Experiment wiederholt (B).

Die Einzelmutanten sowie die Doppelmutante S137A S138A zeigen das gleiche Phosphorylierungsmuster wie IRAK-N155 Wildtyp. Eine Veränderung lässt sich bei der Doppelmutante S140A T141A beobachten, bei der sich das Bandenmuster zwar kaum verändert hat, aber zu kleinerem Molekulargewicht hin leicht verschoben ist. Durch Mutation aller vier Serin- und Threoninreste nach Alanin wurde die Bandenzahl reduziert. Man kann also festhalten, dass innerhalb des untersuchten Motivs durch IRAK-1 phosphoryliert wird und dass es sich dabei vermutlich um mehr als ein Phosphorylierungsereignis handelt. Gleichwohl ließen sich diesen Phosphorylierungen keine einzelnen Aminosäuren zuordnen. In IRAK-N155 sind neben den untersuchten Aminosäuren noch zahlreiche andere Phosphorylierungsstellen der ProST-Region enthalten, weshalb sich das Phosphorylierungsmuster durch eine einzelne Punktmutation nicht deutlich ändert. Aus diesem Grund konnte die bisher verfolgte Strategie zur Identifizierung durch IRAK-1 phosphorylierter Aminosäuren in der ProST-Region nicht auf die weiter C-terminal gelegenen Serin- und Threoninreste ausgedehnt werden.

3.1.4 Phosphoaminosäureanalyse von Punktmutanten

IRAK-1 ist eine Serin/Threonin spezifische Kinase [58, 60]. Das Ergebnis aus Abb. 12 legt nahe, dass IRAK-N118 nur an Threoninresten phosphoryliert wird. Um das zu überprüfen, wurde IRAK-N118 einer Phosphoaminosäureanalyse unterzogen. Die Deletionsmutante wurde dazu mit IRAK cds in HEK293 Zellen coexprimiert und aus dem Zelllysate über die jeweiligen FLAG-Epitoptags forciert copräzipitiert. Nachdem IRAK-N118 im *in vitro* Kinaseassay radioaktiv phosphoryliert worden ist, wurde das Molekül im Polyacrylamidgel von IRAK cds getrennt und aus dem Gel ausgeschnitten. Nach der folgenden salzsauren

Hydrolyse wurde das resultierende Aminosäuregemisch in einer zweidimensionalen Hochspannungs-Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die radioaktiven Aminosäuren wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und konnten über zusätzlich aufgetragene Aminosäurestandards, die mit Ninhydrin angefärbt wurden, identifiziert werden.

Aus Abb. 16 geht hervor, dass IRAK-N118 nicht nur an Threonin-, sondern auch an Serinresten phosphoryliert wird, wenngleich dieses Signal etwas schwächer ist. Da S110 nach dem Kinaseassay mit Punktmutanten von IRAK-N118 hierfür nicht in Frage kommt (s. Abb. 12), muss es sich um die in Abb. P14 beschriebene Hintergrundphosphorylierung der Todesdomäne handeln.

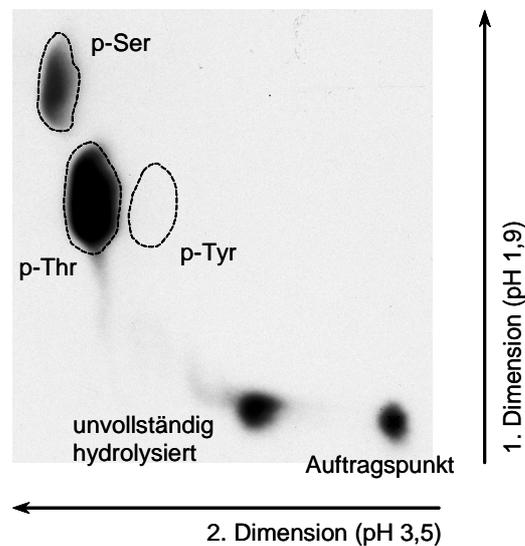


Abb. 16: Phosphoaminosäureanalyse von IRAK-N118. $2 \cdot 10^6$ HEK293 Zellen wurden mit pFI-IRAK-N118 und pFI-IRAK cds cotransfiziert. Nach 40 Stunden Expression wurden die Zellen lysiert und die IRAK-Moleküle mit anti FLAG M2-Agarose aus den Lysaten forciert copräzipitiert. Nach der radioaktiven Phosphorylierung im *in vitro* Kinaseassay wurde die Deletionsmutante im Polyacrylamidgel von IRAK cds getrennt und ausgeschnitten. Durch zweistündige Inkubation mit 6 N HCl bei 110 °C wurde IRAK-N118 hydrolysiert und aus dem Gelstückchen eluiert. Die Salzsäure wurde abgedampft und das Hydrolysat auf eine Cellulose-Dünnschichtkarte aufgetragen, auf der die einzelnen Aminosäuren in einer zweidimensionalen Hochspannungs-Elektrophorese aufgetrennt wurden. Die radioaktiven Aminosäuren wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und über Phosphoserin-, Phosphothreonin- und Phosphotyrosin-Standards, die mit aufgetragen und mit Ninhydrin angefärbt wurden, identifiziert. Die Standards wurden mit gestrichelten Linien eingezeichnet.

Die phosphorylierten IRAK-1 Deletionsmutanten IRAK-N109 und IRAK-N118 trennen sich nach *in vitro* Kinaseassay bei genügend langer Laufstrecke des Geles in jeweils drei Banden auf (s. Abb. 12). Bei IRAK-N118 ist die oberste Bande zumindest zum Teil auf die Phosphorylierung von Threonin 113 und 114 zurückzuführen. Die drei Banden von IRAK-N118 und die unteren beiden Banden von IRAK-N109 wurden nach einem *in vitro* Kinaseassay einzeln ausgeschnitten und getrennt in eine Phosphoaminosäureanalyse eingesetzt (Abb. 17). Da eine Tyrosin-Phosphorylierung aufgrund der Literatur und des vorangegangenen Experimentes ausgeschlossen werden konnte, wurde auf die zweite

Dimension der Dünnschichtchromatographie, in der Phosphothreonin von Phosphoserin getrennt wird, verzichtet.

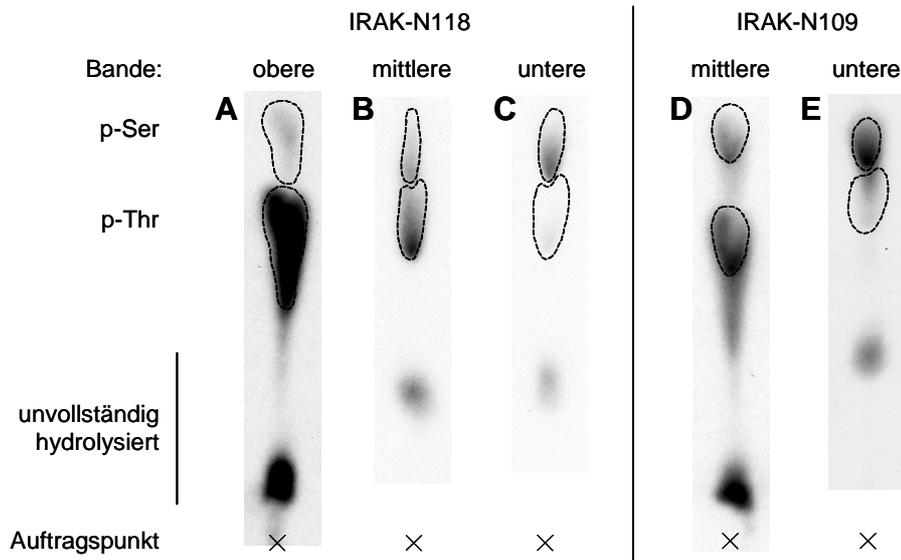


Abb. 17: Phosphoaminosäureanalyse einzelner Banden von IRAK-N109 und IRAK-N118. Je $2 \cdot 10^6$ HEK293 Zellen wurden mit pFI-IRAK-N109 oder pFI-IRAK-N118 und pFI-IRAK cds cotransfiziert. Nach 40 Stunden Expression wurden die Zellen lysiert und die IRAK-Moleküle mit anti FLAG M2-Agarose aus den Lysaten forciert copräzipitiert. Nach der radioaktiven Phosphorylierung im *in vitro* Kinaseassay wurden die Deletionsmutanten im Polyacrylamidgel von IRAK cds getrennt und die einzelnen Banden getrennt ausgeschnitten. Durch zweistündige Inkubation mit 6 N HCl bei 110 °C wurden die Moleküle hydrolysiert und aus den Gelstückchen eluiert. Die Salzsäure wurde abgedampft und das Hydrolysat auf eine Cellulose-Dünnschichtkarte aufgetragen, auf der die einzelnen Aminosäuren in einer eindimensionalen Hochspannungs-Elektrophorese aufgetrennt wurden. Die radioaktiven Aminosäuren wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und über Phosphoserin- und Phosphothreonin-Standards, die mit aufgetragen und mit Ninhydrin angefärbt wurden, identifiziert. Die Standards wurden mit gestrichelten Linien eingezeichnet. Die Teilabbildungen A und D einerseits sowie B, C und E andererseits stammen von zwei verschiedenen Dünnschichtkarten.

Die obere Bande von IRAK-N118 weist ein sehr starkes Signal für Phosphothreonin auf und ein deutlich schwächeres für Phosphoserin (Abb. 17, A). In der mittleren Bande sind Phosphoserin und Phosphothreonin in etwa gleich schwach vertreten (Abb. 17, B), während die untere Bande schließlich nur noch Phosphoserin enthält (Abb. 17, C). Die mittlere und untere Bande von IRAK-N109 (Abb. 17, D und E) weisen die gleiche Phosphoaminosäurezusammensetzung auf wie die entsprechenden Banden von IRAK-N118. Dieses Experiment zeigt, dass die Auftrennung der IRAK-1 Deletionsmutanten in verschiedene Banden auf den Grad ihrer Phosphorylierung zurückzuführen ist. Zusätzlich wird die Schlussfolgerung aus Abb. 12 unterstützt, dass die IRAK-N118 Moleküle, die an Threonin 113 oder 114 phosphoryliert worden sind, in der oberen Bande zu finden sind. Schließlich geht aus diesem Experiment hervor, dass die in Abb. 13 beschriebene Hintergrundphosphorylierung der Todesdomäne von IRAK-1 sowohl an Serin- als auch an Threoninresten erfolgt.

3.1.5 Dephosphorylierung von IRAK-1

Wenn das Bandenmuster von IRAK-1 aufgrund unterschiedlicher Phosphorylierungsgrade des Moleküls entsteht, sollte es möglich sein, die Bandenzahl durch Dephosphorylierung zu reduzieren. Zu diesem Zweck wurde die C-terminale Deletionsmutante IRAK-N139, die einen deutlichen Shift aufweist (vergl. Abb. 6), nach Expression in HEK293 Zellen immunpräzipitiert und für zwei Stunden mit verschiedenen Phosphatasen in geeigneten Puffern inkubiert (Abb. 18).

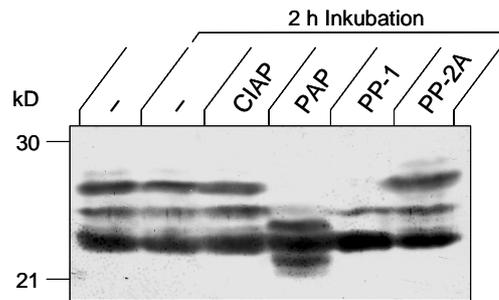


Abb. 18: Dephosphorylierung von IRAK-N139. IRAK-N139 wurde in $2 \cdot 10^6$ HEK293 Zellen exprimiert und mit anti FLAG M2-Agarose aus dem Lysat immunpräzipitiert. Das Präzipitat wurde für zwei Stunden ohne bzw. mit vier verschiedenen Phosphatasen in geeigneten Puffern (s. u.) inkubiert. Nach Auftrennung im Polyacrylamidgel und Westernblot wurde IRAK-N139 mit anti FLAG bioM2 Antikörper angefärbt.

ohne Phosphatase:	37 °C in 50 mM Tris-HCl, pH 7,0
CIAP (Alkalische Phosphatase aus Kalbsdarm):	37 °C in 100 mM Tris-HCl, pH 7,5
PAP (Saure Phosphatase aus Kartoffeln):	37 °C in 40 mM Citrat-HCl, pH 4,8
PP-1 (Proteinphosphatase-1):	30 °C in 50 mM Tris-HCl, pH 7,0
PP-2A (Proteinphosphatase-2A):	30 °C in 50 mM Tris-HCl, pH 8,5

Weitere Pufferbestandteile sind in Kap. 2.9.4 und 2.2 angegeben.

Weder durch Alkalische Phosphatase aus Kalbsdarm noch durch Proteinphosphatase-2A wurde das Bandenmuster von IRAK-N139 verändert. Durch Saure Phosphatase aus Kartoffeln und Proteinphosphatase-1 dagegen wurde die Deletionsmutante teilweise dephosphoryliert. In beiden Fällen ist die oberste Bande verschwunden, durch Inkubation mit Saurer Phosphatase sind zwei neue, kleinere Banden entstanden. Die vollständige Reduktion des Musters auf eine Bande wurde nicht erreicht.

Wie sich das Bandenmuster von Wildtyp IRAK-1 unter dephosphorylierenden Bedingungen verändert, ist im folgenden Experiment untersucht worden. IRAK cds wurde in HEK293 Zellen überexprimiert. Die Zellyse fand zum Teil mit dem für gewöhnlich benutzten IP-Puffer statt, der bereits Phosphatase- und Proteaseinhibitoren enthält und dem zur Inhibition von Ubiquitin abspaltenden Isopeptidasen Iodoacetamid zugesetzt wurde. Ein anderer Teil der Zellen wurde im Reaktionspuffer für Proteinphosphatase-1, der mit Iodoacetamid und Proteaseinhibitoren ergänzt wurde, resuspendiert und mit Ultraschall lysiert. Dieses Lysat wurde nach Entfernung von DNA entweder sofort bei -80 °C eingefroren oder ohne bzw. mit Proteinphosphatase-1 für zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Der Westernblot dieser unterschiedlich behandelten Zellysate ist in Abb. 19 dargestellt.

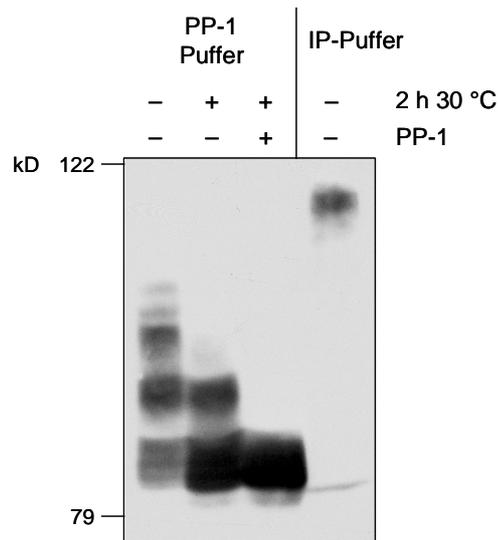


Abb. 19: Dephosphorylierung von IRAK cds. Mit pFl-IRAK cds transfizierte HEK293 Zellen wurden entweder in IP-Puffer + 10 mM Iodoacetamid lysiert oder mit Ultraschall in Reaktionspuffer für Proteinphosphatase-1, dem 10 mM Iodoacetamid und Proteaseinhibitoren zugesetzt wurden. Letzteres Lysat wurde nach Abtrennen der DNA entweder sofort eingefroren oder für 2 Stunden ohne bzw. mit 2,5 U Proteinphosphatase-1 (PP-1) bei 30 °C inkubiert. Die Lysate wurden dann im 7,5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblotet und mit anti IRAK Antikörper 2A9 angefärbt.

Allein durch die Verwendung des für Proteinphosphatase-1 optimierten Puffers ändert sich das Bandenmuster von IRAK-1 deutlich: Es entsteht eine Leiter von Banden mit apparent geringerem Molekulargewicht. Die Inkubation bei 30 °C begünstigt diesen Prozess noch weiter, so dass die oberen Banden verschwinden und die Intensität der untersten Bande zunimmt. Die Zugabe von Proteinphosphatase-1 führt schließlich dazu, dass die gesamte IRAK-1 in der untersten Bande vorliegt. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass der Molekulargewichtsshift, den IRAK-1 bei Aktivierung durchläuft, vollständig auf die Einführung von Phosphatresten zurückgeführt werden kann.

3.2 Ubiquitylierung von IRAK-1

Wie oben gezeigt, ist der Molekulargewichtsshift von IRAK-1 auf Phosphorylierung in der ProST-Region zurückzuführen. In der ProST-Region wurden aber auch zwei PEST-Sequenzen identifiziert, die ein Signal für die Ubiquitylierung und folgende Degradation eines Proteins darstellen können [105]. Zudem wurde in der Literatur über die Ubiquitylierung von IRAK-1 berichtet, die allerdings nicht bewiesen wurde [68, 93]. Aus diesem Grund sollte der Nachweis geführt werden, dass IRAK-1 ubiquityliert wird. Ubiquitin und IRAK cds wurden dazu in HEK293 Zellen coexprimiert. Nach der Immunpräzipitation von IRAK-1 wurde das Präzipitat in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Westernblot mit einem anti Ubiquitin Serum angefärbt. Sollte IRAK-1 ubiquityliert werden, müsste sie im anti Ubiquitin Westernblot ein Signal liefern. Abb. 20 zeigt, dass IRAK-1 zwar präzipitiert wurde, eine Ubiquitylierung aber nicht nachgewiesen werden konnte.

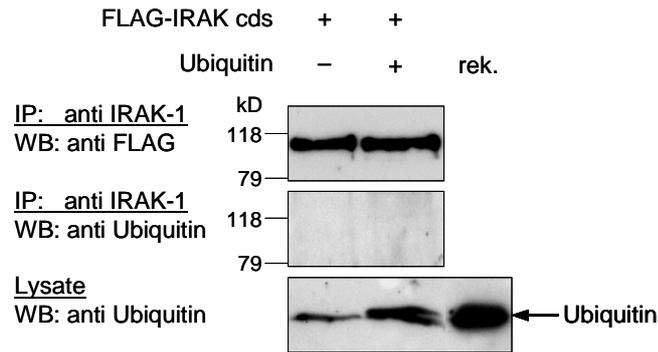


Abb. 20: Anti Ubiquitin Westernblot von IRAK cds. FLAG-getagte IRAK cds wurde entweder alleine oder zusammen mit Ubiquitin in $2 \cdot 10^6$ HEK293 Zellen pro Ansatz 40 Stunden lang exprimiert. Nach der Zellyse wurde die Kinase mit dem anti IRAK-1 Antikörper 2A9 immunpräzipitiert. Das Präzipitat wurde auf zwei Polyacrylamidgele aufgeteilt und nach dem Transfer auf PVDF-Membranen mit anti FLAG bioM2 Antikörper (oben) oder anti Ubiquitin Serum (Mitte) angefärbt. Der anti Ubiquitin Westernblot der Zellysate (unten) zeigt die Expression von Ubiquitin. Zur Kontrolle wurde rekombinantes bovines Ubiquitin mit aufgetragen (rek.).

