

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Höfler)

Untersuchungen zur Signaltransduktion des IL-1R-homologen T1-Rezeptors

Ingrid Ruth Dudeck

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler
2. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel

Die Dissertation wurde am 21.05.2002 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 04.09.2002
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
I Abkürzungsverzeichnis	6
II Einleitung	9
1. Die T1-Expression	9
2. Der T1-Ligand	10
3. Die Funktion von T1	11
3.1. Funktion von T1 bei der Gewebedifferenzierung bzw. Tumorigenese	11
3.2. Beteiligung von T1 an der Immunabwehr	12
4. T1 als Mitglied der Interleukin-1-Rezeptor-Familie	13
4.1. Der IL-1- und der IL-18-Rezeptor	15
5. Die TIR-Familie	16
5.1. Toll-Rezeptoren	17
6. TIR-induzierte Signalkaskaden	18
6.1. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B	18
6.2. Die Aktivierung der MAP-Kinasen	20
7. Ziel der Arbeit	22
III Material und Methoden	23
1. Bezugsquellennachweis	23
1.1. Chemikalien und Radiochemikalien	23
1.2. Enzyme und entsprechende Puffer	25
1.3. Antikörper und Wachstumsfaktoren	25
1.4. Längen- und Proteinstandards	26
1.5. Reagenziensätze und "Kits"	27
1.6. Sonstiges Verbrauchsmaterial	27
1.7. Geräte	27
2. Kultivierung eukaryontischer Zelllinien	28
2.1. Eukaryontische Zelllinien	28
2.2. Nährmedien und Lösungen	28
2.3. Anzucht und Konservierung eukaryontischer Zellen	29
2.3.1. Kultivierung von Adhäsionszellen	29
2.3.2. Konservierung von Adhäsionszellen	29
2.3.3. Kultivierung von Suspensionszellen	29
2.3.4. Konservierung von Suspensionszellen	30
3. Transfektion eukaryontischer Zellen durch <i>LipofectAMINE</i>	30
3.1. Transfektion adhärenter Zellen (HEK 293- bzw. HEK 293T-Zellen)	30
3.2. Transfektion von Suspensionszellen (Jurkat)	30

4.	Bakterienkultur	31
4.1.	Bakterienstämme	31
4.2.	Nährmedien für Bakterienkultur	31
4.3.	Konservierung von Bakterien	32
5.	Transformation von Bakterien	32
5.1.	Herstellung elektrokompetenter Zellen	32
5.2.	Transformation kompetenter Zellen durch Elektroporation	33
6.	Oligonucleotide und Vektoren	33
6.1.	Oligonucleotide	33
6.2.	Vektoren	33
6.3.	Rezeptorkonstrukte, Reporterplasmide und Transfektionskontrollen	34
7.	Allgemeine molekularbiologische Methoden im Umgang mit DNS	34
7.1.	Restriktion von DNS	34
7.2.	Dephosphorylierung linearisierter Vektoren durch alkalische Phosphatase	35
7.3.	Ethanol-fällung	35
7.4.	Verknüpfung von DNS-Fragmenten mit T4-DNS-Ligase	35
7.5.	Plasmidpräparation aus Bakterien	36
7.6.	Plasmidpräparation aus Eukaryontenzellen	36
7.7.	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	36
7.8.	PCR „Polymerase Chain Reaktion“	37
8.	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS	37
8.1.	Auftrennung von DNS durch Agarosegelelektrophorese	37
8.2.	DNS-Isolierung aus präparativen Agarosegelen	38
9.	Transfer und Nachweis von DNS auf Membranen	38
9.1.	Transfer von DNS auf Membranen (Southern Blot)	38
9.2.	Herstellung von Replikafiltern für die Hybridisierung mit DNS-Sonden	39
9.3.	Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden durch PCR	39
9.4.	Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Sonde	40
10.	Herstellung rekombinanter Proteine	41
11.	Analyse von Proteinen	41
11.1.	Konzentrationsbestimmung nach Bradford	41
11.2.	Proteinfällung mit Aceton	41
11.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
11.4.	Übertragung von Proteinen auf Membranen (Western Blot)	42
11.5.	Nachweis von Proteinen auf Membranen	43
11.5.1.	Nachweis durch ECL	43
11.5.2.	Nachweis mit dem ABC-System von Vector	43
11.5.3.	Nachweis mit BCIP und NBT	43
11.6.	Strippen von Membranen	44
11.7.	Biotinylierung von Antikörpern	44
12.	Beschichtung von Zellkulturplatten mit Antikörpern	45
13.	Die λZAP Express-Phagenbank	45
13.1.	Herstellung der λ ZAP Express-Phagenbank	45
13.2.	Titerbestimmung	45
13.3.	Amplifikation der λ ZAP Express-Phagenbank	46
13.4.	Hybridisierung von Replikafiltern mit rekombinanten Proteinen	47
13.5.	Ausschneiden des pBK-CMV-Plasmids aus dem ZAP Express-Vektor	49

13.6.	Herstellung T1-gekoppelter <i>DynaBeads</i>	50
13.7.	Zellen sortieren mittels <i>DynaBeads</i>	50
14.	Herstellung, Amplifikation und „Screen“ der T7-Phagenbanken	51
14.1.	Bestimmung des Phagentiters	51
14.2.	Biopanning	51
14.3.	Beschichtung von Mikrotiterplatten mit rekombinantem Protein	52
15.	Immunpräzipitation biotinylierter Oberflächenproteine	52
16.	Reporteranalysen	53
17.	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	54
IV	Ergebnisse	55
1.	Identifizierung des T1-Liganden	55
1.1.	Herstellung und Reinigung der rekombinanten Proteine	55
1.2.	Durchflusszytometrischer Nachweis des putativen T1-Liganden	55
1.3.	Die λ ZAP Express-Phagenbank	56
1.3.1.	Herstellung und Charakterisierung der λ ZAP Express-Phagenbank	56
1.3.2.	Etablierung einer geeigneten Hybridisierungsmethode	57
1.3.3.	Screen der λ ZAP-Express-Bank	58
1.4.	Anreicherung von ligandenträgenden Zellen durch T1S-gekoppelte <i>DynaBeads</i>	58
1.4.1.	Etablierung des Systems	59
1.4.2.	Screen der cDNS Bank	59
1.5.	Ligandenscreening nach der <i>Phage-display</i> -Methode	60
1.5.1.	Herstellung und Charakterisierung der T7-Phagenbank	60
1.5.2.	Anreicherung T1-bindender Phagen durch "Biopanning"	61
1.6.	Immunpräzipitation des T1-Liganden durch Bindung an mT1S/FLAG	62
2.	Untersuchung der T1-induzierten Signalwege	62
2.1.	Klonierung von Rezeptoren, Hybridrezeptoren und Deletionsmutanten	63
2.1.1.	Durchflusszytometrischer Nachweis der Rezeptoren auf der Zelloberfläche	65
2.2.	Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B	67
2.2.1.	NF- κ B-Aktivierung durch Überexpression von TIM	67
2.2.2.	TIM-abhängige Induktion von NF- κ B durch „Cross-linking“	69
2.2.3.	Untersuchung der T1-induzierten Signalkaskaden durch Hybridrezeptoren	71
2.3.	Untersuchung der NF- κ B-Signalkaskade	72
2.3.1.	Einfluss von IL-1RAcP auf die NF- κ B-Induktion	72
2.3.2.	Beteiligung von MyD88 an der T1-induzierten NF- κ B-Induktion	73
2.3.3.	Beteiligung von TRAF 6 an der T1-induzierten NF- κ B-Aktivierung	75
2.3.4.	NF- κ B-Aktivierung durch Abbau des Inhibitors I κ B	79
2.3.5.	NF- κ B-Aktivierung über die Phosphatidylinositol-3-Kinase	83
2.4.	Untersuchung der MAPK-Signalwege	85
2.4.1.	Aktivierung der Stresskinasen p38-MAPK und JNK	85
2.4.2.	Aktivierung der p42/44-MAP-Kinase in ILT1-transfizierten 293T-Zellen	86
2.4.3.	Aktivierung der p44/42-MAP-Kinase über die MAPK-Kinase MKK1/2	87
2.4.4.	Beteiligung von MyD88 und TRAF6 an der Aktivierung von p44/42 und JNK	88

V	Diskussion	90
1.	Der T1-Ligand	90
2.	Untersuchung der Signalkaskaden	92
3.	Die T1-induzierte NF- κ B-Signalkette	94
4.	Induktion der MAPK	97
VI	Zusammenfassung	99
VII	Literaturverzeichnis	100

I Abkürzungsverzeichnis

βGal	β-Galaktosidase
Ω	Ohm
°C	Grad Celsius
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
18W	18-Wheeler
A	Ampere
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AcPL	„accessory protein-like“
Akt	„PI3K-activated protein kinase“
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen präsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Aqua pur.	Entmineralisiertes Wasser
AS	Aminosäuren
ASK1	“apoptosis signal-regulating kinase 1”
ATF2	“activating transkription factor 2”
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BIS	Bisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytidin
ca.	Circa
CD	“cluster of differentiation”
cDNS	Komplementäre DNS
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm ("calf intestine phosphatase")
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CO ₂	Kohlendioxid
CTP	Cytidintriphosphat
DD	„death domain“
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECSIT	“evolutionary conserved signalling intermediate in Toll pathway”
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-Aminoethyl-Ether) N,N,N',N'-Tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum

ERK	“extracellular signal-regulated kinase”
Fa.	Firma
FACS	Durchflußzytometrie ("fluorescence-activated cell sorting")
Fc	"Fragment crystallizable"
FKS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulatorischer Faktor
h	Stunde(n)
HRP	Meerrettich-Peroxidase
hsp	Hitzeschockprotein
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
IL-1, IL-8, IL-12 usw.	Interleukin-1, Interleukin-8, Interleukin-12 usw.
IL-18R	Interleukin-18 Rezeptor
IL-1RAcP	Interleukin-1 Rezeptor accessorisches Protein
IL-1RI	Interleukin-1 Rezeptor TypI
IL-1RII	Interleukin-1 Rezeptor TypII
IL-1Rrp2	“IL-1 receptor related protein 2”
I κ B	Inhibitor des „nuclear factor κ B“
IPTG	Isopropyl beta-D-thiogalactopyranosid
IRAK	"IL-1 receptor-activated kinase"
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
LMP	„low melting point“
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
mA	Milliampere
mAb	Monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase ("mitogen-activated protein kinase")
max.	Maximal
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
min.	Minimal
MKK	MAPK-Kinasen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMCP	Murine Mastzellprotease
mmol	Millimol
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
MyD88	“myeloid differentiation factor 88”
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
Neg.	Negativ
NF- κ B	„nuclear factor κ B“

NIK	“NF- κ B inducing kinase”
NK	Negativkontrolle
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")
PE	Phycoerythrin
pfu	Plaque-bildende Einheit ("plaque forming unit")
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
pM	Picomolar
Pos.	Positiv
r	Rekombinant
RHR	Rel-homologe Region
RIP	“receptor interacting protein”
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI 1640	“Roswell Park Memorial Institute”-Kulturmedium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
SAPK	Stressaktivierte MAP-Kinasen („stress-activated protein kinases“)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek.	Sekundär
SFM	Serumfreies Medium
SSC	„standard saline citrate“
T	Thymin
TAK1	“transforming growth factor- β -activated kinase 1”
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris/HCl/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TH1/TH2	T-Helferzelle des Typs 1 oder 2
TIR-Domäne bzw. -Familie	Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne bzw. -Familie
TLR	“toll-like receptor”
TM-Domäne	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrose-Faktor
TRADD	“TNF-R1-associated death domain protein”
TRAF-2, -6 usw.	"tumor necrosis factor receptor-associated factor-2, -6"
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Einheit(en)
ÜN	über Nacht
UTP	Uraciltriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

II Einleitung

Das Glykoprotein T1 bzw. ST2 wurde ursprünglich als ein Protein, dessen Expression in Fibroblasten durch die Onkogene Ha-ras und v-mos sowie durch Serumfaktoren induziert werden kann, identifiziert (Klemenz et al., 1989; Werenskiold et al., 1989).

Murines T1 und das homologe Protein der Ratte fit-1 (Bergers et al., 1994) werden sowohl als sezerniertes (T1S, ST2) als auch als membranständiges Protein (T1M, ST2L) exprimiert (Yanagisawa et al., 1993). Die korrespondierende mRNA des membranständigen T1M hat eine Länge von 5 kb und wird in ein 567 AS großes Protein translatiert. T1M besitzt drei Immunglobulindomänen in der extrazellulären Region und eine putative Transmembrandomäne. Die sezernierte lösliche T1-Form entspricht weitgehend der extrazellulären Domäne des membranständigen Rezeptors. Die 2,7 kb große mRNA des sezernierten T1S wird in ein 38 kDa Protein (337 AS) übersetzt, das nach heterologer Glykosylierung einer Größe von 60-70 kDa entspricht (Werenskiold et al., 1992).

Die beiden Varianten entstehen durch differentielles Spleißen (Bergers et al., 1994). Das murine T1-Gen setzt sich aus mindestens 9 Exons zusammen. Bei der Entstehung des 2,7 kb großen T1S-Transkripts wird eine Spleißstelle im Exon 8 übergangen und die Transkription durch ein Stopcodon am Ende dieses Exons beendet.

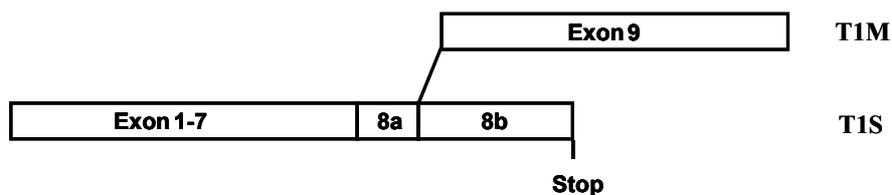


Abb. 1: Spleißvarianten T1M und T1S des murinen T1-Gens

1. Die T1-Expression

Das Expressionsmuster von T1 in murinem Gewebe ist zelltypspezifisch streng reguliert. Es wurde gezeigt, dass T1 in nichthämatopoetischen Zellen fast ausschließlich während der Embryonalentwicklung bestimmter Gewebe wie Knochen, Haut und Brustgewebe exprimiert wird. In diesen Geweben wird vor allem die lösliche T1-Variante transkribiert. Im Gegensatz dazu ist die T1-Expression in hämatopoetischen Zellen nicht auf die Ontogenese beschränkt.

In diesen Zellen wird bevorzugt der membranständige T1-Rezeptor exprimiert (Thomassen et al., 1995; Rossler et al., 1995).

Es konnte gezeigt werden, dass T1M vor allem auf Mastzellen (Moritz et al., 1998) und T-Helfer-Zellen des Typs II (TH2-Zellen, Yanagisawa et al., 1997; Xu et al., 1998; Lohning et al., 1998) exprimiert wird. T1S dagegen wird hauptsächlich von Fibroblasten sezerniert (Gachter et al., 1996; Moritz et al., 1998). Die T1-Transkription wird in den verschiedenen Zelltypen durch unterschiedliche Promotoren induziert. Der stromaufwärts liegende distale Promotor reguliert die Transkription in hämatopoetischen Zellen wie Mastzellen, während der 10,5 kb stromabwärts liegende proximale Promotor die Expression in Fibroblasten steuert (Gachter et al., 1996). Die alternativen ersten Exons werden jeweils an das Exon 2 gespleißt, welches den Translationsstartpunkt enthält. Der fibroblastenspezifische Promotor ist AP-1-abhängig und z.B. durch Serumfaktoren, proinflammatorische Zytokine und Reize wie UV-Licht induzierbar (Thomassen et al., 1995; Kumar et al., 1997). Der mastzellspezifische Promotor ist im Gegensatz dazu konstitutiv aktiv und unabhängig von Serumfaktoren (Thomassen et al., 1995).

Die Transkription des humanen T1 wird ebenfalls durch zwei alternative Promotoren initiiert. Es wurden bisher drei T1-Spleißvarianten identifiziert und kloniert. Hier hat sich die Nomenklatur ST2 etabliert. Neben den bekannten Varianten ST2 und ST2L, welche der löslichen und der membranständigen T1-Form entsprechen, gibt es eine dritte, 1,4 kb große Spleißvariante (ST2V). Bei dieser Variante findet die Termination am Ende eines zusätzlichen Exons (5E) statt, welches zwischen Exon 5 und 6 liegt (Tominaga et al., 1992; Tominaga et al., 1999; Li et al., 2000).

RT-PCR-Studien an zahlreichen humanen Geweben zeigten u.a. eine hohe T1M-Expression in der Milz (Li et al., 2000). Dies steht im Einklang mit den Erkenntnissen im murinen System, welche zeigen, dass T1 eine Rolle in der Immunabwehr spielt und auf TH2-Zellen exprimiert wird (Xu et al., 1998; Lohning et al., 1998). Expressionsunterschiede in humanem und murinem Gewebe lassen aber auf weitere physiologische Funktionen außerhalb des Immunsystems schließen (Li et al., 2000).

2. Der T1-Ligand

Obwohl der T1-Rezeptor bereits seit vielen Jahren bekannt ist, konnte bisher noch kein funktioneller Ligand isoliert werden. Kumar konnte 1995 durch Bindung an rekombinantes T1S einen potentiellen Liganden in Balb/c 3T3-Zellen nachweisen.

Die Behandlung von Jurkat-Zellen mit konzentriertem, konditioniertem Medium von Balb/c 3T3-Zellen führte zu einer 2,5fachen Aktivierung der p38-MAP-Kinase. Der Arbeitsgruppe gelang es allerdings nicht, den Liganden zu klonieren.

Mittels Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass die humane Glioblastomzelllinie A172 ein T1-bindendes Protein exprimiert. Die mRNA dieser Zelllinie wurde 1996 von Gayle zur Herstellung einer cDNA-Bank für die Expression in Säugerzellen (pDC410) verwendet. Aus dieser wurden durch Transfektion unterschiedlicher Pools in CV1/EBNA-Zellen und anschließende Inkubation mit rekombinantem T1-Protein T1-bindende Klone isoliert. Auf diese Weise konnten zwei potentielle Liganden kloniert werden, ein Nachweis für deren Funktionalität fehlt jedoch bislang.

3. Die Funktion von T1

Die Funktion von T1 ist im Detail noch weitgehend ungeklärt. Im wesentlichen gibt es zwei potentielle Funktionsfelder. Es gibt Anhaltspunkte für eine Beteiligung an der Immunabwehr. Ausserdem scheint es eine Rolle bei der Gewebedifferenzierung bzw. Tumorigenese zu spielen.

3.1. Funktion von T1 bei der Gewebedifferenzierung bzw. Tumorigenese

Es gibt Hinweise für eine Beteiligung von T1 an der Differenzierung von Mastzellen, die TIM auf hohem Niveau exprimieren (Rossler et al., 1995; Moritz et al., 1998; Rupp et al., 2000).

Auch eine Beteiligung von T1 an der Differenzierung von Osteoblasten wird diskutiert. Während der Osteogenese wird T1 von Osteoblasten synthetisiert. In invasiven Osteosarkomen kommt es zu einer Reexpression von T1S in den Osteosarkomzellen. Dies weist auf eine Beteiligung von T1 bei der frühen Knochendifferenzierung hin. Es konnte gezeigt werden, dass T1 während der frühen proliferativen Phase der Differenzierung osteoblastischer Zellen synthetisiert wird (Werenskiold et al., 1995).

Mit Hilfe eines *in vivo*-Modells, bei welchem die T1-Expression der murinen Osteosarkomzelllinie K12 durch die stabile Transfektion eines T1-Antisense-Konstrukts inhibiert (K12 AS) war, konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Blockierung der T1-Synthese die osteogene Differenzierung stört (Werenskiold et al., 1999).

Die Injektion der verschiedenen K12-Zelllinien führt in syngenem Balb/c-Mäusen zur Bildung von anaplastischen, nicht mineralisierten, mit Bindegewebsmastzellen infiltrierten Tumoren. Es konnte gezeigt werden, dass die Tumorzinzidenz nach Injektion von K12-Antisense-Transfektanten deutlich reduziert war (Werenskiold et al., 1999).

Auch in Mamakarzinomen kann es zu einer Reexpression von T1 kommen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass T1 in nodal-negativen Tumoren oft überexprimiert vorliegt (Werenskiold et al., 2000). Semiquantitative immunhistochemische Untersuchungen zeigten außerdem, dass die Überexpression von löslichem T1 (T1S) in Tumorgewebe mit einem verbesserten rezidivfreien Überleben der Patientinnen korreliert (Prechtel et al., 2001).

3.2. Beteiligung von T1 an der Immunabwehr

Zahlreiche Studien belegen eine Beteiligung des T1-Rezeptors an immunregulatorischen Prozessen der T-Helfer-Zellen des Typs II. Nach Antigenkontakt erfahren CD4-positive, nicht determinierte T-Helfer-Zellen (TH0-Zellen) eine funktionelle Differenzierung in zwei unterschiedliche Subpopulationen TH1 und TH2. Diese Differenzierung ist abhängig von der Art der Antigenpräsentation (verschiedene APC, MHC-Gene, costimulatorische Moleküle, Antigenkonzentration und -struktur) und dem vorherrschenden Zytokinmilieu. Vor allem die Zytokine IL-4 und IL-12 spielen dabei eine wichtige Rolle, wobei IL-12 die Differenzierung in TH1-Zellen und IL-4 die Differenzierung in TH2-Zellen fördert (Constant et al., 1997; O'Garra, 1998).

TH1-Zellen sezernieren hauptsächlich IL-2, Interferon- γ , TNF- α und GM-CSF. Sie führen über die Aktivierung von Makrophagen zu ausgeprägten Entzündungsprozessen und sind vor allem an den Immunreaktionen gegen intrazelluläre Pathogene beteiligt. Außerdem werden sie mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht.

TH2-Zellen dagegen sezernieren vor allem die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und aktivieren B-Zellen, die wiederum mit der Produktion von Antikörpern reagieren. Sie sind wichtig bei Abwehrreaktionen gegen extrazelluläre Pathogene und aktivieren die humorale Immunantwort. Sie sind außerdem beteiligt an allergischen Reaktionen (Zusammenfassungen in Mosmann et al., 1996; O'Garra et al., 1998; Abbas et al., 1996). Das unterschiedliche Zytokinmuster der beiden Zellpopulationen scheint durch zellspezifische Expression unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren zustande zu kommen. TH2-Zellen exprimieren die Transkriptionsfaktoren GATA-3 und c-maf (zur Übersicht: Murphy et al., 2000), wohingegen TH1-Zellen T-bet exprimieren (Szabo et al., 2000).

Von mehreren Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass der T1-Rezeptor auf TH2-Zellen exprimiert wird. Auf TH1-Zellen konnte der Rezeptor dagegen nicht nachgewiesen werden (Xu et al., 1998; Lohning et al., 1998; Lohning et al., 1999; Kropf et al., 1999). Naive CD4⁺-Zellen exprimieren noch kein T1, die meisten CD4⁺-Zellen werden aber T1-positiv, wenn sie unter TH2-polarisierenden Bedingungen wiederholt mit Antigenen stimuliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass T1 wichtig für die TH2-vermittelte Immunantwort ist. Die Behandlung mit Antikörpern gegen T1 oder mit rekombinantem löslichen T1S führen in einem Modellsystem für adoptives Asthma zu einer abgeschwächten Immunreaktion und zu einer verminderten Produktion der TH2-typischen Zytokine IL-4 und IL-5. Die T1-Expression scheint aber nicht abhängig von der Produktion der Zytokine IL-4, IL-5 oder IL-10 zu sein (Xu et al., 1998; Lohning et al., 1998; Coyle et al., 1999). Die Beteiligung von T1 an der TH2-Immunreaktion konnte in einem weiteren Modellsystem mit *Schistosoma mansoni*-Infektionen bestätigt werden (Lohning et al., 1999).

Untersuchungen an weiteren hämatopoetischen Zelllinien bestätigten die Beteiligung von T1 an immunregulatorischen Prozessen. So konnte nach einer Behandlung mit bakteriellen Lipopolysacchariden *in vitro* (humane Monozyten) und *in vivo* (murines Muskelgewebe und Milz) eine erhöhte IL-1RI-, MyD88- und T1-Expression nachgewiesen werden (Saccani et al., 1998). Proinflammatorische Stimulanzen wie TNF- α , IL-1 α und IL-1 β induzieren die T1-Expression in 3T3-Zellen und die Bestrahlung mit UV-Licht führt *in vivo* ebenfalls zu einer erhöhten T1-Expression (Kumar et al., 1997).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass lösliches humanes T1 an Makrophagen aus dem Knochenmark (bone marrow-derived macrophages, BMM) bindet und dass diese Bindung durch die Behandlung der Zellen mit LPS verstärkt werden kann. Die Behandlung der Zellen mit rekombinantem löslichen T1 führte zu einer Verringerung der LPS-induzierten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-12 oder TNF- α (Sweet et al., 2001).

4. T1 als Mitglied der Interleukin-1-Rezeptor-Familie

Der T1-Rezeptor ist ein Mitglied der Interleukin-1-Rezeptor-Familie. Die Mitglieder dieser Familie weisen drei Immunglobulindomänen in der extrazellulären Domäne auf und haben große Sequenzhomologien innerhalb der zytoplasmatischen Region (Yanagisawa et al., 1993).

Zu den Mitgliedern zählen u.a. neben T1 die Interleukin-1-Rezeptoren I und II (IL-1RI, IL-1RII), das IL-1R accessorische Protein (IL-1RAcP), der IL-18-Rezeptor-1 (IL-18R1), das entsprechende accessorische Protein (AcPL) und ein weitgehend unbekannter Rezeptor (IL-1Rrp2), dessen Ligand kürzlich identifiziert werden konnte (Debets et al., 2001).

Außer dem Gen für das IL-1RAcP sind die kodierenden Sequenzen aller oben genannten Proteine auf einem Gencluster auf dem Chromosom 2q12 lokalisiert (Dale et al., 1999; Li et al., 2000). Innerhalb der IL-1R-Familie weist T1 den höchsten Verwandtschaftsgrad mit dem namengebenden Interleukin-1-Rezeptor auf. Bei den murinen Rezeptoren sind es auf Proteinebene ca. 25% Homologie im extrazellulären und ca. 38% im intrazellulären Bereich (Yanagisawa et al., 1993).

Die große Homologie zwischen den beiden Rezeptoren legte die Vermutung nahe, dass es sich bei dem T1-Rezeptor um ein IL-1-bindendes Protein handelt. Dies konnte jedoch mehrfach widerlegt werden (Rossler et al., 1995; Kumar et al., 1995; Gayle et al., 1996; Yanagisawa et al., 1997).

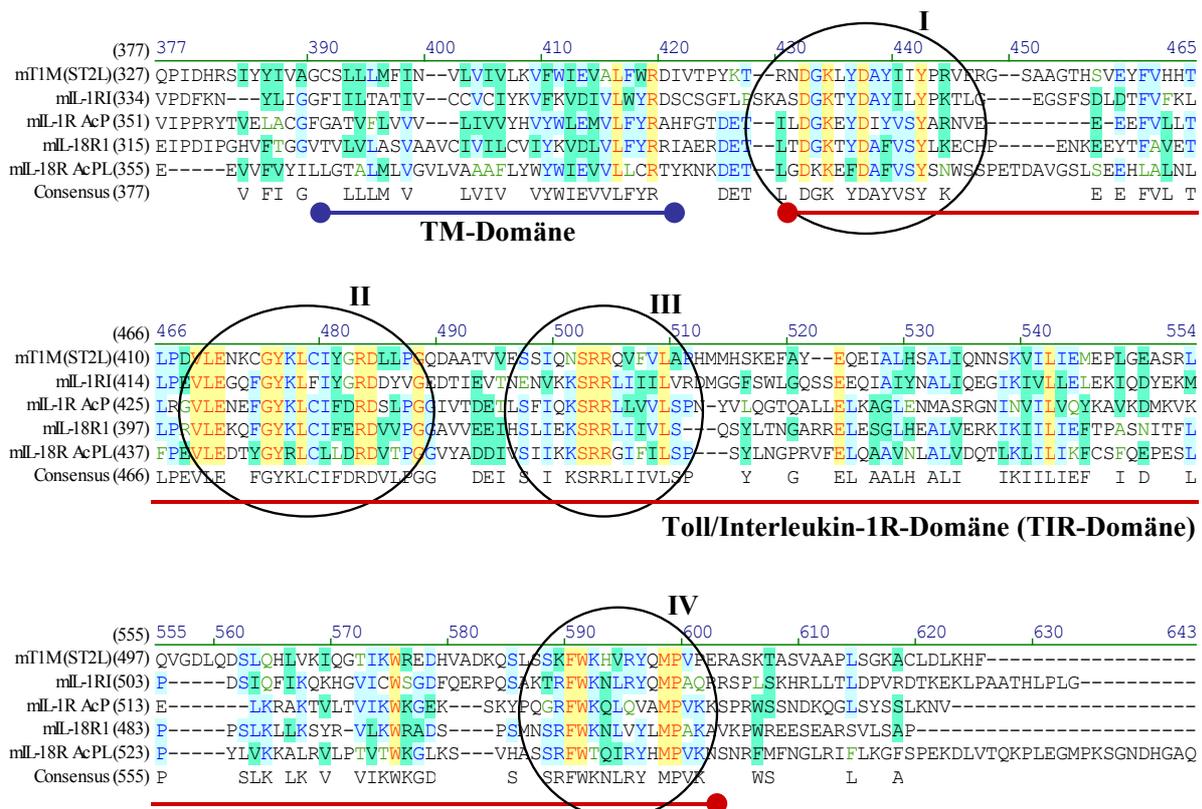


Abb. 2: Sequenzvergleich zwischen Mitgliedern der IL-1R-Familie

Die Aminosäuresequenzen der Transmembrandomänen und der zyttoplasmatischen Regionen einer Auswahl muriner Proteine (T1, IL-1RI, IL-1R AcP, IL-18R1 und IL-18R AcPL) wurden mit dem Programm NTI Suite von Vector verglichen. Markiert ist die Transmembrandomäne (TM-Domäne), die TIR-Domäne und die hochkonservierten Bereiche I-IV innerhalb der TIR-Domäne. Die blauen und grünen Bereiche stellen teilweise konservierte Sequenzen und die gelben Bereiche hochkonservierte Aminosäuren dar.

4.1. Der IL-1- und der IL-18-Rezeptor

Die beiden am besten charakterisierten Mitglieder der IL-1R-Familie sind die Rezeptoren IL-1RI und IL-18R.

Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1 existiert in drei Varianten. Die signalleitenden Agonisten IL-1 α und IL-1 β haben die gleichen biologischen Aktivitäten. Über den blockierenden IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1ra) kann dagegen kein Signal weitergeleitet werden. Vom IL-1-Rezeptor existieren ebenfalls zwei Varianten: der signalleitende 80 kDa große IL-1-Rezeptor Typ I (Sims et al., 1988) und eine verkürzte Form (IL-1RII), der fast die gesamte zytoplasmatische Domäne fehlt (McMahan et al., 1991). Über diesen trunkierten Rezeptor kann kein Signal weitergeleitet werden (zusammengefasst in M. U. Martin und W. Falk, 1997).