Da diesem Experiment eine gute Positivkontrolle in Form eines ubiquitinylierten Proteins fehlt, hat sich Hans-Jörg Schild am Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen freundlicherweise bereit erklärt, von mir präzipitierte IRAK-1 mit den in seiner Arbeitsgruppe zur Verfügung stehenden Reagenzien und Kontrollen auf Ubiquitinylierung zu untersuchen. Sein Mitarbeiter Niels Emmerich hat das Experiment dort durchgeführt und versichert, es bestehe kein Zweifel daran, dass IRAK-1 nicht ubiquitinyliert werde.

3.3 Konsequenzen der Phosphorylierung in der ProST-Region

3.3.1 Stabilität von IRAK-1

Es gibt zahlreiche Beispiele, in denen die Stabilität von Proteinen durch Phosphorylierung kontrolliert wird. So könnte z. B. das Anhängen eines Phosphates an einen Serin- oder Threoninrest ein PEST-Signal aktivieren und damit die Degradation eines Protein auslösen [105]. Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierungen in der ProST-Region einen Einfluss auf den Abbau von IRAK-1 haben, sollte die Stabilität von IRAK cds, K239S cds und IRAK- Δ ProST nach Stimulation mit IL-1 verglichen werden.

HEK293RI Zellen, die stabil mit dem Typ I IL-1 Rezeptor transfiziert sind und dadurch auf IL-1 reagieren, wurden mit Plasmiden für die drei zu untersuchenden IRAK-Moleküle transfiziert. Nach 40 Stunden wurde eine Hälfte der Zellen unstimuliert gelassen, die andere Hälfte für zwei Stunden mit 1 ng/ml IL-1 β stimuliert. Dann wurden die Zellen wie gewohnt lysiert und die IRAK-Moleküle aus den Lysaten immunpräzipitiert. Im Westernblot wurde schließlich die Menge an präzipitiertem Protein analysiert (Abb. 21).

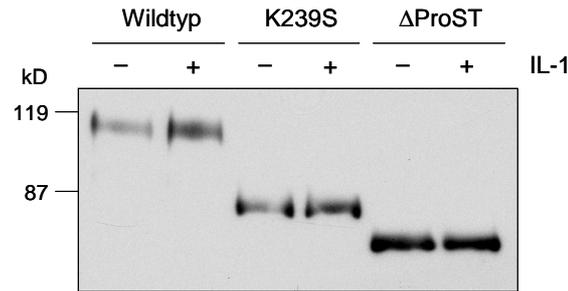


Abb. 21: Westernblot von IRAK cds, K239S cds und IRAK-ΔProST nach IL-1 Stimulation. FLAG-getagte IRAK cds, K239S cds oder IRAK-ΔProST wurden in $2 \cdot 10^6$ HEK293RI Zellen pro Ansatz exprimiert. 40 h später wurden die Zellen entweder unstimuliert gelassen (-) oder 2 h mit 1 ng/ml IL-1 β stimuliert (+). Nach der Zelllyse wurden die Moleküle mit dem anti IRAK-1 Antikörper 2A9 immunpräzipitiert und die Proteinmenge im anti FLAG Westernblot analysiert.

Bei keinem der drei IRAK-Moleküle konnte nach IL-1 Stimulation eine Abnahme der Proteinmenge beobachtet werden. Aufgrund der Überexpression liegt die Wildtyp Kinase auch ohne IL-1 Stimulation schon in vollständig geshifteter, also aktivierter Form vor. Auf diesem Hintergrund ist es nicht gelungen, durch IL-1 Zugabe ein zusätzliches Signal für die Proteolyse zu setzen.

In untransfizierten Zellen ist so wenig IRAK-1 vorhanden, dass sie im Westernblot nicht nachweisbar ist. Nach Überexpression befindet sich so viel IRAK-1 in der Zelle, dass sie bereits konstitutiv aktiviert vorliegt. Kann man nun durch Transfektion möglichst geringer Plasmidmengen eine Situation erzeugen, in der IRAK-1 zwar im Westernblot nachweisbar, jedoch nicht aktiviert ist? Um das herauszufinden, wurden HEK293RI Zellen mit unterschiedlichen Mengen an pFL-IRAK cds transfiziert und 40 Stunden später entweder unstimuliert gelassen oder mit IL-1 β stimuliert. Zelllysate und anti IRAK Immunpräzipitate wurden im Westernblot auf die Proteinmenge und das apparente Molekulargewicht von IRAK-1 untersucht (Abb. 22).

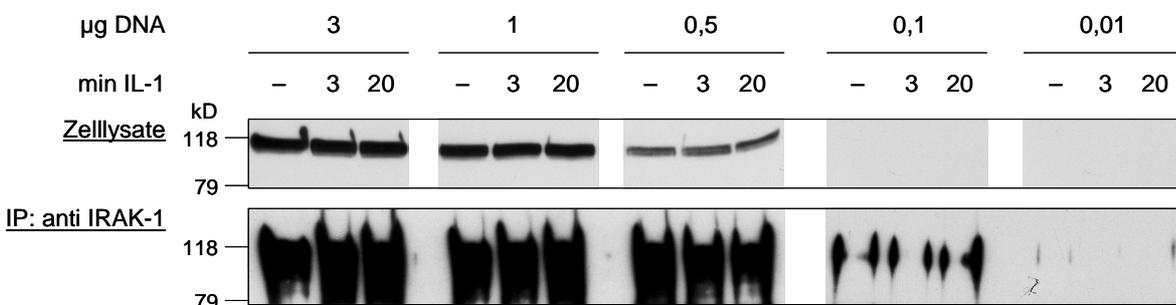


Abb. 22: Westernblot von IRAK cds nach IL-1 Stimulation. $2 \cdot 10^6$ HEK293RI Zellen pro Ansatz wurden mit 0,01, 0,1, 0,5, 1 oder 3 μg pFL-IRAK cds transfiziert. 40 h später wurden die Zellen entweder unstimuliert gelassen oder für 3 bzw. 20 Minuten mit 1 ng/ml IL-1 β stimuliert. Nach der Zelllyse wurden die Moleküle mit dem anti IRAK-1 Antikörper 2A9 immunpräzipitiert. Zelllysate (oben) und Immunpräzipitate (unten) wurden geblottet und mit dem anti IRAK-1 Antikörper 2A9 angefärbt.

Bei der Transfektion von 0,01 oder 0,1 µg Plasmid-DNA konnte IRAK-1 nicht mehr im Zelllysate, sondern nur noch nach Immunpräzipitation nachgewiesen werden. In allen Ansätzen liegt IRAK-1 – soweit nachweisbar – bereits in phosphorylierter Form vor. Die Stimulation mit IL-1 hat wie auch im Experiment zuvor keine Veränderung des IRAK-1 Bandenmusters hervorgerufen.

Somit bestand leider keine Möglichkeit, die Stabilität von IRAK-1 zu messen, und die Frage, ob die Phosphorylierung in der ProST-Region einen Einfluss auf die Proteinstabilität hat, blieb unbeantwortet.

3.3.2 Bedeutung der Phosphorylierung für die Signaltransduktion

Bei Überexpression verstärkt Wildtyp IRAK-1 die IL-1 stimulierte NFκB-Aktivität. Bei EL-4 6.1 Zellen äußert sich das u. a. in einer vermehrten Freisetzung von Interleukin-2. Die Phosphorylierung in der ProST-Region scheint an diesem Verhalten nichts zu ändern, da auch die Überexpression der kinaseinaktiven K239S zum gleichen Resultat führt [67, 75].

Das folgende Experiment sollte zeigen, ob IRAK-1 auch nach vollständiger Deletion der ProST-Region noch in der Lage ist, an der IL-1 Signaltransduktion positiv mitzuwirken. EL-4 6.1 Zellen wurden mit dem NFκB Reporterkonstrukt 5×NFκB-luc und steigenden Mengen an pFI-IRAK-ΔProST transfiziert. Die Zellen wurden dann mit IL-1β oder TNFα als Kontrolle stimuliert. 20 Stunden später wurde in cytosolischen Extrakten die NFκB abhängige Luciferaseexpression gemessen (Abb. 23, A). In einem zweiten Experiment wurden die Zellen nach der Transfektion mit IL-1β und dem Calciumionophor A23187 stimuliert. Nach 20 Stunden wurde dann in den Zellkulturüberständen mittels ELISA die Menge an freigesetztem Interleukin-2 bestimmt (Abb. 23, B). Zur Kontrolle wurde in beiden Experimenten Wildtyp IRAK-1 mitgeführt.

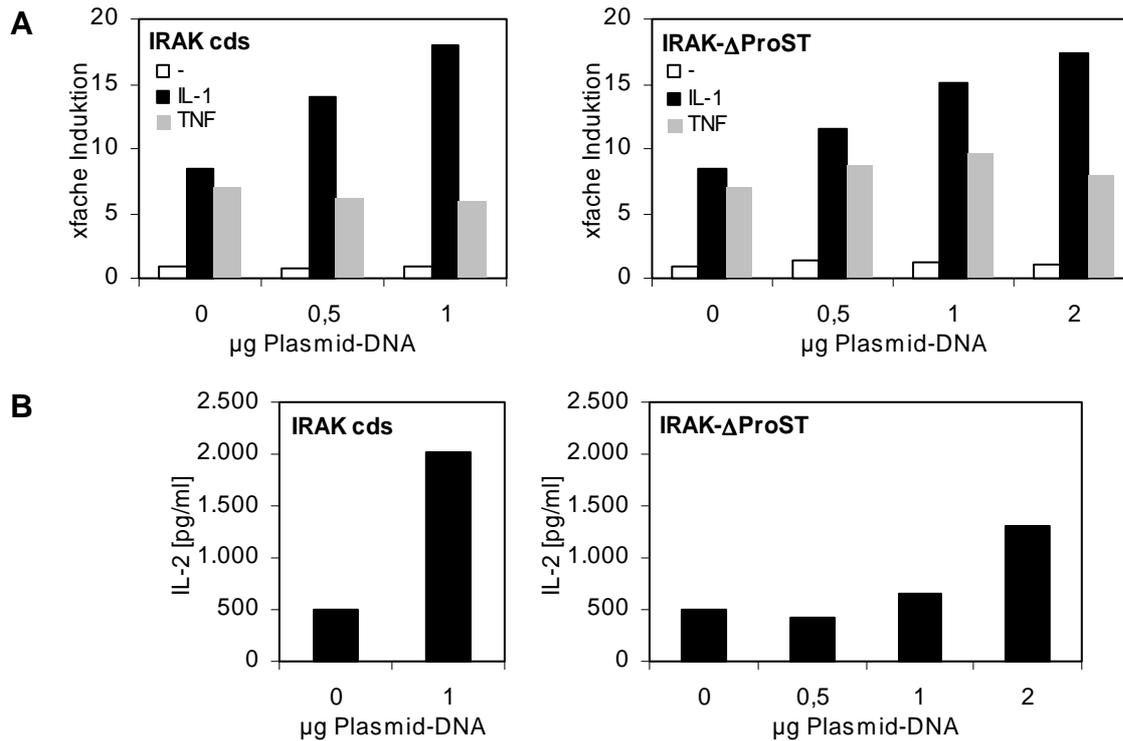


Abb. 23: Einfluß von IRAK-ΔProST auf die IL-1 Signaltransduktion. $5 \cdot 10^6$ EL-4 6.1 Zellen pro Ansatz wurden mit $0,5 \mu\text{g}$ $5 \times \text{NF}\kappa\text{B-luc}$ und steigenden Mengen pFI-IRAK-ΔProST cotransfiziert. (A) 4 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit 10 ng/ml IL-1 β oder 100 ng/ml TNF α stimuliert bzw. unstimuliert gelassen. Nach weiteren 20 Stunden wurden aus den Zellen cytosolische Extrakte hergestellt, in denen die NF κB abhängige Luciferaseexpression gemessen wurde. Die Luciferaseaktivität wurde auf die jeweilige Proteinkonzentration normiert und zur unstimulierten Leervektorkontrolle in Beziehung gesetzt. Die Kontrolle nur mit Reporter gen transfizierter Zellen ist in beiden Teilabbildungen dieselbe. (B) 4 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit 10 ng/ml IL-1 β und $2,5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ A23187 stimuliert. Nach weiteren 20 Stunden wurde im ELISA die in die Zellkulturüberstände freigesetzte Menge an IL-2 bestimmt.

Sowohl im NF κB Reporter gen assay als auch im IL-2 Bioassay verhält sich IRAK-ΔProST qualitativ genauso wie Wildtyp IRAK-1 und K239S, d. h. die ProST-Region, und damit auch die Phosphorylierung in diesem Bereich, ist für die Weiterleitung des IL-1 Signals entbehrlich.

3.3.3 Wechselwirkung mit MyD88 und TRAF6

Wildtyp IRAK-1 und K239S verhalten sich zwar gleich in Bezug auf die Aktivierung von NF κB , sie unterscheiden sich jedoch in der Stabilität der Wechselwirkung mit den Adaptern MyD88 und TRAF6, die in der Signaltransduktionskaskade direkt ober- bzw. unterhalb von IRAK-1 zu finden sind. Die Interaktion von IRAK cds und K239S mit TRAF6 ist so stabil, dass die jeweiligen Proteinkomplexe präzipitiert werden können. Die Copräzipitation von MyD88 gelingt nur mit der kinaseinaktiven Mutante K239S, woraus abgeleitet werden kann, dass die Wechselwirkung von IRAK-1 und MyD88 durch die mehrfache Phosphorylierung von IRAK-1 unterbunden wird [67].

Ob sich die Deletionsmutante IRAK- Δ ProST in Bezug auf die Wechselwirkung mit MyD88 und TRAF6 genauso verhält wie K239S, wurde in einem Coimmunpräzitations-experiment überprüft, bei dem die bereits untersuchten Moleküle IRAK cds und K239S cds als Kontrollen mitgeführt wurden (Abb. 24).

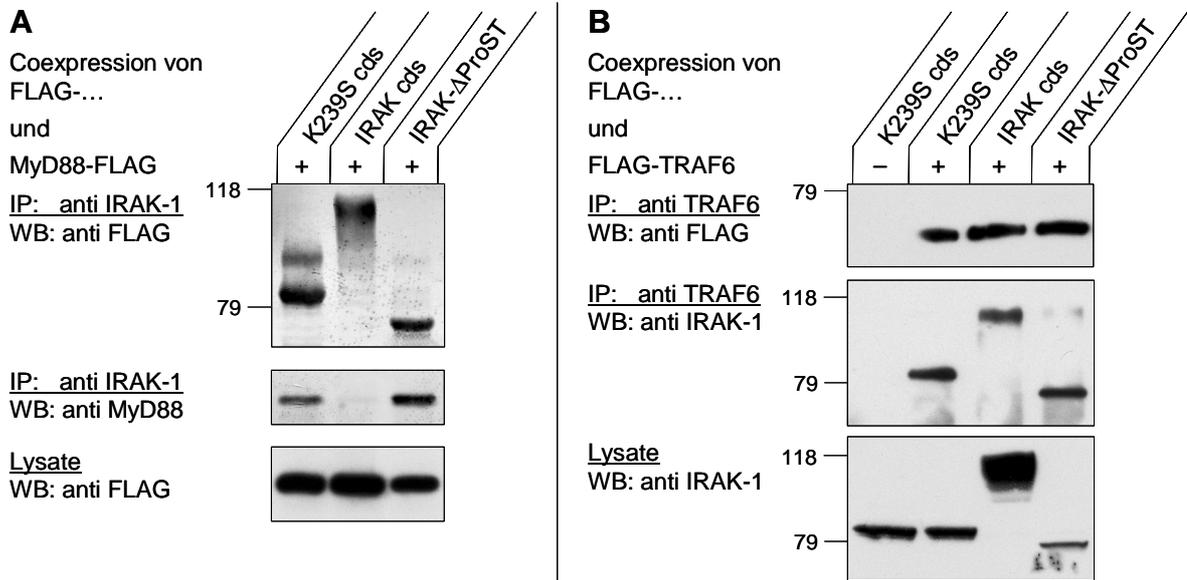


Abb. 24: Coimmunpräzitation von IRAK- Δ ProST mit MyD88 und TRAF6. (A) FLAG-getagte IRAK cds, K239S cds oder IRAK- Δ ProST wurden mit MyD88-FLAG in HEK293 Zellen 40 Stunden coexprimiert. Nach der Zellyse wurden die IRAK-Moleküle mit anti IRAK-1 Antikörper 2A9 und Protein G-Sepharose präzipitiert. Im anti FLAG Westernblot der Immunpräzipitate (oben) wurde die Präzipitation der IRAK-Moleküle überprüft. Die Existenz von MyD88 im Immunpräzipitat wurde durch eine Färbung desselben Blots mit anti MyD88 Serum nachgewiesen (Mitte). Der anti FLAG Westernblot der Zellysate (unten) belegt die gleichmäßige Expression von MyD88. (B) FLAG-getagte IRAK cds, K239S cds oder IRAK- Δ ProST wurden mit FLAG-TRAF6 in HEK293 Zellen 40 Stunden coexprimiert. Nach der Zellyse wurde TRAF6 mit anti TRAF6 Serum und Protein G-Sepharose präzipitiert. Im anti FLAG Westernblot der Immunpräzipitate (oben) wurde die Präzipitation von TRAF6 überprüft. Die Existenz der IRAK-Moleküle im Immunpräzipitat wurde durch eine Färbung desselben Blots mit dem anti IRAK-1 Antikörper 2A9 nachgewiesen (Mitte). Der anti IRAK-1 (2A9) Westernblot der Zellysate (unten) belegt die Expression der IRAK-Moleküle.

Die Wechselwirkung von IRAK- Δ ProST sowohl mit MyD88 als auch mit TRAF6 ist so stabil, dass sie durch Coimmunpräzitation demonstriert werden konnte. Das bedeutet, dass die ProST-Region von IRAK-1 für die Wechselwirkung mit den beiden Adaptern strukturell nicht erforderlich ist. Somit verhält sich IRAK- Δ ProST in Bezug auf die Interaktion mit MyD88 und TRAF6 wie die kinaseinaktive IRAK-1 Mutante K239S.

3.4 Tollip im Toll/IL-1R Signalweg

3.4.1 Wechselwirkung von IRAK und Tollip

Tollip ist ein Molekül aus dem IL-1 Signaltransduktionsweg, das kürzlich beschrieben wurde als Adapter, der IRAK-1 an den aktivierten IL-1 Rezeptorkomplex rekrutiert und somit die Wechselwirkung von IRAK-1 mit MyD88 ermöglicht, die schließlich zur Autophosphorylierung und Aktivierung von IRAK-1 führt [70]. Die Wechselwirkung von Tollip mit IRAK-1 und insbesondere die Beeinflussung der Wechselwirkung durch Phosphorylierung in der ProST-Region sollten in dieser Arbeit genauer untersucht werden.

Zur Kartierung, welche Bereiche der IRAK-1 für eine Wechselwirkung mit Tollip notwendig sind, wurden Coimmunpräzipitationen durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Deletions- und Punktmutanten von humaner IRAK-1 mit humanem Tollip coexprimiert. Nach Immunpräzipitation der IRAK-Moleküle aus dem Zellysate wurde im Westernblot untersucht, ob Tollip als Wechselwirkungspartner von IRAK im Präzipitat zu finden ist.

In ein erstes Experiment wurden neben Wildtyp IRAK-1 zwei kinaseinaktive Punktmutanten, zwei Mutanten, denen entweder die Kinasedomäne oder die ProST-Region fehlt, zwei Moleküle, die nur den N-Terminus umfassen, und die Kinasedomäne in aktiver bzw. inaktiver Form eingesetzt. HEK293 Zellen wurden mit Plasmid-DNA, die für die jeweilige FLAG-getagte IRAK-Mutante codiert, und mit Plasmid für FLAG-getagtes humanes Tollip cotransfiziert. 40 Stunden später wurden die Zellen lysiert, und nach Abtrennen von DNA und großen Zelltrümmern wurden die IRAK-Moleküle mit IRAK-1 Antiserum und Protein G-Sepharose aus dem Lysat herauspräzipitiert. Die im Präzipitat enthaltenen Moleküle wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. In der folgenden Immunfärbung mit anti FLAG Antikörper wurden die präzipitierten exogenen Moleküle nachgewiesen (Abb. 25).

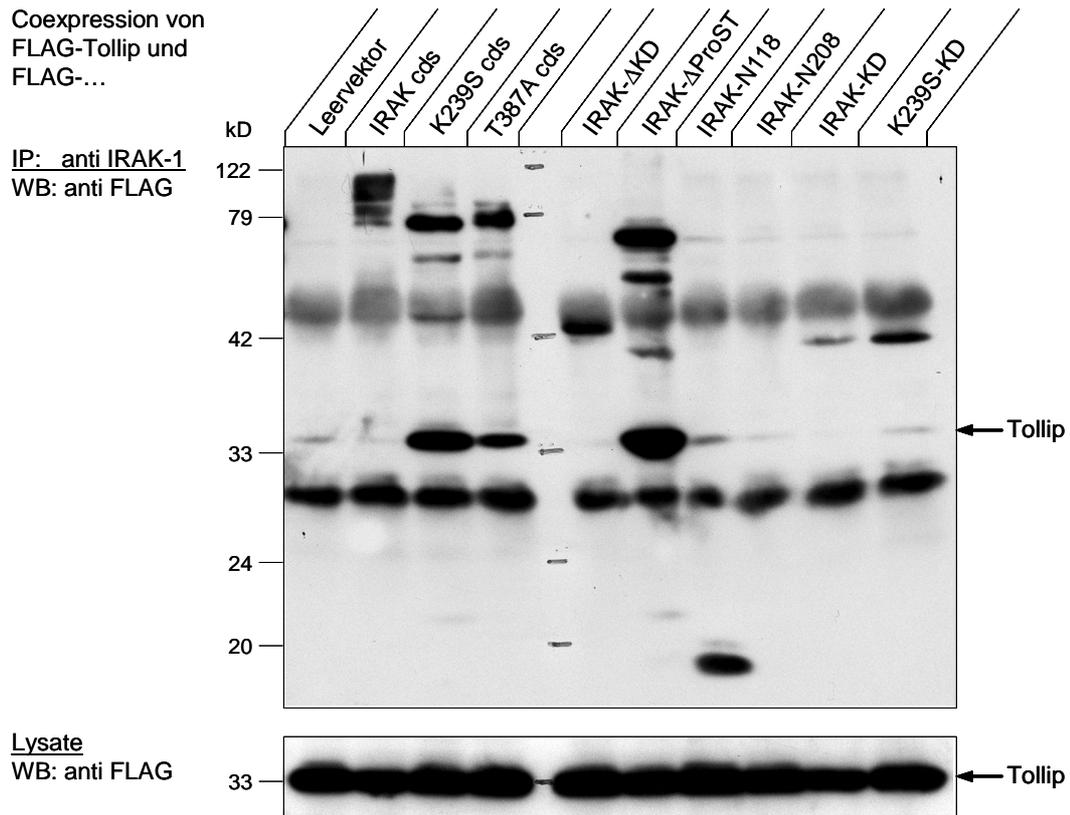


Abb. 25: Coimmunpräzipitation von Tollip mit verschiedenen IRAK-1 Mutanten. FLAG-getagte IRAK-Mutanten und FLAG-getagtes Tollip wurden in HEK293 Zellen 40 Stunden coexprimiert. Nach der Zellyse wurden die IRAK-Moleküle mit anti IRAK-1 Serum präzipitiert. Im anti FLAG Westernblot der Immunpräzipitate (oben) wurden die IRAK-Mutanten und Tollip angefärbt. Der anti FLAG Westernblot der Zellysate (unten) zeigt die gleichmäßige Expression von Tollip.

Tollip ließ sich mit den kinaseinaktiven Mutanten K239S und T387A copräzipitieren, nicht jedoch mit Wildtyp IRAK-1. Die Deletion der Kinasedomäne führte jedoch nicht zur Wechselwirkung von IRAK-1 mit Tollip. Entfernt man stattdessen mit der ProST-Region eine Zielstruktur mehrfacher Phosphorylierungen, ist eine deutliche Wechselwirkung mit Tollip zu erkennen. Über das Verhalten des N-Terminus und der Kinasedomäne lässt sich aus diesem Experiment keine Aussage treffen, weil die Intensität der Tollip-Bande der der Negativkontrolle ähnlich ist, bzw. diese IRAK-Mutanten entweder schlecht (IRAK-KD) oder gar nicht (IRAK-N208) exprimiert oder präzipitiert wurden.

Um über diese Mutanten Klarheit zu erhalten, wurde das Experiment mit einem Teil der Moleküle wiederholt. Zusätzlich wurden der C-Terminus von IRAK-1 sowie IRAK-2 und IRAK-M eingesetzt. Wieder wurden FLAG-getagte IRAK-Mutanten und FLAG-getagtes humanes Tollip in HEK293 Zellen exprimiert. Für die Immunpräzipitation wurden Antiseren gegen IRAK-1, IRAK-2 oder IRAK-M verwendet. Die Detektion der präzipitierten Moleküle erfolgte wiederum im anti FLAG Westernblot (Abb. 26).

Coexpression von
FLAG-Tollip und
FLAG-...

IP: anti IRAK-1, -2 oder -M
WB: anti FLAG

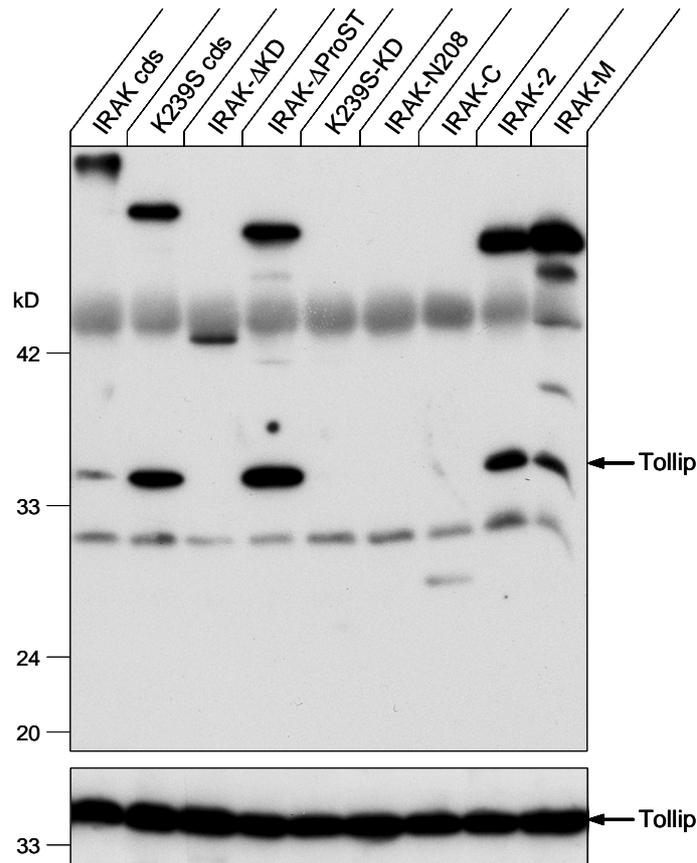


Abb. 26: Coimmunpräzipitation von Tollip mit IRAK-1 Mutanten, IRAK-2 und IRAK-M. FLAG-getagte IRAK-1 Mutanten, IRAK-2 oder IRAK-M und FLAG-getagtes Tollip wurden in HEK293 Zellen 40 Stunden coexprimiert. Nach der Zellyse wurden die IRAK-Moleküle mit anti IRAK-1, anti IRAK-2 oder anti IRAK-M Antiserum präzipitiert. Im anti FLAG Westernblot der Immunpräzipitate (oben) wurden die IRAK-Moleküle und Tollip angefärbt. Der anti FLAG Westernblot der Zellysate (unten) zeigt die gleichmäßige Expression von Tollip.

Wie im letzten Experiment konnte Tollip mit K239S cds und IRAK- Δ ProST copräzipitiert werden, nicht jedoch mit IRAK- Δ KD. Diesmal wurde auch mit Wildtyp IRAK eine geringe Menge Tollip präzipitiert. Der Nachweis der direkten oder indirekten Interaktion mit Tollip gelang auch für die beiden IRAK-1 Homologen IRAK-2 und IRAK-M. K239S-KD, IRAK-N208 und IRAK-C wurden in zu geringer Menge exprimiert und präzipitiert als dass sich eine Aussage über die Wechselwirkung mit Tollip treffen ließe.

In einem weiteren Coimmunpräzipitationsexperiment wurden die Beobachtungen über K239S cds und IRAK- Δ ProST, nämlich die Wechselwirkung mit Tollip, bestätigt (Abb. 27). In diesem Fall konnte Tollip mit dem Wildtyp-Molekül wiederum nicht copräzipitiert werden. Die Deletion der 148 N-terminalen Aminosäuren (Todesdomäne und ein Teil der ProST-Region) in IRAK- Δ N führte zum Verlust der Wechselwirkung mit Tollip. Über IRAK- Δ C kann mangels erfolgreicher Präzipitation keine Aussage getroffen werden.

Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem monoklonalen anti IRAK-1 Antikörper 2A9 (Ausnahme: IRAK- Δ C wurde mit dem anti IRAK-1 Serum präzipitiert.), der Nachweis im Westernblot über die N-terminalen FLAG-tags der IRAK-Mutanten bzw. das C-terminale FLAG-Epitop von Tollip.

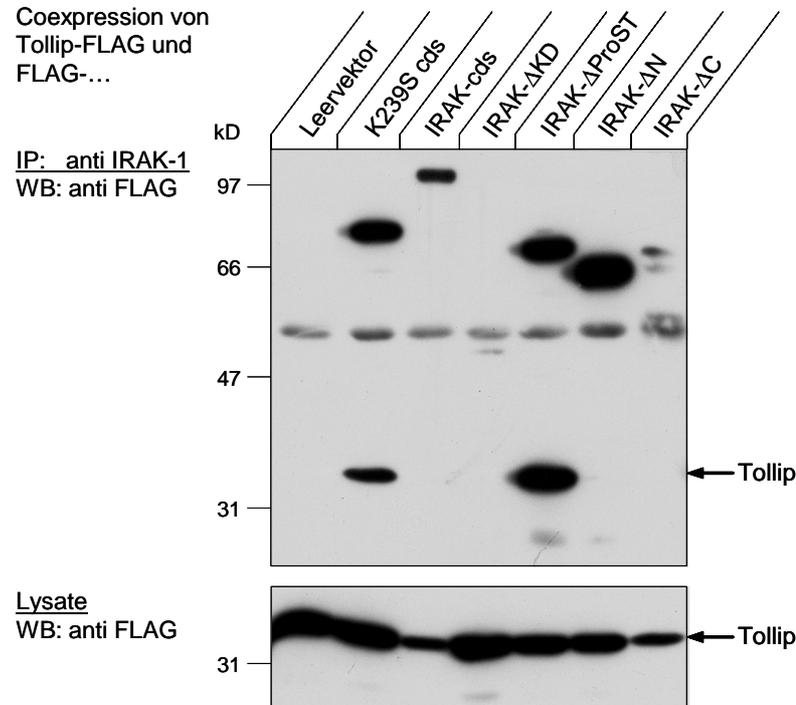


Abb. 27: Coimmunpräzipitation von Tollip mit verschiedenen IRAK-1 Mutanten. FLAG-getagte IRAK-1 Mutanten und C-terminal FLAG-getagtes Tollip wurden in HEK293 Zellen 40 Stunden coexprimiert. Nach der Zellyse wurden die IRAK-Moleküle mit dem monoklonalen anti IRAK-1 Antikörper 2A9 bzw. IRAK- Δ C mit dem anti IRAK-1 Serum präzipitiert. Im anti FLAG Westernblot der Immunpräzipitate (oben) wurden die IRAK-Moleküle und Tollip angefärbt. Der anti FLAG Westernblot der Zellysate (unten) zeigt die Expression von Tollip in allen Proben.

Die Präzipitation der IRAK-Mutanten, die bisher nicht zufriedenstellend gelungen war, wurde durch den Einsatz von anti FLAG M2-Agarose anstelle von anti IRAK-Antikörpern zu verbessern versucht (Abb. 28). Zu diesem Zweck wurde Tollip ohne Epitoptag coexprimiert. Lediglich Wildtyp IRAK-1 wurde mit dem monoklonalen anti IRAK-1 Antikörper 2A9 präzipitiert, weil deren Präzipitation mit anti FLAG Antikörper sehr ineffizient ist. Die Punktmutante T66A wurde untersucht als IRAK-Molekül, das nicht vollständig shiftet und von Burns *et. al* mit Tollip copräzipitiert werden konnte [70].

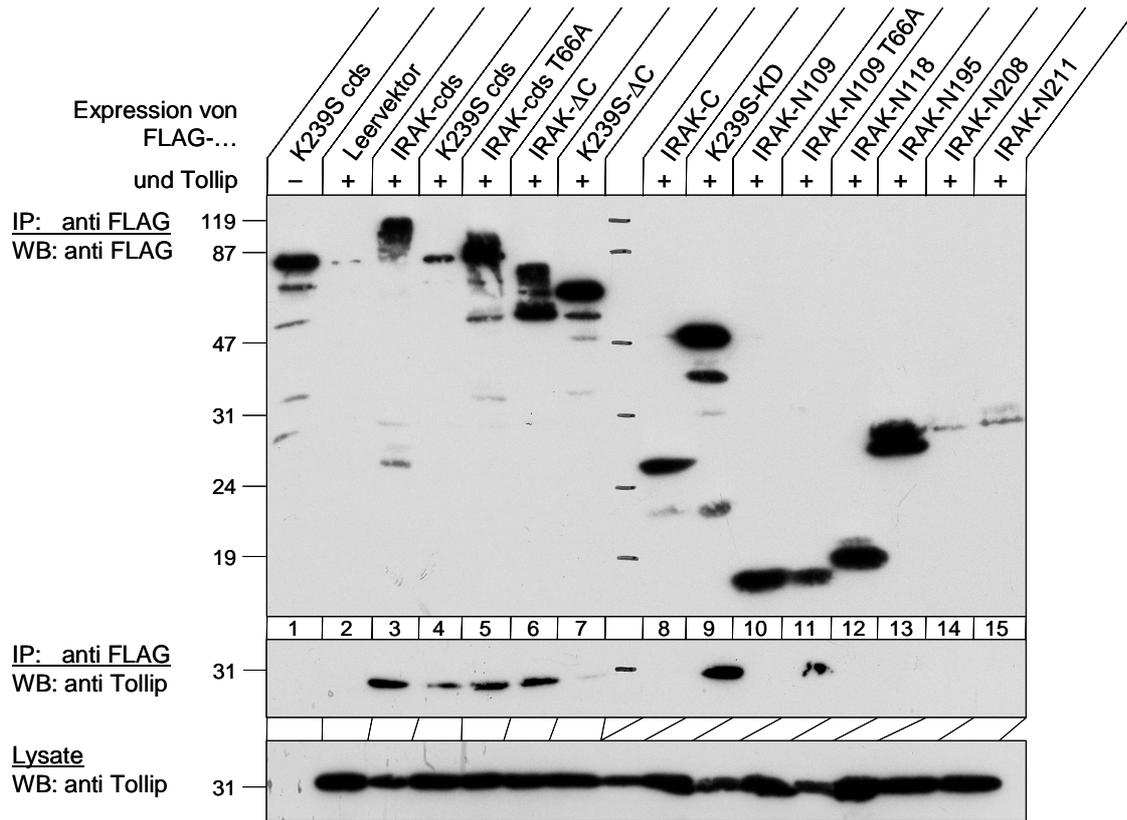


Abb. 28: Coimmunpräzipitation von Tollip mit verschiedenen IRAK-1 Mutanten über das FLAG-Epitoptag. FLAG-getagte IRAK-1 Mutanten und ungetagtes Tollip wurden in HEK293 Zellen 40 Stunden coexprimiert. Nach der Zelllyse wurden die IRAK-Moleküle mit anti FLAG M2-Agarose, bzw. IRAK cds mit dem monoklonalen anti IRAK-1 Antikörper 2A9 und Protein G-Sepharose, präzipitiert. Im anti FLAG Westernblot der Immunpräzipitate (oben) wurde die Präzipitation der IRAK-Moleküle überprüft. Die Existenz von Tollip im Immunpräzipitat wurde durch eine Färbung desselben Blots mit anti Tollip Antikörper nachgewiesen (Mitte). Der anti Tollip Westernblot der Zelllysate (unten) belegt die gleichmäßige Expression von Tollip.

Über das FLAG-Epitoptag konnten praktisch alle IRAK-Mutanten zufriedenstellend präzipitiert werden. Die geringe Menge an IRAK-N208 und -N211 (Bahnen 14 und 15) lag vielmehr an der mangelhaften Proteinexpression (nicht abgebildet) als an der Präzipitation. Es konnte gezeigt werden, dass die Todesdomäne von IRAK-1 in Verbindung mit der ProST-Region nicht ausreicht, um Tollip cozupräzipitieren. Umso weniger hinreichend ist die Todesdomäne alleine (IRAK-N109, Bahn 10). Auch der C-Terminus von IRAK-1 genügt nicht für die Wechselwirkung mit Tollip (Bahn 8), während dessen Deletion die Interaktion nicht unterbindet (Bahnen 6 und 7). Eine deutliche Wechselwirkung mit Tollip konnte für die kinaseinaktive Kinasedomäne gezeigt werden (Bahn 9). Die Wildtyp Kinase verhält sich nach wie vor uneinheitlich. Diesmal wurde Tollip deutlich im Immunpräzipitat von IRAK cds nachgewiesen (Bahn 3). Dazu ist zu bemerken, dass die Wildtyp IRAK-1 nicht nur in ihrer vollständig geschifteten Form präzipitiert wurde, sondern auch ungeschiftete Kinase im Präzipitat enthalten ist. Die Punktmutante T66A (Bahn 5) shiftet nicht vollständig und interagiert in dieser Form mit Tollip [70].

Nachdem die Interaktion mit Tollip für die kinaseinaktive Kinasedomäne gezeigt werden konnte, blieb diese Frage für die aktive Kinasedomäne bislang noch offen. Abb. 29 zeigt, dass die Kinasedomäne nur in ihrer inaktiven Form mit Tollip wechselwirken kann. Auch in diesem Experiment wurde eine geringe Menge Tollip mit IRAK cds copräzipitiert, wobei auch wieder ungeschiftete Kinase im Präzipitat enthalten war.