IL-1 führt vor allem über die Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Osborn et al., 1989; Krasnow et al., 1991) und der MAP-Kinasen (Zusammenfassung in O'Neill und Dinarello, 2000) zur Induktion zahlreicher Zytokine, die ihrerseits Adhäsion und Migration von Lymphozyten, Fieber, Ausbildung allergischer Immunreaktionen, Resorption von Knochen und Knorpel und Induktion der Akut Phasen-Proteine auslösen (zur Übersicht: Dower et al., 1992; Dinarello et al., 1990). Der IL-1RI wird fast ubiquitär exprimiert. Die Spezifität der IL-1-abhängigen Reaktionen wird durch differenzielle Sekretion des Liganden erreicht. IL-1 wird hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen und Mastzellen sezerniert.

Das IL-1 homologe proinflammatorische Zytokin IL-18 spielt eine Rolle bei systemischen und lokalen Entzündungsprozessen. Die Aktivierung des IL-18-Rezeptors führt zu einer Reihe verschiedener biologischer Reaktionen wie der Induktion von Zytokinen (TNF- α und IL-1) und Chemokinen und der Aktivierung von TH1- und NK-Zellen (Takeda et al., 1998; zur Übersicht: Dinarello, 1999). Der IL-18-Rezeptor (IL-18R α), der auf TH1-Zellen exprimiert wird, benötigt für seine Aktivierung analog dem IL-1RI ein accessorisches Protein (AcPL) (Parnet et al., 1996; Torigoe et al., 1997; Born et al., 1998; Xu et al., 1998).

Nach der Aktivierung des Rezeptors werden die gleichen Signalwege, wie sie durch IL-1 aktiviert werden, induziert. Dazu gehören der Transkriptionsfaktor NF- κ B und die MAP-Kinasen (Thomassen et al., 1998). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B findet ebenfalls über die Bindung von MyD88, IRAK und TRAF6 statt (Kojima et al., 1998; Adachi et al., 1998; Kanakaray et al., 1999).

Nicht nur die Rezeptoren zeigen große Sequenzhomologien, auch die Liganden ähneln sich. Sie können zu der IL-1-Familie zusammengefasst werden.

Einige Arbeitsgruppen versuchen durch Sequenzrecherchen in Gendatenbanken neue Mitglieder der Familie zu entdecken, um unbekannte Liganden zu identifizieren. So konnte beispielsweise ein neues IL-18R-bindendes Protein (IL-1H) gefunden werden, welches starke Homologien zu IL-1ra zeigt (Pan et al., 2001). Auch die Liganden für das IL-1Rrp2 wurden auf diese Weise entdeckt. Bei den beiden kürzlich gefundenen IL-1-Mitgliedern IL-1 δ und ϵ handelt es sich um Agonisten und Antagonisten des IL-1Rrp2 (Debets et al., 2001). Leider konnte auch auf diese Weise noch kein Ligand für den T1-Rezeptor identifiziert werden.

5. Die TIR-Familie

Die zytoplasmatische Region dieser Rezeptorfamilie stellt eine in der Evolution hochkonservierte Domäne dar und ist außer bei den Mitgliedern der IL-1R-Familie noch bei zahlreichen anderen Proteinen vorhanden. Die bekanntesten Vertreter sind außer den Mitgliedern der IL-1R-Familie der Toll- und der 18W-Rezeptor aus *Drosophila* und die Toll-homologen Rezeptoren aus Mensch und Maus (TLR; Toll-like-Rezeptoren). Diese werden zu der übergeordneten Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Familie zusammengefasst (TIR-Familie). Die konservierte zytoplasmatische Domäne wird entsprechend als TIR-Domäne bezeichnet. Innerhalb dieser Domäne gibt es vier hochkonservierte Bereiche (siehe Abb. 2).

Im Gegensatz zu den Mitgliedern der IL-1R-Familie tragen die Toll-Rezeptoren und die Toll-like-Rezeptoren im extrazellulären Bereich keine Immunglobulindomänen sondern leucinreiche Sequenzwiederholungen (Abb. 3).

Neben den bereits genannten Mitgliedern zählen noch zahlreiche weitere Proteine, wie beispielsweise das Bindeprotein MyD88, das bei der Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B eine Rolle spielt, oder die Proteine A46R und A52R des Vaccinia Virus, zur TIR-Familie. Die Virusproteine sind Antagonisten der IL-1- und TLR-Signalleitung und hemmen auf diesem Wege die Immunabwehr des Wirtes (Bowie et al., 2000). Sogar pflanzliche Proteine tragen die in der Evolution hochkonservierte TIR-Domäne. Beispielsweise das N-Protein aus Tabak, das für den Schutz der Pflanze gegen den Tabak Mosaik Virus zuständig ist (Whitham et al., 1994). Die pflanzlichen Mitglieder der TIR-Familie tragen allerdings die TIR-Domäne extrazellulär und leucinreiche Sequenzwiederholungen im zytoplasmatischen Bereich (Übersicht in Brightbill und Modlin, 2000 bzw. Muzio und Mantovani, 2001).

1.) Untergruppe mit extrazellulären Immunglobulindomänen:

- IL-1RI, IL-1RII, IL-1RAcP
- IL-18R, IL-18RAcP
- TIM
- IL-1Rrp2, IL-1RAPL, TIGGIR1,



2.) Untergruppe mit leucinreichen Sequenzwiederholungen

- Toll, 18W, TLR1-10



3.) Adaptermoleküle

- MyD88



Abb. 3: Schematische Darstellung einzelner Mitglieder der TIR-Familie

Die Familie ist charakterisiert durch die ca. 200 AS große TIR-Domäne (orange). Die Mitglieder können in mehrere Untergruppen unterteilt werden. 1.) enthält die Mitglieder mit Immunglobulindomänen in der extrazellulären Domäne. Zu dieser Gruppe gehören die IL-1-Rezeptoren, der IL-18R und die jeweiligen accessorischen Proteine. Die Mitglieder der Untergruppe 2.) tragen extrazellulär leucinreiche Sequenzwiederholungen. Zu dieser Gruppe gehören der Toll-Rezeptor und 18W aus *Drosophila* und die zehn Toll-like-Rezeptoren aus Säugern. Die Gruppe 3.) enthält zytosolische Proteine ohne Transmembrandomäne wie MyD88, das neben der TIR-Domäne noch eine „Death Domäne“ (DD, rot) trägt. Die Transmembrandomänen (TM) sind blau dargestellt.

5.1. Toll-Rezeptoren

Der Toll-Rezeptor aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* spielt eine Rolle bei der Ontogenese und der Immunabwehr adulter Fliegen gegen Pilzinfektionen (Lemaitre et al., 1996).

Die Homologie zwischen dem Toll-Rezeptor aus *Drosophila* und anderen Mitgliedern der TIR-Familie beschränkt sich nicht auf die Sequenzhomologie in der TIR-Domäne, sondern betrifft auch die Aktivierung verwandter Signalwege. So ist etwa der Toll-induzierte Transkriptionsfaktor „Dorsal“, wie NF-κB, ein Mitglied der Familie der Rel-Transkriptionsfaktoren. Außer Toll besitzt die Fliege weitere Toll-homologe Rezeptoren wie 18-Wheeler (18W), welches für die Abwehr gegen Bakterien notwendig ist (Williams et al., 1997).

Bisher wurden zehn humane Toll-like-Rezeptoren (TLR1-10) identifiziert (Rock et al., 1998; zusammengefasst in Muzio und Mantovani, 2001). Von einigen ist die Funktion inzwischen bekannt. Der TLR2 beispielsweise spielt eine Rolle bei der Abwehr gegen Gram-positive Bakterien und Pilze (Brightbill et al., 1999; Schwandner et al., 1999; Underhill et al., 1999).

TLR4 erkennt bakterielle Lipopolysaccharide (Poltorak et al., 1998) und TLR9 reagiert auf bakterielle CpG-DNS (Hemmi et al., 2000). Von einigen TLRs konnte gezeigt werden, dass sie den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren (Übersicht in Zhang and Ghosh, 2001).

6. TIR-induzierte Signalkaskaden

Alle bekannten Mitglieder der TIR-Familie haben Funktionen in der Immunabwehr. Auch die induzierten Signalwege stimmen weitgehend überein. Eine zentrale Rolle spielen die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 und die MAP-Kinasen p38, JNK und p44/42.

6.1. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert die Transkription zahlreicher proinflammatorischer Gene (Übersicht in Barnes and Karin, 1997). Normalerweise liegt der Transkriptionsfaktor komplexiert mit dem Inhibitor I κ B inaktiv im Zytoplasma vor. Nach der Aktivierung der Signalkaskade kommt es zur Phosphorylierung des Inhibitors an spezifischen Serinresten, zur Ubiquitinmarkierung und in der Folge zum raschen Abbau von I κ B. Freigesetztes NF- κ B wird in den Kern transloziert (zur Übersicht: Baeuerle et al., 1996 und Karin and Ben-Neriah, 2000). Ein Multiproteinkomplex, bestehend aus den I κ B-Kinasen α und β , dem Gerüstprotein NEMO/IKK γ und der Kinase NIK (NF- κ B-inducing kinase), reguliert die Phosphorylierung des Inhibitors (Regnier et al., 1997; Woronicz et al., 1997; Li et al., 2001). Dabei scheint IKK α die stark homologe Kinase IKK β zu phosphorylieren (Yamamoto et al., 2000). Diese wiederum phosphoryliert den Inhibitor I κ B- α an den Serinresten 32 und 36 und I κ B- β an den Serinresten 19 und 23 (Woronicz et al., 1997). Entgegen früheren Annahmen scheint die Kinase NIK an der IL-1-induzierten NF- κ B-Aktivierung nicht essentiell beteiligt zu sein, da NIK-defiziente Mäuse unveränderte Reaktionen auf IL-1 zeigen (zur Übersicht: Karin and Ben-Neriah, 2000).

Der Mechanismus der Aktivierung der I κ B-Kinase ist noch nicht endgültig geklärt. Am Beispiel der IL-1-induzierten NF- κ B-Aktivierung (Abb. 4) führt die Bindung von IL-1 an den IL-1RI zur Interaktion mit dem IL-1R accessorischen Protein, wobei IL-1 nicht direkt an IL-1RAcP bindet (Greenfeder et al., 1995; Wesche et al., 1998). Die Ausbildung des IL-1R-Komplexes führt zur Bindung von MyD88 über eine homophile Interaktion der TIR-Domänen (Wesche et al., 1997) und zur Bindung der Serin/Threonin-Kinasen IRAK, IRAK2 oder IRAK-M (Wesche et al., 1999).

Die Death-Domänen von IRAK und MyD88 interagieren daraufhin, was zur Autophosphorylierung von IRAK führt. Die Kinaseaktivität ist aber scheinbar nicht essentiell, da auch durch Kinase-inaktives IRAK NF- κ B induziert werden kann (Wesche et al., 1997; Knop et al., 1999). Nach der Aktivierung dissoziiert IRAK schließlich von dem Rezeptorkomplex und interagiert mit TRAF6 (Cao et al., 1996; Cao et al., 1996; Burns et al., 1998). Phosphoryliertes IRAK wird anschließend abgebaut (Yamin et al., 1997).

Der Mechanismus, der zur Aktivierung des IKK-Komplexes durch TRAF6 führt, ist noch nicht geklärt. Ein Protein namens ECSIT (evolutionary conserved signalling intermediate in Toll pathway) könnte beteiligt sein. Es scheint zudem den NF- κ B-Signalweg mit der MAPK-Signalkaskade zu verbinden, da es an der Aktivierung der MAPK-Kinase-1 (MEKK1) beteiligt ist (Kopp et al., 1999). Zur Diskussion steht auch die MAPKKK TAK1. Es konnte gezeigt werden, dass IL-1 endogene TAK1 in 293IL-1RI-Zellen aktiviert und mit TRAF6 interagiert. TAK1 liegt stromaufwärts des IKK-Komplexes (Ninomiya-Tsuji et al., 1999).

Zahlreiche Studien zeigten, dass einige Komponenten des IL-1-Signalweges auch von anderen Mitgliedern der TIR-Familie verwendet werden. So konnte eine Interaktion von TLR4 mit MyD88, IRAK und TRAF6 gezeigt werden, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt (Medzhitov et al., 1998; Muzio et al., 1998). Auch für IL-18 konnte gezeigt werden, dass bei der Aktivierung von NF- κ B die gleichen Komponenten beteiligt sind (Thomassen et al., 1998; Kojima et al., 1998).

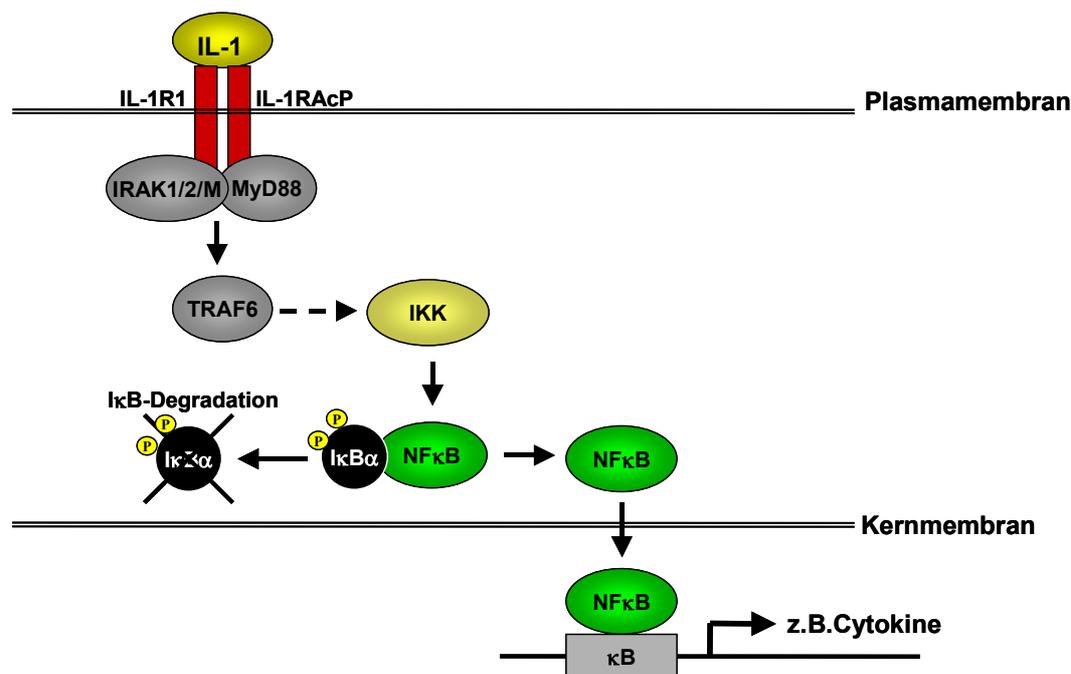


Abb. 4: Schematische Darstellung der IL-1-induzierten NF- κ B-Aktivierung

Der MyD88/TRAF6-Signalweg ist allerdings nicht die einzige Möglichkeit, den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu aktivieren. Das proinflammatorische Zytokin TNF beispielsweise induziert NF- κ B zwar über den IKK-Komplex, dieser wird aber über die Proteine TRADD, RIP und TRAF2 aktiviert (Hsu et al., 1995; Hsu et al., 1996). Außerdem ist eine NF- κ B-Aktivierung über PI3K und Akt möglich. Dies konnte bereits für IL-1 gezeigt werden (Reddy et al., 1997; Kane et al., 1999). Dabei scheint die regulatorische Untereinheit p85 der PI3-Kinase mit IL-1RAcP zu interagieren, was zur Aktivierung der katalytischen Untereinheit p110 führt (Sizemore et al., 1999).

6.2. Die Aktivierung der MAP-Kinasen

Bei den MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinases) handelt es sich um Tyrosin/Threonin-Kinasen. Sie liegen am Ende einer Phosphorylierungskaskade (Abb. 5) und aktivieren verschiedene Transkriptionsfaktoren (zur Übersicht: Blumer et al., 1994). Für IL-1 beispielsweise wurde in unterschiedlichen Zelllinien die Aktivierung der drei am besten charakterisierten MAP-Kinasen p38-MAPK, JNK und ERK1/2 gezeigt (Kracht et al., 1994; Freshney et al., 1994).

Die stark verwandten MAP-Kinasen p42 und p44, auch bekannt als Erk2 bzw. Erk1, werden hauptsächlich durch Mitogene induziert. Sie phosphorylieren zahlreiche intrazelluläre Substrate, einschließlich anderer Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren, und regulieren Proliferation und Differenzierung (Übersicht in Marshall et al., 1995). Im Gegensatz dazu werden die stressaktivierten MAP-Kinasen (SAPK) p54, auch bekannt als c-Jun N-terminal Kinase (JNK), und p38 MAPK durch Mitogene nur geringfügig aktiviert. Sie werden hauptsächlich durch zellulären Stress wie UV-Strahlung, bakterielle LPS oder Zytokine induziert (Hibi et al., 1993; Kyriakis et al., 1994; Rouse et al., 1994; Raingeaud et al., 1995). Aktivierte p54 MAPK (JNK) phosphoryliert die Transaktivierungsdomäne von c-Jun und aktiviert den Transkriptionsfaktor ATF2 (Derijard et al., 1994; Kyriakis et al., 1994; Adler et al., 1992; Livingstone et al., 1995). JNK spielt eine Rolle bei der Aktivierung AP-1-abhängiger Gene (Hibi et al., 1993; Pulverer et al., 1991; van Dam et al., 1995).

Über die Funktion und die stromabwärts liegenden Substrate der p38-MAPK ist weniger bekannt. Sie aktiviert die MAPK-aktivierte Proteinkinase-2 (MAPKAPK-2), die ihrerseits das kleine Hitzeschockprotein hsp27 phosphoryliert (Freshney et al., 1994; Rouse et al., 1994). Die Funktion von hsp27 ist aber noch weitgehend unbekannt.

Die MAP-Kinasen werden über eine Kinasekaskade aktiviert. Dabei werden die MAP-Kinasen durch Phosphorylierung der Kinasedomäne VIII von MAPK-Kinasen (MKK) aktiviert. Die MAPK-Kinasen werden ihrerseits durch MAPKK-Kinasen aktiviert. Die MAPK-Kinasen sind weitgehend bekannt. JNK wird durch MKK7 (Yao et al., 1997), p38-MAPK dagegen durch MKK3 und MKK6 aktiviert. Die MAPK MKK4 kann beide Stresskinasen aktivieren (zur Übersicht: Garrington et al., 1999). MKK1 und MKK2 sind die Kinasen, die stromaufwärts der MAP-Kinasen ERK1/2 liegen (Saklatvala et al., 1993). Über die Kinasen, welche die MKKs aktivieren, ist weit weniger bekannt. Bei den MAPKKK handelt es sich um eine sehr große heterogene Gruppe verschiedener Enzyme. Zu ihnen zählen Raf-1, Mos, NIK, MEKK1-4, MLK2, MLK3, ASK1 und TAK1 (zur Übersicht: Garrington et al., 1999).

Auch über die Aktivierung der MAPKKK ist noch wenig bekannt. Zur Diskussion stehen kleine G-Proteine. Bei der IL-1-induzierten Aktivierung der p38-MAPK konnte beispielsweise eine Beteiligung von Ras gezeigt werden (Palsson et al., 2000).

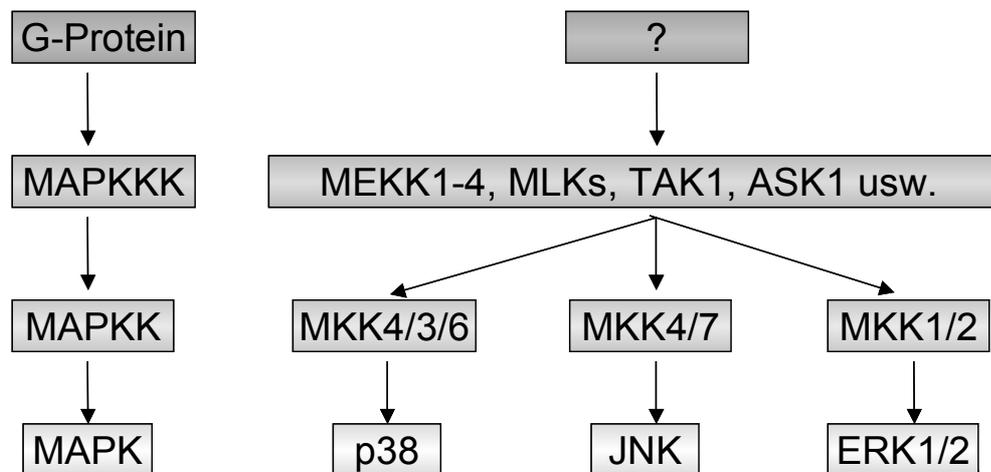


Abb. 5: Allgemeines und spezifisches Schema der Aktivierungskaskaden der MAP-Kinasen

Links ist das Aktivierungsschema der MAPK im allgemeinen aufgezeigt, rechts die Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK1/2.

7. Ziel der Arbeit

Der T1-Rezeptor (T1M/ST2L/fit-1) ist ein Mitglied der TIR-Familie. Alle bisher untersuchten Mitglieder der TIR-Familie haben u.a. immunregulatorische Funktionen. Im Falle von T1M besteht sie vor allem in einer Beteiligung an der Immunreaktion von T-Helfer-Zellen des Typs II, welche T1M auf ihrer Oberfläche exprimieren (Lohning et al., 1998; Xu et al., 1998; Lohning et al., 1999; Coyle et al., 1999). Außerdem kann die T1-Expression durch proinflammatorische Stimulanzen, wie die Zytokine TNF- α , IL-1 α und IL-1 β , oder durch Bestrahlung mit UV-Licht induziert werden (Kumar et al., 1997).

Die genaue Untersuchung der T1-Funktion ist problematisch, da ein funktioneller Ligand bisher noch nicht identifiziert werden konnte. Die Suche nach dem T1-Liganden stellte daher einen Aspekt der Arbeit dar. Mit cDNS aus einem murinen Osteosarkom, von welchem gezeigt werden konnte, dass T1 funktionell eine Rolle spielt (Werenskiold et al., 1999), wurden verschiedene Phagenbanken hergestellt. Als Interaktionspartner für die Isolierung potentieller Liganden wurde rekombinantes murines T1S eingesetzt.

Parallel dazu sollten die T1-induzierten Signalwege identifiziert und näher charakterisiert werden. Der Schwerpunkt lag hierbei auf den Signalwegen, die durch Mitglieder der TIR-Familie aktiviert werden. Hierzu zählen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der MAP-Kinasen. Durch phospho-spezifische Antikörper sollten aktivierte Kinasen nachgewiesen werden. Mittels Reporteranalysen und dem Einsatz von Inhibitoren oder dominant negativer Signaltransmitter wurden die Signalwege auf molekularer Ebene untersucht.

III Material und Methoden

1. Bezugsquellennachweis

1.1. Chemikalien und Radiochemikalien

[α - ³² P]dCTP	ICN, Eschwege
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Aceton	Merck, Darmstadt
Agar (Bacto-Agar)	Difco, Hamburg
Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
APS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BCIP	Boehringer GmbH, Mannheim
Biodyne A, Nylon-Membranen	Pall, Dreieich
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA, Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Digoxigenin-11-dUTP	Boehringer GmbH, Mannheim
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
DMEM	Biochrom, Berlin
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dNTPs	Promega, Mannheim
DTT, Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Biochrom, Berlin
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ficoll	Serva, Heidelberg
FKS	Biochrom, Berlin
Formamid	Merck, Darmstadt
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Glycogenlösung 10 mg/ml	Novagen, Darmstadt
Guanidine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hefeextrakt	Difco, Hamburg
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Heringssperma-DNS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hyperfilm TM ECL TM	Amersham Pharmacia, Freiburg
IPTG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt

Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Biochrom, Berlin
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Maleinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Maltose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Metaphor (low-melting-temperature agarose)	FMC BioProducts, Rockland, ME, USA
Mineralöl	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Fluka, Buchs, CH
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumlauroylsarcosinat	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
NBT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NZ-Amine	Difco, Hamburg
PBS	Biochrom, Berlin
Puffergesättigtes Phenol	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS	Bio-Rad; München
Streptavidin-PE	Pharmingen, San Diego, USA
TEMED	Bio-Rad, München
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris	Merck, Darmstadt
Tris-gesättigtes Phenol	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	ICN, Eschwege
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Trypton	Difco, Hamburg
Tween-20	ICN, Eschwege
Wassergesättigtes Phenol	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Merck, Darmstadt
β-gal	Promega, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
ε-Amino-n-Caproic-Acid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Plastikwaren für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (M&B Stricker, Oberschleißheim), Nunc (Wiesbaden) und In Vitro Systems & Services (Göttingen) bezogen.

1.2. Enzyme und entsprechende Puffer

T4-DNS-Ligase mit zugehörigem Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-DNS-Polymerase	Amersham Pharmacia, Freiburg
10 x PCR-Puffer GeneAmp	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Die Restriktionsendonukleasen und der Universalpuffersatz für Restriktionsendonukleasen sowie die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, "calf intestine phosphatase") wurden von der Fa. Boehringer GmbH (Mannheim) bezogen.

1.3. Antikörper und Wachstumsfaktoren

Primärantikörper:

Name	Eigenschaften	Referenz bzw. Bezugsquelle
Anti-FLAG BioM2	biotinylierter muriner mAb gegen das FLAG-Epitop	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-FLAG M2	muriner monoklonaler Antikörper gegen das FLAG-Epitop	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-SAPK/JNK	polyklonaler Kaninchenantikörper gegen synthetische humane SAPK/JNK	New England BioLabs, Frankfurt
Anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	polyklonaler Kaninchenantikörper gegen synthetische, phosphorylierte, humane SAPK/JNK	New England BioLabs, Frankfurt
Anti-p44/42 MAPK	polyklonaler Kaninchenantikörper gegen synthetische p44/42 MAPK aus der Ratte	New England BioLabs, Frankfurt
Anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	polyklonaler Kaninchenantikörper gegen synthetische, phosphorylierte, humane p44/42 MAPK	New England BioLabs, Frankfurt
Anti-p38-MAPK (Thr180/Tyr182)	polyklonaler Kaninchenantikörper gegen synthetische, humane p38 MAPK	New England BioLabs, Frankfurt
Anti-phospho-p38-MAPK (Thr180/Tyr182)	polyklonaler Kaninchenantikörper gegen synthetische, phosphorylierte, humane p38 MAPK	New England BioLabs, Frankfurt
Anti-mouse IL-1RI	polyklonaler Rattenantikörper gegen murines IL-1RI (p80)	Pharmingen, San Diego, USA
Anti-TRAF6 (H-274)	polyklonaler Kaninchenantikörper gegen die aminoterminalen Aminosäuren 1-274 von humanem TRAF6	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Anti-MyD88	polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes MyD88 (AS 233-248)	Imgenex, San Diego, USA
Anti-I κ B α	Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen synthetisches rI κ B α (Aminosäuren 27-38)	New England BioLabs, Frankfurt
Anti-phospho-I κ B α (Ser32)	Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen synthetisches, phosphoryliertes I κ B α	New England BioLabs, Frankfurt

Name	Eigenschaften	Referenz bzw. Bezugsquelle
Anti-Akt	Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen synthetisches, murines Akt	New England BioLabs, Frankfurt
Anti-phospho-Akt (Ser 473)	Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen synthetisches, phosphoryliertes, murines Akt	New England BioLabs, Frankfurt
Anti- α -Actinin	Monoklonaler Mausantikörper gegen murines und humanes α -Actinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-IL-1 α	Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen rekombinantes, murines IL-1 α	Endogen; Woburn; MA, USA
Anti-T1 3E10	Monoklonaler Rattenantikörper gegen murines T1	Millenium Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA
Anti-huIL-1R Klon: RMHL1-1 (blockierend)	Monoklonaler Antikörper gegen humanen IL-1RI, blockiert die Bindung von IL-1 α , IL-1 β und IL-1ra	Serotec, bezogen über Biozol, Eching bei München

Sekundärantikörper

Name	Eigenschaften	Bezugsquelle
Anti-Digoxigenin-AP	Mit alkalischer Phosphatase konjugiert	Boehringer GmbH, Mannheim
Anti-rabbit IgG HRP	Peroxidasekonjugiert	Promega, Madison, USA
Anti-rat Ig HRP	Peroxidasekonjugiert	Amersham Pharmacia, Freiburg
Anti-mouse AP	Mit alkalischer Phosphatase konjugiert	Dianova, Hamburg
Anti-mouse Ig HRP	Peroxidasekonjugiertes F(ab') ² -Fragment	Amersham Pharmacia, Freiburg

Wachstumsfaktoren

Name	Bezugsquelle
Rekombinantes murines IL-1 α	Cell Concepts, Umkirch
Rekombinanter humaner EGF	Invitrogen, Karlsruhe
Rekombinanter humaner TNF- α	Cell Concepts, Umkirch

1.4. Längen- und Proteinstandards

Name	Bezugsquelle
Rainbow Molekulargewichtsmarker für Proteine RPN 756 oder RPN 800	Amersham Pharmacia, Freiburg
"Prestained Protein Marker, Broad Range"	New England BioLabs, Frankfurt
1kb DNS-Leiter	Life Technologies, Karlsruhe
Protein Standard II (1,38 mg/ml)	Bio-Rad, München

1.5. Reagenziensätze und "Kits"

Name	Bezugsquelle
ABC-System	Vector, Burlingame, CA, USA
Biotin Labeling Kit	Boehringer, Mannheim
Bradford Protein Assay	Bio-Rad, München
CELlection Pan Mouse IgG	Dynal, Hamburg
Cellular Labeling and Immunoprecipitation Kit	Boehringer, Mannheim
Dual Light Kit	Topix, Bedford, MA, USA
ECL Western blotting analysis system	Amersham Pharmacia, Freiburg
Gel Extraktion Kit "QIAquick"	Qiagen, Hilden
LipofectAMINE Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Plasmid Purifikation Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep 8 Miniprep	Qiagen, Hilden
T7Select 10-3 Orient Express cDNA Cloning System, Oligo (dT)	Novagen, Darmstadt
ZAP Express cDNA Synthesis Kit	Stratagene, Amsterdam
ZAP Express Gigapack III Gold packaging extract	Stratagene, Amsterdam

1.6. Sonstiges Verbrauchsmaterial

3 MM Papier, Whatmann	M&B Stricker, Oberschleißheim
96-Well LIA-Platte, weiß, mittlere Bindung, flacher Boden von Greiner	M&B Stricker, Oberschleißheim
Anti-FLAG-M2-Affinity Gel	Kodak, New Haven, CT, USA
BiodyneA-Nylonmembran	Pall, Dreieich
Cell Lysis Buffer (10x)	New England BioLabs, Frankfurt
Dialysemembran	Pierce, Rockford, Illinois, USA
Hybond-C extra (Nitrocellulose)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Immobilon-P (PVDF-Membran)	Millipore, Badford, MA, USA
Küvetten für Gene Pulser	Bio-Rad, München
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim

1.7. Geräte

Durchflusszytometer „Epics XL“	Beckman Coulter, Krefeld
UV-Transilluminator "Eagle Eye II"	Stratagene, Heidelberg
Gene Pulser	Bio-Rad, München
Spectrophotometer „DU 530“	Beckman Coulter, Krefeld
Spektralphotometer „Ultrospec 2000“	Amersham Pharmacia, Freiburg
Fast Blot B33	Bio-Rad, München
Luminometer „LumiCount“	Packard, Dreieich
PCR-Cycler „PTC 100“	MJ Research, Watertown, Mass. USA
Agarose-Gelelektrophoreseapparatur „WIDE MINI SUB TM CELL	Bio-Rad, München
Standard Power Pack „P25“	
Brutschrank "Heraeus"	Biometra, Göttingen
Hybridisierungsofen, Rollofen „Mini 10“	Kendro, Hanau
Polyacrylamid-Gelapparatur „Mini-Protean II“	Hybaid, Heidelberg
Minizentrifuge „5417R“	Bio-Rad, München
Kühlzentrifuge „Sorvall RC-5B“	Eppendorf, Köln
	Kendro, Hanau

2. Kultivierung eukaryontischer Zelllinien

2.1. Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Referenz
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen; HEK 293T tragen "SV 40 large T-antigen"	Graham et al., 1977
Jurkat	Humane T-Zell-Leukämie Zelllinie	Schneider et al., 1977
NIH 3T3	Murine embryonale Fibroblastenzelllinie	Jainchill et al., 1969
K12	Zelllinie aus einem spontanen Osteosarkom	Werenskiold et al., 1999
K12 AS3	K12-Zellen stabil mit einem T1 antisense-Konstrukt transfiziert	Werenskiold et al., 1999
TME 3H3	SV40 transformierte murine Endothelzellen	zur Verfügung gestellt von Prof. Roman Klemenz, Zürich
COS 7	SV 40 transformierte embryonale Nierenzellen aus der afrikanischen grünen Meerkatze	Gluzman, 1981
MDA/EGFP	MDA-Zellen stabil mit EGFP transfiziert	zur Verfügung gestellt von Frau Margit Fuchs, TU-München, Inst. für Mol. Pathologie

2.2. Nährmedien und Lösungen

Medien und Medienzusätze:

Kulturmedium für Adhäsionszellen	90% (v/v) DMEM mit Glutamin 10% (v/v) FKS
Einfriermedium für Adhäsionszellen	70% (v/v) DMEM mit Glutamin 20% (v/v) FKS 10% (v/v) DMSO
Kulturmedium für Suspensionszellen	90% (v/v) RPMI 1640 mit Glutamin 10% (v/v) FKS
Einfriermedium für Suspensionszellen	70% (v/v) RPMI 1640 mit Glutamin 20% (v/v) FKS 10% (v/v) DMSO

DMEM- und RPMI 1640-Medium mit stabilem Glutamin, FKS und Trypsin/EDTA wurden von der Fa. Biochrom KG (Berlin) bezogen.