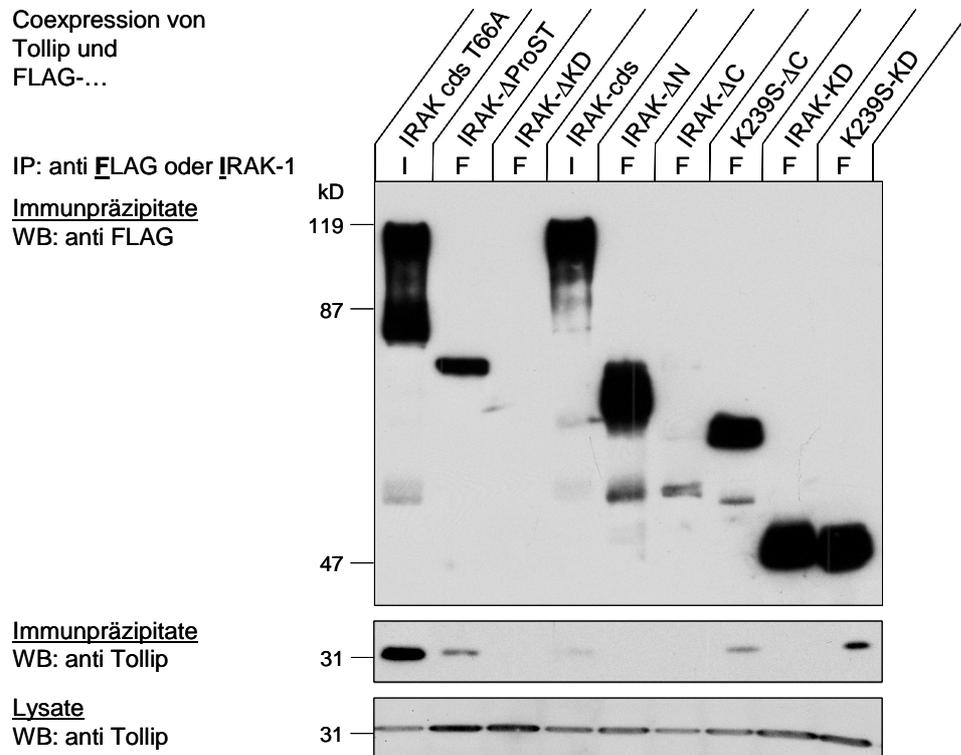


Abb. 29: Coimmunpräzipitation von Tollip mit verschiedenen IRAK-1 Mutanten. FLAG-getagte IRAK-1 Mutanten und ungetagtes Tollip wurden in HEK293 Zellen 40 Stunden coexprimiert. Nach der Zellyse wurden die IRAK-Moleküle mit anti FLAG M2-Agarose (F) oder mit dem monoklonalen anti IRAK-1 Antikörper 2A9 und Protein G-Sepharose (I) präzipitiert. Im anti FLAG Westernblot der Immunpräzipitate (oben) wurde die Präzipitation der IRAK-Moleküle überprüft. Die Existenz von Tollip im Immunpräzipitat wurde durch eine Färbung desselben Blots mit anti Tollip Antikörper nachgewiesen (Mitte). Der anti Tollip Westernblot der Zellysate (unten) zeigt die Expression von Tollip in allen Proben.

Die Ergebnisse der einzelnen Coimmunpräzipitationsexperimente sind in Abb. 30 zusammengefaßt.

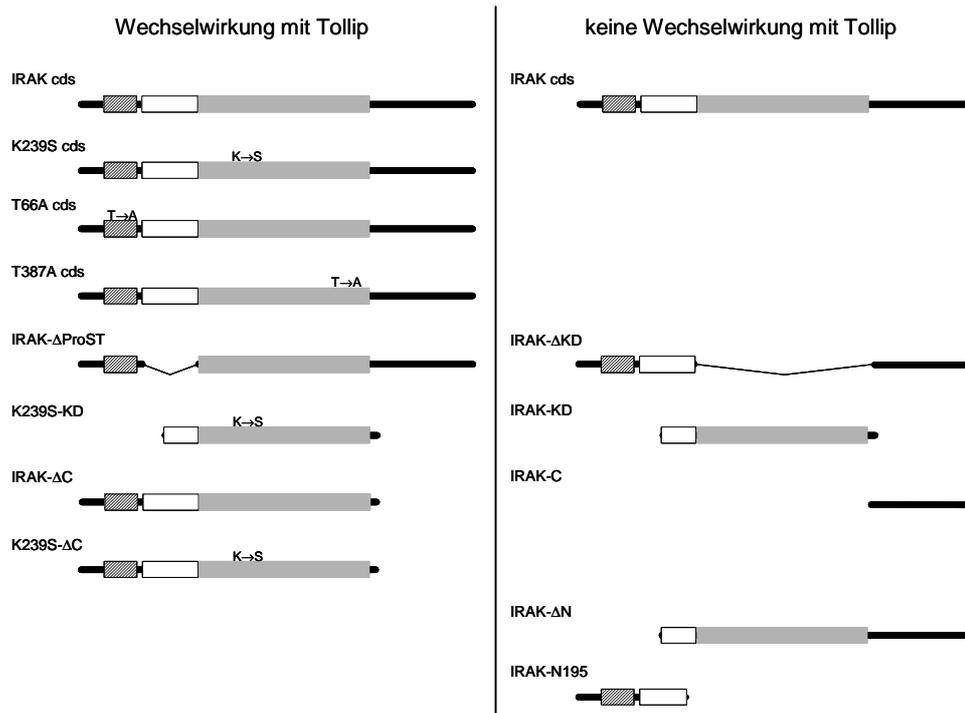


Abb. 30: Zusammenfassung der Ergebnisse der Coimmunpräzitationsexperimente. IRAK cds wurde auf beiden Seiten der Abbildung dargestellt, weil die Ergebnisse nicht einheitlich waren.

Eine sehr interessante Beobachtung entstand, als für eine Coimmunpräzitation die Wechselwirkungspartner getrennt exprimiert und die Zelllysate erst zur Präzitation gemischt wurden. In diesem Fall konnte Tollip mit keiner der eingesetzten IRAK-Mutanten copräzitiert werden. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden FLAG-getagte K239S cds und C-terminal FLAG-getagtes Tollip in einem Ansatz coexprimiert und wie gewohnt mit dem anti IRAK-1 Antikörper 2A9 präzitiert. In einem zweiten Ansatz wurden die beiden Moleküle getrennt voneinander exprimiert und die Zelllysate erst vor der Immunpräzitation gemischt. (Abb. 31).

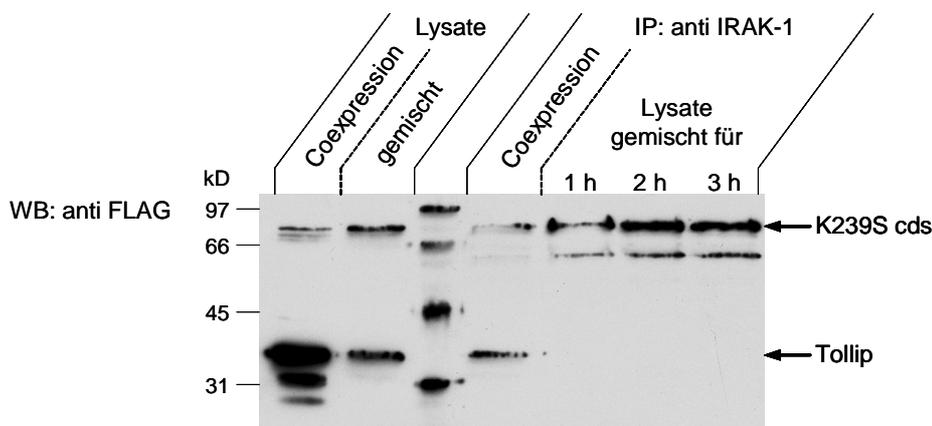


Abb. 31: Coimmunpräzitation von Tollip mit K239S cds nach getrennter Expression und Mischen der Lysate. FLAG-getagte K239S cds und C-terminal FLAG-getagtes Tollip wurden in HEK293 Zellen 40 Stunden entweder getrennt exprimiert oder coexprimiert. Die Zellen wurden lysiert, und vor der Immunpräzitation mit dem anti IRAK-1 Antikörper 2A9 wurden die Lysate der getrennt transfizierten Zellen für 1, 2 oder 3 Stunden gemischt. Im anti FLAG Westernblot der Zelllysate (links) und Immunpräzitate (rechts) wurden K239S cds und Tollip angefarbt.

Wiederum konnte nach getrennter Expression von K239S cds und Tollip und Mischen der Lysate vor der Immunpräzipitation keine Wechselwirkung zwischen den beiden Molekülen nachgewiesen werden.

3.4.2 Phosphorylierung von Tollip durch IRAK-1

Um der Frage nachzugehen, ob Tollip durch IRAK-1 phosphoryliert werden kann, wurde Tollip mit K239S cds coexprimiert und entweder direkt über das C-terminale FLAG-tag oder indirekt über K239S cds immunpräzipitiert. Die Kinaseaktivität in Form von IRAK cds oder IRAK-ΔC wurde nach getrennter Expression vor der Immunpräzipitation zugemischt. Der anschließende *in vitro* Kinaseassay sollte zeigen, ob Tollip phosphoryliert wird, während die Immunpräzipitation in einem anti FLAG Westernblot kontrolliert wurde (Abb. 32).

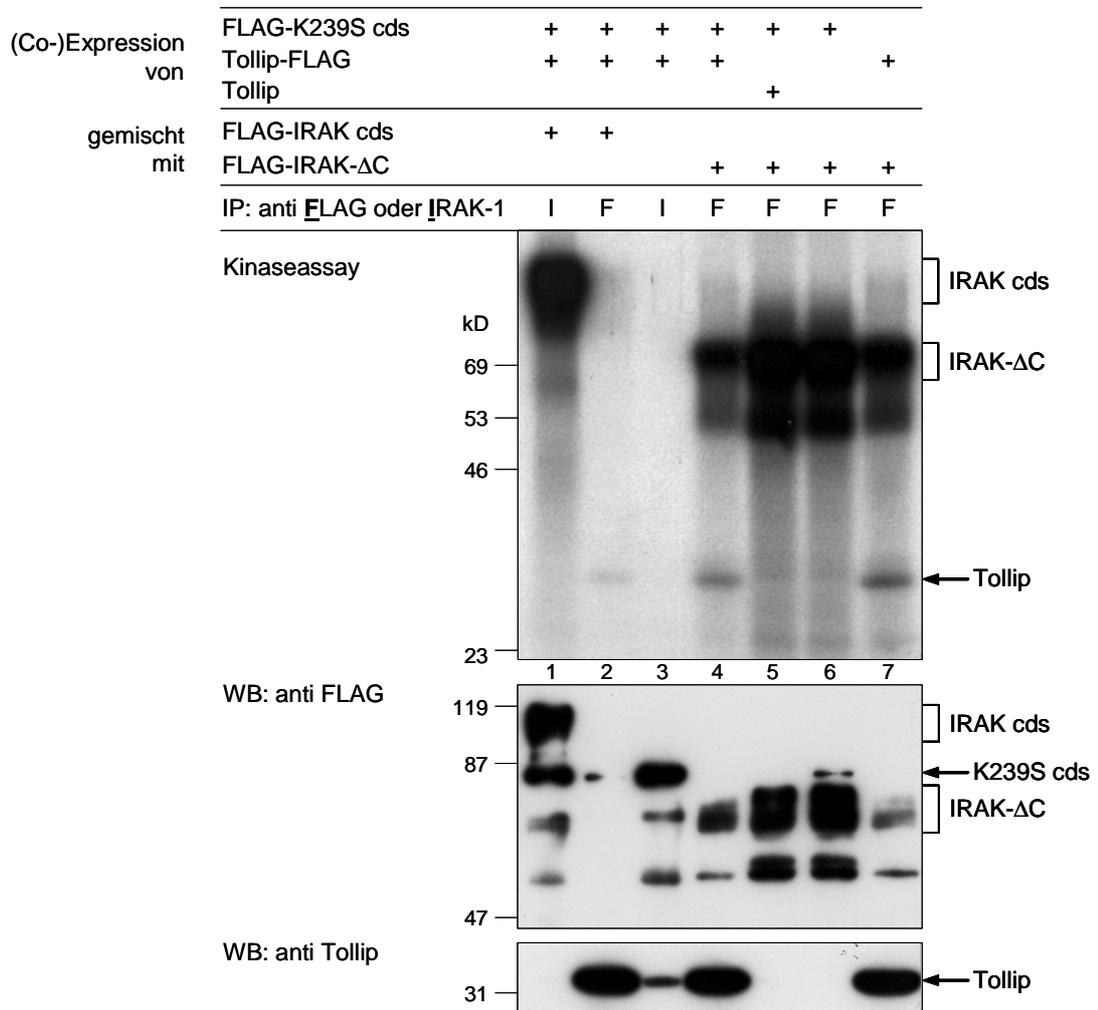


Abb. 32: Kinaseassay mit Tollip und IRAK-1. FLAG-getagte K239S cds und Tollip wurden in HEK293 Zellen 40 Stunden coexprimiert. Nach der Zellyse wurde Lysat von Zellen, die entweder IRAK cds oder IRAK-ΔC exprimierten, zugemischt. Nach der Immunpräzipitation entweder mit anti FLAG M2-Agarose oder anti IRAK-1 Antikörper 2A9 und Protein G-Sepharose wurde eine Hälfte der Präzipitate in einen *in vitro* Kinaseassay (oben) eingesetzt, während die andere Hälfte im anti FLAG (Mitte) oder anti Tollip (unten) Westernblot auf die Anwesenheit der eingesetzten Moleküle kontrolliert wurde.

Tollip wird durch IRAK- Δ C phosphoryliert (Bahnen 4 und 7). Der Nachweis ist jedoch nur gelungen, wenn beide Moleküle forciert coimmunpräzipitiert wurden, also beide über ihr jeweiliges FLAG-tag. Eine echte Copräzipitation über K239S cds hat nur in dem einen Fall stattgefunden, als keine IRAK-Kinaseaktivität in der Probe enthalten war (Bahn 3). In Bahn 2 wurde mit der anti FLAG M2-Agarose nur so wenig Wildtyp IRAK präzipitiert, dass sie im Westernblot nicht nachweisbar war und Tollip im Kinaseassay nur sehr schwach phosphoryliert wurde. In Bahn 5 konnte Tollip nicht über IRAK- Δ C copräzipitiert werden, weil diese beiden Moleküle nicht coexprimiert wurden (vergl. Abb. 31).

3.4.3 Funktion von Tollip im Toll/IL-1R Signalweg

3.4.3.1 Überexpression von Tollip

Burns *et al.* haben für Tollip bei Überexpression einen dominant negativen Effekt auf die IL-1 abhängige NF κ B-Aktivierung beschrieben [70]. Um diesen Einfluss von Tollip auf die IL-1 Signaltransduktion in unserem System zu überprüfen, wurde ein NF κ B Reporterassay durchgeführt (Abb. 33). EL-4 6.1 Zellen wurden mit dem NF κ B Reporterkonstrukt 5 \times NF κ B-luc und steigenden Mengen an Plasmiden für murines oder humanes Tollip transfiziert. Die Zellen wurden dann mit IL-1 β oder TNF α als Kontrolle stimuliert. 17 Stunden später wurde in cytosolischen Extrakten die NF κ B abhängige Luciferaseexpression gemessen. Als Kontrollen wurden Wildtyp IRAK-1 und die Todesdomäne der IRAK-1 (IRAK-N155) überexprimiert.

Während die Kontrollen die erwarteten IL-1 abhängigen Effekte zeigen, nämlich NF κ B Aktivierung im Fall von IRAK cds (Abb. 33, A) und NF κ B Inhibition im Fall von IRAK-N155 (Abb. 33, B) [67], konnte für Tollip kein dominant negativer Effekt auf die IL-1 induzierte NF κ B Aktivierung gemessen werden. Die Überexpression von Tollip allein hatte sogar eher einen leicht aktivierenden Effekt (Abb. 33, C und D). Bei gemeinsamer Überexpression von IRAK-1 und Tollip konnte die NF κ B Aktivität gegenüber IRAK-1 alleine tatsächlich leicht reduziert werden (Abb. 33, E), allerdings ist dieser Effekt möglicherweise auf die Gesamtmenge an codierendem Plasmid zurückzuführen (vergl. Abb. 33, A).

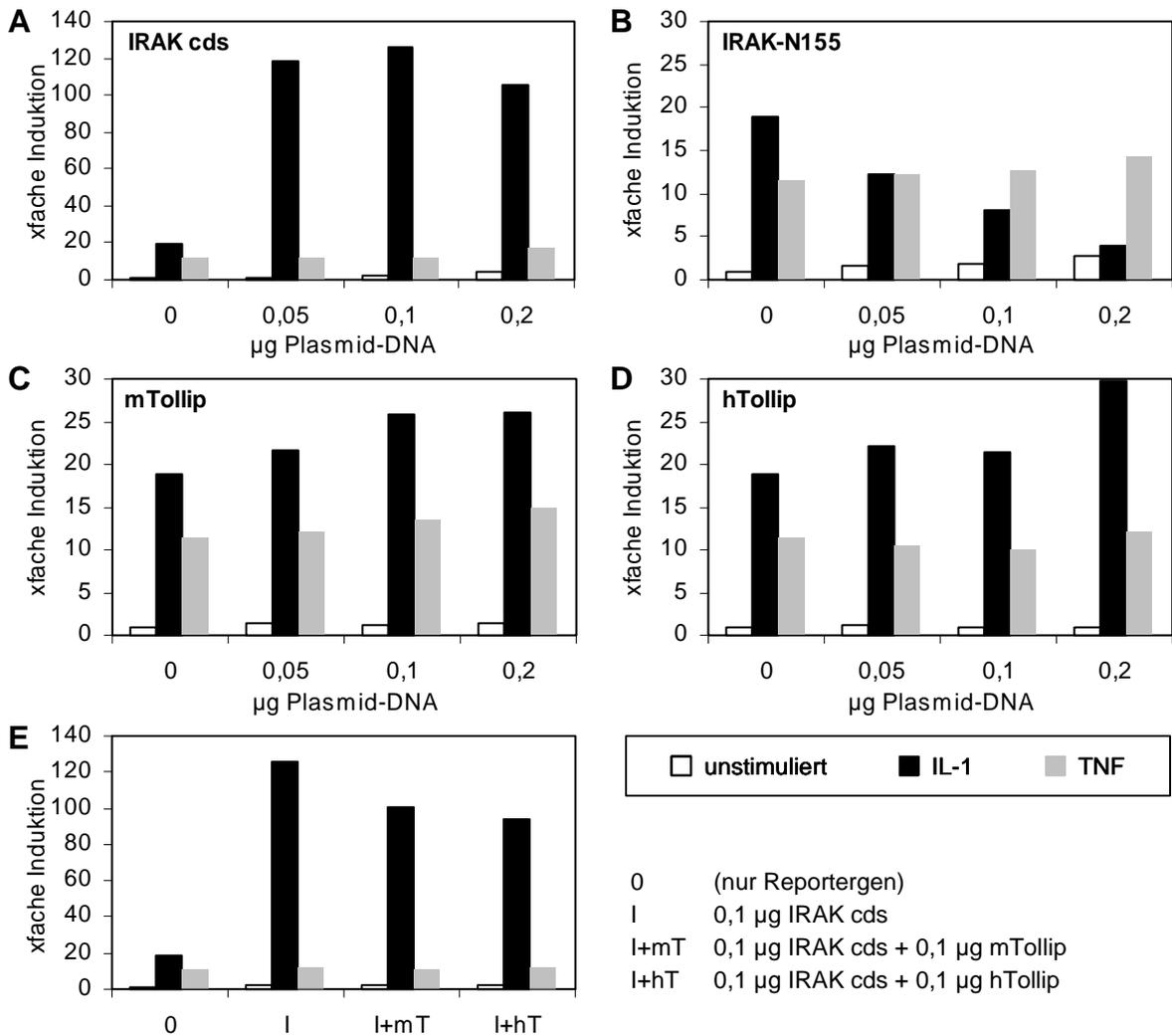


Abb. 33: NFκB-Reporterassay nach Überexpression von Tollip. $3 \cdot 10^6$ EL-4 6.1 Zellen pro Ansatz wurden mit $0,2 \mu\text{g}$ $5 \times \text{NF}\kappa\text{B-luc}$ und steigenden Mengen pFI-mTollip (C) oder pFI-hTollip (D) bzw. pFI-IRAK cds (A) oder pFI-IRAK-N155 (B) als Kontrollen transfiziert. In je einem Transfektionsansatz wurde pFI-mTollip bzw. pFI-hTollip mit pFI-IRAK cds cotransfiziert (E). 4 Stunden später wurden die Zellen mit 1 ng/ml IL- 1β oder 100 ng/ml TNF α stimuliert bzw. unstimuliert gelassen. Nach weiteren 17 Stunden wurden aus den Zellen cytosolische Extrakte hergestellt, in denen die NFκB abhängige Luciferaseexpression gemessen wurde. Die Luciferaseaktivität wurde auf die jeweilige Proteinkonzentration normiert und zur unstimulierten Leervektorkontrolle in Beziehung gesetzt. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Ordinatenachsen. Die Kontrolle nur mit Reporter gen transfizierter Zellen ist in allen Teilabbildungen dieselbe.

3.4.3.2 Ausschaltung der Tollip-Expression durch RNA Interferenz

Eine gute Möglichkeit, die Funktion eines Moleküls zu untersuchen, besteht darin, das Molekül aus dem verwendeten System zu entfernen. Das kann man durch die Deletion des entsprechenden Genes aus dem Genom z. B. einer Maus erreichen. Allerdings ist es sehr aufwendig, eine solche *knock out* Maus zu generieren. Eine technisch einfachere Alternative stellt die kürzlich entwickelte Methode der RNA Interferenz (RNAi) dar [106] (zusammengefasst in [107]). Man transfiziert die Zielzelle mit einem 21 Nukleotide langen RNA Doppelstrang (*small interfering RNA*, siRNA), der zu einem Ausschnitt der interessierenden Gensequenz komplementär ist, was dazu führt, dass dieses Gen nicht

mehr exprimiert wird. Der Mechanismus der RNA Interferenz wurde bislang nicht vollständig aufgeklärt. Man vermutet, dass die doppelsträngige RNA einen antiviralen Schutzmechanismus der Zelle aktiviert. Demnach dient die siRNA einem Nukleasekomplex als Matrize, der spezifisch die zum *antisense* Strang der siRNA komplementäre mRNA des Zielgens zerstört, so dass es nicht zur Translation kommen kann.

Die Methode der RNA Interferenz wurde hier genutzt, um die Expression von Tollip zu unterbinden und die Auswirkung auf die IL-1/TLR Signaltransduktion zu untersuchen. Die siRNA wurde dazu mit dem *Silencer siRNA Construction Kit* der Firma Ambion hergestellt. Um die Qualität der produzierten siRNA und die Methode an sich zu kontrollieren, wurden neben drei verschiedenen siRNA Molekülen gegen das Gen für murines Tollip auch drei siRNA Duplices gegen das murine IRAK-4 Gen hergestellt. Eine IRAK-4 *knock out* Maus wurde von Suzuki *et al.* hergestellt und zeigt keinerlei Signaltransduktion über den IL-1/TLR Weg mehr [72]. Dementsprechend dürfte eine mit siRNA gegen IRAK-4 transfizierte Zelle nicht mehr auf IL-1 oder LPS reagieren.

Zunächst wurden alle Sequenzen der Art AAN₂₁ aus muriner IRAK-4 bzw. murinem Tollip aufgelistet. Die Sequenzen, die nicht mindestens 100 Nukleotide vom Start- oder Stoppcodon entfernt waren, blieben unberücksichtigt, um mögliche Störungen durch Transkriptionsfaktoren zu vermeiden. Danach wurde der GC-Gehalt der Sequenzen bestimmt, und nur die Sequenzen wurden berücksichtigt, deren GC-Gehalt zwischen 40 und 60 % lag. Die verbleibenden potentiellen Zielsequenzen wurden mit dem „BLAST Search“ Programm des NCBI mit der Gendatenbank abgeglichen, um sicherzustellen, dass die ausgewählten Sequenzen ausschließlich im Tollip bzw. IRAK-4 Gen vorkommen. Diese Bedingung war für alle Sequenzen erfüllt. Aus den in Frage kommenden Sequenzen wurden schließlich für jedes der beiden Gene drei ausgewählt: je eine im 5'-Bereich, in der Mitte und im 3'-Bereich, wenn möglich mit der Sequenz AAN₁₉TT oder AAN₁₉TN. Die ausgewählten Sequenzen sind in Kap. 2.11 abgedruckt.

Wenn durch RNA Interferenz die Translation eines Proteins verhindert werden kann, darf es im Zelllysat nach Transfektion mit siRNA nicht mehr nachweisbar sein. Voraussetzungen dafür sind jedoch eine ausreichende Transfektionseffizienz und die genügend schnelle Proteolyse der zum Zeitpunkt der Transfektion bereits vorhandenen Moleküle.

Um die Wirksamkeit der gegen Tollip hergestellten siRNA zu demonstrieren, wurden Swiss 3T3 Zellen mit den drei verschiedenen siRNA Präparationen transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und evtl. vorhandenes Tollip mit anti Tollip Antikörper immunpräzipitiert. Die Analyse der Präzipitate erfolgte im Westernblot, der mit anti Tollip Antikörper gefärbt wurde (Abb. 34).

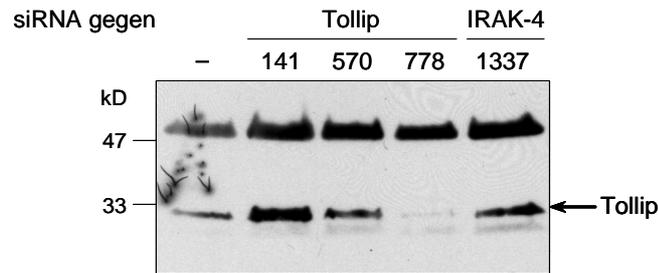


Abb. 34: Immunpräzipitation von endogenem Tollip nach Transfektion mit siRNA. $5 \cdot 10^6$ Swiss 3T3 Zellen wurden ohne siRNA (-) oder mit siRNA 141, 570 oder 778 gegen murines Tollip oder mit siRNA 1337 gegen murine IRAK-4 transfiziert (finale siRNA Konzentration: 2 nM). 48 Stunden später wurden die Zellen lysiert und endogenes Tollip mit dem anti Tollip Antikörper Kimmy-1 und Protein G-Sepharose immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurde im Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblotet und mit anti Tollip Antikörper angefärbt.

In den ohne siRNA und mit siRNA gegen IRAK-4 transfizierten Zellen konnte endogenes Tollip nachgewiesen werden. Dass in den Zellen, die ohne siRNA transfiziert wurden, weniger Tollip angefärbt wurde, ist auf die geringere Menge an aufgetragenem Präzipitat zurückzuführen, wie aus der Intensität der Bande bei ~ 50 kD hervorgeht, bei der es sich um die schwere Kette des präzipitierenden Antikörpers handelt. Die Ergebnisse der Transfektionen mit siRNA gegen Tollip sind uneinheitlich. Während die Expression von Tollip durch siRNA 778 praktisch vollständig verhindert und durch siRNA 570 verringert werden konnte, wurde sie durch siRNA 141 nicht beeinflusst.

Der Einfluss von siRNA Transfektion auf die Expression von IRAK-4 konnte auf Proteinebenen nicht untersucht werden, weil kein Antikörper gegen IRAK-4 zur Verfügung stand und das Protein daher nicht detektiert werden konnte.

Nachdem die Wirksamkeit zumindest eines Teils der siRNA Präparationen gegen Tollip auf Proteinebene gezeigt wurde, sollte der Einfluss der siRNA auf die IL-1 Signaltransduktion untersucht werden. Zur Etablierung der experimentellen Bedingungen wurde zunächst die siRNA gegen IRAK-4 eingesetzt, bei der ein negativer Effekt auf die IL-1 oder LPS Antwort erwartet werden konnte. Swiss 3T3 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der siRNA Präparationen 321, 630 und 1337 gegen murine IRAK-4 transfiziert und nach 48 Stunden mit LPS stimuliert. Als Messgröße wurde die IL-6 Produktion der Zellen gewählt, die am Ende des IL-1/TLR Signalweges steht. 24 Stunden nach Stimulation wurde also mittels ELISA die IL-6 Konzentration im Zellkulturüberstand gemessen und im MTT-Assay die Zellvitalität bestimmt. Aus Abb. 35 geht hervor, dass die Steigerung der IL-6 Produktion nach LPS Stimulation durch den Einsatz der siRNA 1337 verhindert wurde. Die siRNA 1337 hat die IRAK-4 Expression also offenbar erfolgreich unterbunden, wodurch der IL-1/TLR Signalweg stillgelegt wurde. siRNA 321 hat einen geringeren Einfluss auf die IL-6 Produktion, während bei siRNA 630 keine Wirkung festgestellt werden konnte.

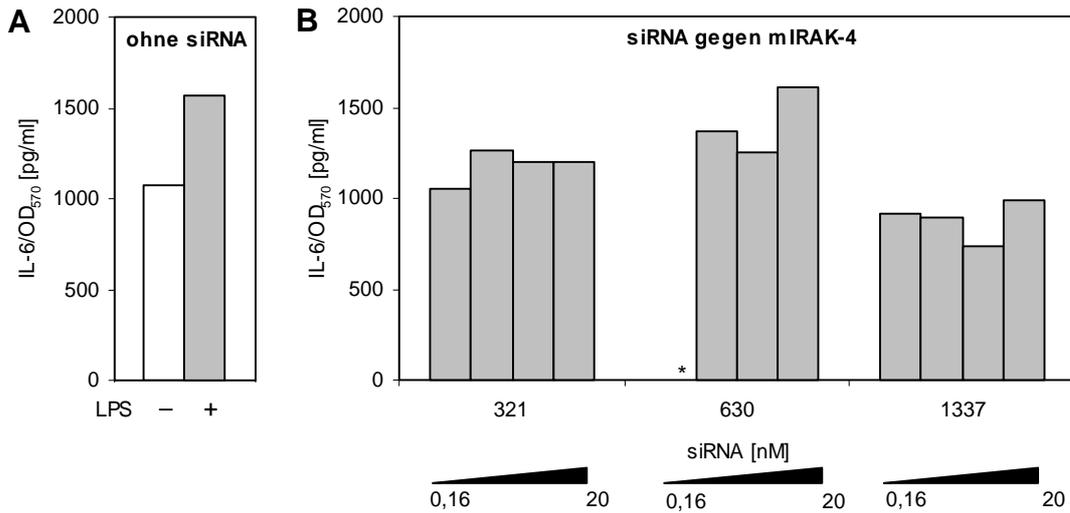


Abb. 35: LPS induzierte IL-6 Synthese von Swiss 3T3 Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen IRAK-4. 2000 Swiss 3T3 Zellen pro Punkt wurden mit 0,16, 0,8, 4 oder 20 nM der drei siRNA Präparationen gegen murine IRAK-4 transfiziert (B). Zur Kontrolle wurde ein Teil der Zellen ohne siRNA dem Transfektionsprotokoll unterworfen (A). Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Weitere 24 Stunden später wurde die IL-6 Konzentration in den Zellkulturüberständen gemessen und die Zellvitalität im MTT-Assay bestimmt. Die IL-6 Produktion wurde auf den OD-Wert aus dem MTT-Assay normiert. * Dieser Messpunkt ist ausgefallen.

Nachdem die Funktionsfähigkeit der siRNA gegen murines Tollip demonstriert werden konnte (Abb. 34) und die Wirksamkeit von siRNA im Bioassay nachgewiesen wurde (Abb. 35), sollte die gleiche Versuchsdurchführung mit den drei siRNA Präparationen gegen murines Tollip klären, ob die Abwesenheit von Tollip Auswirkungen auf den IL-1/TLR Signalweg hat (Abb. 36). Die Transfektion keiner der siRNA Präparationen hat einen aussagekräftigen Einfluss auf die IL-6 Produktion nach LPS Stimulation.

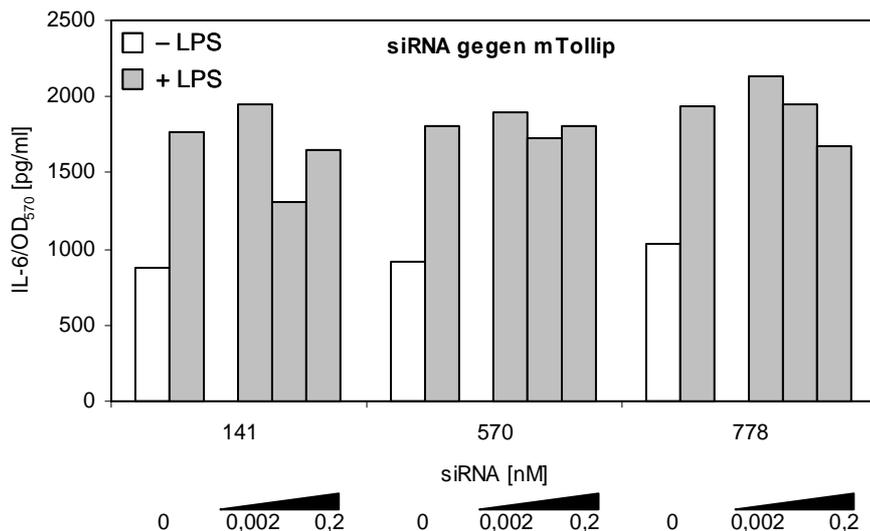


Abb. 36: LPS induzierte IL-6 Synthese von Swiss 3T3 Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen Tollip. 2000 Swiss 3T3 Zellen pro Punkt wurden mit 0, 0,002, 0,02 oder 0,2 nM der drei siRNA Präparationen gegen murines Tollip transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Weitere 24 Stunden später wurde die IL-6 Konzentration in den Zellkulturüberständen gemessen und die Zellvitalität im MTT-Assay bestimmt. Die IL-6 Produktion wurde auf den OD-Wert aus dem MTT-Assay normiert.

4 Diskussion

Die Mitglieder der Toll/IL-1 Rezeptor Familie spielen eine bedeutende Rolle in der angeborenen Immunabwehr, indem sie Strukturen eindringender Pathogene oder proinflammatorische Zytokine wie IL-1 oder IL-18 erkennen. Alle verschiedenen Familienmitglieder bedienen sich dabei eines gemeinsamen intrazellulären Signalweges, um durch die Induktion der Expression von Effektorgenen eine Entzündungsreaktion hervorzurufen, durch die die Ausbreitung der Infektion eingedämmt werden soll. Ein zentrales Element dieses Signalweges ist die Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase IRAK-1, die im Zuge ihrer Aktivierung mehrfachen Phosphorylierungen unterworfen ist. Diese Phosphorylierungen beeinflussen die Wechselwirkung von IRAK-1 mit ihren direkten Interaktionspartnern sowie die Stabilität von IRAK-1 und damit ihre Verfügbarkeit als Signalelement.

4.1 Phosphorylierungen in der ProST-Region

Ein Hauptziel dieser Arbeit war die Identifizierung der Bereiche in IRAK-1, und wenn möglich einzelner Aminosäuren, die phosphoryliert werden. Dafür ist zunächst die Kenntnis der Domänenstruktur notwendig. Der N-Terminus von IRAK-1 bildet eine sogenannte Todesdomäne (*death domain*). Es handelt sich dabei um eine α -helikale Struktur, die zuerst im TNF Rezeptorsystem beschrieben wurde. Verschiedene Moleküle des TNF Signalweges tragen eine solche Domäne, die dort für die Auslösung des programmierten Zelltodes (Apoptose) essentiell ist und daher ihren Namen trägt. Aber auch zahlreiche andere Moleküle, die nicht mit Apoptose in Zusammenhang gebracht werden, enthalten Todesdomänen, die in diesem Fall als Protein Interaktionsdomänen fungieren und die Ausbildung von Homo- oder Heterooligomeren vermitteln (Übersicht in [108]). Ebendies ist auch der Fall bei IRAK-1, die über ihre Todesdomäne an das Adaptermolekül MyD88 bindet und so an den Rezeptorkomplex koppelt. Im Zentrum von IRAK-1 befindet sich die konservierte Subdomänenstruktur eukaryotischer Proteinkinasen. Bestimmte hochkonservierte Aminosäuren in Subdomäne VIb sind dabei charakteristisch für Serin/Threonin-Kinasen [109]. An diese Kinasedomäne schließt sich der rund 200 Aminosäuren lange C-Terminus an, der keine Homologie zu bekannten Proteinstrukturelementen aufweist und dessen Funktion unklar ist.

Auf der Suche nach möglichen Phosphorylierungsbereichen erregte die 112 Aminosäuren lange Sequenz zwischen der N-terminalen Todesdomäne und der zentralen Kinasedomäne (AS 100–211) besondere Aufmerksamkeit. Die Hälfte aller Aminosäuren in dieser Region sind Prolin-, Serin- oder Threoninreste, weshalb wir diesen Sequenzabschnitt ProST-Region genannt haben. In dieser Region häufen sich potentiell phosphorylierbare Aminosäuren zwischen zahlreichen Prolinen, die als sogenannte „Strukturbrecher“ die Ausbildung von kompakten Sekundär- und Tertiärstrukturen verhindern können. Folglich

sollte die ProST-Region für modifizierende Enzyme gut zugänglich sein. Ein weiterer Hinweis auf die Eignung dieses Sequenzbereiches als Phosphorylierungsziel ist die Anwesenheit einer möglichen und einer wahrscheinlichen PEST-Sequenz, die mit dem Programm PEST-FIND identifiziert wurden. PEST-Sequenzen sind hydrophile Bereiche von mindestens 12 Aminosäuren, die mindestens ein Prolin, ein Glutamat oder Aspartat und ein Serin oder Threonin enthalten und von Lysin-, Arginin- oder Histidinresten flankiert werden. Positiv geladene Aminosäuren dürfen innerhalb der Sequenz nicht vorkommen. Es wurde gezeigt, dass PEST-Sequenzen in vielen Molekülen an der Regulation der Proteinlebensdauer beteiligt sind. Die Phosphorylierung in PEST-Sequenzen bzw. deren flankierenden Sequenzbereichen ist oftmals ein Signal für die nachfolgende Ubiquitylierung des Proteins, das auf diese Weise zum proteolytischen Abbau an das 26S Proteasom adressiert wird (Übersicht in [105]).