Lösungen

PBS (phosphate buffered saline)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2
PBS/EDTA	1 x PBS 0,02% (w/v) EDTA

2.3. Anzucht und Konservierung eukaryontischer Zellen

2.3.1. Kultivierung von Adhäsionszellen

Tiefgefrorene Zellen wurden im Ethanolbad aufgetaut, in warmem Kulturmedium (DMEM mit 10% FKS) aufgenommen und auf 10 cm Zellkulturschalen ausgesät.

Zur Kultivierung der Zellen wurden diese je nach Konfluenzgrad alle 2-4 Tagen geteilt. Dabei wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS oder PBS/EDTA gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium suspendiert, je nach Zellart z.B. 1:10 verdünnt, auf neuen Kulturschalen ausgesät und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.3.2. Konservierung von Adhäsionszellen

Zur Konservierung wurden die Zellen trypsiniert, in Medium aufgenommen, schonend zentrifugiert (2400 rpm, 5 min, 4°C), mit PBS gewaschen und in Einfriermedium aufgenommen (1-2 x 10⁶ Zellen/ml). Die Zellen wurden in Kryoröhrchen (M&B Stricker, Oberschleißheim) erst bei -80°C (24 h) eingefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.3.3. Kultivierung von Suspensionszellen

Tiefgefrorene Zellen wurden im Ethanolbad aufgetaut, in warmem Kulturmedium (RPMI mit 10% FKS) aufgenommen und in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät. Zur Kultivierung wurden die Zellen je nach Zelldichte alle 3-4 Tage 1:10 verdünnt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.3.4. Konservierung von Suspensionszellen

Zur Konservierung wurden die Zellen schonend zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in Einfriermedium aufgenommen ($1-2 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Zellen wurden in Kryoröhrchen (M&B Stricker, Oberschleißheim) erst bei -80°C (24 h) eingefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3. Transfektion eukaryontischer Zellen durch *LipofectAMINE*

3.1. Transfektion adhärenter Zellen (HEK 293- bzw. HEK 293T-Zellen)

Die Transfektion kann mit variierenden LipofectAMINE- und DNS-Konzentrationen durchgeführt werden. Die optimalen Bedingungen müssen für jede Zelllinie bestimmt werden.

Die Transfektion von HEK 293- bzw. HEK-293T-Zellen ist am Beispiel einer 24-Well-Zellkulturschale, wie sie für die Reportergenanalysen verwendet wurden, beschrieben. Für größere Versuchsansätze wurden die Mengen entsprechend angepasst.

Ca. $1-1.5 \times 10^5$ Zellen/Well wurden auf eine 24-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Am darauffolgenden Tag sollten die Zellen zwischen 50% und 70% konfluent sein. $1,25 \mu\text{l}$ *LipofectAMINE* wurden mit $150 \mu\text{l}$ serumfreiem DMEM-Medium gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden $0,4 \mu\text{g}$ DNS in $150 \mu\text{l}$ serumfreiem DMEM-Medium aufgenommen. Beide Lösungen wurden miteinander gemischt und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Dieser Mix wurde auf die mit PBS gewaschenen Zellen pipetiert und 5-12 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurde der Mix abgenommen und durch Vollmedium (DMEM mit 10% FKS) ersetzt.

3.2. Transfektion von Suspensionszellen (Jurkat)

$5 \mu\text{l}$ *LipofectAMINE*-Reagenz wurde in $100 \mu\text{l}$ serumfreiem RPMI-Medium aufgenommen und für 15 min bei RT inkubiert. $1,6 \mu\text{g}$ DNS wurden in der gleichen Menge serumfreiem Medium (SFM) aufgenommen und zu der LipofectAMINE-Lösung gegeben. Diese Mischung wurde für 30 min bei RT inkubiert.

Währenddessen wurden 1×10^6 Zellen mit SFM gewaschen und in $100 \mu\text{l}$ SFM aufgenommen. Die Mischung aus LipofectAMINE-Reagenz und DNS wurde zu den Zellen gegeben und in einer 24-Well-Platte für 12-24 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 1-2 ml RPMI-Medium mit 10% FKS zugegeben und bis zur Verwendung bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Wie bei der Transfektion von adhärenen Zellen kann auch bei der Transfektion von Suspensionszellen mit variierenden LipofectAMINE- und DNS-Konzentrationen gearbeitet werden. Die optimalen Bedingungen müssen für jede Zelllinie bestimmt werden.

4. Bakterienkultur

4.1. Bakterienstämme

Bezeichnung	Organismus/Beschreibung	Referenz
MV1193	E.coli	Zoller und Smith, 1987
XL1-Blue MRF'	Wirtsbakterium für λ-Phagen der ZAP Express-Phagenbank	Stratagene, Amsterdam
XL0LR	Wirtsbakterium für ExAssist-Helferphagen der ZAP Express-Phagenbank	Stratagene, Amsterdam
BLT5403 und BLT5615	Wirtsbakterien für Phagen der <i>T7Select 10-3 Orient Express</i> -Phagenbank	Novagen, Darmstadt

4.2. Nährmedien für Bakterienkultur

Medium	Bestandteile
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l demineralisiertes Wasser
SOB-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 10 ml 250 mM KCl ad 1 l demineralisiertes Wasser ; pH 7,0 Nach dem Autoklavieren 5 ml steriles 2 M MgCl ₂ zugeben.
SOC-Medium	1 l SOB-Medium 20 ml 1 M sterile Glucoselösung
NZY	5 g NaCl 2 g MgCl ₂ x 7 H ₂ O 5 g Hefeextrakt 10 g NZ-Amine ad 1 l demineralisiertes Wasser, pH 7,5
NZY-Topargar	0,7% (w/v) Agarose in NZY-Medium

Medium	Bestandteile
M9-Minimalmedium	200 ml 5 x M9-Salze 2 ml 1 M MgSO ₄ -Lösung 20 ml 20% (w/v) Glucoselösung 0,1 ml 1 M CaCl ₂ -Lösung ad 1000 ml Aqua dest.
10 x M9-Salze	10 g NH ₄ Cl 30 g KH ₂ PO ₄ 60 g Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O ad 1000 ml Aqua dest.

Für feste Nährböden wurde 1,5% (w/v) Agar zugegeben und anschließend autoklaviert. Das Medium wurde auf 60°C abgekühlt und in Petrischalen gegossen. Für Selektionsplatten wurde 100 mg/l Ampicillin, 50 mg/l Kanamycin oder 12,5 mg/l Tetracyclin eingesetzt.

4.3. Konservierung von Bakterien

930 µl einer Übernachtskultur wurden mit 70 µl sterilem DMSO gemischt und bei -80°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

5. Transformation von Bakterien

5.1. Herstellung elektrokompeter Zellen

E. coli-Bakterien des Stammes MV1193 wurden auf eine Minimalplatte ausgestrichen und für 1-2 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde zum Animpfen einer ÜN-Kultur in LB-Medium verwendet. 500 ml LB-Medium wurden mit 2,5 ml ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C geschüttelt, bis eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,5-0,7 erreicht war.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden alle auf Eis bzw. im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Die Bakterienkultur wurde für 10-15 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (4°C, 20 min, 4500 rpm, GS3-Rotor von Sorvall). Das Bakterienpellet wurde zweimal mit 250 ml eiskaltem, sterilem, destilliertem H₂O und einmal mit einer eiskalten 10%igen Glycerinlösung gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in ca. 500µl eiskalter 10%iger Glycerinlösung aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in 50 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.2. Transformation kompetenter Zellen durch Elektroporation

50 µl kompetente Zellen wurden auf Eis langsam aufgetaut und mit 1-3 µl Ligationsansatz gemischt. Die Mischung wurde luftblasenfrei in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und für 1 min bei 4°C inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω im *Gene Pulser* der Firma Bio-Rad.

Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 30-60 min bei 37°C geschüttelt. 100 µl der Suspension wurde auf eine LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Der Rest wurde kurz zentrifugiert, der Überstand fast vollständig abgenommen, die Zellen in dem Restüberstand resuspendiert und ebenfalls ausplattiert.

6. Oligonucleotide und Vektoren

6.1. Oligonucleotide

Name	Sequenz
ZAPEx seq	ACAGGAAACAGCTATGACCTTG
ZAP 3'	TAATACGACTCACTATAGGGCGA
T7-UP	GGAGCTGTCGTATTCCAGTC
T7-DOWN	AACCCCTCAAGACCCGTTA
actin-seq	GGTCACCCACACTGTGCCCATCTA
actin-rev	GCATTGCGGTGGACGATGGAGGG
mIL-1α rev Xho	GTGAGCTCTGATATCTGGAAGTCTGTC
mIL-1α seqE	CCGAATTCCAAGATGGCCAAAGTTCC
T7seq	TAATACGACTCACTATAGGG
Trev1303X	GCTCTAGATTATCAAGGTGTCCTATATCTCTCCAGAACAG
T1b	TGATGTAGCACTGGCGGTGGTCTAG
T1MrevX1	GCTCTAGATTATCAAAAGTGTTTCAGGTCTAAGC

6.2. Vektoren

pRc/CMV (Invitrogen Corp., Groningen, Niederlande): Für eine hohe konstitutive Expression trägt der Vektor die Enhancer- und Promotorsequenzen des unmittelbar frühen Gens des humanen Cytomegalovirus (CMV).

6.3. Rezeptorkonstrukte, Reporterplasmide und Transfektionskontrollen

Konstrukt	Beschreibung	Referenz
pCM-T1M (T1M)	Trägt den murinen T1M-Vollängenklon in pRc/CMV	Rupp, 2000
pCM-T1M Δ K (T1M Δ K)	Trägt murines T1M in pRc/CMV. Der vierte konservierte Bereich der TIR-Domäne ist deletiert.	Rupp, 2000
pCM-T1M Δ 372 (T1M Δ 372)	Trägt murines T1M in pRc/CMV. Fast die komplette zytoplasmatische Domäne ist deletiert.	Rupp, 2000
pCM-IL-1RI (mIL-1RI)	Trägt den murinen IL-1RI-Vollängenklon in pRc/CMV	Rupp, 2000
pCM-IL-1R Δ P (mIL-1R Δ P)	Trägt murines IL-1RI in pRc/CMV. Der vierte konservierte Bereich der TIR-Domäne ist deletiert.	Rupp, 2000
pILT1 (ILT1)	Trägt den chimären Rezeptor ILT1, bei dem der extrazelluläre Bereich von T1M durch die entsprechende Sequenz von IL-1RI ersetzt wurde, in pRc/CMV.	Rupp, 2000
pILT1 Δ K (ILT1 Δ K)	Trägt den chimären Rezeptor ILT1 in pRc/CMV. Der vierte konservierte Bereich der TIR-Domäne ist deletiert.	Rupp, 2000
pILT1 Δ 372 (ILT1 Δ 372)	Trägt den chimären Rezeptor ILT1 in pRc/CMV. Fast die komplette zytoplasmatische Domäne ist deletiert.	Siehe IV2.1
pEF/bGal	Trägt die lacZ-cDNA unter der Kontrolle eines EF1 α -Promoters	Hans Häcker., nicht publiziert
pTRAF6 C	Trägt den C-Terminus des humanen TRAF6	Hacker et al., 2000
pMyD88 C	Trägt den C-Terminus des murinen MyD88, der am 5'-Ende mit einem FLAG-Epitop fusioniert ist.	Hacker et al., 2000
IgG/Luci	Trägt drei κ B-Motive vor einem minimalen IFN- β -Promoter in pGL3 (Promega)	Fujita et al., 1993

Die Plasmide pIgG/Luci, pEF/bGal, pMyD88 C und pTRAF6 C wurden mir freundlicherweise von Dr. Hans Häcker (TU-München) zur Verfügung gestellt.

7. Allgemeine molekularbiologische Methoden im Umgang mit DNS

7.1. Restriktion von DNS

Die Restriktionen wurden mit dem jeweils geeigneten Puffer aus dem Universalpuffersatz für Restriktionsendonukleasen (A, B, L, M, H) der Firma Boehringer (Mannheim) durchgeführt. Für analytische Zwecke wurden in der Regel 1 μ g DNS (DNS-Endkonzentration 0,1 μ g/ μ l) in entsprechendem Puffer mit 1 U Enzym geschnitten.

Wenn für das Enzym nichts anderes angegeben war, wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Für präparative Zwecke wurden die Mengen entsprechend erhöht.

Die Restriktionen wurden auf einem analytischen Agarosegel überprüft, wobei die Agarosekonzentration von der Größe der aufzutrennenden Fragmente abhing.

7.2. Dephosphorylierung linearisierter Vektoren durch alkalische Phosphatase

Die Dephosphorylierung der 5'-Enden wurde mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) im Restriktionsansatz durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden nach dem Endonukleaseverdau 2 U Phosphatase pro µg DNS zum Restriktionsansatz gegeben und für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 20 mmol EGTA und Erwärmen auf 65°C für 10 min abgestoppt.

7.3. Ethanolfällung

TE-Puffer	10 mM Tris/HCl
	0,1 mM EDTA
	pH 8,0

Die DNS-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 3 Volumen 100% Ethanol (kalt) versetzt und 30 min bei -70°C oder über Nacht bei -20°C gefällt.

Nach der Fällung wurde der Ansatz 30 min bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert und das Sediment mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 15000 rpm, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das DNS-Pellet ca. 10 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Sediment in geeigneter Konzentration (z.B. 1 µg/µl) in TE-Puffer resuspendiert.

7.4. Verknüpfung von DNS-Fragmenten mit T4-DNS-Ligase

Ansatz	200 ng geschnittene Vektor-DNS
	2-3facher molarer Überschuss des DNS-Fragmentes
	0,5-1,0 U T4-DNS-Ligase
	1 µl 10 x T4-DNS-Ligase-Puffer
	ad 10 µl Wasser

Der Ansatz wurde über Nacht im Kühlschrank (ca. 4-8°C) inkubiert. Kontrollansätze enthielten keine Ligase bzw. kein DNS-Fragment.

7.5. Plasmidpräparation aus Bakterien

Die Plasmidpräparation für analytische und präparative Zwecke wurde nach der vom Hersteller für „high-copy“-Plasmide angegebenen Vorschrift mit dem *QIAprep 8 Miniprep Kit* bzw. dem *Plasmid Purification Kit* der Firma Quiagen durchgeführt.

7.6. Plasmidpräparation aus Eukaryontenzellen

Lysepuffer	0.6% SDS 10 mM EDTA
Phenol/Chloroform	50% (v/v) puffergesättigte Phenollösung 50% (v/v) Chloroform
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	96% (v/v) Chloroform 4% (v/v) Isoamylalkohol

Ca. 400 µl Lysepuffer wurde auf eine konfluente 10 cm Zellkulturschale gegeben und 30 min bei RT inkubiert. Die Lysate wurden in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und 100 µl 5 M NaCl zugegeben. Nach einer mehrstündigen Inkubation im Eiswasserbad (5-12 h) wurden die Lysate für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Probe wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform versetzt, geschüttelt und 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, welche die DNS enthält, wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform versetzt. Nach erneutem Schütteln und Zentrifugieren unter den gleichen Bedingungen wurde wiederum die wässrige Phase abgenommen, mit 1,5 ml Ethanol und 1,5 µl Glycogen (10 mg/ml von Novagen) versetzt und für 30 min bei -20°C gefällt. Nach einer 30minütigen Zentrifugation bei 15000 rpm und 4°C wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und in 200 µl Wasser, 500 µl Ethanol und 0,7 µl Glycogen (10 mg/ml von Novagen) resuspendiert. Anschließend wurde wiederum 30 min bei -20°C gefällt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und in 20 µl Wasser aufgenommen. Die DNS kann bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt werden. Für die Elektroporation von Bakterien wurden 10 µl DNS-Lösung eingesetzt.

7.7. Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration wurde im Spektralphotometer Ultrospec 2000 von Amersham Pharmacia bei 280 nm bestimmt. Dabei entspricht eine OD₂₈₀ von 1 einer DNS-Konzentration von 50 µg/ml. Die Reinheit kann durch den Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ abgeschätzt werden. Er sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.

7.8. PCR „Polymerase Chain Reaktion“

Chemikalien und Lösungen

dNTP-Mischung je 1,25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in Aqua dest.

Ansatz

Template	
2,5 µl 10 x PCR-Puffer (GeneAmp, Perkin Elmer)	
3,0 µl 25 mM Magnesiumchlorid (Perkin Elmer)	
4,0 µl 1,25 mM dNTP-Mischung (Promega)	
1,25 µl 20 µM Primer 1	
1,25 µl 20 µM Primer 2	
0,1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) (Amersham Pharmacia)	
ad 25 µl Aqua dest.	

Die Reaktion wurde für 30 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Vor Beginn des Reaktionszyklus wurde der Ansatz durch Erhitzen für 10 min auf 95°C denaturiert und darüber hinaus die hitzeinduzierbare Polymerase aktiviert. In den weiteren Zyklen erfolgte die Trennung der DNS-Stränge für 1 min bei 95°C.

Für die anschließende Bindung der Primer („annealing“) wurde die Temperatur für 1,5 min gesenkt. Die Temperatur hängt dabei von der Länge und dem AT-GC-Verhältnis der verwendeten Oligonucleotide ab. Die Polymerisierungsreaktion fand bei 72°C für 1,5 min statt. Nach Ablauf sämtlicher Reaktionszyklen wurde noch einmal für 10 min bei 72°C inkubiert, um alle partiell polymerisierten DNS-Stränge zu vervollständigen. Das Ergebnis wurde durch eine analytische Agarosegelelektrophorese dargestellt.

8. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS

8.1. Auftrennung von DNS durch Agarosegelelektrophorese

Analytische Agarosegelelektrophorese

TBE-Puffer	89 mM Tris/HCl 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
5 x DNS-Auftragspuffer	100 mM EDTA 10% (w/v) Ficoll 0,5% (w/v) SDS 0,25% (w/v) Bromphenolblau

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden Flachgele mit einer Agarosekonzentration zwischen 0,7% und 2% verwendet.

Die Agarose wurde in 0,5 x TBE-Puffer geschmolzen, auf ca. 60°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) versetzt. Anschließend wurden die Proben mit 1/10 Volumen 10 x DNS-Auftragspuffer gemischt. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 0,5 x TBE verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 70 V für 30-60 min. Die Banden wurden anschließend auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert. Als Größenmarker diente die „1kb DNS-Leiter“ von Gibco Life Technologies.

Präparative Agarosegelelektrophorese

0,25% (w/v) Agarose und 0,75% (w/v) LMP-Agarose (Metaphor) wurde in 1x TBE-Puffer geschmolzen, auf ca. 60°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) gemischt. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen 10 x DNS-Auftragspuffer versetzt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 50 V für 1-2 h. Die Banden wurden anschließend auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Für die Isolierung von DNS-Fragmenten wurden ausgewählte Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten.

8.2. DNS-Isolierung aus präparativen Agarosegelen

Die Isolierung von DNS-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen wurde nach der vom Hersteller angegebenen Vorschrift mit dem *Gel Extraktion Kit "QIAquick"* der Firma Qiagen durchgeführt.

9. Transfer und Nachweis von DNS auf Membranen

9.1. Transfer von DNS auf Membranen (Southern Blot)

Depurinierungslösung	0,25 M HCl	
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl	
	0,5 M NaOH	
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl	
	0,5 M Tris/HCl	pH 7,5
20 x SSC	3 M NaCl	
	0,3 M Natriumcitrat	pH 7,0

Ein DNS-Agarosegel wurde zweimal 7 min in Depurinierungslösung inkubiert, zweimal mit demineralisiertem Wasser gewaschen, zweimal 15 min in Denaturierungslösung inkubiert und wiederum zweimal mit Wasser gewaschen.

Nach Neutralisierung für zweimal 15 min wurde über Nacht ein Kapillartransfer in 20 x SSC durchgeführt. Die DNS wurde auf eine *BiodyneA*-Nylonmembran übertragen, die anschließend für 1 h bei 80°C gebacken wurde.

9.2. Herstellung von Replikafiltern für die Hybridisierung mit DNS-Sonden

Waschlösung	2 x SSC	
	0,2 M Tris/HCl	pH 7,5

Die Herstellung der Denaturierungslösung und Neutralisierungslösung ist unter III9.1 beschrieben.

Herstellung der Replikas auf Nylonmembranen

Bakterienbewachsene Agarplatten wurden für ca. 2 Stunden im Kühlschrank abgekühlt, damit sich später der Agar beim Abziehen der Membran nicht von der Platte löst. Die vorgeschchnittene Nitrocellulose- bzw. Nylonmembran (*Hybond-C extra* oder *BiodyneA*) wurde von der Mitte aus auf die Agarplatte gelegt und die Lage der Membran durch Stiche mit einer Kanüle markiert.

Die Membran wurde vorsichtig abgezogen und bei RT für 2 min in Denaturierungslösung, 5 min in Neutralisierungslösung und 30 sek in Waschlösung inkubiert. Schließlich wurde die Membran für 1-2 h im Brutschrank bei 80°C gebacken.

9.3. Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden durch PCR

Um DNS zu markieren, wird mittels PCR das Nukleotidanalogen Digoxigenin-11-dUTP in die neu synthetisierte DNS eingebaut.

Ansatz	ca. 100 ng Template
	5 µl 10 x PCR-Puffer mit MgCl ₂
	0,2 µl 10 mM dNTPs
	2 µl Dig-11-dUTP (2 mmol)
	je 1 µl Primer 1 und Primer 2 (a' 10 pmol/µl)
	0,25 µl DNS-Taq-Polymerase (5 U/µl)
	ad 50 µl Aqua dest.

Die Reaktion wurde für 20-30 Zyklen unter den Bedingungen, wie sie unter III7.8 (PCR) beschrieben sind, durchgeführt. Die Annealing-Temperatur hängt auch hier von der Länge und dem AT-GC-Verhältnis der verwendeten Oligonucleotide ab. Das Ergebnis wurde durch eine analytische Agarosegelelektrophorese überprüft. DIG-markierte DNS kann bei -20°C aufbewahrt werden.

9.4. Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Sonde

20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0
Hybridisierungslösung	5 x SSC 50% (v/v) Formamid 0,1 % (w/v) N-lauroylsarcosine, Natriumsalz 0,02 % (w/v) SDS 5 % Blocking Reagenz (<i>DNA Labeling and Detection Kit, Boehringer</i>)
Puffer 1	100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7,5
Puffer 2	0,5% <i>Blocking Reagenz</i> in Puffer 1
5%ige Blocking-Reagenz-Stocklösung	100 mM Maleinsäure 5% (w/v) <i>Blocking Reagenz</i>
Puffer 3	0,1 M Tris-HCl 0,1 M NaCl 0,05 M Magnesiumchlorid pH 9,5

Der Zusatz von Formamid bewirkt, dass die Hybridisierungstemperatur von eigentlich 68°C auf 42°C gesenkt werden kann. Außerdem muss die Lösung nicht frisch angesetzt werden, sondern kann bei -20°C aufbewahrt werden. Die Konzentration an *Blocking Reagenz* muss allerdings von 0,5% auf 5% erhöht werden.

Wenn Replikafilter hybridisiert werden sollten, wurden sie, wie unter III9.2 beschrieben, vorbehandelt, um die Zellen aufzuschließen und die DNS zu denaturieren. Bei einem Southern-Blot ist dies nicht notwendig.

Die Membran wurde 1 h bei 42°C in Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Währenddessen wurde die DIG-markierte DNS für 10 min bei 95°C denaturiert und in Hybridisierungslösung aufgenommen (25 ng/ml). Diese Lösung wurde auf die Membran gegeben und ÜN bei 42°C im Rollofen hybridisiert. Anschließend wurde die Membran zweimal jeweils 5 min bei RT mit 2 x SSC und zweimal jeweils 15 min bei 68°C mit 0,1 x SSC gewaschen. Die folgenden Schritte wurden bei 37°C im Hybridisierungsofen durchgeführt. Die Membran wurde mit Puffer 1 gewaschen und 30 min mit Puffer 2 blockiert. Daraufhin wurde der Anti-DIG-Antikörper in Puffer 1 aufgenommen (1: 5000) und für 30 min auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran zweimal 15 min mit Puffer 1 gewaschen, für 2 min in Puffer 3 inkubiert und mit BCIP und NBT gefärbt (siehe III11.5.3).

10. Herstellung rekombinanter Proteine

Die rekombinanten Proteine T1S/FLAG, mIL-1R/FLAG und AcP/FLAG wurden, wie bei Rupp (2000) beschrieben, hergestellt und gereinigt.

11. Analyse von Proteinen

11.1. Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem *Bradford-Protein Assay* der Fa. Bio-Rad durchgeführt. Das Bradford-Reagenz wurde 1:5 mit Wasser zur gebrauchsfertigen Bradford-Lösung verdünnt.

10 µl Probe wurden ad 1 ml mit Bradford-Lösung versetzt und die Proteinkonzentration im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Zur Herstellung einer Eichgeraden wurde der *Proteinstandard II* von Bio-Rad eingesetzt.

11.2. Proteinfällung mit Aceton

Die Probe wurde mit 3 Vol. Aceton gemischt und 10 min auf Eis gefällt. Nach der Zentrifugation (10.000 rpm, 5 min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit Aceton gewaschen. Das Pellet kann in SDS-Auftragspuffer aufgenommen und die Proteine durch Western-Blot-Analyse untersucht werden.

11.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

5 x SDS-Auftragspuffer	1,52 g Tris/HCl 2 g SDS 2 ml β-Mercaptoethanol 4 g Ficoll 400 ad 40 ml Aqua pur. pH 6,8
1 x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl 192 mM Glycin 0,05% (w/v) SDS pH 8,3

Es wurde eine Gelapparatur der Fa. Bio-Rad verwendet. Die Mengen für die Herstellung der Polyacrylamidgele sind auf die Größe dieser Gelapparatur abgestimmt.

Trenngel 10% (12,5%)	30 % AA/0,8%BIS	2 ml (2,5 ml)
	1M Tris/HCl pH 8,8	2,25ml
	20 % SDS	30 μ l
	Aqua pur.	1,7 ml (1,2 ml)
	Temed	5 μ l
	10 % (w/v) APS	30 μ l
Sammelgel (5%)	30 % AA/0,8%BIS	0,33 ml
	1M Tris/HCl pH 6,8	0,5 ml
	20 % SDS	10 μ l
	Aqua pur.	1,17 ml
	Temed	2 μ l
	10 % (w/v) APS	15 μ l
	Färben mit Bromphenolblau	

Die Proben wurden mit 1/5 Volumen 5 x SDS-Auftragspuffer versetzt, für 5 min bei 95°C erhitzt, für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Als Marker wurde beispielsweise der Rainbow Molekulargewichtsmarker (RPN 756 oder RPN 800) von Amersham Pharmacia verwendet. Die Probenauftrennung erfolgte je nach Größe des nachzuweisenden Proteins für 1-1.5 h bei 120 V.

11.4. Übertragung von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

Anodenpuffer 1	0,3 M Tris
	20% (v/v) Methanol
Anodenpuffer 2	25 mM Tris
	20% (v/v) Methanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris
	40 mM ϵ -Amino-n-caproic-acid
	20% (v/v) Methanol

Die Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) erfolgte durch die „Semi-Dry“ Methode mit der Fast Blot B33-Apparatur der Fa. Bio-Rad.

Die PVDF-Membran wurde zum Benetzen für 5 min in Methanol getaucht, anschließend kurz mit Wasser gespült und in Anodenpuffer 2 äquilibriert. Pro Blot wurden acht Stück Whatmann-Papier 3MM vorbereitet. Drei Stück wurden in Anodenpuffer 1 getaucht und auf die Anodenseite der Blotapparatur gelegt. Auf diese folgten zwei mit Anodenpuffer 2 getränkte 3MM-Papiere. Anschließend folgte die Membran und das Gel. Den Abschluss des „Sandwiches“ stellten drei mit Kathodenpuffer getränkte 3MM-Papiere dar. Der Transfer fand für 1-1,5 h bei einer konstanten Stromstärke statt. Diese ist abhängig von der Gelgröße und – Dicke (0,8 mA/cm² bei 1-1,5 mm dicken Gelen).