All diese Überlegungen machten die ProST-Region zu einem attraktiven Zielbereich bei der Untersuchung der Phosphorylierung von IRAK-1. Durch den Einsatz einer Reihe von C-terminalen Deletionsmutanten von IRAK-1, die neben dem N-Terminus mit der Todesdomäne unterschiedlich lange Fragmente der ProST-Region enthalten, konnte gezeigt werden, dass die ProST-Region tatsächlich ein Ziel für zahlreiche Phosphorylierungsereignisse darstellt. Die kürzeren Deletionsmutanten wiesen als Phosphorylierungsmuster nur eine oder zwei Banden auf, während schon ab der Anwesenheit nur des ersten Drittels der ProST-Region bereits komplizierte Muster aus mindestens fünf Banden zu sehen waren. Offenbar sind also nicht alle Moleküle einer Mutante im gleichen Maße homogen phosphoryliert, so dass ein Bandenmuster entstand. Dieses Bandenmuster erstreckte sich im Acrylamidgel über einen Molekulargewichtsbereich von etwa 10 kD. Da ein einzelner Phosphatrest ein Molekulargewicht von rund 80 Dalton hat, kann die Änderung des Laufverhaltens nicht allein in der Zunahme des Molekulargewichtes der IRAK Moleküle begründet sein. Stattdessen muss man entweder von einer Konformationsänderung ausgehen, die auf der Phosphorylierung beruht, oder von einer anderen, zusätzlichen posttranslationalen Modifikation von IRAK-1. Die schrittweise weitere Verlängerung der untersuchten ProST-Region ergab immer unterschiedliche Muster in Bezug auf Anordnung und Intensität der Banden, wobei sich der Molekulargewichtsbereich, über den sich das Bandenmuster erstreckte, nicht weiter vergrößerte. Das deutet darauf hin, dass eine mögliche Konformationsänderung nach einer begrenzten Anzahl von Phosphorylierungen abgeschlossen ist und durch Phosphorylierung von zusätzlichen Aminosäuren in den längeren Deletionsmutanten lediglich das Bandenmuster verändert wird.

Nachdem bereits bekannt war, dass die Phosphorylierung von IRAK-1 zum Verlust der Wechselwirkung mit MyD88 führt [50], konnte Johannes Knop in seiner Dissertation zeigen, dass die Phosphorylierung der Todesdomäne von IRAK-1 für diese Abdissoziation von MyD88 verantwortlich ist [67]. Seine Beobachtung entstand beim Einsatz einer

Deletionsmutante, die neben der eigentlichen Todesdomäne etwa die Hälfte der ProST-Region umfasst. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten nun darauf hin, dass die Phosphorylierungen nicht in der eigentlichen Todesdomäne stattfinden, sondern in der ProST-Region. Um das jedoch definitiv zu zeigen, wurde zum einen die rekombinant hergestellte ProST-Region in einem *in vitro* Kinaseassay untersucht, der zeigte, dass die isolierte ProST-Region als Substrat für IRAK-1 dient. Zum anderen wurden phosphorylierte Deletionsmutanten von IRAK-1 mit Carboxypeptidase-Y vom C-Terminus her proteolytisch abgebaut, bis die eigentliche Todesdomäne übrig blieb, die keinerlei Phosphorylierung mehr erkennen ließ. Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Phosphorylierungsereignisse, die zum Verlust der Wechselwirkung mit MyD88 führen, nicht in der eigentlichen Todesdomäne stattfinden, sondern in der C-terminal angrenzenden ProST-Region.

Die Ergebnisse der Experimente mit C-terminalem Abbau von IRAK-1 durch Carboxypeptidase-Y zeigten die Todesdomäne als sehr stabile kompakte Struktur, die von der Protease nicht angegriffen werden konnte. Die Struktur der Todesdomäne von Pelle, dem *Drosophila* Homolog von IRAK-1, ist parallel zu dieser Arbeit durch Kristallstrukturanalyse aufgeklärt worden. Es handelt sich dabei um eine globuläre Domäne aus sechs α -Helices [71]. Wenn die ProST-Region im Gegensatz zur Todesdomäne von Carboxypeptidase-Y angegriffen werden kann, weist das auf eine offenere Struktur der ProST-Region hin, was in gutem Einklang mit der Existenz zahlreicher Proline in diesem Sequenzabschnitt steht.

Im *in vitro* Kinaseassay mit der eigentlichen Todesdomäne zeigte diese bisweilen ein Phosphorylierungssignal, das jedoch wesentlich schwächer war als in den Mutanten, die Teile der ProST-Region enthielten. Zudem konnte die Phosphorylierung der Todesdomäne keinem Serin- oder Threoninrest individuell zugeordnet werden, wie die Mutation aller einzelnen phosphorylierbaren Aminosäuren erwies. Bei der Phosphoaminosäureanalyse der schwachen Phosphorylierungssignale konnten sowohl Phosphoserin als auch Phosphothreonin nachgewiesen werden. In dem gewählten Versuchsansatz (*in vitro* Kinaseassay nach forcierter Coimmunpräzipitation) scheint es sich bei dieser Phosphorylierung der eigentlichen Todesdomäne um ein recht seltenes Ereignis zu handeln, das nur wenige IRAK-1 Moleküle betrifft. Zudem tritt diese Phosphorylierung an unterschiedlichen Aminosäuren auf. Insgesamt handelt es sich vermutlich um einen unspezifischen Vorgang ohne Relevanz für die Funktion von IRAK-1 in der Signaltransduktion. Denkbar wäre auch, dass in den Zellen, in denen die Proteine hergestellt werden, eine andere schwache Kinaseaktivität vorhanden ist, die mit IRAK-1 copräzipitiert wird und dann eine sehr schwache Phosphorylierung der IRAK-1 im Bereich der Todesdomäne durchführt, die keine Autophosphorylierung darstellt.

Einen anderen Eindruck muss man gewinnen, wenn man eine Punktmutante von vollständiger IRAK-1 betrachtet, bei der das Threonin 66 aus der Todesdomäne durch einen Alaninrest ersetzt wurde. T66 ist eine Aminosäure, die in Todesdomänen unterschiedlicher Moleküle aus dem Toll/IL-1R Signalweg konserviert ist (z. B. IRAK-2, Pelle, Tube, MyD88) [70]. In dieser Arbeit wurde die Punktmutante bei den Experimenten zur Interaktion von IRAK und Tollip eingesetzt. Wildtyp IRAK-1 macht bei Stimulation oder Überexpression einen Molekulargewichtsshift durch und läuft im Gel als diskrete Bande bei etwa 100 kD. Bei der Punktmutante T66A vollzieht sich dieser Molekulargewichtsshift nicht in allen Molekülen vollständig, so dass sich die Mutante im Westernblot als Schmier zwischen 80 und 100 kD darstellt. Dass zum einen sehr deutlich gezeigt werden konnte, dass die Todesdomäne nicht an bestimmten Aminosäuren phosphoryliert wird, dagegen die Eliminierung der Möglichkeit zur Phosphorylierung an Threonin 66 aber die Phosphorylierung der Wildtyp IRAK-1 beeinflusst, stellt einen Widerspruch dar, der im Zuge dieser Arbeit nicht aufgelöst werden konnte. Möglicherweise ist Threonin 66 für die Homooligomerisierung von IRAK-1 wichtig, die die *trans*-Phosphorylierung in der ProST-Region ermöglicht. In einem Modell der beiden Todesdomänen von IRAK-1 und dem Wechselwirkungspartner MyD88 befindet sich T66 genau im Bereich der optimalen Interaktion zwischen den beiden sehr kompakten Strukturen, so dass T66 rein strukturell eine attraktive Aminosäure wäre, die nach Phosphorylierung eine massive Veränderung dieser Proteininteraktion vermuten ließe. Leider konnten durch die hier durchgeführten Experimente keine Beweise für diese attraktive Arbeitshypothese gefunden werden.

4.2 Identifikation einzelner phosphorylierter Aminosäuren

Nachdem die ProST-Region als Zielbereich für mehrfache Phosphorylierung identifiziert werden konnte, war es das Bestreben, die Phosphorylierungsstellen weiter einzugrenzen und, wenn möglich, einzelne phosphorylierte Aminosäuren zu benennen. Die Aufteilung der ProST-Region in sieben nicht überlappende Peptide, die im IRAK-Kinaseassay untersucht worden, hat gezeigt, dass die Phosphorylierungen nicht einem bestimmten Sequenzabschnitt innerhalb der ProST-Region zugewiesen werden konnten. Vielmehr eigneten sich fünf der sieben eingesetzten Peptide als Substrat für IRAK-1. Folglich finden die Phosphorylierungen über den gesamten Sequenzabschnitt der ProST-Region verteilt statt. Dieser Befund deckt sich mit der Beobachtung, dass die Deletionsmutanten, die unterschiedlich lange Abschnitte der ProST-Region umfassen, alle unterschiedliche Phosphorylierungsmuster aufweisen.

Indem Punktmutanten verschiedener Deletionsmutanten hergestellt wurden, bei denen einzelne Serin- oder Threoninreste gegen Alanin ausgetauscht wurden, konnte für einzelne Aminosäuren geklärt werden, ob sie durch IRAK-1 *in vitro* phosphoryliert werden oder nicht. Bei direkt benachbarten Serin- und Threoninresten fiel die genaue Zuordnung nicht

immer ganz leicht. Während z. B. die Threonine 113 und 114 offenbar beide phosphoryliert werden, konnte für die Serinreste 119 und 120 nicht geklärt werden, ob beide oder eine der Aminosäuren modifiziert werden. Bei dem Versuch, phosphorylierte Aminosäuren durch Massenspektroskopie des vollständigen IRAK-1 Moleküls zu identifizieren, die Herr Dr. Mischak von der Medizinischen Hochschule Hannover freundlicherweise durchführte, konnte bestätigt werden, dass entweder S119 oder S120 phosphoryliert wird. Während nicht abschließend geklärt werden konnte, welche der beiden Aminosäuren modifiziert wird, sprachen die meisten Hinweise für die Phosphorylierung von S119. Insgesamt stellt sich die Frage, ob in der realen Situation überhaupt zwischen benachbarten Phosphorylierungsstellen unterschieden wird. Es erscheint unwahrscheinlich, dass die Entscheidung, welche zweier benachbarter Aminosäuren tatsächlich phosphoryliert wird, das Verhalten von IRAK-1 im Signalweg zu beeinflussen vermag.

Zu dem gleichen Schluss kommt man bei der Untersuchung eines besonders auffälligen Sequenzmotivs. Mit S137, S138, S140 und T141 häufen sich phosphorylierbare Aminosäuren in unmittelbarer Nähe zu einer der beiden PEST-Sequenzen (AS 117–133). Die Nähe zur PEST-Sequenz ist deshalb interessant, weil die Phosphorylierung innerhalb oder flankierend zu PEST-Sequenzen ein Signal zur Degradation des Proteins darstellen kann [105]. Die Untersuchung der entsprechenden Punktmutanten zeigte, dass die Zerstörung einer einzelnen potentiellen Phosphorylierungsstelle keinen Einfluss auf das Phosphorylierungsmuster hat. Erst die Mutation von zwei oder mehr Aminosäuren führte zur Reduktion der Phosphorylierung. Damit scheinen in diesem Motiv mehrere Aminosäuren phosphoryliert zu werden, wobei die Auswahl der konkreten Phosphorylierungsstellen variabel zu sein scheint.

Die Phosphoaminosäureanalyse der Punktmutanten von IRAK-N118 bestätigte die Vermutung, dass die einzelnen Banden im Phosphorylierungsmuster der Deletionsmutanten unterschiedliche Phosphorylierungsstadien des jeweiligen Moleküls darstellen. So konnte in der unteren Bande von IRAK-N118 lediglich Phosphoserin nachgewiesen werden, während die mittlere Bande zusätzlich Phosphothreonin enthielt. In der obersten Bande, die auf die Phosphorylierung von T113 und T114 zurückgeht, nahm die Menge an Phosphothreonin noch einmal deutlich zu.

Die Strategie der Mutation einzelner Serin- oder Threoninreste konnte nicht auf die Untersuchung der gesamten ProST-Region ausgedehnt werden. Wenn man eine Aminosäure im C-terminalen Bereich der ProST-Region mutiert, sind im restlichen Molekül so viele intakte Phosphorylierungsstellen enthalten, dass man keinen Einfluss der Mutation auf das Bandenmuster mehr beobachten kann.

Obwohl also nicht alle phosphorylierbaren Aminosäuren der ProST-Region einzeln untersucht werden konnten, so zeigt sich doch, dass viele der Serin- und Threoninreste

phosphoryliert werden. Ganz offensichtlich reicht eine Mindestzahl an Phosphorylierungen aus, um die Strukturveränderung von IRAK-1 hervorzurufen, die zur Veränderung des Laufverhaltens in der SDS-PAGE führt. Viele der Phosphorylierungsereignisse scheinen dabei redundant und untereinander austauschbar zu sein, solange die Mindestzahl an Phosphorylierungen nicht unterschritten wird.

4.3 Biologische Konsequenzen der Phosphorylierungen

4.3.1 NF κ B Aktivierung

Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Phosphorylierung von IRAK-1 für die Weiterleitung des Signals nicht erforderlich ist [65, 75, 76, 93]. So wird z. B. die IL-1 induzierte NF κ B Aktivität durch Überexpression einer kinaseinaktiven Mutante von IRAK-1 gesteigert. Auch IRAK-2 und IRAK-M, die keine Kinaseaktivität besitzen, können IRAK-1 im IL-1 und LPS Signalweg ersetzen und die Responsivität IRAK-1 defizienter Zellen wiederherstellen [65, 93].

Wenn die ProST-Region nur eine Bedeutung für die Phosphorylierung hat und keine weiteren Funktionen in der Signaltransduktion übernimmt, sollte sich eine IRAK-1 Mutante ohne ProST-Region genauso verhalten wie kinaseinaktive IRAK-1. In der Tat aktiviert die hier verwendete IRAK- Δ ProST, eine Mutante von IRAK-1, die anstelle der vollständigen ProST-Region (AS 110–211) ein HA Epitoptag enthält, die IL-1 stimulierte NF κ B Aktivität genauso wie kinaseinaktive IRAK-1 oder die Wildtyp Kinase. Diese Deletionsmutante verstärkte zudem in einer Maus T-Zelllinie die IL-1 induzierte IL-2 Synthese genauso wie der Wildtyp. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtung, dass die Kinaseaktivität von IRAK-1, und damit die Phosphorylierung in der ProST-Region, für die Signalweiterleitung nicht erforderlich ist. Gleichzeitig ist die ProST-Region bei der Adapterfunktion, die IRAK-1 im Toll/IL-1R Signalweg ausübt, auch strukturell entbehrlich.

Zwischenzeitlich erschien eine Publikation, deren Ergebnisse zu den hier getroffenen Aussagen im Widerspruch stehen. Durch Überexpression einer IRAK-1 Mutante ohne die Aminosäuren 104–198 (dUD genannt für „*undetermined domain*“) in IRAK-1 defizienten Zellen konnte die IL-1 stimulierte NF κ B Aktivität nicht wiederhergestellt werden, was mit kinaseinaktiver IRAK-1 K239A dagegen erwartungsgemäß gelang [68]. Im Gegensatz zur NF κ B konnte die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) durch die Transfektion von dUD aktiviert werden, was die Autoren zu der Schlussfolgerung veranlasste, dass der NF κ B und der JNK Signalweg sich oberhalb von oder auf der Höhe von IRAK-1 trennen. Da der JNK Signalweg in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, konnte diese Aussage nicht überprüft werden. Li *et al.* behaupten weiterhin, kinaseinaktive IRAK-1 K239A werde nach IL-Stimulation phosphoryliert, dUD dagegen nicht. Folglich stehe die IL-1 induzierte

Modifikation von IRAK-1 im engen Zusammenhang mit der Fähigkeit, NF κ B zu aktivieren [68]. Die Autoren sind dabei die einzigen, die eine Phosphorylierung kinaseinaktiver IRAK-1 in IRAK-1 defizienten Zellen postulieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der anderen oben angesprochenen Veröffentlichungen [65, 75, 76] belegen, dass die Fähigkeit von IRAK-1, NF κ B zu aktivieren, nicht von der Modifikation durch Phosphorylierung abhängig ist.

Die Phosphorylierung von IRAK-1 wird stattdessen für die Verweildauer der Kinase im Rezeptorkomplex und für die Proteolyse am Proteasom verantwortlich gemacht. Ob diese beiden Funktionen nun speziell der ProST-Region zugewiesen werden können, wurde unter Einsatz der IRAK- Δ ProST Mutante untersucht.

4.3.2 Wechselwirkung mit MyD88 und TRAF6

Nachdem IRAK-1 in den Rezeptorkomplex rekrutiert wurde, interagiert die Kinase über ihre Todesdomäne mit der Todesdomäne des Adaptermoleküls MyD88, das an die TIR-Domänen des Rezeptorkomplexes assoziiert vorliegt. IRAK-1 bildet dabei vermutlich ein Homodi- oder -oligomer. Die Wechselwirkung zwischen MyD88 und IRAK-1 ist *in vitro* nur nachweisbar, solange IRAK-1 nicht phosphoryliert ist, also nur bei Einsatz einer kinaseinaktiven Mutante [50, 67]. MyD88 konnte auch mit IRAK- Δ ProST copräzipitiert werden, d. h. die Deletionsmutante verhält sich auch in Bezug auf die Wechselwirkung zu MyD88 wie eine kinaseinaktive IRAK-1 Mutante. Die ProST-Region ist für diese Interaktion also strukturell nicht erforderlich. Die bisherige Modellvorstellung, dass die Phosphorylierung von IRAK-1 für die Abdissoziation von MyD88 verantwortlich ist, kann insofern präzisiert werden, als die Phosphorylierung, die das Verlassen des Rezeptorkomplexes bewirkt, in der ProST-Region stattfindet.

Genauso wie die Assoziation von IRAK-1 an MyD88 ist die Wechselwirkung mit TRAF6 eine Voraussetzung für die Signaltransduktion [74, 80]. Da IRAK- Δ ProST in der Lage ist, das IL-1 Signal zu NF κ B hin weiterzuleiten, musste die Interaktion der Deletionsmutante mit TRAF6 gefordert werden. In der Tat konnte IRAK- Δ ProST mit TRAF6 copräzipitiert werden, d. h. auch für diese Wechselwirkung, die dem C-Terminus von IRAK-1 zugeschrieben wird, ist die ProST-Region nicht notwendig. Dieses Ergebnis steht erneut im Widerspruch zu Li *et al.*, denen die Coimmunpräzipitation von dUD und TRAF6 nicht gelungen ist [68].