11.5. Nachweis von Proteinen auf Membranen

TBS	10 mM Tris/HCl; pH 7,5 0,9% (w/v) NaCl
TBST	10 mM Tris/HCl; pH 7,5 0,9% (w/v) NaCl 0,1% (v/v) Tween 20
Milchpuffer	2,5% Magermilchpulver in TBST

In der Regel wurden unspezifische Bindungsstellen der Membranen mit Milchpuffer blockiert (ÜN, 4°C). Alle anschließenden Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Membran wurde für 2 h mit einer Verdünnung des primären Antikörpers in Milchpuffer inkubiert und anschließend 3 x für jeweils 10 min mit TBST gewaschen. Schließlich wurde die Membran für 1 h mit einer Verdünnung des sekundären Antikörpers in Milchpuffer inkubiert und erneut 3 x 10 min mit TBST gewaschen. Je nach Sekundärantikörper konnten verschiedene Färbemethoden eingesetzt werden.

11.5.1. Nachweis durch ECL

Peroxidasekonjugierte Sekundärantikörper wurden nach der Vorschrift des Herstellers mit dem *ECL-System* von Amersham Pharmacia nachgewiesen.

11.5.2. Nachweis mit dem ABC-System von Vector

Biotingekoppelte Antikörper wurden nach der Vorschrift des Herstellers mit dem ABC-System von Vector nachgewiesen.

11.5.3. Nachweis mit BCIP und NBT

Sekundärantikörper, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert vorlagen, wurden mit BCIP und NBT gefärbt.

AP-Puffer	100 mM Tris/HCl; pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
BCIP-Stammlösung	50 mg/ml BCIP in Dimethylformamid
NBT-Stammlösung	50 mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid
AP-Färbelösung	3,3 µl BCIP-Stammlösung 6,6 µl NBT-Stammlösung in 10 ml AP-Puffer

Die mit TBST gewaschene Membran (siehe III11.5) wurde für ca. 2 min in AP-Puffer äquilibriert und mit 10 ml AP-Färbelösung im Dunkeln unter mehrmaligem Schwenken gefärbt, bis ein violetter Farbkomplex zu sehen war. Anschließend wurde die Reaktion durch Waschen mit Aqua pur. abgestoppt und die Membran bei RT getrocknet.

11.6. Strippen von Membranen

TBST	siehe III11.5
Strippuffer	0,8 M Glycin pH 2,5
Stripplösung	5,625 ml Strippuffer ad 45 ml Aqua dest.

Wurden die Proteine auf einer Membran bereits einmal durch die Bindung von Antikörpern nachgewiesen, können diese wieder entfernt und die Membran erneut für einen Proteinnachweis eingesetzt werden.

Um die gebundenen Antikörper und Färbereagenzien zu entfernen, wurde die Membran 3 x 30 min bei RT mit TBST gewaschen und für 30 min in Stripplösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran wiederum 3 x 30 min mit TBST gewaschen und der Nachweis wie unter III11.5 beschrieben fortgeführt.

11.7. Biotinylierung von Antikörpern

Die Biotinylierung von Antikörpern wurde mit dem *Biotin Labeling Kit* der Fa. Boehringer durchgeführt. Wegen der geringen Mengen wurde ungebundenes Biotin aber nicht wie vom Hersteller empfohlen über Sephadex-Säulen, sondern durch Dialyse entfernt.

Je nach Proteingröße und Anzahl der freien Aminogruppen werden unterschiedliche Biotinmengen eingesetzt. Nachfolgend ist die Biotinylierung des Anti-T1-Antikörpers 3E10 beschrieben:

Zur Herstellung der Biotinlösung wurde Biotin-7-NHS in DMSO (2 mg/ml) aufgenommen. 200 µg Antikörper (2 mg/ml) wurden in einem Eppendorfreaktionsgefäß mit 6 µl Biotinlösung (2 mg/ml) versetzt und für 2 h bei RT leicht geschüttelt. Anschließend wurde der Deckel des Gefäßes entfernt und durch eine Dialysemembran ersetzt. Das Gefäß wurde mit der Dialysemembran nach unten in 1 l PBS getaucht. Dabei darf das Reaktionsgefäß nicht zu weit in den Puffer tauchen, da sonst Puffer durch die Membran in das Gefäß gelangt und die Proteinlösung verdünnt. Die Dialyse fand ÜN bei 4°C unter ständigem Rühren des Puffers statt.

12. Beschichtung von Zellkulturplatten mit Antikörpern

PBS

Siehe III.2.2

Je 200 µl einer Antikörperverdünnung (5 bzw. 10 µg/ml PBS) wurde auf ein Well einer 24-Well-Zellkulturplatte gegeben. Die Platten wurden ÜN im Kühlraum inkubiert und überschüssiger Antikörper durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Platten können mit PBS beschichtet mehrere Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

13. Die λZAP Express-Phagenbank

13.1. Herstellung der λZAP Express-Phagenbank

Die *λZAP Express Phagenbank* wurde mit 5 µg poly(A)⁺-mRNS aus dem Osteosarkom OS50 K12 AS3 mit dem *ZAP Express cDNA Synthesis Kit* der Fa. Stratagene hergestellt. Bis auf die radioaktive Markierung der cDNS, die in diesem Fall nicht stattfand, wurde die Bank nach den Anweisungen des Herstellers kloniert. Die mRNS wurde durch reverse Transkription mit einem Oligo-dT-Primer in cDNS umgeschrieben. Über den Primer wurde am 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle eingefügt. Durch die Bindung von Adaptoren am 3'-Ende wurde die zweite Restriktionsschnittstelle generiert. Nach einem Restriktionsverdau wurden die Fragmente über eine Sepharosesäule der Größe nach fraktioniert. Für die Ligation in den vorgeschrittenen λZAP Express-Vektor wurden cDNS-Fragmente mit einer Größe zwischen 500 und 2000 bp verwendet.

Nach der Ligation der Fragmente in den Vektor wurden die rekombinanten Vektoren mit dem "*Gigapack III Gold Packaging Extrakt*" durch "self assembling" in die λ-Phagenköpfe verpackt.

13.2. Titerbestimmung

Eine XL1-Blue-Übernachtskultur in LB-Medium mit 10 mM MgSO₄ und 0,2% Maltose wurde verdünnt und bei 37°C auf dem Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1 kultiviert. Geschmolzener NZY-Topagar wurde mit MgSO₄ und Maltose in oben genannter Konzentration versetzt und bei 45-55°C flüssig gehalten. Die Bakterien wurden zentrifugiert (10 min, 2000 rpm, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in steriler 10 mM MgSO₄-Lösung aufgenommen (OD₆₀₀ = 0,5).

Für eine 9 cm-Petrischale wurde jeweils 200 µl Bakteriensuspension mit 1 µl Phagenamplifikat (unterschiedliche Verdünnungen) versetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Dieser Ansatz wurde mit flüssigem Topagar gemischt, sofort auf eine vorgewärmte NZY-Platte (37°C) gegeben und durch vorsichtiges Schwenken auf der gesamten Platte verteilt. Schließlich wurden die Platten mit dem fest gewordenen Topagar umgedreht für ca. 8 h bei 37°C inkubiert und die Plaques ausgezählt.

13.3. Amplifikation der λZAP Express-Phagenbank

SM-Puffer	5,8 g NaCl
	2,0 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	50 ml 1M Tris/HCl (pH 7,5)
	5 ml 2% (w/v) Gelatine
	Aqua dest. ad 1 l

XL1-Blue-Zellen wurden, wie unter III13.2 beschrieben, in einer MgSO₄-Lösung aufgenommen. Für eine 15 cm-Schale wurden 600 µl Bakteriensuspension mit der entsprechenden Menge primärem Phagenamplifikat gemischt (5×10^4 pfu pro 15cm-Schale) und für 15 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit flüssigem Topagar gemischt, sofort auf eine vorgewärmte NZY-Platte (37°C) gegeben und durch vorsichtiges Schwenken auf der gesamten Platte verteilt.

Schließlich wurde die Platte mit dem fest gewordenen Topagar umgedreht für ca. 8 h bei 37°C inkubiert. Die Plaques sollten nicht größer als 1-2 mm sein. Die Platte wurden mit 10 ml SM-Puffer überschichtet und ÜN im Kühlschrank inkubiert. Die Phagensuspension wurde von der Platte genommen und die noch anhaftenden Phagen mit weiteren 2 ml SM-Puffer von den Platten gewaschen. Die Suspension wurde bis zu einer Endkonzentration von 5% (v/v) mit Chloroform versetzt, gut gemixt und für 15 min bei RT inkubiert. Größere Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (10 min; 2000 rpm, RT) entfernt, der Überstand mit Chloroform bis zu einer Endkonzentration von 0,3 % (v/v) versetzt und bei 4°C bis zu seiner Verwendung aufbewahrt.

Für eine längere Lagerung wurde das Amplifikat mit 7% (v/v) DMSO versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

13.4. Hybridisierung von Replikafiltern mit rekombinanten Proteinen

Puffer und Lösungen

HEPES binding buffer (HBB)	25 mM HEPES, pH 7,9 25 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 0,5 mM DTT
GuanidinHCl-Lösung (frisch)	Entsprechende Menge GuanidinHCl in HBB
IPTG-Stocklösung	100 mM IGPT in H ₂ O
TBS	20 mM Tris/HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl
TBST	0,05% Tween 20 in TBS

Blockierungspuffer

Milchpuffer	2,5 % Magermilchpulver in TBST
Milchpuffer mit BSA	2,5 % Magermilchpulver 0,5 % BSA in TBST
BSA	1 % BSA in TBST

Herstellung der Replikafilter

NZY-Topagar	NZY-Medium mit 0,7% (w/v) Agarose; autoklaviert
Magnesiumsulfat-Stocklösung	1 M MgSO ₄ ; sterilfiltriert
Maltose-Stocklösung	20% (w/v) Maltose; sterilfiltriert

Eine Übernachtskultur des Wirtsbakterienstammes XL1-Blue in LB-Medium mit 10 mM MgSO₄ und 0,2% Maltose wurde verdünnt und bei 37°C auf dem Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1 kultiviert. NZY-Topagar wurde geschmolzen, MgSO₄- und Maltoselösung in oben genannter Konzentration zugegeben und bei 45-55°C flüssig gehalten.

Die Bakterien wurden zentrifugiert (10 min, 2000 rpm, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in der Hälfte der Ursprungsmenge steriler 10 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert. Die OD₆₀₀ wurde mit MgSO₄-Lösung auf 0,5 eingestellt.

Für eine 15 cm-Petrischale wurden 600 µl Bakteriensuspension mit der entsprechenden Menge an sekundärem Phagenamplifikat gemischt und für 15 min bei 37°C inkubiert.

Die Suspension wurde mit flüssigem Topagar gemischt, sofort auf eine vorgewärmte NZY-Platte (37°C) gegeben und durch vorsichtiges Schwenken auf der gesamten Platte verteilt. Schließlich wurden die Platten mit dem fest gewordenen Topagar umgedreht für ca. 8 h bei 37°C inkubiert. Die Platten sollten mindestens zwei Tage alt sein, damit sich später beim Abziehen der Membranen der Topagar nicht von den Platten löst.

Die Nitrocellulose- bzw. Nylonmembran (*Hybond-C extra* oder *BiodyneA*) wurde passend zugeschnitten, für 10 min in eine 10 mM IPTG-Lösung getaucht und bei RT auf Whatmann 3MM-Papier getrocknet. Die vorbehandelten Membranen wurden auf die Phagenplatten gelegt und für 6 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Platten für mindestens 10 min bei 4°C gekühlt und die Position der Membran mit einer sterilen Nadel markiert. Schließlich wurden die Filter abgezogen und erneut bei RT auf 3MM-Papier getrocknet.

Denaturierung und Renaturierung der Proteine

Die Denaturierung und Renaturierung der Proteine wurde bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Dazu wurden die Membranen zweimal für 10 min unter leichtem Schütteln in einer frisch hergestellten 6 M GuanidinHCl-Lösung inkubiert. Für die langsame Renaturierung wurden die Filter fünfmal für jeweils 5 min in GuanidinHCl-Lösung inkubiert, wobei bei jedem Schritt die GuanidinHCl-Konzentration halbiert wurde. Schließlich wurden die Membranen zweimal 5 min mit HBB (HEPES binding buffer) gewaschen.

Hybridisierung mit rekombinanten Proteinen

Vor der Hybridisierung mit rekombinanten T1S/FLAG oder IL-1R/FLAG wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Filter durch eine einstündige Inkubation mit Milchpuffer blockiert. Anschließend wurde das rekombinante Protein in Milchpuffer aufgenommen (5 µg/ml) und die Membranen mit der Proteinverdünnung ÜN bei 4°C inkubiert. Nach drei 10minütigen Waschschritten bei RT mit TBST folgte die einstündige Inkubation der Filter mit einer verdünnten Antikörperlösung (Anti-FLAG BioM2 in Milchpuffer; 10µg/ml). Nachdem die Filter erneut dreimal für 10 min mit TBST gewaschen wurden, folgte die Färbung mit dem ABC-System von Vector (siehe III1.5.2).

Bei der Hybridisierung gibt es zahlreiche Variationsmöglichkeiten. Beispielsweise ist die Verwendung unterschiedlicher Blockierungsreagenzien möglich. Die Protein- bzw. Antikörperkonzentrationen können variiert oder die Inkubationszeiten bzw. -temperaturen verändert werden. Auch der Einsatz anderer Antikörper oder Färbemethoden ist möglich (siehe III1.5).

13.5. Ausschneiden des pBK-CMV-Plasmids aus dem ZAP Express-Vektor

Übernachtskulturen der Wirtsstämme XL1-Blue und XL0LR wurden zentrifugiert (1000 x g) und die Zellen in steriler 10 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert, bis eine OD₆₀₀ von 1 erreicht war.

Dies entspricht einer Zelldichte von 8×10^8 Zellen/ml. Die XL1-Blue-Zellen wurden mit dem sekundären Phagenamplifikat in einem Verhältnis 1:10 (Phagen : Zellen) gemischt. Dabei wurde die 100fache Menge Phagenamplifikat eingesetzt. Wenn beispielsweise aus einem Phagenamplifikat, bestehend aus 50000 verschiedenen Phagenklonen, das CMV-Plasmid ausgeschnitten wurde, musste Phagenamplifikat entsprechend 5×10^6 pfu mit 5×10^7 Bakterienzellen gemischt werden. Zu dieser Mischung wurde der *ExAssist* Helferphage in einer Konzentration 10:1 (Helferphage : Zelle) zugegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 20 ml NZY-Medium zugegeben und für ca. 3 h bei 37°C geschüttelt. Die Suspension wurde für 20 min auf 65-70°C erhitzt, zentrifugiert (1000 x g, 10 min, RT) und der Überstand, welcher die Phagmide enthält, in ein steriles Falconröhrchen überführt. Für die Titerbestimmung wurden 1 µl Überstand mit 200 µl XL0LR-Zellen in MgSO₄-Lösung gemischt, für 15 min bei 37°C inkubiert, 40 µl 5 x NZY-Medium zugegeben und weitere 45 min bei 37°C inkubiert. 10 bzw. 100 µl der Mischung wurden auf kanamycinhaltige LB-Platten (50 µg/ml) plattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Nach der Titerbestimmung wurde ein größerer Ansatz so berechnet, dass jeder ursprüngliche Phagenklon mindestens 100 mal vorhanden ist.

Wenn beispielsweise ursprünglich 50000 Phagenklone vorhanden waren, sollte der Ansatz mindestens 5×10^6 Bakterienkolonien ergeben. Die entsprechende Menge Überstand wurde mit der 200fachen Menge XL0LR-Zellen in MgSO₄-Lösung gemischt, für 15 min bei 37°C inkubiert, 1/5 Vol 5 x NZY-Medium zugegeben und weitere 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit kanamycinhaltigem NZY-Medium verdünnt und bei 37°C im Schüttler so lange kultiviert, bis eine OD₆₀₀ von 1 erreicht war. Aus dieser Kultur wurde mit dem *Plasmid Purification Kit* der Firma Quiagen Plasmid-DNS isoliert.

13.6. Herstellung T1-gekoppelter *DynaBeads*

PBS (phosphate buffered saline)	siehe III2.2
Waschpuffer	1 x PBS 0,1% (w/v) BSA

DynaBeads (CELLlection Pan Mouse IgG) von Dynal wurden nach der vom Hersteller angegebenen Vorschrift erst mit dem Antikörper Anti-FLAG M2 von Kodak und anschließend mit rekombinantem T1S/FLAG gekoppelt. Dazu wurden pro Versuch 1×10^7 Beads (= 25 μ l) steril in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit Waschpuffer gewaschen und in der Ursprungsmenge Puffer aufgenommen.

Pro 25 μ l Beads wurden 0,5 μ g Anti-FLAG M2-Antikörper zugegeben und 30 min bei RT auf einem Rad für Eppendorfreaktionsgefäße gemischt. Anschließend wurden die Beads 4 x mit Waschpuffer gewaschen, in der Ursprungsmenge Puffer aufgenommen und pro 25 μ l Beads 0,25 μ g rekombinantes T1S/FLAG zugegeben. Nach der Inkubation für 30 min bei RT wurde 4 x mit Waschpuffer gewaschen, die Beads wiederum in der Ursprungsmenge Puffer aufgenommen und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

13.7. Zellen sortieren mittels *DynaBeads*

PBS (phosphate buffered saline)	(siehe III2.2)
Waschpuffer	1 x PBS 0,1% (w/v) BSA
DNase-Lösung	DNase in „releasing-buffer“ (im <i>CELLlection Pan Mouse IgG</i> -Kit enthalten)

Adhärente Zellen wurden trypsiniert, in Medium aufgenommen, zweimal mit Waschpuffer gewaschen und gezählt. Jeweils 2×10^6 Zellen wurden in 1 ml Waschpuffer aufgenommen, 25 μ l proteingekoppelte *DynaBeads* zugegeben und für 15 min bei 4°C gemischt.

Die Beads wurden durch einen Magneten separiert und der Überstand abgenommen. Er enthält die ungebundenen Zellen. Die Beads wurden anschließend dreimal mit Waschpuffer gewaschen, in 200 μ l Waschpuffer aufgenommen und zum Eluieren der gebundenen Zellen mit 4 μ l DNase-Lösung gemischt. Nach 15minütiger Inkubation bei RT wurden die Beads wiederum durch einen Magneten abgetrennt und der Überstand, der die gebundenen Zellen enthält, in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

Die Beads wurden noch einmal in 200 μ l Waschpuffer aufgenommen, kurz gemischt, durch den Magneten abgetrennt und der Überstand zu der Fraktion der gebundenen Zellen gegeben.

14. Herstellung, Amplifikation und „Screen“ der T7-Phagenbanken

Die T7-cDNS-Bank wurde nach der Vorschrift des Herstellers mit dem *OrientExpress-System* von Novagen kloniert. Dabei wurde mittels reverser Transkription mit einem oligo-dT-Primer mRNA in cDNS transkribiert. An den Enden der cDNS-Fragmente wurden Linker mit Restriktionsschnittstellen ligiert und die entstehenden Fragmente mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut. Überschüssige Linker und kleine cDNS-Fragmente wurden mittels Größenfraktionierung abgetrennt. Nach der Ligation der Fragmente mit den T7-Vektorarmen wurde die DNS mit dem *T7Select-System* in die T7-Phagen verpackt. Da die primären Phagen die Fusionsproteine noch nicht auf der Phagenoberfläche exprimieren, wurden, wie im Manual unter *Liquid Lysate Amplification* beschrieben, sekundäre Phagen amplifiziert. Die Lysate können bei 4°C oder unter Zugabe von 0,1 Vol. 80% Glycerol bei -80°C aufbewahrt werden.

14.1. Bestimmung des Phagentiters

Top-Agarose	10 g Trypton
	5 g Hefeextrakt
	5 g NaCl
	6 g Agarose
	ad 1 l demineralisiertes Wasser

Eine Übernachtskultur der Wirtszellen BLT5403 in LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin wurde verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 kultiviert. Von dem Phagenamplifikat wurde eine Verdünnungsreihe in LB-Medium hergestellt.

250 µl Bakteriensuspension wurde mit jeweils 100 µl Amplifikat und 3 ml geschmolzener Top-Agarose (45-50°C) gemischt, sofort auf eine vorgewärmte LB-Platte mit Ampicillin gegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Platte verteilt. Nachdem die Top-Agarose erstarrt war, wurden die Platten umgedreht für 3-4 h bei 37°C oder ÜN bei RT inkubiert.

14.2. Biopanning

TBST	10 mM Tris/HCl pH 7,5
	0,9% (w/v) NaCl
	0,1% (v/v) Tween 20
Elutionspuffer	1% (w/v) SDS in TBST

In jedes Well einer beschichteten Mikrotiterplatte wurden 200 µl sekundäres Phagenamplifikat gegeben. Dabei sollte jeder primäre Phage statistisch mindestens 100 mal vertreten sein. Die Platte wurde für 30 min bei RT inkubiert und anschließend fünfmal mit TBST gewaschen. Schließlich wurden 200 µl Elutionspuffer zugegeben, für 10-20 min bei RT inkubiert und die eluierten Phagen in 50 ml einer Bakterienkultur des Wirtsstammes BLT5403 ($OD_{600} = 0,5-1$) überführt. Die Bakterienkultur wurde bei 37°C auf dem Schüttler so lange inkubiert, bis die Lyse der Zellen zu sehen war (1-3 h). Die Kultur wurde zentrifugiert (10 min, 8000 x g) und der Titer des Überstandes bestimmt. Dieses Amplifikat wurde für einen erneuten Anreicherungsschritt eingesetzt. Insgesamt wurden drei aufeinanderfolgende „Biopanning-Schritte“ durchgeführt.

14.3. Beschichtung von Mikrotiterplatten mit rekombinantem Protein

TBS	10 mM Tris/HCl pH 7,5 0,9% (w/v) NaCl
Milchpuffer	0,1% (v/v) Tween 20 2,5% Magermilchpulver in TBS

ELISApplatten wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht sterilisiert, jedes Well mit 100 µl einer Proteinlösung in TBS (5 µg/ml) oder als Kontrolle nur mit TBS beschichtet und ÜN bei 4°C inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit Aqua dest. und dreimaliges Waschen mit TBS wurde ungebundenes Protein entfernt. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit Milchpuffer (1 h; RT) abgesättigt. Wiederum wurden die Wells mehrere Male mit Aqua dest. gewaschen, mit Wasser überschichtet und bei 4°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

15. Immunpräzipitation biotinylierter Oberflächenproteine

Die Biotinylierung von Proteinen auf der Zelloberfläche und die Immunpräzipitation wurde mit dem *Cellular Labeling and Immunoprecipitation Kit* von Boehringer mit den im Kit enthaltenen Reagenzien durchgeführt. Dabei wurden die Zellen zweier konfluenter 15 cm-Schalen mit PBS gewaschen und jeweils 2 ml Biotinylierungspuffer mit 10 µl Biotin-7-NHS-Stocklösung zugegeben. Die Zellen wurden für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (15 min, 4°C) abgestoppt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 2 ml Lysispuffer (30 min, 4°C) lysiert. Grobe Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation des Lysates (5000 rpm, 10 min, 4°C) entfernt.

50 µl *Anti-FLAG-M2-Affinity Gel* wurde mit PBS gewaschen, zum Zelllysat gegeben, für 1 h bei RT gemischt und anschließend zentrifugiert (5000 rpm, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde mit 15 µg rekombinatem T1S/FLAG bzw. als Spezifitätskontrolle AcP/FLAG versetzt. Nach einer 1stündigen Inkubation bei 4°C wurde 50 µl mit PBS gewaschenes *Anti-FLAG-M2-Affinity Gel* zugegeben und für mindestens 3 h bei 4°C gemischt. Schließlich wurde das Anti-FLAG-Gel 4 mal mit TBS gewaschen und das Pellet in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die biotinylierten Proteine wurden mit Streptavidin-AP und dem Färbesystem BCIP/NBT (siehe III 1.5.3) nachgewiesen.

16. Reportergenanalysen

Die Reportergenanalysen wurden durch Cotransfektion unterschiedlicher Rezeptorkonstrukte, eines NF-κB-abhängigen Luciferasereporterplasmides (IgG/Luci) und eines β-Galaktosidase-Expressionsvektors als Transfektionskontrolle (pEF/βGal) in HEK 293T-Zellen mittels *LipofectAMINE-Reagenz* durchgeführt. Unterschiedliche DNS-Mengen wurden durch Zugabe des Leervektors (pRc/CMV) ausgeglichen.

1 x 10⁵ HEK 293T-Zellen wurden pro Well einer 24-Well-Zellkulturschale ausgesät und einen Tag bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Zellen sollten zum Zeitpunkt der Transfektion zwischen 50% und 70% konfluent sein. Für die Transfektion (siehe auch III 3.1) wurden 1,25 µl *LipofectAMINE-Reagenz* in 150 µl SFM und 0,4 µg DNS in 150 µl SFM eingesetzt. Die DNS setzte sich in der Regel aus 50 ng Rezeptorkonstrukt, 40 ng Luciferasereporter (IgG/Luci), 30 ng Transfektionskontrolle (pEF/βGal) und dem Leervektor pRc/CMV-Vektor (ad 0,4 µg DNS) zusammen.

Die Zellen wurden nach der Transfektion für 12-24 h in serumhaltigem Medium und anschließend, um die endogene NF-κB-Aktivität möglichst gering zu halten, für 6 h in serumfreiem Medium (SMF) im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Schließlich wurden die Zellen für 6 h mit 10 ng/ml IL-1α induziert. Abweichungen von diesem Protokoll sind im Ergebnisteil bei den entsprechenden Experimenten dokumentiert.

Die Luciferaseaktivität und die β-Galaktosidaseaktivität wurden in weißen 96-Well-Platten von Greiner mit dem *Dual Light Kit* von Topix bestimmt. Bei der Verwendung des *Dual Light Kits* wurden jeweils die Hälfte der angegebenen Reagenzienmengen eingesetzt.

Die Messung fand im *LumiCount* von Packard mit dem Programm *PlateReader Version 2.11* von Packard statt.

Die Werte der relativen Luciferaseaktivität wurden standardisiert durch Abzug der Hintergrundaktivität (untransfizierte Zellen) und Bezug auf die Werte der β -Galaktosidaseaktivität (Transfektionskontrolle). Zudem wurden die Ergebnisse auf einen möglichst konstanten Wert (z.B. nichtinduzierte CMV-Kontrolle) standardisiert, indem diesem ein konstanter Wert (z.B. 1) zugeordnet wurde. In der Regel wurde der Mittelwert und die Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

17. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

FACS-Puffer	0,1% (w/v) Natriumazid 1% (w/v) FKS in PBS (siehe III.2.2)
-------------	--

Adhärente Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA abgelöst, in DMEM mit 10% FKS aufgenommen und die Zellzahl in der *Neubauer Zählkammer* bestimmt.

600.000 Zellen wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 4°C und 2700 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden 2 x mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit 100 μ l einer Verdünnung des Primäantikörpers oder bindenden Proteins in FACS-Puffer (5-10 μ g/ml) für 30 min auf Eis inkubiert. Bei den Kontrollen wurde nur FACS-Puffer oder ein Kontrollantikörper bzw. Kontrollprotein in FACS-Puffer zugegeben. Nach einem weiteren Waschschrift mit FACS-Puffer wurden 100 μ l einer Verdünnung des Sekundäantikörpers in FACS-Puffer (5-10 μ g/ml) zugegeben und erneut 30 min auf Eis inkubiert. Meist wurde ein biotinmarkierter Sekundäantikörper verwendet. In diesen Fällen wurde mit Phycoerythrin konjugiertem Streptavidin gefärbt, indem die Zellen für 30 min mit einer verdünnten Streptavidin-PE-Lösung (1:1000 in FACS-Puffer) auf Eis inkubiert wurden. Anschließend erfolgte ein letzter Waschschrift mit FACS-Puffer und die Messung der Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer *Epics XL* von Beckman Coulter. Dabei wurden, durch das Setzen eines Rahmens bei dem FSC/SSC („forward/sideward scatter“), nur lebende vereinzelte Zellen erfasst.

IV Ergebnisse

1. Identifizierung des T1-Liganden

Die Identifizierung des T1-Liganden sollte durch die Rezeptor/Ligand-Interaktion erreicht werden. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Phagenbanken hergestellt. Eine *λZAP-Express-cDNA-Bank* (Stratagene) und eine *T7Select-Phagenbank* (Novagene). Für die Herstellung beider Banken wurde die poly(A)⁺mRNS eines murinen Osteosarkoms verwendet. Die mRNS des Osteosarkoms schien für unsere Zwecke besonders gut geeignet, da mittels Durchflusszytometrie (siehe IV1.2) und BIAcore-Spektroskopie (unveröffentlichte Beobachtung E. Thomassen) nachgewiesen werden konnte, dass Zellen des Osteosarkoms sowohl ein membranständiges als auch ein lösliches T1-bindendes Protein tragen. Für die Interaktion mit dem Liganden stand, als hochaffiner Interaktionspartner, gereinigtes rekombinantes T1S-Protein (Rupp et al., 1995) zur Verfügung.

1.1. Herstellung und Reinigung der rekombinanten Proteine

Rekombinantes murines T1S/FLAG wurde, wie in Rupp et al. (1995) beschrieben, hergestellt. Analog der Herstellung des rekombinanten mT1S/FLAG wurden die Proteine mIL-1RI/FLAG und mIL-1RAcP/FLAG exprimiert und aufgereinigt (Wesche et al., 1997; Kollwe et al., 2000).

1.2. Durchflusszytometrischer Nachweis des putativen T1-Liganden

Verschiedene für die Arbeit essentielle Zelllinien, wie die Osteosarkomzelllinie K12 AS3, wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Expression T1-bindender Oberflächenmoleküle untersucht.

Die potentiellen Liganden wurden durch Bindung an rekombinantes mT1S/FLAG-Protein, biotinmarkierten Anti-FLAG-Antikörper und Phycoerythrin konjugiertes Streptavidin (Streptavidin-PE) nachgewiesen. Um die T1-Spezifität der Bindung zu zeigen, wurde bei analogen Ansätzen mT1S/FLAG durch Puffer oder durch rekombinantes mIL-1RAcP/FLAG ersetzt.

Auf der Oberfläche der Zelllinien K12, K12AS3, TME 3H3 und NIH 3T3 konnte T1-bindendes Protein nachgewiesen werden. Die Interaktion ist spezifisch, da das Kontrollprotein mIL-1RacP/FLAG keine Oberflächenbindung zeigte. Bei den Zelllinien MDA, HEK 293 und HEK 293T war weder eine Bindung von mT1S/FLAG noch mIL-1RacP/FLAG zu beobachten. Exemplarisch sind in Abb. 6 die Untersuchungsergebnisse zu den Zelllinien K12 AS3 und MDA abgebildet.