4.3.3 Stabilität von IRAK-1

Neben dem Einfluss auf die Interaktion mit MyD88 und TRAF6 wird der Phosphorylierung von IRAK-1 eine Rolle bei der eigenen Proteolyse zugesprochen. IRAK-1 wird nach IL-1 Stimulation innerhalb einiger Sekunden phosphoryliert und anschließend degradiert, so dass das Molekül nach 20 Minuten nicht mehr nachweisbar ist.

Da dieser Prozess durch den Einsatz von Proteasominhibitoren blockiert werden kann, geht man davon aus, dass die Proteolyse von IRAK-1 am Proteasom stattfindet [67, 73]. Wird die Phosphorylierung von IRAK-1 durch den Einsatz eines unspezifischen Kinaseinhibitors verhindert, so kommt es nicht zur Proteolyse [73]. In unstimulierten HepG2 Zellen wurde eine Proteinhalbwertszeit für IRAK-1 von 7 Stunden gemessen, die nach IL-1 Stimulation nur noch ~6 Minuten betrug. Die Lebensdauer von kinaseinaktiver IRAK-1, die sich nicht autophosphorylieren kann, wurde durch IL-1 Stimulation nicht beeinflusst. Das gleiche gilt für die kinaseinaktive Splicevariante IRAK-1b [69].

Insbesondere die ProST-Region könnte für die Proteolyse von IRAK-1 verantwortlich sein, weil dort zahlreiche Phosphorylierungen stattfinden und weil sie zwei PEST-Sequenzen enthält, die in vielen Molekülen ein Proteolysesignal darstellen [105]. In diesem Fall sollte IRAK- Δ ProST genauso wie kinaseinaktive IRAK-1 langsamer degradiert werden als das Wildtyp Molekül. Diese Vermutung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit leider nicht bestätigt werden, weil kein geeignetes Testsystem zur Messung der Proteolyse von IRAK-1 zur Verfügung stand.

Nach transienter Überexpression der verschiedenen IRAK-1 Mutanten konnte im Westernblot keine IL-1 abhängige Abnahme der Proteinmenge nachgewiesen werden. Das Problem dabei besteht darin, dass auch ohne IL-1 Stimulation die gesamte nachweisbare IRAK-1 bereits aktiviert, also phosphoryliert und geschiftet vorliegt. Nach der transienten Transfektion wird soviel IRAK-1 exprimiert, dass es offenbar durch zufällige Oligomerisierung über die Todesdomäne zur konstitutiven Aktivierung und Phosphorylierung kommt. Die zusätzliche Stimulation mit IL-1 hat dann keine Wirkung mehr.

Untransfizierte Zellen exprimieren zu wenig IRAK, als dass das Protein im Westernblot in ausreichender Menge nachweisbar wäre, geschweige denn eine Reduktion der Proteinmenge nach IL-Stimulation gezeigt werden könnte. Der Abbau von IRAK-1 wurde in stabil transfizierten Zellen demonstriert [67]. Da aber keine Zelllinie zur Verfügung stand, die IRAK- Δ ProST stabil überexprimiert, konnte ein solcher Ansatz nicht gewählt werden. Es blieb der Versuch, so viel IRAK-1 transient zu transfizieren, dass das Protein im Westernblot noch nachweisbar war, in der Zelle aber noch nicht durch Oligomerisierung aktiviert wurde. Eine solche Situation konnte leider nicht hergestellt werden. Bereits bei der Transfektion geringster Plasmid-Mengen lag die Kinase in aktivierter Form vor.

4.4 Weitere Modifikationen

Die starke Veränderung des Laufverhaltens von IRAK-1 im Acrylamidgel nach Aktivierung kann nicht allein durch die Molekulargewichtszunahme aufgrund zusätzlich eingefügter Phosphatreste erklärt werden. Ein Phosphatrest hat ein Molekulargewicht von nur rund 80 Dalton, während der Molekulargewichtsshift von IRAK-1 etwa 20 kD umfasst. Daraus ergibt sich die Frage, ob Phosphorylierung die alleinige posttranslationale Modifikation ist, die IRAK-1 widerfährt.

Durch die Inkubation von Wildtyp IRAK-1 mit Proteinphosphatase-1 verschwand das Leitermuster im Polyacrylamidgel, und das gesamte Protein wurde in der untersten Bande fokussiert. Somit konnte nachgewiesen werden, dass der Molekulargewichtsshift und die Ausbildung des Bandenmusters allein durch die Phosphorylierung von IRAK-1 verursacht werden. Falls eine zusätzliche Modifikation stattfindet, so schlägt sie sich nicht im Laufverhalten der Kinase nieder. Dass der Molekulargewichtsshift durch Dephosphorylierung rückgängig gemacht werden kann, ist auch in der Literatur beschrieben [73], allerdings wurde in dem Fall Proteinphosphatase-2A verwendet, mit der IRAK-1 in der vorliegenden Arbeit nicht dephosphoryliert werden konnte.

Als weitere posttranslationale Modifikation neben Phosphorylierung wurde für IRAK-1 bisher nur Ubiquitylierung beschrieben. Allerdings wurde die Ubiquitylierung noch nicht sicher bewiesen. In den beiden Veröffentlichungen derselben Arbeitsgruppe wurde ein diffuser hochmolekularer „Schmier“ oberhalb phosphorylierter IRAK-1 im Westernblot als Hinweis auf Ubiquitylierung verstanden. Die Immunfärbung fand dabei allerdings nur mit anti IRAK Antikörpern statt und nicht mit Antikörpern, die spezifisch Ubiquitin erkennen. Die Ubiquitylierung von IRAK-1 ist eine attraktive Modellvorstellung, weil das Anhängen von Polyubiquitinketten ein Protein zur Degradation an das 26S Proteasom adressieren kann (Übersicht in [110, 111]). In einigen Proteinen, die schnell abgebaut werden, ist die mehrfache Phosphorylierung in PEST-Sequenzen notwendige Voraussetzung für die Ubiquitylierung, so z. B. in den G1 Cyclinen Cln2 [112] und Cln3 [113] oder dem Transkriptionsaktivator Gcn4 [114] in der Hefe.

Die kovalente Bindung von Ubiquitinketten an das Zielprotein vollzieht sich in drei Schritten: Zunächst wird das Ubiquitin an seinem C-terminalen Glycinrest durch ein Ubiquitin aktivierendes Enzym (E1) aktiviert. Das aktivierte Ubiquitin wird dann durch ein Ubiquitin konjugierendes Enzym (E2) auf ein Mitglied aus der Familie der Ubiquitin-Ligasen (E3) übertragen, das spezifisch an das Substrat gebunden ist. Die Ubiquitin-Ligase katalysiert schließlich die kovalente Verknüpfung des Ubiquitinmoleküls mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes im Zielprotein. Polyubiquitinketten entstehen durch die sukzessive Verknüpfung weiterer Ubiquitinmoleküle an Lys48 des jeweils zuvor angehängten Ubiquitins (Übersicht in [111]).

Entgegen den Vermutungen aus der Literatur konnte in dieser Arbeit klar nachgewiesen werden, dass IRAK-1 nicht ubiquitinyliert wird. Sowohl im eigenen als auch in einem auf Proteolyse am Proteasom spezialisierten Labor wurde dieses Ergebnis erzielt. Das bedeutet jedoch nicht, dass der Abbau von IRAK-1 am Proteasom mit diesem Ergebnis unvereinbar ist. Ubiquitinylierung ist nicht unbedingt eine Voraussetzung für die Proteolyse am Proteasom. So wurde z. B. für Ornithindecaboxylase nachgewiesen, dass die Degradation am Proteasom ohne vorherige Ubiquitinylierung stattfindet [115].

4.5 Tollip im Toll/IL-1R Signalweg

4.5.1 Interaktion mit IRAK-1

Tollip wurde als Bindungspartner von IRAK-1 beschrieben, bindet aber nur an unstimulierte, nicht phosphorylierte IRAK-1. Nach Stimulation mit IL-1 wurde Tollip durch Coimmunpräzipitationsexperimente neben MyD88 und IRAK-1 im IL-1 Rezeptorkomplex nachgewiesen [70]. Da Tollip nur mit IL-1RAcP alleine oder mit einem Komplex aus IL-1RI und IL-1RAcP nachgewiesen werden konnte, aber nicht mit IL-1RI alleine, schloss man, dass Tollip nach IL-1 Stimulation an IL-1RAcP bindet und auf diese Weise nicht aktivierte IRAK-1, mit der es assoziiert vorliegt, an den Rezeptorkomplex rekrutiert. Dort kommt es zur Interaktion der Todesdomänen von IRAK-1 und MyD88, woraufhin IRAK-1 aktiviert und phosphoryliert wird. Im Zuge der Phosphorylierung geht die Wechselwirkung mit MyD88 verloren und IRAK-1 verlässt den Rezeptorkomplex wieder. Gleichzeitig bewirkt die Phosphorylierung auch die Dissoziation von Tollip.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche strukturellen Voraussetzungen auf Seiten von IRAK-1 zur Wechselwirkung mit Tollip führen. Dazu wurden zahlreiche Punkt- und Deletionsmutanten von IRAK-1 in Coimmunpräzipitationsexperimente eingesetzt. Aus diesen Experimenten ging hervor, dass der Phosphorylierungsgrad von IRAK-1 für die Interaktion entscheidend ist. Wie schon aus der Literatur bekannt, konnte Tollip gut mit kinaseinaktiver IRAK K239S, aber nicht mit phosphorylierter Wildtyp IRAK-1 copräzipitiert werden. Dazu ist zu bemerken, dass die Copräzipitation mit Wildtyp IRAK-1 in manchen der Experimente durchaus gelang, wenngleich nur wenig Tollip detektiert werden konnte. Das war immer dann der Fall, wenn nicht alle IRAK-1 Moleküle in vollständig geshifteter Form vorlagen und eine diskrete Bande bei etwa 100 kD bildeten, sondern auch in geringerem Maße phosphorylierte IRAK-1 präzipitiert wurde. In Übereinstimmung damit konnte Tollip mit den Punktmutanten T387A und T66A copräzipitiert werden, die zwar nicht kinaseinaktiv sind, aber keinen bzw. einen unvollständigen Molekulargewichtsshift durchlaufen. Tollip assoziiert also nur dann mit IRAK-1, wenn in der ProST-Region keine Phosphorylierung stattfindet. Dementsprechend konnte Tollip auch mit IRAK- Δ ProST copräzipitiert werden. Zusätzlich bedeutet dies, dass die ProST-Region für die Interaktion mit Tollip strukturell nicht erforderlich ist.

Strukturell notwendig und auch ausreichend ist dagegen die Kinasedomäne. Eine Interaktion mit Tollip konnte für IRAK- Δ KD nicht gezeigt, wohingegen mit der isolierten kinaseinaktiven Kinasedomäne Tollip copräzipitiert werden konnte. Dass das mit der aktiven Kinasedomäne nicht gelang, mag daran gelegen haben, dass sich bei der eingesetzten Mutante an die Kinasedomäne N-Terminal noch etwa die Hälfte der ProST-Region anschließt, in der Phosphorylierungen stattfinden können.

Dieses Ergebnis, dass IRAK-1 über die Kinasedomäne mit Tollip interagiert, steht im Widerspruch zu der bisher einzigen Veröffentlichung über die Wechselwirkung von IRAK-1 und Tollip. Die Autoren erwähnen, dass IRAK-1 über die 208 N-terminalen Aminosäuren mit Tollip interagiert, zeigen dazu aber keine Daten [70]. Die 208 N-terminalen Aminosäuren umfassen die Todesdomäne und die ProST-Region. Eine Wechselwirkung zwischen den N-terminalen 195 Aminosäuren von IRAK-1 und Tollip konnte in der vorliegenden Arbeit dagegen nicht dargestellt werden.

In einem *in vitro* Kinaseassay konnte gezeigt werden, dass Tollip durch IRAK-1 phosphoryliert wird. Damit ist Tollip das erste Molekül außer IRAK-1 selbst, das als Substrat für IRAK-1 identifiziert werden konnte. Die Phosphorylierung von Tollip durch IRAK-1 nach Stimulation mit LPS wurde mittlerweile noch von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt [116]. Sehr interessant war in dem *in vitro* Kinaseassay, dass eine echte Coimmunpräzipitation von IRAK K239S und Tollip nur dann möglich war, wenn keine IRAK-1 Kinaseaktivität in Form von IRAK- Δ C in der Probe enthalten war. Das lässt darauf schließen, dass nicht nur die Phosphorylierung in der ProST-Region von IRAK-1 zur Dissoziation von Tollip führt, sondern dass zusätzlich die Phosphorylierung von Tollip die Wechselwirkung mit kinaseinaktiver IRAK-1 verhindert.

4.5.2 Funktion von Tollip

Zur Spekulation über die Funktion von Tollip im Toll/IL-1R Signalweg gibt eine Beobachtung Anlass, die bei einem Coimmunpräzipitationsexperiment entstand. Die Coimmunpräzipitation von kinaseinaktiver IRAK-1 und Tollip gelang nur, wenn beide Moleküle in derselben Zelle coexprimiert wurden. Wenn die beiden Moleküle getrennt exprimiert und erst vor der Präzipitation die Zelllysate gemischt wurden, kam es nicht zur Wechselwirkung. Offenbar ist für die Interaktion also die gemeinsame Expression notwendig. Burns *et al.* stellen dar, dass IRAK-1 vor der Aktivierung im Komplex mit Tollip vorliegt [70]. Möglicherweise wird dieser Komplex bereits bei der gemeinsamen Expression der beiden Moleküle gebildet. Mit anderen Worten fungiert Tollip eventuell als Chaperon von IRAK-1. Durch die Bindung an Tollip erhält IRAK-1 vor der Rekrutierung an den Rezeptorkomplex offenbar keine Gelegenheit zur Oligomerisierung. Nach transienter Transfektion wird IRAK-1 möglicherweise so stark überexprimiert, dass nicht genug Tollip als Bindungspartner zur Verfügung steht. Als Folge kann nicht komplexierte

IRAK-1 über die Todesdomäne oligomerisieren und auf diese Weise im Zusammenspiel mit TRAF6 die Signaltransduktion auslösen.

Burns *et al.* zeigen, dass sich die Überexpression von Tollip dominant negativ auf die IL-1 stimulierte NFκB Aktivität auswirkt [70]. Zu dem gleichen Ergebnis kommt eine andere Arbeitsgruppe, die zunächst die Interaktion von Tollip mit TLR2 und TLR4 demonstriert hat, bei Stimulation mit LPS, wenngleich diese Daten etwas weniger überzeugend sind [116]. Der dominant negative Effekt ließe sich dadurch erklären, dass überschüssiges, nicht mit IRAK-1 komplexiertes Tollip an IL-1RAcP bindet und somit kompetitiv die Bindung von Tollip/IRAK-1 Komplexen verhindert. In den eigenen Experimenten konnte die dominant negative Wirkung von Tollip nicht nachgestellt werden. Die Überexpression hatte auf die IL-1 abhängige NFκB Aktivierung keinerlei Einfluss.

Um sich der Funktion von Tollip im Toll/IL-1R Signalweg von einer anderen Seite her zu nähern, wurde statt das Molekül überzuexprimieren die Expression von Tollip unterbunden. Mit der Methode der RNA Interferenz wird die mRNA des Zielgens in der Zelle spezifisch zerstört, so dass es nicht zur Translation kommen kann [106]. Durch die Transfektion von Swiss 3T3 Zellen mit siRNA gegen murines Tollip konnte die Expression von Tollip unterbunden werden, so dass 48 Stunden nach der Transfektion im Westernblot kein endogenes Tollip mehr nachgewiesen werden konnte. Nachdem die Funktionsfähigkeit der siRNA Präparationen damit überprüft worden war, wurden in einem NFκB Reporterassay die Auswirkungen des Fehlens von Tollip auf die Signaltransduktion untersucht. Auch diese Methodik wurde erfolgreich kontrolliert, indem siRNA gegen IRAK-4 eingesetzt wurde. Die Unterbindung der Expression von Tollip hatte in diesem Experiment keinen Einfluss auf die IL-1 stimulierbare NFκB Aktivität.

Wenn Tollip ein Chaperon von IRAK-1 ist, dürfte die IRAK-1 Expression nicht mehr normal funktionieren, sobald Tollip nicht mehr exprimiert werden kann. Ohne IRAK-1 müsste auch die IL-1 Signaltransduktion deutlich vermindert sein, wie die IRAK-1 *knock out* Maus gezeigt hat. Eine weitere Modellvorstellung war, dass Tollip monomere IRAK-1 bindet und so die Oligomerisierung verhindert. Wenn in diesem Modell Tollip fehlt, müsste die spontane Oligomerisierung von IRAK-1 zur Aktivierung des IL-1 Signalweges führen. Wenn Tollip für die Rekrutierung von IRAK-1 an den Rezeptorkomplex unerlässlich ist, müsste die Abwesenheit von Tollip zum Verlust der IL-1 Signaltransduktion führen. Die experimentellen Daten sprechen für keine dieser drei Erklärungsmöglichkeiten, weil durch die Transfektion der siRNA gegen Tollip weder die IL-1 stimulierte NFκB Aktivität zurückgegangen ist, noch die Signaltransduktion in unstimulierten Zellen gesteigert wurde.

4.6 Die ProST-Region als molekularer Schalter

Obwohl die Strukturen zahlreicher Proteine, die PEST-Sequenzen enthalten, röntgenkristallographisch aufgeklärt wurden, konnten die enthaltenen PEST-Sequenzen nicht aufgelöst werden, weil sie selbst im kristallinen Zustand eine sehr große konformationelle Flexibilität aufweisen [105]. Detlef Neumann aus unserer Arbeitsgruppe hat in Zusammenarbeit mit einem Team von Bioinformatikern und Strukturspezialisten an der Universität von Bologna ein Strukturmodell für IRAK-1 errechnet. Sowohl die Todesdomäne als auch die Kinasedomäne wurden dabei als kompakte globuläre Domänen dargestellt. Für die verbindende ProST-Region konnte dagegen keine zuverlässige Sekundär- oder Tertiärstruktur errechnet werden, weil die zahlreichen Prolinreste eine hohe Flexibilität dieses Sequenzabschnittes erwarten lassen. Demzufolge stellt sich die ProST-Region als ein flexibles Verbindungsglied zwischen zwei recht starren Domänen dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, dass die Phosphorylierungen, die in der ProST-Region von IRAK-1 stattfinden, zur Dissoziation von den Interaktionspartnern MyD88 und Tollip führen. Dabei ist die ProST-Region nicht direkt am Kontakt zu den beiden Molekülen beteiligt. Der Kontakt zu MyD88 wird über die Todesdomänen beider Moleküle hergestellt, der zu Tollip erfolgt über die Kinasedomäne von IRAK-1. Nun ist es vorstellbar, dass die zahlreichen Phosphorylierungsereignisse, die in der flexiblen Gelenkregion zwischen Todes- und Kinasedomäne stattfinden, eine Konformationsänderung induzieren, die die Positionierung der beiden Domänen zueinander so verändert, dass der Kontakt zu MyD88 und Tollip verloren geht. Gleichzeitig könnte ein Sequenzabschnitt aus der ProST-Region, möglicherweise eine PEST-Sequenz, durch die Konformationsänderung offengelegt werden und als Signal für die Degradation am Proteasom fungieren. In diesem Modell hätte die ProST-Region die Funktion eines molekularen Schalters, der durch Phosphorylierung umgelegt wird und die Wechselwirkung von IRAK-1 mit den Komponenten des Rezeptorkomplexes sowie die eigene Proteinstabilität reguliert.