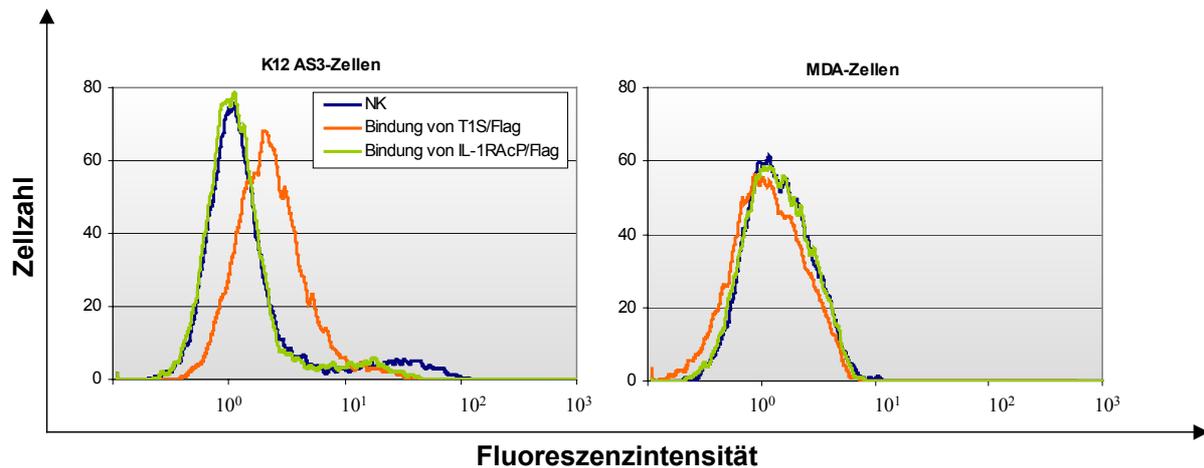


Abb. 6: Durchflusszytometrischer Nachweis T1-bindender Proteine auf der Zelloberfläche

6×10^5 Zellen wurden mit rekombinantem mT1S/FLAG (10 $\mu\text{g/ml}$) bzw. mIL-1RacP/FLAG (10 $\mu\text{g/ml}$) oder bei der Negativkontrolle (NK) mit Puffer inkubiert. Die Bindung der Fusionsproteine wurde mit einem monoklonalen, biotinmarkierten Antikörper gegen das FLAG-Epitop (Anti-FLAG BioM2; 10 $\mu\text{g/ml}$) und mit Streptavidin-PE (1:1000) nachgewiesen. Die Fluoreszenzintensität wurde im Epics XL von Beckman Coulter gemessen.

1.3. Die λ ZAP Express-Phagenbank

1.3.1. Herstellung und Charakterisierung der λ ZAP Express-Phagenbank

Die λ ZAP Express Phagenbank wurde mit 5 μg poly(A)⁺-mRNS eines murinen Tumors aus K12 AS3-Zellen hergestellt. Der Phagentiter wurde bestimmt und die Phagen amplifiziert. Die Titerbestimmung ergab insgesamt 3,3 Mio. primäre Phagen.

Die Größe der Inserts wurde mittels PCR mit den insertflankierenden Primern *ZAPEx seq* und *ZAP 3'* bestimmt. Die Größe der Inserts lag wie gewünscht zwischen 500 und 2000 kb.

Der Erfolg der Klonierung wurde getestet, indem DIG-markierte Aktin-DNS hybridisiert und diese mit biotinkoppeltem Anti-DIG-Antikörper und dem *ABC-Färbesystem* von Vektor nachgewiesen wurde.

Einige der gefärbten Plaques wurden gepickt und mittels PCR Aktin-DNS nachgewiesen. Ca. 1% der primären Plaques trugen Aktin-DNS als Insert (Ergebnisse nicht gezeigt).

1.3.2. Etablierung einer geeigneten Hybridisierungsmethode

Als Modell für die Etablierung der Nachweismethode wurde die Interaktion zwischen dem IL-1-Rezeptor Typ I und seinem Liganden IL-1 α verwendet. Zu diesem Zweck wurde die vollständige IL-1 α -cDNS in den λ ZAP Express-Vektor kloniert, dieser in Phagen verpackt und die DNS-Sequenz durch Sequenzierung bestätigt.

Durch Westernanalyse mit einem Antikörper gegen murines IL-1 α wurde überprüft, ob das entsprechende Protein exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurde der Vektor „*pBK-CMV*“ aus dem λ ZAP-Express-Vektor ausgeschnitten und in E.coli-Bakterien transformiert. Durch IPTG-induzierte Proteinexpression und Nachweis durch Westernanalyse mit einem Anti-IL-1 α -Antikörper konnte gezeigt werden, dass IL-1 α exprimiert wird (Ergebnisse nicht gezeigt).

Um eine geeignete Hybridisierungsmethode zu etablieren, wurde IL-1 α -Amplifikat mit einem Amplifikat gemischt, in welchem IL-1 α durch PCR nicht nachweisbar war. Wirtsbakterien wurden infiziert und auf Platten ausplattiert. Nach der Inkubation im Brutschrank wurden Replikafilter genommen, die mittels Hybridisierung mit rekombinantem mIL-1RI/FLAG untersucht wurden. Das gebundene FLAG-gekoppelte Protein wurde durch biotinmarkierten Anti-FLAG-Antikörper mit dem *ABC-Färbesystem* von Vektor nachgewiesen.

Trotz zahlreicher Versuche mit variierenden Parametern konnte keine spezifische Bindung zwischen mIL-1RI/FLAG und IL-1 α nachgewiesen werden.

Folgende Parameter wurden bei den Etablierungsversuchen verändert:

- Färbemethoden z.B. *ABC-System* von Vektor, *ECL-System* von Amersham oder BCIP/NBT
- Antikörperkombinationen zum Nachweis von IL-1R/FLAG z.B. biotinylierter Anti-FLAG M2-Antikörper und ABC-System von Vektor oder Anti-FLAG M2-Antikörper, Anti-mouse-AP und BCIP/NBT
- Blockierungsreagenzien (z.B. Milchpulver, BSA oder Gelatine)
- Konzentrationen des rekombinanten Proteins und der Antikörper
- Dauer der Inkubations- und Waschschrte
- Temperaturen während der Inkubations- und Waschschrte (4°C - 37°C)
- Einsatz unterschiedlicher Membranen

Da auf diese Weise keine Interaktion zwischen IL-1 α und dem IL-1-Rezeptor nachgewiesen werden konnte, sollte durch Western-Analyse getestet werden, ob das Protein in Phagen-infizierten Bakterien exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurden Wirtsbakterien mit IL-1 α -tragenden Phagen infiziert, die Expression durch IPTG induziert und anschließend durch Western-Analyse mit einem entsprechenden Antikörper im Überstand bzw. Pellet IL-1 α nachgewiesen.

Ein Protein der entsprechenden Größe war nicht nachweisbar. Auch ein Versuch, bei dem das Protein aus dem Überstand durch Acetonfällung angereichert wurde, zeigte nicht das gewünschte Ergebnis.

1.3.3. Screen der λ ZAP-Express-Bank

Das zu IV1.3.2 analoge Experiment, bei dem auf der Suche nach dem T1-Liganden Replikafilter mit rekombinantem mT1S/FLAG hybridisiert und die Bindung des Proteins durch Anti-FLAG BioM2 und dem *ABC-Färbesystem* nachgewiesen wurde, ergab ebenfalls keine spezifische Bindung an einzelne Klone.

Es sind verschiedene Gründe für das Scheitern der Versuche denkbar. Eine mögliche Ursache für das Fehlen einer spezifischen Proteininteraktion ist eine veränderte Faltung oder unzureichende Glykosylierung der Proteine bei der Expression in Bakterien. Dies könnte durch die Expression der Proteine in Säugerzellen verhindert werden.

1.4. Anreicherung von ligandenträgenden Zellen durch T1S-gekoppelte *DynaBeads*

Die *λ ZAP Express-Phagenbank* erlaubt eine Proteinexpression in Bakterien und Säugetierzellen. Bei der Expression in Säugerzellen ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass die Proteine in ihrer nativen Faltung und Glykosylierung vorliegen. Die cDNS-Bank wurde transient in Säugerzellen transfiziert. Zellen, die daraufhin den membranständigen Liganden exprimieren, sollten mittels T1S-gekoppelter *DynaBeads* angereichert werden. Für die Herstellung der cDNS-Bank wurde mRNA eines Osteosarkoms, entstanden aus K12 AS3-Zellen, verwendet. Von den Osteosarkomzellen konnte durchflusszytometrisch gezeigt werden, dass sie ein membranständiges T1-bindendes Protein tragen (siehe IV1.2). Die cDNS für den membranständigen Liganden sollte demnach in der Bank enthalten sein.

Für dieses Experiment wurde der Säugetiervektor pBK-CMV mittels Helferphagen aus den Vektoren der Phagenbank geschnitten. Die cDNS-Bank wurde mittels *LipofectAMINE-Reagenz* von Life Technologies in HEK293T-Zellen transfiziert.

Anschließend wurden Zellen, die T1-bindende Proteine auf der Oberfläche exprimieren, durch T1-gekoppelte *DynaBeads* angereichert. Die *DynaBeads* wurden zunächst mit dem Antikörper Anti-FLAG M2 von Kodak und anschließend mit rekombinatem mT1S/FLAG gekoppelt.

1.4.1. Etablierung des Systems

Vorab sollte getestet werden, ob eine Anreicherung von ligandenträgenden Proteinen durch T1S-gekoppelte *DynaBeads* prinzipiell möglich ist.

Zu diesem Zweck wurden ligandenträgende Zellen (TME 3H3-Zellen) von Zellen, welche T1S in der FACS-Analyse nicht binden (MDA-Zellen), durch T1S-gekoppelte *DynaBeads* voneinander getrennt. Um die Zellen im Durchflusszytometer voneinander unterscheiden zu können, wurden MDA-Zellen mit stabil transfiziertem EGFP verwendet. Diese wurden mir freundlicherweise von Frau Margit Fuchs zur Verfügung gestellt (Inst. für Molekulare Pathologie der TU-München).

Die Abb. 7 zeigt, dass bei einer Ausgangsmenge an ligandenpositiven TME 3H3-Zellen von 7,2% eine Anreicherung auf 68,4% stattfand. Die Ausbeute lag jedoch lediglich bei ca. 10%.

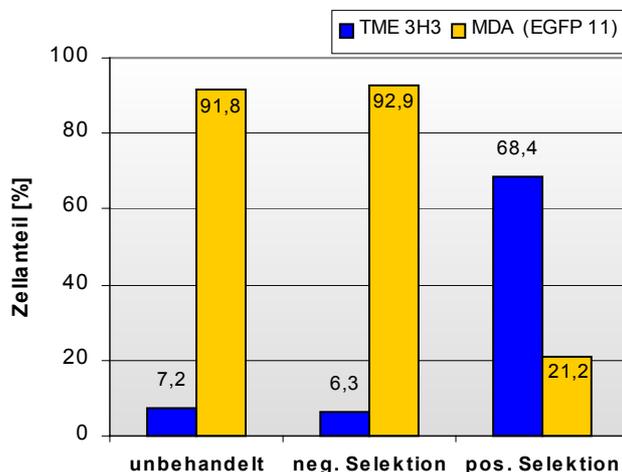


Abb. 7: Anreicherung ligandenträger Zellen durch T1-gekoppelte *DynaBeads*

TME 3H3- und MDA EGFP11-Zellen wurden gemischt und mit T1-gekoppelten *DynaBeads* sortiert. Der Gehalt an fluoreszierenden Zellen (MDA EGFP11) der unbehandelten Zellmischung, der ungebundenen Zellen (neg. Selektion) und der gebundenen Zellen (pos. Selektion) wurden im Durchflusszytometer Epics XL von Beckman Coulter bestimmt.

1.4.2. Screen der cDNS Bank

Um ligandenträgende Vektoren anzureichern, wurde der Vektor pBK-CMV, wie im Protokoll beschrieben, aus den Vektoren der λ ZAP-Express-Phagenbank herausgeschnitten und amplifiziert. Die Vektoren wurden mittels *LipofectAMINE* in HEK 293-Zellen, welche nach FACS-Analyse T1S nicht auf der Zelloberfläche binden, transfiziert.

Die Transfektanten wurden durch T1-gekoppelte *DynaBeads* sortiert. Die Plasmide der angereicherten Zellen wurden nach Hirt isoliert und in *E.coli*-Zellen amplifiziert. Dieser Anreicherungsprozess wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Dabei sollten Plasmide angereichert werden, welche die Sequenz für ein T1-bindendes Protein tragen. Bei den einzelnen Anreicherungsschritten wurden jeweils ca. 10 Mio. transfizierte Zellen eingesetzt. Anschließend wurde die Anzahl an gebundenen Zellen bestimmt. Sie betrug zwischen 1×10^5 und 5×10^5 Zellen und änderte sich bei den einzelnen Selektionsschritten nur unwesentlich. Die erwartete Zunahme an gebundenen Zellen konnte nicht festgestellt werden.

Trotzdem wurde durch PCR mit den insertflankierenden Primern *λZAPEx seq* und *λZAPEx 3'* geprüft, ob eine Anreicherung bestimmter Insertgrößen stattgefunden hatte. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Fragmentgrößen angereichert wurden, die aber bei den verschiedenen Versuchsansätzen unterschiedlich waren. Durch Kreuzhybridisierung mit DIG-markierten Sonden einzelner Inserts sollte geprüft werden, ob die angereicherten Fragmente gleiche Sequenzen trugen. Eine Anreicherung bestimmter Sequenzen konnte nicht gezeigt werden.

Ein möglicher Grund für die fehlende Anreicherung von T1-bindenden Proteinen wäre, dass zu viele verschiedene Plasmide durch die Transfektion mit *LipofectAMINE* (Life Technologies) in die Einzelzelle gebracht wurden, und dass die Zellen deshalb Schwierigkeiten bei der Transkription und Translation haben. Darum wurden bei dem folgenden Ansatz steigende Mengen der cDNS durch neutrale Heringssperma-DNS ersetzt. Doch auch bei diesem Ansatz konnte keine Anreicherung bestimmter Plasmide erreicht werden.

1.5. Ligandenscreening nach der *Phage-display*-Methode

Bei der T7-Phagen-Bank werden die klonierten cDNS-Fragmente an die DNS eines Phagenhüllproteins fusioniert und dadurch auf der Oberfläche der Phagen exprimiert. Positive Klone können somit durch Bindung an T1S-gecoatete Platten angereichert werden.

1.5.1. Herstellung und Charakterisierung der T7-Phagenbank

Die T7-cDNS-Bank wurde mit dem *OrientExpress-System* von Novagen, wie im Protokoll des Herstellers angegeben, mit $4\mu\text{g poly(A)}^+$ -mRNS eines murinen Tumors aus K12 AS3-Zellen hergestellt (siehe IV1.3.1). Nach der Ligation der Fragmente mit den T7-Vektorarmen wurde die DNS mit dem *T7Select-System* in die T7-Phagen verpackt.

Die Untersuchung der Insertgrößen mit den flankierenden T7-UP- und T7-Down-Primern ergab, dass die Fraktionierung über die im *Kit* enthaltene Säule unzureichend war. Es wurden hauptsächlich Fragmente unter 500 bp in die Vektoren kloniert. Wenn man wegen der großen strukturellen Homologie des T1-Rezeptors zu IL-1RI annimmt, dass es auch Homologien zwischen den Liganden gibt, erwartet man eine mRNS-Länge von ca. 1000 bp.

Da mit der Sepharosesäule des *λZAP Express-Systems* eine gute Auftrennung erzielt werden konnte, wurde dieses System für die Fraktionierung verwendet. Die Bestimmung der Insertgrößen dieser Bank ergab Fragmentgrößen zwischen 500 und 3000 bp.

Die Titerbestimmung zeigte, dass die Anzahl an primären Phagen weit unter der erwarteten Menge des Herstellers lag. Er bewegte sich zwischen 200.000 und 600.000 pfu/ml statt der erwarteten 1×10^7 - 1×10^9 pfu/ml. Um ausreichende Phagemengen zu erhalten, wurden drei Banken hergestellt, die zusammen $1,1 \times 10^6$ primäre Phagen ergaben. Die primären Phagen der verschiedenen Ansätze wurden vereinigt und, nach der Vorschrift des Herstellers, sekundäre Phagen amplifiziert.

1.5.2. Anreicherung T1-bindender Phagen durch "Biopanning"

Ligandenexprimierende Phagen sollten durch Bindung an immobilisiertes rekombinantes mT1S/FLAG angereichert werden (Biopanning).

Mikrotiterplatten wurden mit rekombinantem mT1S/FLAG oder für die Spezifitätskontrollen mit rekombinantem mIL-1RAcP/FLAG beschichtet. Anschließend wurden durch Bindung an die beschichteten Platten T1-bindende Phagen angereichert, amplifiziert und zwei weiteren „Panningschritten“ unterzogen. Zwischen den einzelnen Anreicherungsschritten wurde der Titer der gebundenen Phagen bestimmt. Es zeigte sich jedoch keine signifikante Erhöhung des Titers. Beispielsweise ergaben bei einem Biopanning-Experiment die Titerbestimmungen des Eluates des ersten Anreicherungsschrittes 2800 pfu/μl, des zweiten 11200 pfu/μl und des dritten 7700 pfu/μl.

Die Bestimmung der Insertgrößen angereicherter Phagen durch PCR mit den insertflankierenden Primern *T7-UP* und *-DOWN* zeigte, dass keine Anreicherung bestimmter Fragmentgrößen stattgefunden hatte. Durch Kreuzhybridisierung mit ausgewählten DIG-markierten Inserts konnte außerdem gezeigt werden, dass keine bestimmten Sequenzen angereichert wurden. Auch die mehrfache Wiederholung dieser Anreicherungsmethode führte zu keinem anderen Ergebnis.

1.6. Immunpräzipitation des T1-Liganden durch Bindung an mT1S/FLAG

Kumar et al. beschrieben 1995 einen potentiellen sezernierten T1-Liganden in Balb/c 3T3-Zellen, der mittels Immunpräzipitation nachgewiesen, jedoch nicht kloniert werden konnte. Sie zeigten, dass durch konzentriertes, konditioniertes Medium dieser Zellen in Jurkat-Zellen, die endogenen T1-Rezeptor tragen, die p38-MAPK induziert werden kann.

Analog sollte hier durch Immunpräzipitation mit rekombinantem mT1S/FLAG T1-bindende Proteine aus Extrakten potentiell ligandentragender Zellen gefischt werden. Zu diesem Zweck wurden die Oberflächenproteine der zwei Zelllinien TME 3H3 und K12 mit dem *Cellular Labeling and Immunoprecipitation Kit* von Roche biotinmarkiert und die Zellen vorsichtig lysiert. Die Immunpräzipitation wurde mit rekombinantem mT1S/FLAG und Anti-FLAG-Agarose durchgeführt. Zum Nachweis der T1-Spezifität wurde ein analoger Ansatz mit rekombinantem mL-1RAcP/FLAG durchgeführt. Die gefällten biotinylierten Proteine wurden durch Western-Blot-Analyse mit streptavidingekoppelter alkalischer Phosphatase und dem Färbesystem *BCIP/NBT* nachgewiesen. Es konnte auch nach mehrmaligen Versuchen kein spezifisch an mT1S/FLAG-bindendes Protein präzipitiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Trotz zahlreicher unterschiedlicher Methoden konnte kein potentieller T1-Ligand isoliert werden. Deshalb wurde der Schwerpunkt der Arbeit auf die Aufklärung und Charakterisierung der T1-induzierten Signalkaskaden verlegt. Die Ergebnisse zu diesen Untersuchungen sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

2. Untersuchung der T1-induzierten Signalwege

Bei der Identifizierung und Untersuchung der T1-induzierten Signalkaskaden wurde der Schwerpunkt auf Signalwege gelegt, die durch Mitglieder der TIR-Familie induziert werden. Zu diesen zählen der Transkriptionsfaktor NF- κ B und die MAP-Kinasen.

Die NF- κ B-Aktivierung und die Charakterisierung der Signalkaskade wurde hauptsächlich durch Reportergenanalysen untersucht. Dabei wurden Zellen transient mit verschiedenen Rezeptorkonstrukten, einem NF- κ B-abhängigen Luciferasereporterplasmid mit drei NF- κ B-Bindungsstellen (IgG/Luci) und einer Transfektionskontrolle (β -Galaktosidase-Vektor pEF/ β Gal) cotransfiziert. Nach einer mehrstündigen Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen gegebenenfalls induziert (z.B. mit IL-1 α) und schließlich lysiert.

Über die Messung der Luciferase- und β -Galaktosidaseaktivität konnte dann das Ausmaß der NF- κ B-Induktion berechnet werden.

Die Untersuchungen zur Aktivierung der Kinasen wurden hauptsächlich mittels Western-Blot-Analysen durchgeführt. Hierbei wurden Zellen mit verschiedenen Rezeptorkonstrukten transfiziert, induziert (z.B. mit IL-1 α) und schließlich lysiert. Die induzierten Kinasen wurden daraufhin in Western-Blot-Analysen durch phospho-spezifische Antikörper nachgewiesen.

2.1. Klonierung von Rezeptoren, Hybridrezeptoren und Deletionsmutanten

Für die Untersuchung der Signalkaskaden wurden unterschiedliche Rezeptorkonstrukte verwendet. Zum einen die Vollängenklone des T1- und, für Kontrollexperimente, des IL-1-Rezeptors und zum anderen Deletionsmutanten, die den Signalweg blockieren sollten. Außerdem wurden Hybridrezeptoren, bei denen die extrazelluläre Domäne des T1-Rezeptors durch die entsprechende Region des IL-1-Rezeptors ersetzt wurde, eingesetzt (Abb. 8). Sie sind daraufhin durch den IL-1R-Liganden IL-1 induzierbar.

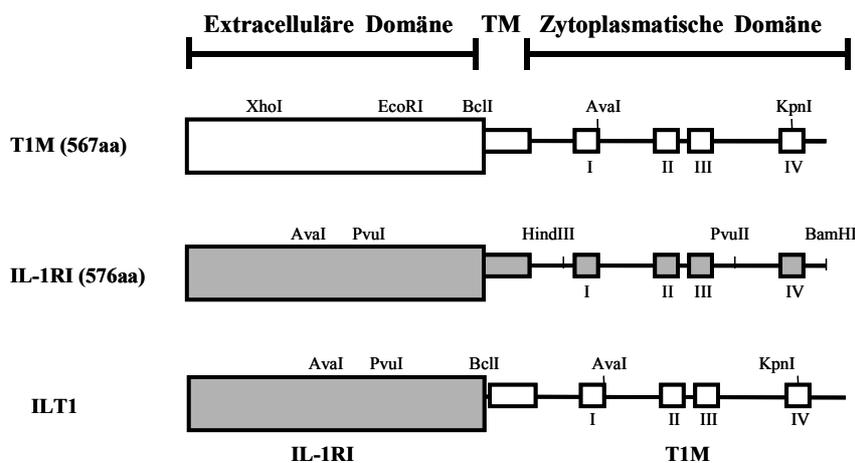


Abb. 8: Schema der cDNS der Rezeptorkonstrukte T1M, mIL-1RI und des chimären Rezeptors ILT1

Es sind die codierenden Regionen der Rezeptoren T1M (weiß) und mIL-1RI (grau) gezeigt. Bei dem chimären Rezeptor ILT1 ist die extrazelluläre Domäne von T1M durch die entsprechende Domäne des IL-1-Rezeptors ersetzt. Dargestellt sind außerdem für die Klonierung wichtige Restriktionsschnittstellen, die Transmembran-domäne (TM) und die vier hochkonservierten Domänen (I-IV) innerhalb der zytoplasmatischen TIR-Domäne.

Von dem Hybridrezeptor ILT1 wurden, analog den Rezeptoren T1M und mIL-1RI, Deletionskonstrukte hergestellt (siehe Abb. 9). Bei den Δ P- bzw. Δ K-Konstrukten wurde durch Restriktion der PvuII- bzw. der KpnI-Schnittstellen die vierte konservierte Domäne, von der in früheren Arbeiten gezeigt wurde, dass sie z.B. bei der IL-1-abhängigen Induktion des Chemokins IL-8 essentiell ist (Kuno et al., 1993), deletiert. Dagegen wurde bei den Δ 372-Deletionskonstrukten fast die komplette zytoplasmatische Domäne entfernt.

Alle in Abb. 9 gezeigten Rezeptorkonstrukte, außer ILT1 Δ 372, lagen bereits aus anderen Untersuchungen vor. Sie waren in den Vektor pRc/CMV, der eine hohe konstitutive Expression unter der Kontrolle des CMV-Promotors erlaubt, kloniert. Die Klonierung der Rezeptorkonstrukte wurde, wie bei Rupp (2000) beschrieben, durchgeführt.

Für die Klonierung der ILT1 Δ 372-Deletionsmutante wurde aus dem Vektor pILT1 mittels PCR mit den Primern *T7seq*, der an den Promotor bindet, und *Trev1303X*, der kurz hinter der T1-Transmembrandomäne bindet und eine XbaI-Schnittstelle trägt, das ILT1 Δ 372-Fragment generiert. Es wurde mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XbaI geschnitten und in den pRc/CMV-Vektor kloniert.

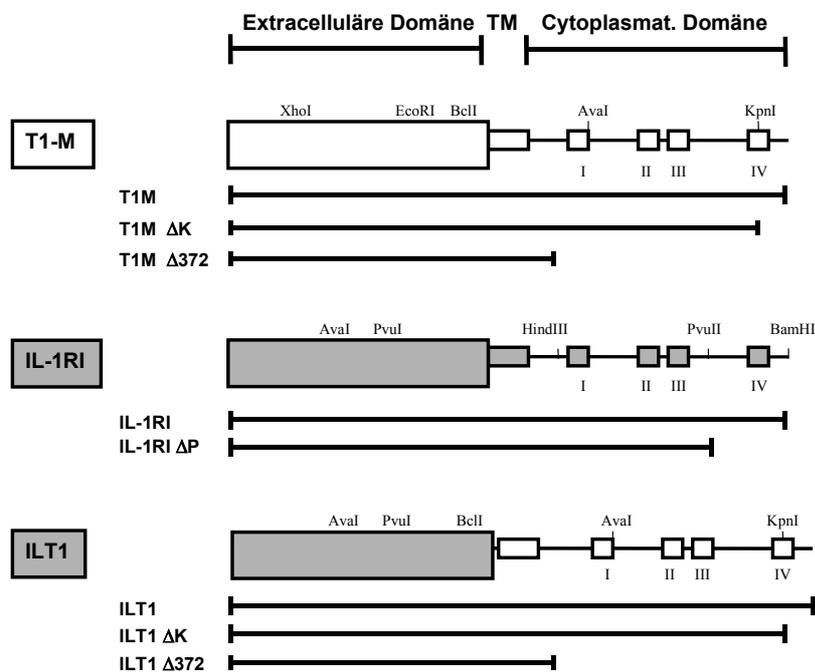


Abb. 9: Schema der Rezeptorkonstrukte und der Deletionsmutanten

Deutlich hervorgehoben sind die codierenden Regionen der Rezeptoren T1M (weiß), mIL-1RI (grau) und des chimären Rezeptors ILT1, bei welchem die extrazelluläre Domäne des T1M durch die entsprechende Domäne des IL-1-Rezeptors ersetzt wurde. Markiert sind hier außerdem die Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung von Bedeutung waren, die Transmembrandomäne (TM) und die hochkonservierten Domänen (I-IV) innerhalb der TIR-Domäne. Unter den codierenden Regionen der Rezeptorkonstrukte T1M, mIL-1RI und ILT1 sind die jeweiligen Deletionskonstrukte aufgezeigt.

Für Experimente, bei denen der T1-Rezeptor durch "Cross-linking" aktiviert werden sollte (siehe IV2.2.2), wurden Konstrukte benötigt, die statt der extrazellulären Domäne das FLAG-Epitop tragen.

Die im extrazellulären Bereich deletierte T1-Variante FLAG/T1M (Abb. 10) wurde mittels PCR mit den Primern *T1b* und *T1MrevX*, der eine *XbaI*-Schnittstelle trägt, generiert und mit den Restriktionsendonukleasen *BclI* und *XbaI* geschnitten. Das Fragment wurde in den Vektor pFLAG-CMV (Kodak) kloniert, der neben dem CMV-Promotor eine *preproTrypsin Leadersequenz* und das FLAG-Epitop trägt. Das deletierte T1M-Konstrukt wurde im richtigen Leserahmen in den Vektor kloniert, so dass es fusioniert an das FLAG-Epitop und die Leadersequenz vorliegt.

Der FLAG/T1M-Vektor diente als Ausgangsprodukt für das Deletionskonstrukt FLAG/T1M $\Delta 372$ (Abb. 10). Es wurde durch PCR mit den Primern *T7seq* und *Trev 1303X* amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *HindIII* geschnitten und in den Vektor pFLAG-CMV ligiert.

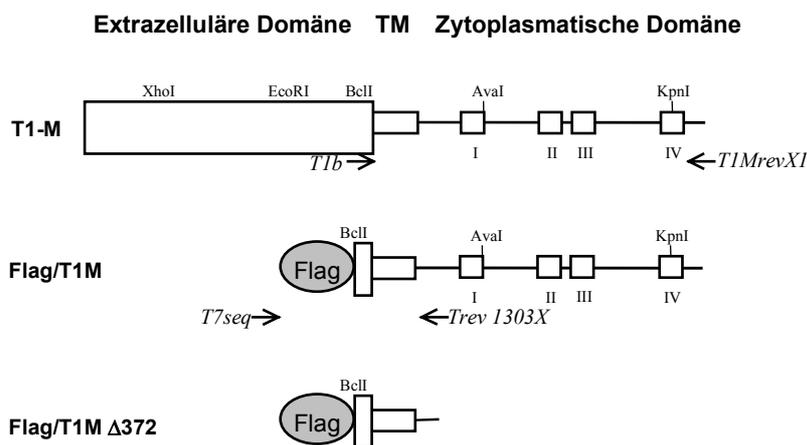


Abb. 10: Schematische Darstellung der FLAG/T1M-Konstrukte

Deutlich hervorgehoben sind die codierenden Regionen der Rezeptoren T1M, FLAG/T1M und des Deletionskonstruktes FLAG/T1M $\Delta 372$. Markiert sind hier außerdem die Restriktionsschnittstellen und Primerbindungsstellen, die für die Klonierung von Bedeutung waren, die Transmembrandomäne (TM) und die hochkonservierten Domänen (I-IV) innerhalb der TIR-Domäne.

2.1.1. Durchflusszytometrischer Nachweis der Rezeptoren auf der Zelloberfläche

Auf Protein- und RNS-Ebene wurde die Expression der meisten Rezeptorkonstrukte durch Westernanalyse bzw. RT-PCR bereits erfolgreich nachgewiesen (Rupp, 2000). Durch Durchflusszytometrie sollte bestätigt werden, dass die Konstrukte auf der Oberfläche der Zellen exprimiert werden.

Die Rezeptorkonstrukte wurden mittels *LipofectAMINE* transient in HEK 293T-Zellen transfiziert. Anschließend wurden die Rezeptoren auf der Zelloberfläche durch spezifische Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe (siehe Tabelle unten) markiert und die Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer Epics XL von Beckman Coulter gemessen.

Konstrukte	Verwendete Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe
T1M; T1M Δ K; T1M Δ 372	biotinylierter Anti-T1-Antikörper 3E10 (5 μ g/ml) Phycoerythrin konjugiertes Streptavidin (1:1000)
mIL-1RI; mIL-1RI Δ P	Anti-IL-1RI-Antikörper (5 μ g/ml) biotinylierter Anti-rat-Antikörper (5 μ g/ml) Phycoerythrin konjugiertes Streptavidin (1:1000)
ILT1;ILT1 Δ K; ILT1 Δ 372	Anti-IL-1RI-Antikörper (5 μ g/ml) biotinylierter Anti-rat-Antikörper (5 μ g/ml) Phycoerythrin konjugiertes Streptavidin (1:1000)
FLAG/T1M; FLAG/T1M Δ 372	biotinylierter Anti-FLAG-Antikörper M2 (10 μ g/ml) Phycoerythrin konjugiertes Streptavidin (1:1000)

Im Gegensatz zu den Rezeptoren mit vollständiger zytoplasmatischer Domäne (T1M, ILT1, mIL-1RI und FLAG/T1M) und den Δ 372-Deletionskonstrukten (T1M Δ 372; ILT1 Δ 372 und FLAG/T1M Δ 372) zeigten die Deletionsmutanten, bei denen das vierte konservierte Motiv der TIR-Domäne fehlt (ILT1 Δ K, IL-1R Δ P, T1M Δ K), keine ausreichende Oberflächenexpression. Exemplarisch wird hier die Expression der Hybridrezeptorkonstrukte (ILT1, ILT1 Δ K und ILT1 Δ 372) gezeigt (Abb. 11). Die mIL-1RI-, T1M- und FLAG/T1M-Konstrukte verhielten sich analog. Für die weiteren Untersuchungen wurden nur die Δ 372-Deletionskonstrukte verwendet.

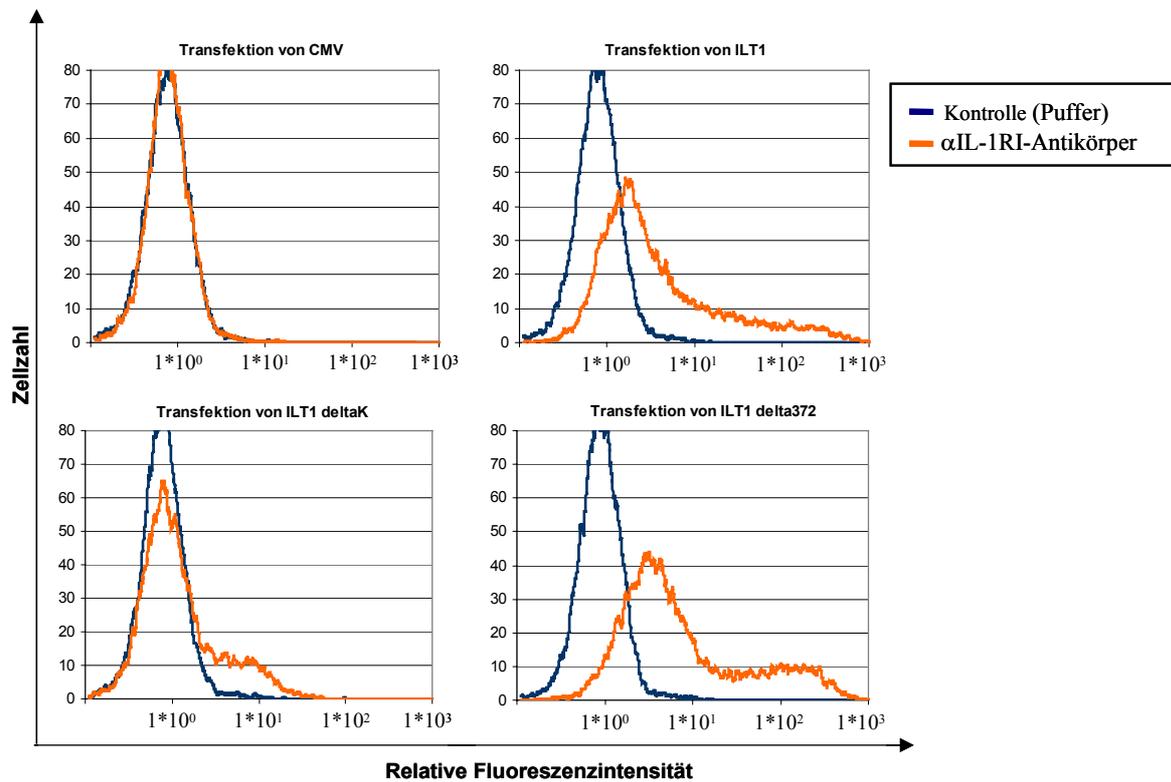


Abb. 11: Durchflusszytometrischer Nachweis verschiedener Rezeptorkonstrukte auf der Zelloberfläche

HEK 293T-Zellen wurden mittels LipofectAMINE mit den Rezeptorkonstrukten ILT1; ILT1 Δ K; ILT1 Δ 372 und als Kontrolle mit pRc/CMV transfiziert. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert. 6×10^5 Zellen wurden mit Anti-IL-1RI-Antikörper oder bei den Kontrollen mit FACS-Puffer inkubiert. Die Bindung des Antikörpers wurde mit einem biotinyliertem Anti-rat-Antikörper und Phycoerythrin konjugiertem Streptavidin nachgewiesen und die Fluoreszenzintensität im Epics XL von Beckman Coulter gemessen.

2.2. Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Zu Beginn musste geklärt werden, auf welche Art und Weise der Rezeptor aktiviert werden kann. Bereits mehrere Arbeitsgruppen zeigten, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B durch chimäre Rezeptoren, bestehend aus der extrazellulären Region von IL-1RI und dem zytoplasmatischen Teil von TIM (Mitcham et al., 1996; Born et al., 2000), induziert werden kann. Die NF- κ B-Aktivierung wurde für die Untersuchungen zur T1-Aktivierung herangezogen.

2.2.1. NF- κ B-Aktivierung durch Überexpression von TIM

Eine Möglichkeit der Aktivierung eines Signalweges ist die Überexpression bestimmter Komponenten der Signalkaskade. Durch Reporteranalysen soll geklärt werden, ob Überexpression von TIM den Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert.

Dazu wurde das Rezeptorkonstrukt T1M und der NF- κ B-abhängige Luciferasereporter IgG/Luci mittels *LipofectAMINE-Reagenz* (Life Technologies) in HEK 293T-Zellen cotransfiziert. Als Transfektionskontrolle diente ein β -Galaktosidase exprimierendes Plasmid (pEF/ β Gal).

Als Positivkontrolle diente das Rezeptorkonstrukt mLIL-1RI, von welchem bekannt ist, dass IL-1-abhängig NF- κ B induziert werden kann. Aus diesem Grund wurden die Zellen, nachdem sie 16-24 h in Vollmedium und 12 h in Hungermedium inkubiert wurden, für 6 h mit IL-1 α induziert. Nach der Lyse der Zellen wurde die Luciferase- und β -Galaktosidaseaktivität mit dem *Dual-Light-Kit* von Topix bestimmt. Die Luciferaseaktivität wurde bezogen auf die β -Galaktosidaseaktivität.

Bei mLIL-1RI-transfizierten Zellen ist eine durchschnittlich 7fache Steigerung der NF- κ B-Aktivität durch Induktion mit IL-1 α zu beobachten. Dagegen konnte nach Überexpression von T1M im Vergleich zur Negativkontrolle (pRc/CMV) weder bei den unbehandelten noch bei den IL-1 α -induzierten Zellen eine Erhöhung der Luciferaseaktivität nachgewiesen werden. Die schwache NF- κ B-Induktion durch IL-1 ist auf die Anwesenheit von endogenem huIL-1RI auf den HEK 293T-Zellen zurückzuführen (Abb. 12).

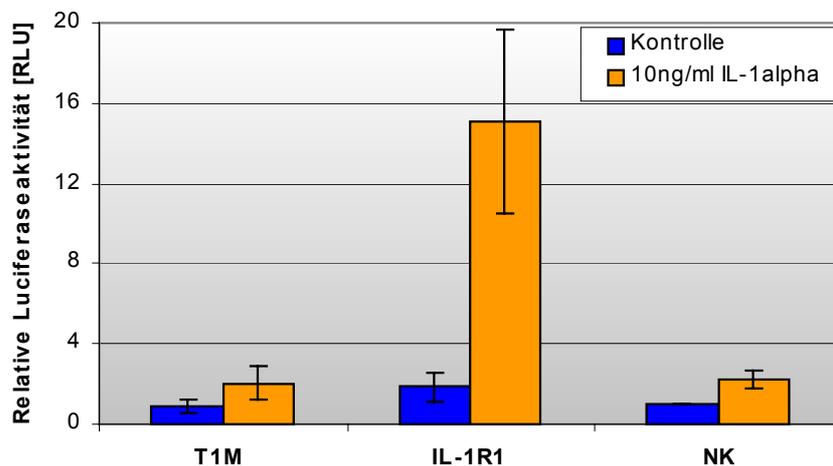


Abb. 12: Einfluss der Rezeptor-Überexpression auf die NF- κ B-Aktivität

2×10^5 HEK 293T-Zellen wurden transient mittels *LipofectAMINE* mit den Vektoren T1M (50 ng), mLIL-1RI (50 ng) oder dem Leervektor pRc/CMV (Negativkontrolle; NK) transfiziert. Das NF- κ B-abhängige Reporterplasmid IgG/Luci (40 ng) und die Transfektionskontrolle pEF/ β -Gal (30 ng) wurden cotransfiziert. Nach einer 24stündigen Inkubation bei 37°C wurde das Zellmedium durch serumfreies Medium ersetzt. Nach weiteren 12 h wurden die Zellen für 6 h mit IL-1 α (10 ng/ml) oder als Kontrolle mit PBS induziert. Die Luciferase- und β -Galaktosidaseaktivität wurden mit dem *Dual Light Kit* von Topix bestimmt. Die Werte der relativen Luciferaseaktivität wurden bezogen auf die der β -Galaktosidaseaktivität. Es sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Die Konzentrationsabhängigkeit der NF- κ B-Induktion wurde durch Transfektion steigender Mengen T1M untersucht. Bei diesen Reporteragen-Assays wurde ebenfalls das Reporteragenplasmid IgG/Luci und die Transfektionskontrolle pEF/ β Gal cotransfiziert. Die Zellen wurden für 16-24 h in serumhaltigem Medium inkubiert, lysiert und anschließend die Luciferase- und β -Gal-Aktivität bestimmt. Als Positivkontrolle diente ein analoger Ansatz mit steigenden Mengen mL-1RI. Bei der Negativkontrolle wurde das Rezeptorkonstrukt durch das CMV-Plasmid ersetzt.

In Abb. 13 ist zu sehen, dass auch durch Transfektion steigender T1M-Mengen keine erhöhte Luciferaseaktivität gemessen werden konnte. Dagegen führte die Überexpression des IL-1-Rezeptors zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Erhöhung der Luciferaseaktivität.

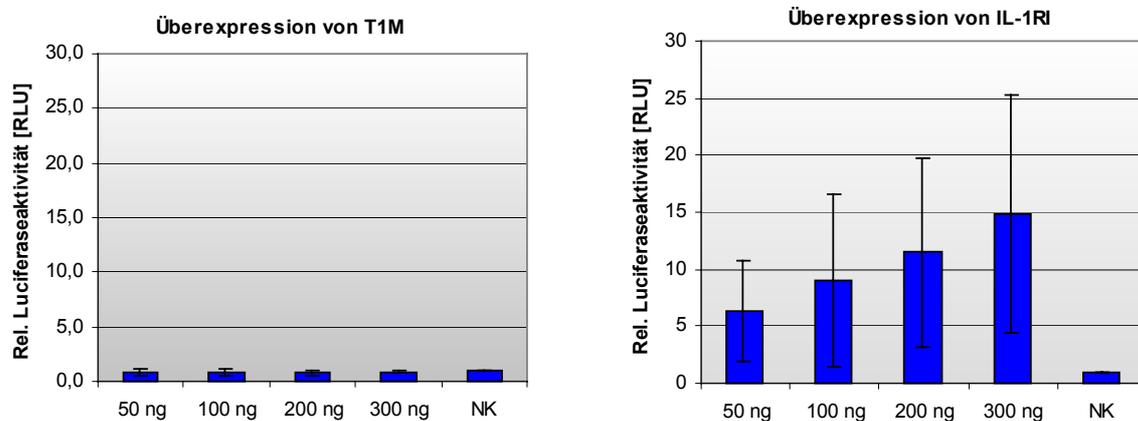


Abb. 13: Einfluss steigender Mengen T1M bzw. mL-1RI auf die NF- κ B-Aktivität

2×10^5 HEK 293T-Zellen wurden transient mittels *LipofectAMINE* mit unterschiedlichen Mengen des Vektors T1M bzw. mL-1RI transfiziert. Als Negativkontrolle (NK) diente die Transfektion mit dem Leervektor (pRc/CMV). Das NF- κ B-abhängige Reporterplasmid IgG/Luci (40ng) und die Transfektionskontrolle pEF/ β -Gal (30 ng) wurden cotransfiziert. Nach einer 16-24stündigen Inkubation in Vollmedium (37°C) wurden die Zellen lysiert und mit dem *Dual Light Kit* von Topix die Luciferase- und β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Die Werte der relativen Luciferaseaktivität wurden bezogen auf die der β -Galaktosidaseaktivität. Es sind jeweils die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

2.2.2. T1M-abhängige Induktion von NF- κ B durch „Cross-linking“

Homodimerisierende Rezeptoren können unter bestimmten Voraussetzungen durch „Cross-linking“ mit spezifischen Antikörpern aktiviert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass auf diese Weise mit dem T1-spezifischen Antikörper „3E10“ in aktivierten TH2-Zellen die Produktion von TH2-typischen Zytokinen induziert werden kann. Bei diesem Experiment wurden jedoch keine Signalmoleküle nachgewiesen (Meisel et al., 2001).

Da dieser Antikörper aber bei *in vivo*-Experimenten als blockierend beschrieben ist (Lohning et al., 1998), wurden in einem zweiten Ansatz die T1M-Konstrukte mit dem FLAG-Epitop fusioniert (siehe IV.2.1) und das Experiment mit einem Anti-FLAG-Antikörper durchgeführt.

HEK 293T-Zellen wurden mit dem Rezeptorplasmid T1M bzw. FLAG/T1M, dem NF- κ B-abhängigen Luciferasereporter IgG/Luci und der Transfektionskontrolle pEF/ β Gal cotransfiziert. Bei den Kontrollen wurden an Stelle der Konstrukte mit vollständiger zytoplasmatischer Domäne die Deletionskonstrukte T1M Δ 372 bzw. FLAG/T1M Δ 372 oder der Leervektor pRc/CMV transfiziert. Nach einer 24stündigen Inkubation wurden die transfizierten Zellen auf antikörperbeschichtete 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach einer 6stündigen Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen lysiert und die Luciferase- und β -Galaktosidasaktivität mit dem *Dual Light Kit* im Lumicount bestimmt.

Weder der T1-Antikörper 3E10 noch der Anti-FLAG-Antikörper waren in der Lage, den Transkriptionsfaktor NF- κ B zu aktivieren. Ein vergleichbarer Ansatz, bei dem der Antikörper in löslicher Form eingesetzt wurde, bestätigte dieses Resultat (Ergebnisse nicht gezeigt). Interessant ist allerdings, dass die Überexpression des FLAG/T1-Konstruktes im Gegensatz zu T1M zu einer schwachen aber reproduzierbaren Induktion des Transkriptionsfaktors führt. Diese Induktion war bei dem FLAG/T1 Δ 372-Konstrukt, dem fast die komplette zytoplasmatische Domäne fehlt, nicht zu beobachten (Abb. 14).

Durch *Cross-linking* ist eine Aktivierung und damit auch die Identifizierung und Charakterisierung der T1-induzierten Signalwege nicht möglich.

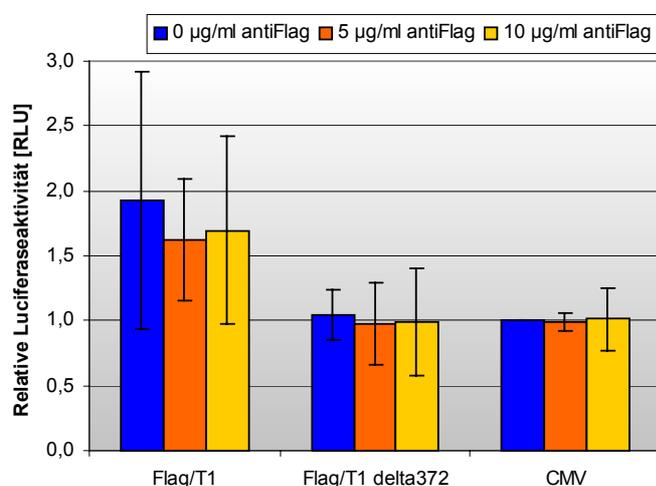


Abb. 14: Einfluss des T1-Rezeptor-Cross linkings auf die NF- κ B-Aktivität

In HEK 293T-Zellen wurden transient mittels *LipofectAMINE* FLAG/T1 bzw. FLAG/T1 Δ 372 transfiziert. Als Negativkontrolle diente die Transfektion mit dem Leervektor (pRc/CMV). Das NF- κ B-abhängige Reporterplasmid IgG/Luci und die Transfektionskontrolle pEF/ β -Gal wurden cotransfiziert. Nach einer 16-24stündigen Inkubation in Vollmedium wurden die Zellen auf 24-Well Zellkulturschalen überführt, die mit unterschiedlichen Mengen Anti-FLAG M2-Antikörper beschichtet waren. Nach 6 h wurden die Zellen lysiert und mit dem *Dual Light Kit* von Topix die Luciferase- und β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Die Werte der relativen Luciferaseaktivität wurden bezogen auf die der β -Galaktosidaseaktivität. Es sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

2.2.3. Untersuchung der T1-induzierten Signalkaskaden durch Hybridrezeptoren

Wie bereits erwähnt, können Signalwege von Rezeptoren, deren Liganden unbekannt sind, durch Hybridrezeptoren untersucht werden. Auf diese Weise wurden u.a. bereits erfolgreich Komponenten der TLR4-induzierten NF- κ B-Signalkaskade aufgeklärt (Muzio et al., 1998).

Bei dem chimären Rezeptor ILT1 wurde die extrazelluläre Domäne von T1M durch die entsprechende Region von IL-1RI ersetzt. Als Kontrolle wurde ein Rezeptorkonstrukt mit verkürzter zytoplasmatischer Domäne (ILT1 Δ 372) eingesetzt.

Durch Reporteranalyse soll getestet werden, ob das chimäre Rezeptorkonstrukt ILT1 den Transkriptionsfaktor NF- κ B über den Liganden des IL-1-Rezeptors (IL-1 α) induziert, und ob das deletierte Konstrukt ILT1 Δ 372, dem fast die komplette zytoplasmatische Domäne fehlt, als dominant negative Variante eingesetzt werden kann.

Die Rezeptorkonstrukte ILT1 oder ILT1 Δ 372 wurden mittels *LipofectAMINE-Reagenz* (Life Technologies) in HEK 293T-Zellen transfiziert. Der NF- κ B-abhängige Luciferasereporter (IgG/Luci) und die Transfektionskontrolle pEF/ β Gal wurden cotransfiziert. Bei der Negativkontrolle wurde das Rezeptorkonstrukt durch den Leervektor pRc/CMV ersetzt. Als Positivkontrolle diente das Rezeptorkonstrukt mIL-1RI, von welchem bekannt ist, dass IL-1-abhängig NF- κ B induziert werden kann. Die Zellen wurden nach 16-24stündiger Inkubation in Vollmedium und 12stündiger Inkubation in Hungermedium für 6 h mit IL-1 α induziert. Nach der Lyse der Zellen wurden die Luciferase- und β -Galaktosidaseaktivität mit dem *Dual-Light-Kit* von Topix bestimmt.

Durch Reporteranalyse (Abb. 15) wurde bestätigt, dass nach transienter Transfektion des chimären Rezeptors (ILT1) und des IL-1-Rezeptors IL-1-abhängig NF- κ B induziert wird. Durch die Induktion konnte die Luciferaseaktivität um das 11 bzw. 16fache erhöht werden. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von IL-1 α zu ILT1 Δ 372-transfizierten Zellen zu keiner erhöhten Luciferaseaktivität. Sogar die endogene IL-1 α -induzierte NF- κ B-Aktivität, die bei der Negativkontrolle zu beobachten ist und von endogen vorhandenem huIL-1RI in den HEK 293T-Zellen herrührt, wird durch die Transfektion des Deletionskonstrukts gehemmt. Es kann demnach als dominant negatives Konstrukt eingesetzt werden. Bei der Positivkontrolle (mIL-1RI) konnte wie erwartet durch Behandlung mit IL-1 α der Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert werden. Hier war durch die Behandlung mit IL-1 α eine Erhöhung um das 16fache möglich.

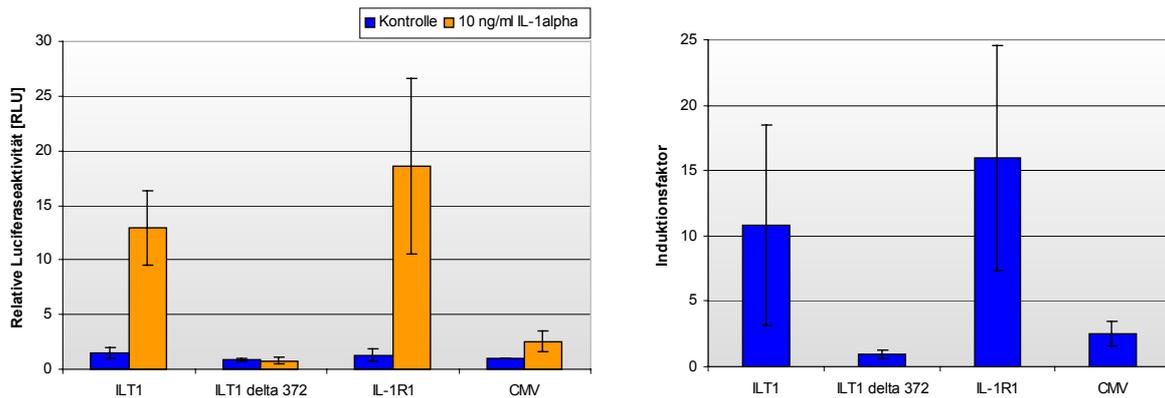


Abb. 15: IL-1-abhängige NF- κ B-Aktivierung durch den chimären Rezeptor ILT1

2×10^5 HEK 293T-Zellen wurden transient mittels *LipofectAMINE* mit den Vektoren ILT1, ILT1 Δ 372; mIL-1RI (50 ng) oder dem Leervektor pRc/CMV (Negativkontrolle; NK) transfiziert. Das NF- κ B-abhängige Reporterplasmid IgG/Luci (40 ng) und die Transfektionskontrolle pEF/ β -Gal (30 ng) wurden cotransfiziert. Nach einer 24stündigen Inkubation bei 37°C wurde das Zellmedium durch serumfreies Medium ersetzt. Nach weiteren 12 h Inkubation wurden die Zellen 6 h mit 10 ng/ml IL-1 α oder als Kontrolle mit PBS induziert. Die Luciferase- und β -Galaktosidaseaktivität wurden mit dem *Dual Light Kit* von Topix bestimmt. Die Werte der relativen Luciferaseaktivität wurden bezogen auf die der β -Galaktosidaseaktivität. Es sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst (links). Rechts wurde der Induktionsfaktor der drei unabhängigen Experimente berechnet (induziert/nicht induziert).

2.3. Untersuchung der NF- κ B-Signalkaskade

2.3.1. Einfluss von IL-1RAcP auf die NF- κ B-Induktion

Bei der ligandenabhängigen Aktivierung des IL-1-Rezeptors bindet das IL-1R-homologe Protein IL-1RAcP (IL-1R accessorisches Protein) an den IL-1/IL-1R-Komplex.

Durch Reportergenanalyse sollte getestet werden, ob IL-1RAcP auch bei der NF- κ B-Aktivierung durch den chimären Rezeptor ILT1 beteiligt ist. Als Kontrollen dienten wiederum der IL-1-Rezeptor, das deletierte Konstrukt ILT1 Δ 372 und der Leervektor (pRc/CMV).

Der Reportergen-Assay wurde, wie unter IV2.2.3 beschrieben, durchgeführt. Zusätzlich fand eine Cotransfektion von IL-1RAcP statt.

Durch Cotransfektion des Hybridrezeptors ILT1 und IL-1RAcP konnte der basale Spiegel an aktivem NF- κ B (ohne Induktion durch IL-1 α) um das 3fache erhöht werden. Dagegen war die IL-1-induzierte NF- κ B-Aktivität durch Cotransfektion von AcP nur geringfügig erhöht (Abb. 16).

Vergleichbare Ergebnisse waren bei der Transfektion des IL-1-Rezeptors zu erkennen. Bei Cotransfektion des Deletionskonstruktes ILT1 Δ 372 mit dem accessorischen Protein war im Vergleich zu dem Ansatz ohne AcP sowohl der basale als auch der IL-1 α -induzierte NF- κ B-Spiegel erhöht (Abb. 16).

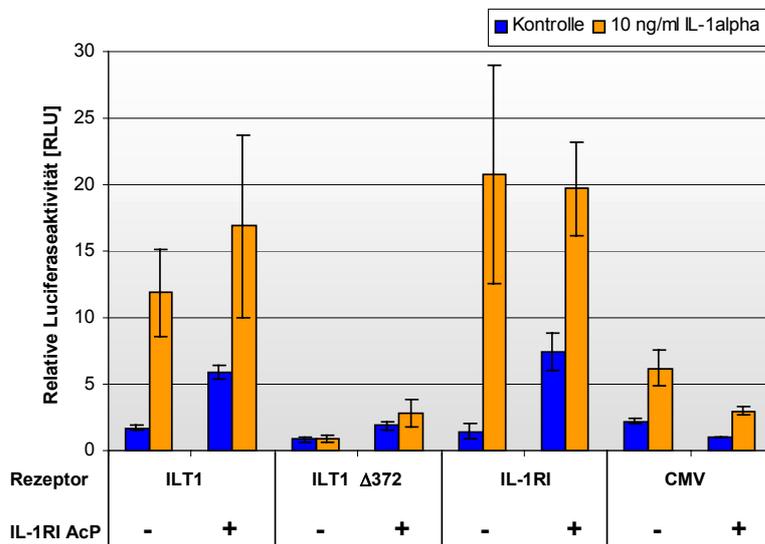


Abb. 16: Einfluss von IL-1RI AcP auf die NF- κ B-Aktivierung

HEK 293T-Zellen wurden transient mittels *LipofectAMINE* mit den Vektoren ILT1, ILT1 Δ 372; mL-1RI (50 ng) oder dem Leervektor pRc/CMV (Negativkontrolle; NK) transfiziert. Das NF- κ B-abhängige Reporterplasmid IgG/Luci (40 ng) und die Transfektionskontrolle pEF/ β -Gal (30 ng) wurden cotransfiziert. Außerdem wurde bei den gekennzeichneten (+) Proben das Konstrukt IL-1RAcP cotransfiziert (50 ng). Bei den Kontrollen wurde AcP durch CMV ersetzt. Nach einer 24 h Inkubation bei 37°C wurde das Zellmedium durch serumfreies Medium ersetzt. Nach weiteren 12 h Inkubation wurden die Zellen 6 h mit 10 ng/ml IL-1 α oder als Kontrolle mit PBS induziert. Die Luciferase- und β -Galaktosidaseaktivität wurden mit dem *Dual Light Kit* von Topix bestimmt. Die Werte der relativen Luciferaseaktivität wurden bezogen auf die der β -Galaktosidaseaktivität. Es sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

2.3.2. Beteiligung von MyD88 an der T1-induzierten NF- κ B-Induktion

Der Signaltransmitter MyD88 ist ein Bestandteil der IL-1-induzierten NF- κ B-Signalkaskade. Er bindet nach der ligandeninduzierten Aktivierung des IL-1-Rezeptors an den Rezeptorkomplex.

Durch Reporteranalyse mit dem dominant negativen Konstrukt MyD88 C, bei dem die aktivierende N-terminale "Death domain" deletiert wurde (Hacker et al., 2000), soll die Beteiligung von MyD88 an der T1-induzierten NF- κ B-Aktivierung untersucht werden.

Der chimäre Rezeptor ILT1 oder der IL-1-Rezeptor, das NF- κ B-abhängige Reporterplasmid IgG/Luci, die Transfektionskontrolle pEF/ β -Gal und steigende Mengen dominant negatives MyD88 (MyD88 C) wurden durch *LipofectAMINE* in HEK 293T-Zellen cotransfiziert.

Die transfizierten Zellen wurden, nachdem sie für 16-24 h in Vollmedium und 12 h in Hungermedium inkubiert wurden, mit 10ng/ml IL-1 α induziert.

Es konnte gezeigt werden, dass die ligandeninduzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors bei ILT1- und mIL-1RI-transfizierten Zellen durch MyD88 C konzentrationsabhängig gehemmt wird (Abb. 17).

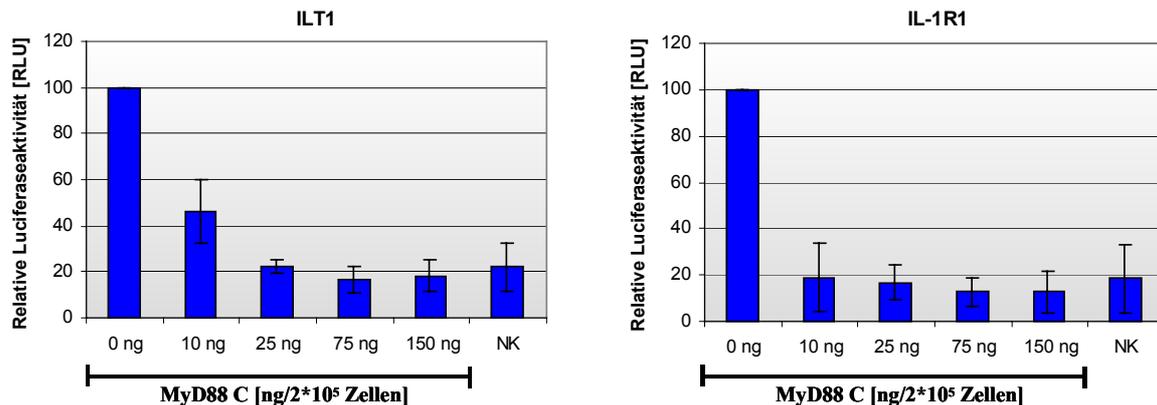


Abb. 17: Dominant negatives MyD88 inhibiert die IL-1-abhängige NF- κ B-Aktivierung

Ca. 2×10^5 HEK 293T-Zellen wurden mittels *LipofectAMINE* mit den Vektoren ILT1 bzw. mIL-1RI (je 50 ng) und steigenden Mengen dominant negativem MyD88 (MyD88 C) transfiziert. Das NF- κ B-abhängige Reporterplasmid IgG/Luci (40 ng) und die Transfektionskontrolle pEF/ β -Gal (30 ng) wurden cotransfiziert. Bei der Negativkontrolle (NK) wurde statt des Rezeptorplasmids der Leervektor CMV transfiziert. Die unterschiedlichen Plasmidmengen wurden durch Zugabe des Leervektors pRc/CMV ausgeglichen. Nach einer 24stündigen Inkubation in Vollmedium wurde das Zellmedium für weitere 12 h durch serumfreies Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen 6 h mit 10 ng/ml IL-1 α induziert. Die Luciferase- und β -Galaktosidaseaktivität wurden mit dem *Dual Light Kit* von Topix bestimmt. Die Werte der relativen Luciferaseaktivität wurden bezogen auf die der β -Galaktosidaseaktivität. Es sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Bei der TNF-induzierten NF- κ B-Aktivierung ist MyD88 nicht beteiligt. Um zu zeigen, dass die Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch dominant negatives MyD88 spezifisch ist, wurde ein vergleichbares Experiment mit TNF-induzierter NF- κ B-Aktivierung durchgeführt.