4.7 Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse haben zweierlei Bedeutung. Zum einen wurde hier zum ersten Mal auf molekularer Ebene geklärt, auf welche Weise IRAK-1 mit den verschiedenen Proteinen im aktiven IL-1 Rezeptorkomplex interagiert und wie diese Protein Interaktionen durch Phosphorylierungsereignisse gesteuert werden. Die Erkenntnis, dass IRAK-1 durch Autophosphorylierung die eigene Verfügbarkeit als Signalkoppler im aktiven Rezeptorkomplex zeitlich begrenzt und die Bindung an sein Chaperon und „*silencer*“ Tollip beendet, um optimal mit dem „*downstream* Adaptor“ TRAF6 interagieren zu können, sowie letztlich seine eigene Verfügbarkeit als intaktes Protein

reguliert, ist in dieser Form als Funktionsprinzip neuartig. Unterstrichen wird dies durch die Tatsache, dass neben IRAK-1 nur Tollip als Substrat für die sehr aktive IRAK-1 beschrieben werden konnte.

Über diese für die Grundlagenforschung wichtigen Erkenntnisse hinaus können aus den Ergebnissen dieser Arbeit wichtige Schlüsse für die Entwicklung von IRAK-1 Inhibitoren gezogen werden. Im Gegensatz zu anderen, in verschiedenen Cytokinsignalwegen aktivierten Proteinkinasen, empfiehlt sich hier eine Inhibition der enzymatischen Aktivität der IRAK-1 eben nicht. Denn man müsste dann damit rechnen, dass man in die Schalterfunktion von IRAK-1 inhibitorisch eingreift. Als Folge würden das IL-1 Signal oder im Falle der Toll-ähnlichen Rezeptoren die Signale, die durch mikrobielle Bestandteile ausgelöst werden, eher verlängert und damit verstärkt, als dass sie wie gewünscht verringert oder unterbunden würden. Da die Aktivierung der IRAK-1 jedoch durch eine Reihe von Protein-Protein Interaktionen ausgelöst wird, wäre eine pharmakologische Intervention auf dieser Ebene denkbar. Nachteil eines solchen „Assoziationsinhibitors“ ist jedoch, dass solche Moleküle in der Regel auf Peptid- oder Proteinbasis aufgebaut sind und daher naturgemäß nur sehr schwierig in intakte Zellen hineingebracht werden können, wo sie ihre Wirkung entfalten könnten. Zurzeit sind solche Ansätze technisch noch schwierig. Dass sie jedoch prinzipiell möglich sind, beweist eindrucksvoll die Natur. Pockenviren bedienen sich kleiner Proteine, die sehr wirkungsvoll und spezifisch in die Signaltransduktion der Toll/IL-1 Rezeptor Familie eingreifen [117]. Wenigstens für sehr schwere, akut lebensbedrohende Situationen, wie zum Beispiel den durch LPS über TLR4 vermittelten septischen Schock, könnte man durchaus an eine kurzfristige Therapie mit einem solchen IRAK-1 Assoziationsinhibitor denken, der über ein virales Vehikel in die Zellen eingebracht werden könnte.

5 Literaturverzeichnis

1. O'Neill L (2000). The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence. *Biochem Soc Trans* **28**(5), 557-563.
2. O'Neill LA (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* **2000**(44), RE1.
3. Akira S, Takeda K, and Kaisho T (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**(8), 675-680.
4. Hallman M, Ramet M, and Ezekowitz RA (2001). Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr Res* **50**(3), 315-321.
5. Morisato D, and Anderson KV (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.
6. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, and Hoffmann JA (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**(6), 973-983.
7. Tauszig S, Jouanguy E, Hoffmann JA, and Imler JL (2000). Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(19), 10520-10525.
8. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, and Janeway CA, Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**(6640), 394-397.
9. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, and 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.
10. Beutler B, Du X, and Poltorak A (2001). Identification of Toll-like receptor 4 (Tlr4) as the sole conduit for LPS signal transduction: genetic and evolutionary studies. *J Endotoxin Res* **7**(4), 277-280.
11. Beutler B, and Poltorak A (2000). Positional cloning of Lps, and the general role of toll-like receptors in the innate immune response. *Eur Cytokine Netw* **11**(2), 143-152.
12. Chuang T, and Ulevitch RJ (2001). Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta* **1518**(1-2), 157-161.
13. Aderem A, and Ulevitch RJ (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**(6797), 782-787.
14. Kirschning CJ, Wesche H, Merrill Ayres T, and Rothe M (1998). Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* **188**(11), 2091-2097.
15. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, and 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.
16. Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, and Golenbock DT (1999). Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* **274**(47), 33419-33425.
17. Sasu S, LaVerda D, Qureshi N, Golenbock DT, and Beasley D (2001). Chlamydia pneumoniae and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. *Circ Res* **89**(3), 244-250.

18. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H, and Wagner H (2001). Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* **276**(33), 31332-31339.
19. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, and Kolb H (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* **164**(2), 558-561.
20. Smiley ST, King JA, and Hancock WW (2001). Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* **167**(5), 2887-2894.
21. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, and Aderem A (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**(6832), 1099-1103.
22. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, and Madara JL (2001). Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* **167**(4), 1882-1885.
23. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, and Flavell RA (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**(6857), 732-738.
24. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, and Akira S (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* **3**(2), 196-200.
25. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, and Akira S (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**(6813), 740-745.
26. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, and Kimoto M (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* **189**(11), 1777-1782.
27. Ulevitch RJ, and Tobias PS (1999). Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* **11**(1), 19-22.
28. Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM, and et al. (1988). cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* **241**(4865), 585-589.
29. McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, Cosman D, Lupton SD, Brunton LL, Grubin CE, Wignall JM, Jenkins NA, Brannan CI, and 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.
30. Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, and Ju G (1995). Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem* **270**(23), 13757-13765.
31. Torigoe K, Ushio S, Okura T, Kobayashi S, Taniai M, Kunikata T, Murakami T, Sanou O, Kojima H, Fujii M, Ohta T, Ikeda M, Ikegami H, and Kurimoto M (1997). Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. *J Biol Chem* **272**(41), 25737-25742.
32. Born TL, Thomassen E, Bird TA, and Sims JE (1998). Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling. *J Biol Chem* **273**(45), 29445-29450.
33. Born TL, Smith DE, Garka KE, Renshaw BR, Bertles JS, and Sims JE (2000). Identification and characterization of two members of a novel class of the interleukin-1 receptor (IL-1R) family. Delineation of a new class of IL-1R-related proteins based on signaling. *J Biol Chem* **275**(39), 29946-29954.

34. Kumar S, McDonnell PC, Lehr R, Tierney L, Tzimas MN, Griswold DE, Capper EA, Tal-Singer R, Wells GI, Doyle ML, and Young PR (2000). Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family. *J Biol Chem* **275**(14), 10308-10314.
35. Smith DE, Renshaw BR, Ketchum RR, Kubin M, Garka KE, and Sims JE (2000). Four new members expand the interleukin-1 superfamily. *J Biol Chem* **275**(2), 1169-1175.
36. Dunn E, Sims JE, Nicklin MJ, and O'Neill LA (2001). Annotating genes with potential roles in the immune system: six new members of the IL-1 family. *Trends Immunol* **22**(10), 533-536.
37. Sims JE, and Dower SK (1994). Interleukin-1 receptors. *Eur Cytokine Netw* **5**(6), 539-546.
38. Vigers GP, Anderson LJ, Caffes P, and Brandhuber BJ (1997). Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta. *Nature* **386**(6621), 190-194.
39. Schreuder H, Tardif C, Trump-Kallmeyer S, Soffientini A, Sarubbi E, Akesson A, Bowlin T, Yanofsky S, and Barrett RW (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.
40. Korherr C, Hofmeister R, Wesche H, and Falk W (1997). A critical role for interleukin-1 receptor accessory protein in interleukin-1 signaling. *Eur J Immunol* **27**(1), 262-267.
41. Wesche H, Korherr C, Kracht M, Falk W, Resch K, and Martin MU (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.
42. Slack JL, Schooley K, Bonnert TP, Mitcham JL, Qwarnstrom EE, Sims JE, and Dower SK (2000). Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* **275**(7), 4670-4678.
43. Radons J, Gabler S, Wesche H, Korherr C, Hofmeister R, and Falk W (2002). Identification of essential regions in the cytoplasmic tail of interleukin-1 receptor accessory protein critical for interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* **277**(19), 16456-16463.
44. Heguy A, Baldari CT, Censini S, Ghiara P, and Telford JL (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.
45. Colotta F, Dower SK, Sims JE, and Mantovani A (1994). The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today* **15**(12), 562-566.
46. Neumann D, Kollwe C, Martin MU, and Boraschi D (2000). The membrane form of the type II IL-1 receptor accounts for inhibitory function. *J Immunol* **165**(6), 3350-3357.
47. Lang D, Knop J, Wesche H, Raffetseder U, Kurrle R, Boraschi D, and Martin MU (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.
48. Orlando S, Sironi M, Bianchi G, Drummond AH, Boraschi D, Yabes D, and Mantovani A (1997). Role of metalloproteases in the release of the IL-1 type II decoy receptor. *J Biol Chem* **272**(50), 31764-31769.
49. Kollwe C (1999). Regulation der Interleukin-1 Antwort durch den Typ II Interleukin-1 Rezeptor. Diplomarbeit, Universität Hannover, Fachbereich Chemie
50. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, and Cao Z (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* **7**(6), 837-847.
51. Bonnert TP, Garka KE, Parnet P, Sonoda G, Testa JR, and Sims JE (1997). The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. *FEBS Lett* **402**(1), 81-84.

52. Hultmark D (1994). Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* **199**(1), 144-146.
53. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, and O'Neill LA (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**(6851), 78-83.
54. Horng T, Barton GM, and Medzhitov R (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* **2**(9), 835-841.
55. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, and 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.
56. Seki E, Tsutsui H, Nakano H, Tsuji N, Hoshino K, Adachi O, Adachi K, Futatsugi S, Kuida K, Takeuchi O, Okamura H, Fujimoto J, Akira S, and Nakanishi K (2001). Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta. *J Immunol* **166**(4), 2651-2657.
57. Burns K, Martinon F, Esslinger C, Pahl H, Schneider P, Bodmer JL, Di Marco F, French L, and Tschopp J (1998). MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* **273**(20), 12203-12209.
58. Martin M, Bol GF, Eriksson A, Resch K, and 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.
59. Croston GE, Cao Z, and Goeddel DV (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.
60. Cao Z, Henzel WJ, and Gao X (1996). IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* **271**(5252), 1128-1131.
61. Shelton CA, and Wasserman SA (1993). pelle encodes a protein kinase required to establish dorsoventral polarity in the Drosophila embryo. *Cell* **72**(4), 515-525.
62. Grosshans J, Bergmann A, Haffter P, and 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.
63. Trofimova M, Sprengle AB, Green M, Sturgill TW, Goebel MG, and Harrington MA (1996). Developmental and tissue-specific expression of mouse pelle-like protein kinase. *J Biol Chem* **271**(30), 17609-17612.
64. Muzio M, Ni J, Feng P, and Dixit VM (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* **278**(5343), 1612-1615.
65. Wesche H, Gao X, Li X, Kirschning CJ, Stark GR, and 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.
66. Li S, Strelow A, Fontana EJ, and Wesche H (2002). IRAK-4: A novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(8), 5567-5572.
67. Knop J (2000). Die Signaltransduktion durch den Interleukin-1 Rezeptorkomplex: Funktion und Mechanismus der IL-1 Rezeptor Assoziierten Proteinkinase IRAK. Dissertation, Universität Hannover, Fachbereich Chemie
68. Li X, Commane M, Jiang Z, and Stark GR (2001). IL-1-induced NFkappa B and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation diverge at IL-1 receptor-associated kinase (IRAK). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8), 4461-4465.

69. Jensen LE, and Whitehead AS (2001). IRAK1b, a novel alternative splice variant of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK), mediates interleukin-1 signaling and has prolonged stability. *J Biol Chem* **276**(31), 29037-29044.
70. Burns K, Clatworthy J, Martin L, Martinon F, Plumpton C, Maschera B, Lewis A, Ray K, Tschopp J, and Volpe F (2000). Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol* **2**(6), 346-351.
71. Xiao T, Towb P, Wasserman SA, and Sprang SR (1999). Three-dimensional structure of a complex between the death domains of Pelle and Tube. *Cell* **99**(5), 545-555.
72. Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, Takada H, Wakeham A, Itie A, Li S, Penninger JM, Wesche H, Ohashi PS, Mak TW, and Yeh WC (2002). Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* **416**(6882), 750-756.
73. Yamin TT, and Miller DK (1997). The interleukin-1 receptor-associated kinase is degraded by proteasomes following its phosphorylation. *J Biol Chem* **272**(34), 21540-21547.
74. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, and Goeddel DV (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* **383**(6599), 443-446.
75. Knop J, and Martin MU (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.
76. Maschera B, Ray K, Burns K, and Volpe F (1999). Overexpression of an enzymically inactive interleukin-1-receptor-associated kinase activates nuclear factor-kappaB. *Biochem J* **339**(Pt 2), 227-231.
77. Knop J, Wesche H, Lang D, and Martin MU (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.
78. Park YC, Burkitt V, Villa AR, Tong L, and Wu H (1999). Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature* **398**(6727), 533-538.
79. Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y, and 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.
80. Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, van der Heiden A, Itie A, Wakeham A, Khoo W, Sasaki T, Cao Z, Penninger JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV, and Mak TW (1999). TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* **13**(8), 1015-1024.
81. Naito A, Azuma S, Tanaka S, Miyazaki T, Takaki S, Takatsu K, Nakao K, Nakamura K, Katsuki M, Yamamoto T, and Inoue J (1999). Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells* **4**(6), 353-362.
82. Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, and 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.
83. Ono K, Ohtomo T, Sato S, Sugamata Y, Suzuki M, Hisamoto N, Ninomiya-Tsuji J, Tsuchiya M, and Matsumoto K (2001). An evolutionarily conserved motif in the TAB1 C-terminal region is necessary for interaction with and activation of TAK1 MAPKKK. *J Biol Chem* **276**(26), 24396-24400.

84. Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Ninomiya-Tsuji J, and Matsumoto K (2000). TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* **5**(4), 649-658.
85. Takaesu G, Ninomiya-Tsuji J, Kishida S, Li X, Stark GR, and Matsumoto K (2001). Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* **21**(7), 2475-2484.
86. Qian Y, Commene M, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, and Li X (2001). IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NFkappa B. *J Biol Chem* **276**(45), 41661-41667.
87. Irie T, Muta T, and Takeshige K (2000). TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Lett* **467**(2-3), 160-164.
88. Kishimoto K, Matsumoto K, and Ninomiya-Tsuji J (2000). TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *J Biol Chem* **275**(10), 7359-7364.
89. Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, and Chen ZJ (2000). Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**(2), 351-361.
90. Hatada EN, Krappmann D, and Scheidereit C (2000). NF-kappaB and the innate immune response. *Curr Opin Immunol* **12**(1), 52-58.
91. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, and Chen ZJ (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**(6844), 346-351.
92. Chang L, and Karin M (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**(6824), 37-40.
93. Li X, Commene M, Burns C, Vithalani K, Cao Z, and Stark GR (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.
94. Thomas JA, Allen JL, Tsen M, Dubnicoff T, Danao J, Liao XC, Cao Z, and Wasserman SA (1999). Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase. *J Immunol* **163**(2), 978-984.
95. Kanakaraj P, Schafer PH, Cavender DE, Wu Y, Ngo K, Grealish PF, Wadsworth SA, Peterson PA, Siekierka JJ, Harris CA, and Fung-Leung WP (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.
96. Kanakaraj P, Ngo K, Wu Y, Angulo A, Ghazal P, Harris CA, Siekierka JJ, Peterson PA, and Fung-Leung WP (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.
97. Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12), 5463-5467.
98. Graham FL, and van der Eb AJ (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**(2), 456-467.
99. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith GA, and Struhl K. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates/Wiley & Sons, New York
100. McCutchan JH, and Pagano JS (1968). Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran. *J Natl Cancer Inst* **41**(2), 351-357.

101. Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**(1-2), 55-63.
102. Bradford MM (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.
103. Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-685.
104. Schaegger H, and von Jagow G (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**(2), 368-379.
105. Rechsteiner M, and Rogers SW (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* **21**(7), 267-271.
106. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, and Tuschl T (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**(6836), 494-498.
107. Sharp PA (2001). RNA interference--2001. *Genes Dev* **15**(5), 485-490.
108. Feinstein E, Kimchi A, Wallach D, Boldin M, and Varfolomeev E (1995). The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends Biochem Sci* **20**(9), 342-344.
109. Hanks SK, and Hunter T (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J* **9**(8), 576-596.
110. Hershko A, and Ciechanover A (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-479.
111. Ciechanover A (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *Embo J* **17**(24), 7151-7160.
112. Lanker S, Valdivieso MH, and Wittenberg C (1996). Rapid degradation of the G1 cyclin Cln2 induced by CDK-dependent phosphorylation. *Science* **271**(5255), 1597-1601.
113. Yaglom J, Linskens MH, Sadis S, Rubin DM, Futcher B, and Finley D (1995). p34Cdc28-mediated control of Cln3 cyclin degradation. *Mol Cell Biol* **15**(2), 731-741.
114. Kornitzer D, Raboy B, Kulka RG, and Fink GR (1994). Regulated degradation of the transcription factor Gcn4. *Embo J* **13**(24), 6021-6030.
115. Hayashi S, Murakami Y, and Matsufuji S (1996). Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein. *Trends Biochem Sci* **21**(1), 27-30.
116. Zhang G, and Ghosh S (2002). Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem* **277**(9), 7059-7065.
117. Bowie A, Kiss-Toth E, Symons JA, Smith GL, Dower SK, and O'Neill LA (2000). A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18), 10162-10167.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christian Kollewe
Geburtsdatum, -ort: 4. Juni 1974 in Hildesheim
Adresse: Nelkenstraße 12
30167 Hannover

Schulbildung

08/1980–07/1984 Grundschule Ochtersum, Hildesheim
08/1984–07/1986 Orientierungsstufe der St.-Augustinus-Schule, Hildesheim
08/1986–05/1993 Bischöfliches Gymnasium Josephinum, Hildesheim
05/1993 Abitur

Hochschulstudium

10/1993–08/1999 Diplomstudiengang Biochemie im Fachbereich Chemie der
Universität Hannover
12.09.1995 Vordiplom
02/1999–08/1999 Diplomarbeit im Institut für Pharmakologie der
Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe
von Prof. Dr. M. Martin:
Die Regulation der Interleukin-1 Antwort durch den Typ II
Interleukin-1 Rezeptor
02.08.1999 Diplom
09/1999–06/2002 Dissertationsarbeit im Institut für Pharmakologie der
Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe
von Prof. Dr. M. Martin