HEK 293T-Zellen wurden mit steigenden Mengen MyD88 C, dem Reporterplasmid und der Transfektionskontrolle cotransfiziert. Die Transfektion eines TNF-Rezeptors war nicht erforderlich, da die Zellen endogen ausreichende Mengen des Rezeptors tragen. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 16-24 h in Vollmedium und 12 h in Hungermedium inkubiert und anschließend für 6 h mit 100ng/ml TNF- α induziert.

In Abb. 18 (links) ist zu sehen, dass die Luciferaseaktivität trotz steigender Mengen MyD88 C nicht abnimmt.

Die Proteinexpression wurde durch Westernanalyse untersucht. HEK 293T-Zellen wurden mit steigenden Mengen MyD88 C transfiziert und MyD88 C durch einen Anti-MyD88-Antikörper nachgewiesen. Abb. 18 (rechts) zeigt, dass die Transfektion steigender Mengen MyD88 C zu einer entsprechenden Erhöhung der Proteinsynthese führt.

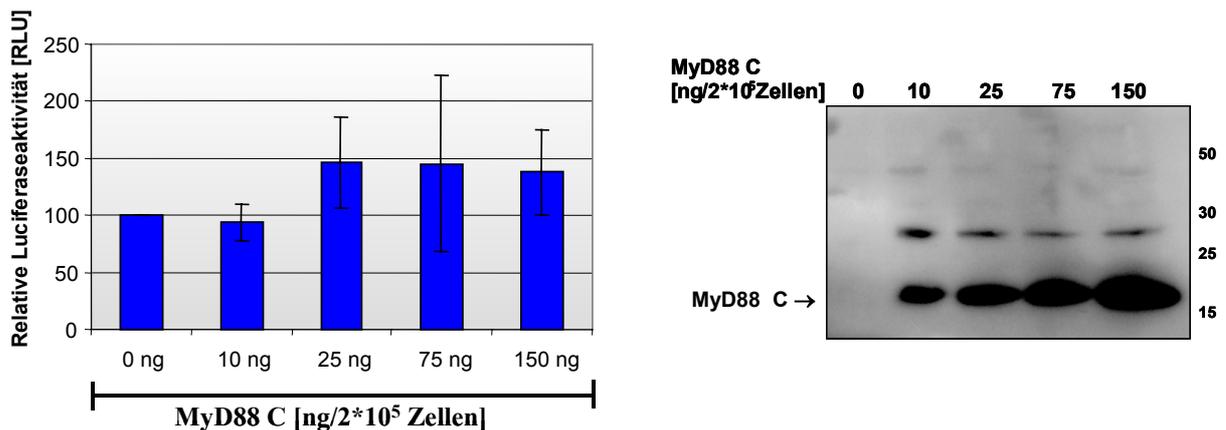


Abb. 18: Einfluss von MyD88 auf die TNF-induzierte NF-κB-Induktion (links) und Nachweis steigender Mengen MyD88 C durch Westernanalyse (rechts)

Links: Ca. 2×10^5 HEK 293T-Zellen wurden mittels *LipofectAMINE* mit steigenden Mengen dominant negativem MyD88 (MyD88 C), dem NF-κB-abhängigen Reporterplasmid IgG/Luci und der Transfektionskontrolle pEF/β-Gal cotransfiziert. Die unterschiedlichen Plasmidmengen wurden durch Zugabe des Leervektors pRc/CMV ausgeglichen. Nach einer 24stündigen Inkubation in Vollmedium wurde das Zellmedium für weitere 12 h durch serumfreies Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen 6 h mit 100 ng/ml TNFα induziert. Die Luciferase- und β-Galaktosidaseaktivität wurden mit dem *Dual Light Kit* von Topix bestimmt. Die Werte der relativen Luciferaseaktivität wurden bezogen auf die der β-Galaktosidaseaktivität. Es sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. **Rechts:** Ca. 2×10^5 HEK 293T-Zellen wurden mittels *LipofectAMINE* mit steigenden Mengen dominant negativem MyD88 (MyD88 C) transfiziert. Nach ca. 24stündiger Inkubation wurden die Zellen lysiert und jeweils 15 μg Protein auf ein denaturierendes 12% Polyacrylamidgel aufgetragen. MyD88 C wurde durch Bindung von Anti-MyD88-AK und Anti-rabbit IgG HRP mit dem *ECL-System* von Amersham nachgewiesen.

2.3.3. Beteiligung von TRAF 6 an der T1-induzierten NF-κB-Aktivierung

Weitere wichtige Moleküle der NF-κB-Signalkaskade sind die Mitglieder der TRAF-Familie. TRAF6 beispielsweise ist an der IL-1-induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB beteiligt.

Eine Reporteranalyse mit dominant-negativem TRAF6 (TRAF6 C), dem die für die Aktivierung essentielle N-terminale „ring finger“-Domäne fehlt (Hacker et al., 2000), sollte Aufschluss über die Beteiligung von TRAF6 an der IL-1-induzierten Aktivierung von NF-κB durch den chimären Rezeptor ILT1 geben.

Der chimäre Rezeptor ILT1 bzw. der IL-1-Rezeptor, das Reporterplasmid IgG/Luci, die Transfektionskontrolle pEF/ β -Gal und steigende Mengen des dominant negativen TRAF6-Konstruktes (TRAF6 C) wurden durch *LipofectAMINE* in HEK 293T-Zellen cotransfiziert. Nach 16-24stündiger Inkubation in Vollmedium und 12stündiger Inkubation in Hungermedium wurden die Zellen mit IL-1 α induziert.

Wie in Abb. 19 zu sehen ist, hemmt TRAF6 C konzentrationsabhängig die IL-1-abhängige NF- κ B-Induktion bei beiden Rezeptoren.

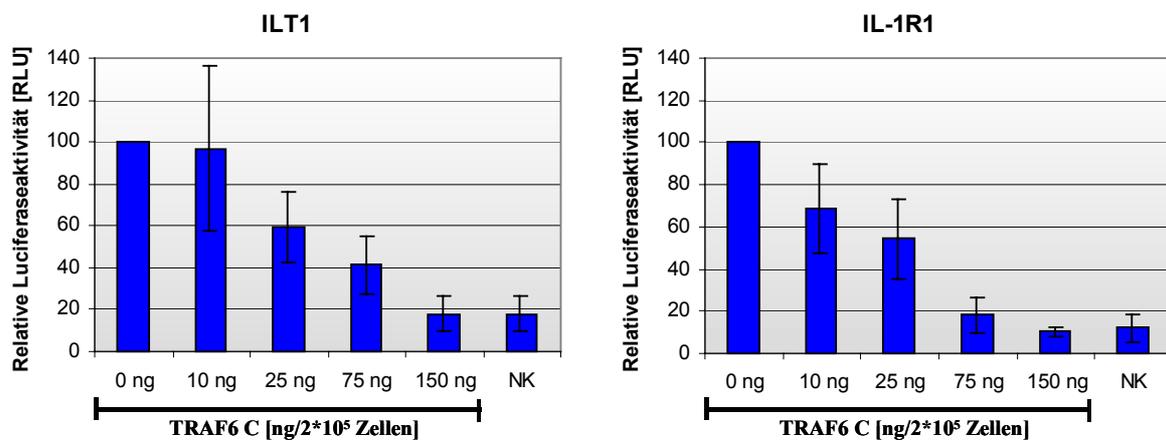


Abb. 19: Dominant negatives TRAF6 hemmt die IL-1-abhängige NF- κ B-Induktion

Ca. 2×10^5 HEK 293T-Zellen wurden mittels *LipofectAMINE* mit den Vektoren ILT1 bzw. mIL-1RI (je 50 ng) und steigenden Mengen dominant negativem TRAF6 (TRAF6 C) transfiziert. Das NF- κ B-abhängige Reporterplasmid IgG/Luci (40 ng) und die Transfektionskontrolle pEF/ β -Gal (30 ng) wurden cotransfiziert. Bei der Negativkontrolle (NK) wurde statt des Rezeptorplasmids der Leervektor CMV transfiziert. Die unterschiedlichen Plasmidmengen wurden durch Zugabe des Leervektors pRc/CMV ausgeglichen. Nach einer 24stündigen Inkubation in Vollmedium wurde das Zellmedium für 12 h durch serumfreies Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen 6 h mit 10 ng/ml IL-1 α induziert. Die Luciferase- und β -Galaktosidaseaktivität wurden mit dem *Dual Light Kit* von Topix bestimmt. Es sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Um zu zeigen, dass die Inhibierung der IL-1-induzierten NF- κ B-Aktivierung durch den chimären Rezeptor ILT1 spezifisch ist, wurde als Vergleich in einem analogen Ansatz die Beteiligung von TRAF6 an der TNF-induzierten NF- κ B-Aktivierung untersucht. HEK 293T-Zellen wurden mit steigenden Mengen TRAF6 C, dem Reporterplasmid IgG/Luci und der Transfektionskontrolle pEF/ β Gal cotransfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 16-24 h in Vollmedium und 12 h in Hungermedium inkubiert und anschließend der endogene TNF-Rezeptor für 6 h mit 100ng/ml TNF induziert. Nach der Lyse der Zellen wurden die Luciferase- und die Galaktosidaseaktivität bestimmt.

Durch Western-Blot-Analyse wurde außerdem überprüft, ob das dominant negative TRAF6 C-Konstrukt in steigenden Mengen exprimiert wird. Dazu wurden HEK 293T-Zellen mit steigenden Mengen TRAF6 C transfiziert, ca. 24 h inkubiert, lysiert und 15 µg Protein in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. TRAF6 C, welches ein FLAG-Epitop trägt, wurde im Western-Blot mit dem Anti-FLAG M2-Antikörper nachgewiesen.

Wie in Abb. 20 (links) zu erkennen ist, konnte dominant negatives TRAF6 die TNF-induzierte NF-κB-Aktivierung nicht signifikant hemmen. Durch Western-Blot-Analyse (Abb. 20, rechts) konnte allerdings gezeigt werden, dass TRAF6 C in steigenden Mengen exprimiert wird.

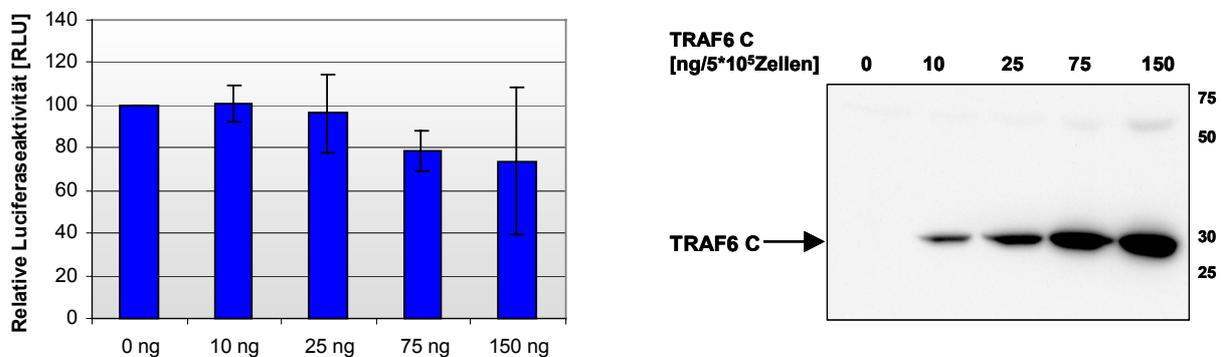


Abb. 20 Einfluss von TRAF6 auf die TNF-induzierte NF-κB-Induktion (links) und Nachweis steigender Mengen TRAF6 C durch Westernanalyse (rechts)

Links: Ca. 2×10^5 HEK 293T-Zellen wurden mittels *LipofectAMINE* mit steigenden Mengen dominant negativem TRAF6 (TRAF6 C), dem NF-κB-abhängigen Reporterplasmid IgG/Luci und der Transfektionskontrolle pEF/β-Gal cotransfiziert. Nach einer 24stündigen Inkubation in Vollmedium wurde das Zellmedium für 12 h durch serumfreies Medium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen 6 h mit 100 ng/ml TNFα induziert. Die Luciferase- und β-Galaktosidaseaktivität wurden mit dem *Dual Light Kit* von Topix bestimmt. Es sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. **Rechts:** Ca. 2×10^5 HEK 293T-Zellen wurden mittels *LipofectAMINE* mit steigenden Mengen dominant negativem TRAF6 (TRAF6 C) transfiziert. Nach ca. 24stündiger Inkubation wurden die Zellen lysiert und jeweils 15 µg Protein auf ein denaturierendes 12,5% Polyacrylamidgel aufgetragen. TRAF6 C wurde durch Bindung von Anti-FLAG M2-Antikörper und Anti-mouse HRP mit dem *ECL-System* von Amersham nachgewiesen.

2.3.3.1 Einfluss der TRAF6 C-Expression auf die β-Galaktosidaseaktivität

Bei allen bisher gezeigten Reporteranalysen wurde als Transfektionskontrolle das β-Galaktosidase-exprimierende Plasmid pEF/βGal cotransfiziert. Die Werte der Luciferaseaktivität wurden anschließend auf die entsprechenden Werte der β-Galaktosidaseaktivität bezogen. Bei den Versuchen zur Inhibierung der NF-κB-Aktivität durch dominant-negatives TRAF6 jedoch veränderte sich die β-Galaktosidaseaktivität stark, während sie bei allen übrigen Versuchen vergleichbar war.

Die in Kapitel IV2.3.3 gezeigten Ergebnisse zur Inhibierung der NF- κ B-Aktivierung durch dominant negatives TRAF6 zeigten sich, wenn die Werte der Luciferaseaktivität nicht auf die der β -Galaktosidaseaktivität bezogen wurden. Dieses Phänomen wurde in folgendem Kapitel näher untersucht.

Konzentrationsabhängige Abnahme der β -Galaktosidaseaktivität durch TRAF6 C

Ob durch steigende Mengen TRAF6 C die β -Galaktosidaseaktivität abnimmt, wurde durch einen Reporter-Gen-Assay untersucht. Die Versuche wurden, wie unter IV2.3.3 beschrieben, durchgeführt.

Sie zeigten deutlich eine dosisabhängige Verringerung der β -Galaktosidaseaktivität durch steigende TRAF6 C-Mengen. Dabei spielte es keine Rolle, welches Rezeptorkonstrukt cotransfiziert wurde oder ob die Zellen mit IL-1 α induziert wurden oder nicht. Exemplarisch ist in Abb. 21 die β -Galaktosidaseaktivität bei Zellen gezeigt, die mit dem chimären Rezeptor ILT1 transfiziert und nicht induziert wurden.

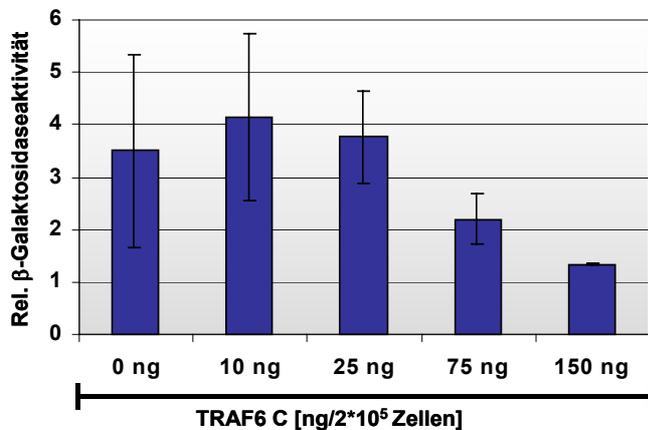


Abb. 21: Transiente TRAF6 C-Expression inhibiert die β -Galaktosidaseaktivität

Ca. 2×10^5 HEK 293T-Zellen wurden mittels *LipofectAMINE* mit dem Vektor ILT1 (50 ng) und steigenden Mengen dominant negativem TRAF6 (TRAF6 C) transfiziert. Das NF- κ B-abhängige Reporterplasmid IgG/Luci (40 ng) und die Transfektionskontrolle pEF/ β -Gal (30 ng) wurden cotransfiziert. Nach einer 24stündigen Inkubation in Vollmedium wurde für weitere 12 h in serumfreiem Medium inkubiert. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde mit dem *Dual Light Kit* von Topix bestimmt. Es sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Eine mögliche Erklärung für die sinkende β -Galaktosidaseaktivität bei steigender TRAF6 C-Konzentration besteht in einer Schädigung und damit einem verstärkten Absterben der Zellen. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Zelllysate mittels *Bradford* zeigte jedoch, dass die Gesamtproteinkonzentration bei steigenden transfizierten TRAF6 C-Mengen nicht signifikant abnahm.

Einfluss steigender Mengen TRAF6 C auf die Expression der Rezeptorkonstrukte

Durch Western-Analyse wurde untersucht, ob steigende TRAF6 C-Konzentrationen einen Einfluss auf die Expression der Rezeptorkonstrukte haben.

HEK 293T-Zellen wurden wie oben mit den Rezeptorkonstrukten und steigenden Mengen TRAF6 C transfiziert. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert und schließlich lysiert. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration nach *Bradford* wurden die Lysate auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen und die Rezeptorkonstrukte durch einen Antikörper gegen murines IL-1RI nachgewiesen.

Die Expression der Rezeptorkonstrukte konnte durch steigende TRAF6 C-Mengen nicht beeinflusst werden (Ergebnis nicht gezeigt).

2.3.4. NF- κ B-Aktivierung durch Abbau des Inhibitors I κ B

Zahlreiche Studien zeigten, dass das Kernlokalisierungssignal des Transkriptionsfaktors NF- κ B im nichtinduzierten Zustand durch den Inhibitor I κ B maskiert vorliegt. Nach der Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade wird der Inhibitor phosphoryliert, ubiquitinmarkiert und schließlich abgebaut. Das Kernlokalisierungssignal von NF- κ B wird frei und der Transkriptionsfaktor transloziert in den Kern. Inzwischen gibt es aber auch Anhaltspunkte für eine von der Degradation des Inhibitors unabhängige NF- κ B-Aktivierung. Aus diesem Grund sollte durch Western-Blot-Analyse mit einem I κ B-spezifischen Antikörper untersucht werden, ob ein I κ B-Abbau stattfindet.

HEK 293T-Zellen wurden mit den Rezeptorkonstrukten ILT1 oder zum Vergleich mit mIL-1RI oder pRc/CMV transfiziert. Nach einer ca. 24stündigen Inkubation wurden die Zellen für einen unterschiedlichen Zeitraum mit IL-1 α induziert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. I κ B wurde mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Wie in Abb. 22 zu sehen ist, findet in allen Fällen ein IL-1 α -induzierter Abbau des Inhibitors statt, es ergaben sich allerdings keine Unterschiede zwischen Kontrollen und IL-1R- bzw. ILT1-transfizierten Zellen.

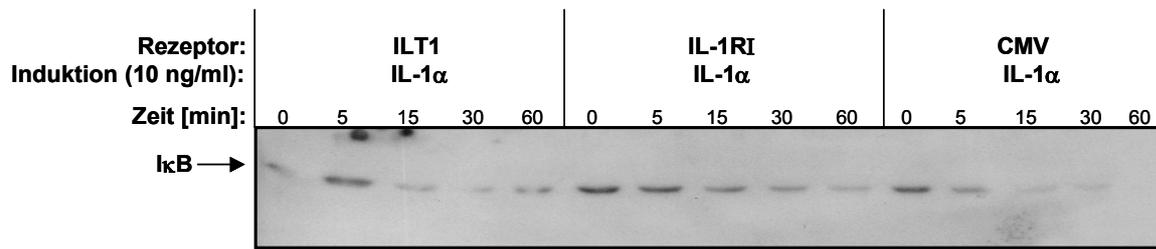


Abb. 22: IL-1α-abhängiger Abbau des Inhibitors IκB

HEK 293T-Zellen wurden auf eine 12-Well-Zellkulturschale ausgesät. Die zu ca. 70% konfluenten Zellen wurden mittels *LipofectAMINE-Reagenz* mit den Rezeptorkonstrukten ILT1 oder mL-1RI (jeweils 100 ng) transfiziert. Insgesamt wurden für die Transfektion 800 ng DNA und 2,5 µl *LipofectAMINE-Reagenz* eingesetzt. Die fehlende DNA-Menge wurde durch Zugabe des Leervektors pRc/CMV ausgeglichen. Für den Nachweis der Spezifität wurde ausschließlich der Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden ca. 24 h im Brutschrank inkubiert und für einen unterschiedlichen Zeitraum mit IL-1α induziert. Nach der Lyse der Zellen wurden die Proteinkonzentrationen nach *Bradford* bestimmt und pro Spur 15 µg Gesamtprotein auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch einen „semi dry blot“ wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und IκB durch Bindung von Anti-IκB-Antikörper und Anti-rabbit IgG HRP mit dem *ECL-System* von Amersham nachgewiesen.

2.3.4.1 Beitrag des endogenen humanen IL-1RI zum Abbau des Inhibitors IκB

Zur Unterscheidung der Beiträge von endogenem humanem IL-1R und den transfizierten murinen IL-1R und ILT1 wurde die Aktivität des endogenen Rezeptors durch einen Antikörper gegen humanes IL-1RI gezielt blockiert.

Die Spezifität des Antikörpers wurde durch Reportergenanalysen überprüft. Dazu wurden HEK 293T-Zellen mit dem murinen Rezeptor IL-1RI bzw. dem Leervektor pRc/CMV, dem Reportergenkonstrukt IgG/Luci und der Transfektionskontrolle cotransfiziert. Nach 24stündiger Inkubation in Vollmedium und 12stündiger Inkubation in Hungermedium, wurden steigende Mengen des blockierenden huIL-1RI-Antikörpers zugegeben. Nach einer Stunde wurden die Zellen für 6 h mit IL-1α induziert. Die Luciferase- und β-Galaktosidaseaktivität wurden mit dem *Dual Light Kit* bestimmt.

Der Antikörper blockiert die IL-1α-induzierte NF-κB-Aktivierung durch den endogenen humanen IL-1RI (Abb. 23, links). Dagegen konnte die NF-κB-Induktion durch IL-1α in den mit mL-1RI transfizierten Zellen nur geringfügig gehemmt werden.

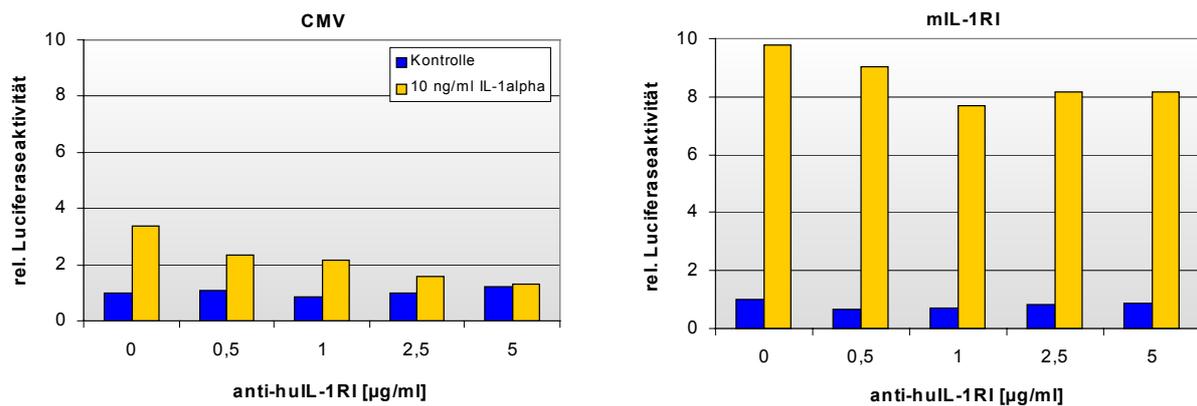


Abb. 23: Blockierung der IL-1-induzierten NF-κB-Aktivität durch Anti-huIL-1RI-Antikörper

2 x 10⁵ HEK 293T-Zellen wurden transient mittels *LipofectAMINE* mit mIL-1RI (50 ng) oder dem Leervektor pRc/CMV (Negativkontrolle; NK) transfiziert. Das NF-κB-abhängige Reporterplasmid IgG/Luci (40 ng) und die Transfektionskontrolle pEF/β-Gal (30 ng) wurden cotransfiziert. Nach einer 24stündigen Inkubation bei 37°C wurde das Zellmedium durch serumfreies Medium ersetzt und für weitere 12 h inkubiert. Anschließend wurden steigende Mengen Anti-huIL-1RI-Antikörper zugegeben und nach einer Stunde für weitere 6 h mit 10 ng/ml IL-1α oder als Kontrolle mit PBS induziert. Die Luciferase- und β-Galaktosidaseaktivität wurden mit dem *Dual Light Kit* von Topix bestimmt. Die Werte der relativen Luciferaseaktivität wurden bezogen auf die der β-Galaktosidaseaktivität.

IL-1α-induzierter IκB-Abbau durch den murinen Hybridrezeptor ILT1

Der IκB-Abbau über die Aktivierung des Hybridrezeptors wurde durch Reporteranalysen bei gleichzeitiger Blockierung des endogenen humanen IL-1-Rezeptors nachgewiesen.

HEK 293T-Zellen wurden mit den Rezeptorkonstrukten ILT1 oder zur Kontrolle mit mIL-1RI bzw. pRc/CMV transfiziert. Nach einer 24stündigen Inkubation wurden die Zellen für eine Stunde mit 5 µg/ml blockierendem Anti-huIL-1RI-Antikörper vorbehandelt und anschließend mit IL-1α induziert. Die Lysate wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. IκB wurde mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Nach der Blockierung des endogenen humanen IL-1-Rezeptors findet weder durch den Hybridrezeptor ILT1 noch durch den murinen IL-1-Rezeptor ein signifikanter Abbau von IκB statt (Abb. 24).

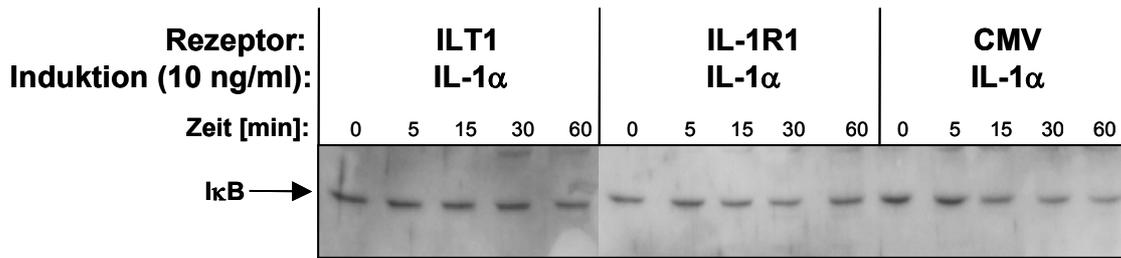


Abb. 24: Blockierender Anti-huIL-1R-Antikörper blockiert den IL-1 α -abhängigen Abbau des Inhibitors I κ B

HEK 293T-Zellen wurden auf eine 12-Well-Zellkulturschale ausgesät. Die zu ca. 70% konfluenten Zellen wurden mittels *LipofectAMINE-Reagenz* mit den Rezeptorkonstrukten ILT1 oder mIL-1RI (jeweils 100 ng) transfiziert. Insgesamt wurden für die Transfektion 800 ng DNA und 2,5 μ l *LipofectAMINE-Reagenz* eingesetzt. Die fehlende DNA-Menge wurde durch Zugabe des Leervektors pRc/CMV ausgeglichen. Für den Nachweis der Spezifität wurde ausschließlich der Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden ca. 24 h im Brutschrank inkubiert, mit 5 μ g/ml Anti-huIL-1RI-Antikörper vorbehandelt und anschließend für einen unterschiedlichen Zeitraum mit 10 μ g/ml IL-1 α induziert. Nach der Lyse der Zellen wurde die Proteinkonzentration nach *Bradford* bestimmt und pro Spur 15 μ g Gesamtprotein auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch einen „semi dry blot“ wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und I κ B durch Bindung von Anti-I κ B-Antikörper und Anti-rabbit IgG HRP mit dem *ECL-System* der Fa. Amersham nachgewiesen.

Um die Spezifität der Hemmung des I κ B-Abbaus durch die Blockierung des endogenen IL-1-Rezeptors zu zeigen, wurden HEK 293T-Zellen mit den Rezeptorkonstrukten ILT1 oder mIL-1RI transfiziert. Nach einer ca. 24stündigen Inkubation wurden die Zellen für eine Stunde mit 5 μ g/ml blockierendem Anti-huIL-1RI-Antikörper, 5 μ g/ml Isotypenkontrolle oder PBS vorbehandelt und anschließend 30 min mit IL-1 α induziert. Als Kontrolle diente die Induktion von CMV-transfizierten Zellen mit EGF. Die Lysate wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. I κ B wurde mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Wie aus Abb. 25 zu sehen ist, konnte bestätigt werden, dass nach der Transfektion der murinen Rezeptorkonstrukte ILT1 und mIL-1RI durch die Behandlung mit IL-1 α ein Abbau von I κ B stattfindet und dass dieser durch die Vorbehandlung der Zellen mit dem blockierenden Anti-huIL-1RI gehemmt werden kann. Dagegen war bei der Behandlung mit dem irrelevanten Antikörper (Isotypenkontrolle) keine Hemmung des I κ B-Abbaus zu erkennen. Ein vergleichbares Bild bieten Zellen, die ausschließlich mit dem Leervektor transfiziert wurden. Die Spezifität wurde durch einen analogen Versuch, bei dem die Zellen mit EGF induziert wurden, gezeigt. Hier hatte die Behandlung mit dem blockierenden Antikörper keinen signifikanten Einfluss auf die I κ B-Menge.

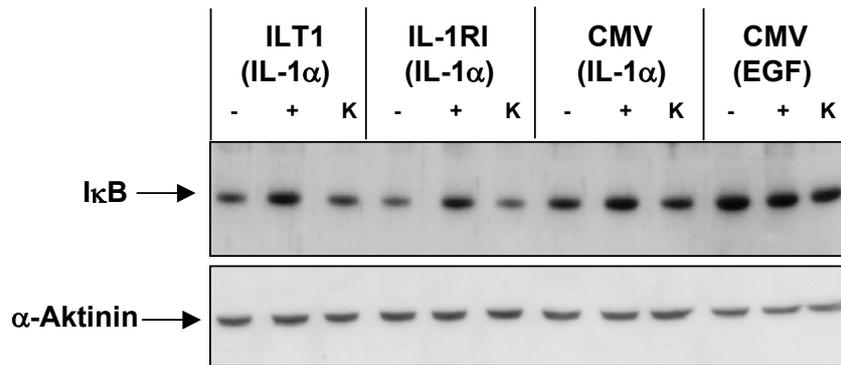


Abb. 25: IL-1 α -abhängiger Abbau des Inhibitors I κ B bei blockiertem endogenem IL-1-Rezeptor im Vergleich zu einem irrelevanten Antikörper

HEK 293T-Zellen wurden auf eine 12-Well-Zellkulturschale ausgesät. Die zu ca. 70% konfluenten Zellen wurden mittels *LipofectAMINE-Reagenz* mit den Rezeptorkonstrukten ILT1 oder mIL-1RI (jeweils 100 ng) transfiziert. Insgesamt wurden für die Transfektion 800 ng DNA und 2,5 μ l *LipofectAMINE-Reagenz* eingesetzt. Die fehlende DNA-Menge wurde durch Zugabe des Leervektors pRc/CMV ausgeglichen. Für den Nachweis der Spezifität wurde ausschließlich der Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden ca. 24 h im Brutschrank inkubiert, mit 5 μ g/ml Anti-huIL-1RI-Antikörper (+), einem irrelevanten Antikörper als Isotypenkontrolle (IK) oder Puffer (-) vorbehandelt und anschließend für 30 min mit IL-1 α bzw. EGF induziert. Nach der Lyse der Zellen wurden die Proteinkonzentrationen nach *Bradford* bestimmt und pro Spur 15 μ g Gesamtprotein auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch einen „semi dry blot“ wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und I κ B durch Anti-I κ B-Antikörper und Anti-rabbit IgG HRP mit dem *ECL-System* der Fa. Amersham nachgewiesen. Für die Auftragskontrolle wurden in der gleichen Reihenfolge wiederum jeweils 15 μ g Protein auf ein 12,5 % Polyacrylamidgel aufgetragen, geblotet und α -Aktinin nachgewiesen.

2.3.5. NF- κ B-Aktivierung über die Phosphatidylinositol-3-Kinase

Ein alternativer Weg der IL-1- oder TNF-abhängigen NF- κ B-Aktivierung führt über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und/oder die stromabwärts liegende Kinase Akt (Reddy et al., 1997; Wang et al., 1998; Reddy et al., 2000).

Deshalb wurde die Beteiligung der PI3K bei der IL-1-induzierten NF- κ B-Aktivierung durch das chimäre Rezeptorkonstrukt ILT1 mittels eines Reporterassays in Anwesenheit steigender Konzentrationen des PI3K-Inhibitors LY 294002 untersucht.

Die Rezeptorkonstrukte ILT1 bzw. mIL-1RI wurden mittels *LipofectAMINE-Reagenz* in HEK 293T-Zellen transfiziert. Der NF- κ B-abhängige Luciferasereporter (IgG/Luci) und die Transfektionskontrolle pEF/ β Gal wurden cotransfiziert. Die Zellen wurden nach 16-24stündiger Inkubation in Vollmedium und 12stündiger Inkubation in Hungermedium für 30 min mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors vorbehandelt und anschließend für 6 h mit IL-1 α induziert. Nach der Lyse der Zellen wurden die Luciferase- und β -Galaktosidaseaktivität mit dem *Dual-Light-Kit* von Topix bestimmt (siehe Abb. 26).

Die Aktivierung der Kinase Akt wurde durch Western-Blot-Analyse untersucht. Dabei wurden HEK 293T-Zellen mit den Rezeptorkonstrukten ILT1 oder mIL-1RI transfiziert.

Nach einer 24stündigen Inkubation wurden die Zellen für einen unterschiedlichen Zeitraum mit IL-1 α induziert. Die Lysate wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Phosphoryliertes Akt wurde mit einem phospho-spezifischen Akt-Antikörper nachgewiesen (siehe Abb. 27).

Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von steigenden Konzentrationen LY294002 keinen Einfluss auf die IL-1 α -induzierte NF- κ B-Aktivierung hatte (Abb. 26).

Eine IL-1-abhängige Aktivierung der Kinase Akt konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 27, links). Ein Kontrollexperiment mit EGF-induzierten Zellen zeigte jedoch, dass dieser Signalweg prinzipiell aktivierbar ist (Abb. 27, rechts).

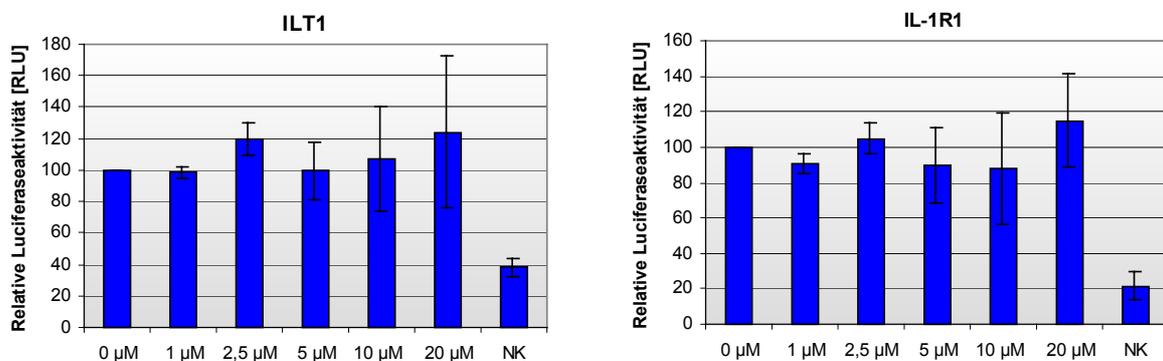


Abb. 26: Einfluss des PI3K-Inhibitors LY294002 auf die IL-1-abhängige NF- κ B-Aktivierung

2×10^5 HEK 293T-Zellen wurden transient mittels *LipofectAMINE* mit ILT1 oder mL-1R1 (50 ng) transfiziert. Als Negativkontrolle wurde lediglich der Leervektor pRc/CMV transfiziert. Das NF- κ B-abhängige Reporterplasmid IgG/Luci (40 ng) und die Transfektionskontrolle pEF/ β -Gal (30 ng) wurden cotransfiziert. Nach einer 24 h Inkubation bei 37°C wurde das Zellmedium durch serumfreies Medium ersetzt und für weitere 12 h inkubiert. Anschließend wurden steigende Mengen Inhibitor LY294002 zugegeben und nach 30 min für weitere 6 h mit 10 ng/ml IL-1 α induziert. Die Luciferase- und β -Galaktosidaseaktivität wurden mit dem *Dual Light Kit* von Topix bestimmt. Die Werte der relativen Luciferaseaktivität wurden bezogen auf die der β -Galaktosidaseaktivität. Es sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Ansätzen zusammengefasst.

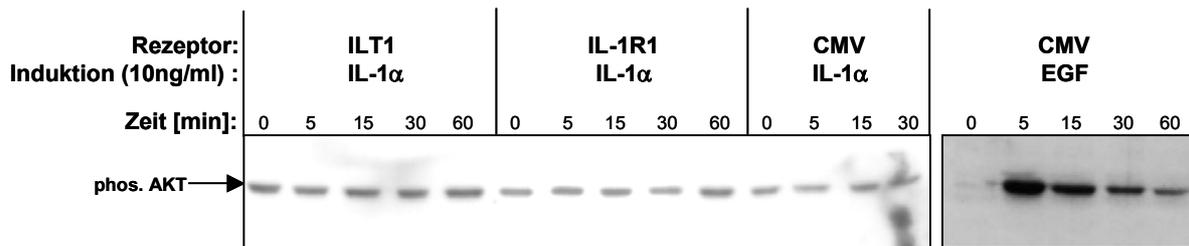


Abb. 27: Einfluss der Rezeptoren mL-1RI und ILT1 auf die IL-1-induzierte Aktivierung der Kinase Akt
 HEK 293T-Zellen wurden auf eine 12-Well-Zellkulturschale ausgesät. Die zu ca. 70% konfluenten Zellen wurden mittels *LipofectAMINE-Reagenz* mit den Rezeptorkonstrukten ILT1 oder mL-1RI (jeweils 100 ng) transfiziert. Insgesamt wurden für die Transfektion 800 ng DNA und 2,5 μ l *LipofectAMINE-Reagenz* eingesetzt. Die fehlende DNA-Menge wurde durch Zugabe des Leervektors pRc/CMV ausgeglichen. Für den Nachweis der Spezifität wurde ausschließlich der Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden ca. 24 h im Brutschrank inkubiert und für einen unterschiedlichen Zeitraum mit IL-1 α bzw. EGF induziert. Nach der Lyse der Zellen wurden die Proteinkonzentrationen nach *Bradford* bestimmt und pro Spur 15 μ g Gesamtprotein auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch einen „semi dry blot“ wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und phosphoryliertes Akt durch einen phospho-spezifischen Anti-Akt-Antikörper und Anti-rabbit IgG HRP mit dem *ECL-System* der Fa. Amersham nachgewiesen.

2.4. Untersuchung der MAPK-Signalwege

Die meisten bisher untersuchten Mitglieder der TIR-Familie induzieren Mitglieder der MAPK-Familie. Von IL-1 beispielsweise ist bekannt, dass es die drei wichtigsten MAP-Kinasen induziert. Zu diesen zählen die p42/44-MAP-Kinase und die beiden Stresskinasen p38-MAPK und JNK (Kracht et al., 1994; Freshney et al., 1994).

2.4.1. Aktivierung der Stresskinasen p38-MAPK und JNK

Die IL-1-abhängige Induktion der Stresskinasen p38-MAPK und JNK wurde durch Western-Blot-Analysen mit einem Antikörper gegen phosphorylierte p38-MAP-Kinase bzw. JNK untersucht. Zu diesem Zweck wurden HEK 293T-Zellen mittels *LipofectAMINE* mit dem Hybridrezeptor ILT1 oder mL-1RI transfiziert. Nach einer ca. 24stündigen Inkubation wurden die Zellen unterschiedlich lange mit IL-1 α induziert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt, die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und aktivierte Kinasen durch die spezifischen Antikörper gegen phosphorylierte p38-MAPK bzw. JNK nachgewiesen.

Wie aus Abb. 28 zu sehen ist, wurde sowohl in den ILT1- als auch in den IL-1RI-transfizierten Zellen durch die Behandlung mit IL-1 α beide Stresskinasen aktiviert. Auch in den Zellen, welche lediglich mit dem Leervektor transfiziert wurden, ist eine Aktivierung erkennbar. Diese ist auf die Anwesenheit von endogenem IL-1-Rezeptor zurückzuführen.

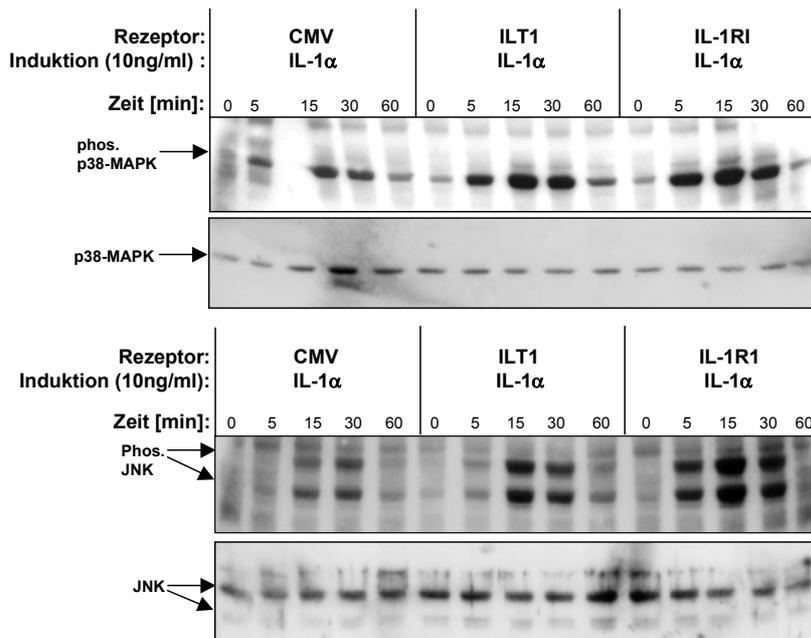


Abb. 28: IL-1-abhängige Induktion der p38-MAPK und JNK durch den chimären Rezeptor ILT1

HEK 293T-Zellen wurden auf eine 12-Well-Zellkulturschale ausgesät. Die zu ca. 70% konfluenten Zellen wurden mittels *LipofectAMINE-Reagenz* mit den Rezeptorkonstrukten ILT1 oder mIL-1RI (jeweils 100 ng) transfiziert. Insgesamt wurden für die Transfektion 800 ng DNA und 2,5 µl *LipofectAMINE-Reagenz* eingesetzt. Die fehlende DNA-Menge wurde durch Zugabe des Leervektors pRc/CMV ausgeglichen. Für den Nachweis der Spezifität wurde ausschließlich der Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden ca. 24 h im Brutschrank inkubiert und für einen unterschiedlichen Zeitraum mit IL-1 α induziert. Nach der Lyse der Zellen wurden die Proteinkonzentrationen nach *Bradford* bestimmt und pro Spur 15 µg Gesamtprotein auf eine PVDF-Membran übertragen und (A) die p38-MAP-Kinase durch einen phospho-spezifischen Anti-p38-Antikörper bzw. (B) Anti-JNK, Anti-rabbit IgG HRP mit dem *ECL-System* nachgewiesen. Für die Auftragskontrolle wurden die Lysate noch einmal in der gleichen Reihenfolge aufgetragen, geblottet und gesamt p38-MAPK bzw. JNK nachgewiesen.

2.4.2. Aktivierung der p42/44-MAP-Kinase in ILT1-transfizierten 293T-Zellen

Auch die Induktion der p42/44-MAP-Kinase wurde durch Western-Blot-Analyse mit ILT1- bzw. IL-1R-transfizierten HEK 293T-Zellen untersucht. Die transfizierten Zellen wurden für einen unterschiedlich langen Zeitraum mit IL-1 α induziert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt, die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und aktivierte p42/44-MAP-Kinase durch einen spezifischen Antikörper gegen phosphorylierte p42/44-MAP-Kinase nachgewiesen.

Wie die beiden Stresskinasen p38 und JNK konnte auch die p44/42-MAP-Kinase in ILT1- bzw. IL-1R-transfizierten Zellen durch IL-1 α induziert werden (Abb. 29). Die schwächere Aktivierung der p44/42-MAP-Kinase bei CMV-transfizierten Zellen resultiert aus der Anwesenheit von endogenem huIL-1RI.

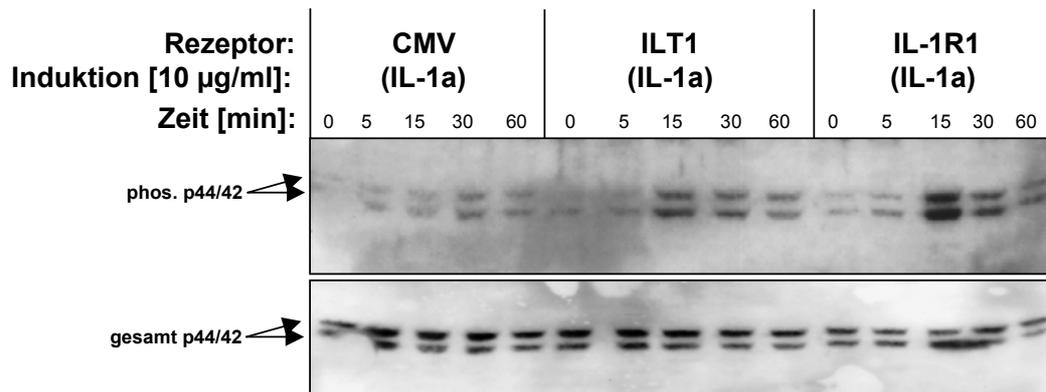


Abb. 29: IL-1-abhängige Induktion der p44/42-MAP-Kinase durch den chimären Rezeptor ILT1

HEK 293T-Zellen wurden auf eine 12-Well-Zellkulturschale ausgesät. Die zu ca. 70% konfluenten Zellen wurden mittels *LipofectAMINE-Reagenz* mit den Rezeptorkonstrukten ILT1 oder mL-1RI (jeweils 100 ng) transfiziert. Insgesamt wurden für die Transfektion 800 ng DNA und 2,5 µl *LipofectAMINE-Reagenz* eingesetzt. Die fehlende DNA-Menge wurde durch Zugabe des Leervektors pRc/CMV ausgeglichen. Für die Kontrollen wurde ausschließlich der Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden ca. 24 h im Brutschrank inkubiert und für einen unterschiedlich langen Zeitraum mit 10 ng/ml IL-1α bzw. EGF induziert. Nach der Lyse der Zellen wurden die Proteinkonzentrationen nach *Bradford* bestimmt und pro Spur 15 µg Gesamtprotein auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch einen „semi dry blot“ wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und p44/42 durch einen phosho-spezifischen Anti-p44/42-Antikörper und Anti-rabbit IgG HRP mit dem *ECL-System* der Fa. Amersham nachgewiesen. Für die Auftragskontrolle wurde die Membran gestrippt und mittels Anti-p44/42-Antikörper und Anti-rabbit IgG HRP mit dem *ECL-System* gesamt p44/42 nachgewiesen.

2.4.3. Aktivierung der p44/42-MAP-Kinase über die MAPK-Kinase MKK1/2

Die stromaufwärts liegenden Kinasen der MAP-Kinasen sind zum Großteil bereits bekannt. Beispielsweise wird die p44/42-MAPK durch die MAPK-Kinase MKK1/2 phosphoryliert und damit aktiviert.

Durch Untersuchungen mit den MKK1/2-Inhibitoren PD 98059 und UO 126 sollte geklärt werden, ob die Induktion der p44/42-MAP-Kinase über MKK1/2 stattfindet. Zu diesem Zweck wurden ILT1- bzw. mL-1RI-transfizierte 293T-Zellen mit den Inhibitoren vorbehandelt und schließlich für unterschiedliche Zeiträume mit IL-1α induziert.

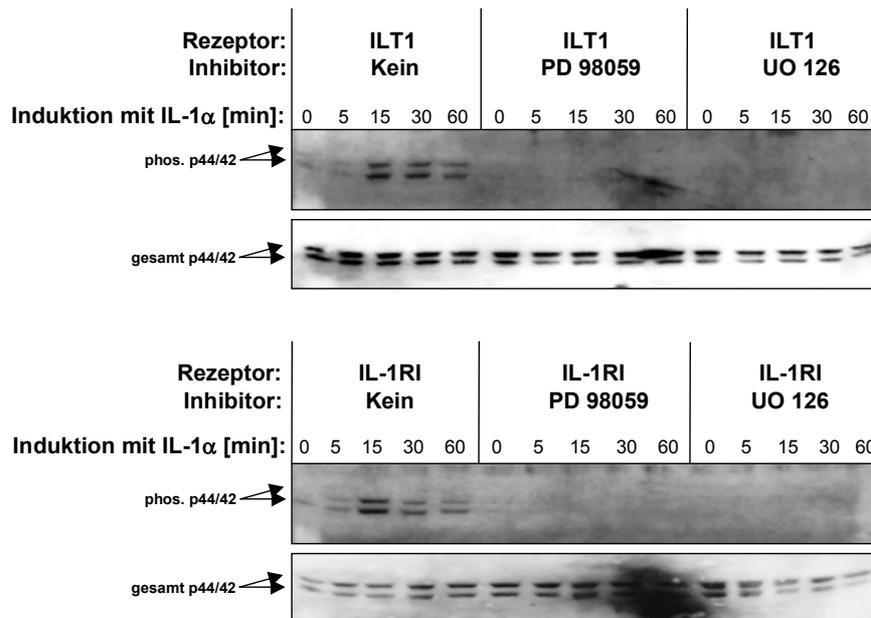


Abb. 30: Blockierung der p44/42-Aktivierung durch die MKK1/2-Inhibitoren PD 98059 bzw. UO 126

HEK 293T-Zellen wurden auf eine 12-Well-Zellkulturschale ausgesät. Die zu ca. 70% konfluenten Zellen wurden mittels *LipofectAMINE-Reagenz* mit den Rezeptorkonstrukten ILT1 oder mIL-1RI (jeweils 100 ng) transfiziert. Insgesamt wurden für die Transfektion 800 ng DNA und 2,5 µl *LipofectAMINE-Reagenz* eingesetzt. Die fehlende DNA-Menge wurde durch Zugabe des Leervektors pRc/CMV ausgeglichen. Für den Nachweis der Spezifität wurde ausschließlich der Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden ca. 24 h im Brutschrank inkubiert, für 30 min mit den Inhibitoren (jeweils 50 µM) vorbehandelt und für einen unterschiedlichen Zeitraum mit IL-1α induziert. Nach der Lyse der Zellen wurden die Proteinkonzentrationen nach *Bradford* bestimmt und pro Spur 15 µg Gesamtprotein auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch einen „semi dry blot“ wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und die p44/42-MAP-Kinase durch einen phosphospezifischen Anti-p44/42-Antikörper und Anti-rabbit IgG HRP mit dem *ECL-System* nachgewiesen. Für die Auftragskontrolle wurden die Membranen gestrippt und mittels Anti-p44/42-Antikörper und Anti-rabbit IgG HRP mit dem *ECL-System* gesamt p44/42 nachgewiesen.

2.4.4. Beteiligung von MyD88 und TRAF6 an der Aktivierung von p44/42 und JNK

Die stromaufwärts liegenden Mitglieder der Signalkaskaden, welche zu der Aktivierung der MAP-Kinasen führen, sind zum Großteil noch unbekannt. Durch Western-Blot-Analysen mit dominant-negativen MyD88- und TRAF6-Varianten sollte die Beteiligung dieser Moleküle an der Aktivierung der MAP-Kinasen durch das chimäre Rezeptorkonstrukt untersucht werden.

293T-Zellen wurden mit den Rezeptoren ILT1 bzw. IL-1RI und steigenden Konzentrationen dominant negativem MyD88 (MyD88 C) bzw. TRAF6 (TRAF6 C) transfiziert, für ca. 24 h inkubiert und mit IL-1α induziert. Die Lysate der Zellen wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt, die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und aktivierte MAP-Kinasen durch die jeweiligen spezifischen Antikörper gegen phosphorylierte MAP-Kinasen nachgewiesen.

Durch die Cotransfektion von MyD88 C bzw. TRAF6 C konnte sowohl in ILT1- als auch in IL-1RI-transfizierten Zellen eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Aktivität der Kinasen p44/42 und JNK erzielt werden. Diese war aber auch bei der Kontrolle, bei der der Einfluss der dominant negativen Konstrukte auf die EGF-induzierte NF- κ B-Aktivierung untersucht wurde, zu beobachten. Exemplarisch sind in Abb. 31 die Ergebnisse zu der Inhibierung der p44/42-MAP-Kinase durch MyD88 C gezeigt.

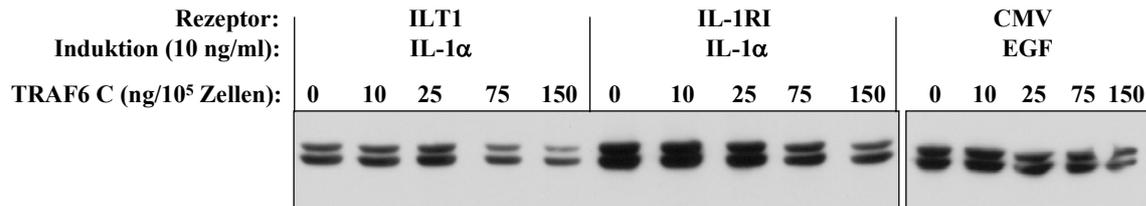


Abb. 31: Einfluss von dominant negativem TRAF6 C auf die Aktivierung der p44/42-MAP-Kinase

HEK 293T-Zellen wurden auf eine 12-Well-Zellkulturschale ausgesät. Die zu ca. 70% konfluenten Zellen wurden mittels *LipofectAMINE-Reagenz* mit den Rezeptorkonstrukten ILT1 oder mL-1RI (jeweils 100 ng) und steigenden Mengen TRAF6 C cotransfiziert. Insgesamt wurden für die Transfektion 800 ng DNA und 2,5 μ l *LipofectAMINE-Reagenz* eingesetzt. Unterschiedliche DNA-Menge wurde durch Zugabe des Leervektors pRc/CMV ausgeglichen. Für den Nachweis der Spezifität wurde ausschließlich der Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden ca. 24 h im Brutschrank inkubiert und für 10 min mit IL-1 α bzw. bei der Kontrolle mit EGF induziert. Nach der Lyse der Zellen wurden die Proteinkonzentrationen nach *Bradford* bestimmt und pro Spur 15 μ g Gesamtprotein auf ein 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch einen „semi dry blot“ wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und die p44/42-MAP-Kinase durch einen phosphospezifischen Anti-p44/42-Antikörper, Anti-rabbit IgG HRP und mit dem *ECL-System* der Fa. Amersham nachgewiesen.

V Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die Signalkette des T1-Rezeptors aufzuklären. Als Voraussetzung hierfür sollte zunächst ein funktioneller T1-Ligand isoliert werden. In Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen wurden bereits zwei potentielle T1-Liganden veröffentlicht (siehe Einleitung; Gayle et al., 1996; Kumar et al., 1995). Die Funktionalität konnte bislang jedoch noch nicht gezeigt werden.

1. Der T1-Ligand

Die Strategie für die Suche nach dem T1-Liganden gründete sich auf eine Reihe von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe. Diese hatten gezeigt, dass der T1-Rezeptor einerseits auf Mastzellen hoch exprimiert ist (Rossler et al., 1995), und andererseits bei der Differenzierung von Knochen und Osteosarkomen eine essentielle Rolle spielt (Werenskiold et al., 1999). Für beide Zelltypen gab es darüber hinaus direkte Hinweise auf die Synthese T1-bindender potentieller Liganden. Die Untersuchungen von Zellkultur-Überständen mittels Surface-Plasmon-Spektroskopie (BIAcore) belegte die Synthese eines sezernierten T1-bindenden Proteins in primären Mastzellen (E. Thomassen, unveröffentlicht), während cytometrische Messungen eine spezifische Bindung von rekombinantem löslichem T1S an die Zelloberfläche der Osteosarkomzelllinie K12 AS ergab – ein Hinweis auf die Anwesenheit eines membranständigen T1-bindenden Proteins (siehe Abb. 6). Da Transplantattumore der K12AS-Osteosarkomzellen zudem eine außergewöhnlich starke Infiltration mit Mastzellen aufweisen (Ruhstorfer, 2001) stand zu vermuten, dass dieses Gewebe auch den/die unbekanntem T1-Liganden enthält. Aufgrund dieser Befunde erschien das Osteosarkomgewebe als besonders geeignetes Ausgangsmaterial für die Isolierung eines T1-Liganden.

Zur Identifizierung dieses Moleküls wurde die Technik der Expressionsklonierung von cDNS aus dem Osteosarkom gewählt. cDNS-Klone, die für T1-bindende Proteine kodieren, sollten mittels ihrer Affinität zu rekombinantem T1S (Rupp et al., 1995) identifiziert bzw. angereichert werden. Das verwendete Affinitätsreagenz, rekombinantes T1S aus Insektenzellen, war auch für den o.g. Nachweis T1-bindender Proteine verwendet worden. Seine biologische Aktivität belegen Experimente, in denen T1S aus Insektenzellen die T1-abhängige Aktivierung von TH2 Zellen *in vitro* inhibieren konnte (Meisel et al, 2001).

Zur Identifizierung von cDNS Klonen für den T1-Liganden wurde zunächst eine repräsentative *λZAP Express Phagenbank* hergestellt. Nach bakterieller Expression der cDNS Bank war eine spezifische Bindung des rekombinanten T1S Proteins an Phagenplaques nicht nachweisbar. Daraufhin durchgeführte Kontrollexperimente mit einem vergleichbaren System, der Interaktion zwischen dem IL-1-Rezeptor und seinem Liganden IL-1 α , zeigten eine mangelhafte Expression des Liganden in phageninfizierten Bakterien. Das Modellprotein IL-1 α war in phageninfizierten Bakterien durch Westernanalyse nicht nachweisbar. Die Transfektion von Bakterienzellen mit dem aus den Phagen gewonnenen Expressionsplasmid pBK/CMV dagegen induzierte eine deutliche Expression von IL-1 α . Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der *λZAP* Vektor für die bakterielle Expression IL-1 verwandter Proteine nicht geeignet ist. Ähnliche Probleme ergaben sich auch bei Verwendung eines alternativen bakteriellen Expressionssystems, das ein Ligandenscreening nach der *Phage-display*-Methode erlaubt (T7-Phagenbank). Auch hier konnten keine T1-bindenden Phagen angereichert werden.

Um die Probleme der bakteriellen Expression zu umgehen und die Wahrscheinlichkeit für eine korrekte Synthese und Faltung T1-bindender Proteine zu erhöhen, wurde im weiteren ein auf der Säugerzelllinie HEK 293 basiertes Expressionssystem verwendet. Diese Technik war bereits erfolgreich zur Klonierung membranständiger Liganden verwendet (Riedl, 2001) Nach transienter Transfektion der Expressionsbank in HEK 293-Zellen wurden Zellen, welche daraufhin ein membranständiges T1-bindendes Protein synthetisierten, mittels T1S-gekoppelter *DynaBeads* angereichert. Unterschiedliche Populationen primärer Plasmide zeigten in unabhängigen Versuchsansätzen eine deutliche Anreicherung definierter Plasmide. Der Vergleich der angereicherten Plasmidpopulationen ergab jedoch keinerlei Sequenzhomologien, so dass auch auf diesem Wege ein funktioneller T1-Ligand nicht isoliert werden konnte. Eine mögliche Ursache für den Misserfolg der Strategie ist eine zu geringe Oberflächenexpression des plasmidkodierte T1-Liganden aufgrund der Cotransfektion einer Vielzahl unterschiedlicher Plasmide. Um diesen Effekt zu umgehen, wurde das Gemisch aus Expressions-Plasmiden vor der Transfektion mit steigenden Mengen neutraler Heringssperma-DNS verdünnt. Doch konnte auch mit diesem Ansatz kein T1-bindendes Protein isoliert werden.

2. Untersuchung der Signalkaskaden

Zelloberflächen-Lokalisierung der Rezeptoren und Deletionsmutanten

Da ein funktioneller T1-Ligand im vorgegebenen Zeitrahmen nicht isoliert werden konnte, waren zur Untersuchung der Signalketten alternative Methoden zur ligandenunabhängigen Aktivierung des T1-Rezeptors erforderlich. Zur Etablierung geeigneter Aktivierungsprotokolle wurden Säugerzellen transient mit Vektoren transfiziert, die eine konstitutive Expression des T1- oder IL-1-Rezeptors erzwingen. Voruntersuchungen ergaben, dass sowohl die vollständigen Rezeptoren als auch Deletionsmutanten, denen die zytoplasmatische Domäne vollständig fehlte, auf der Oberfläche der transient transfizierten Zellen exprimiert werden. Deletionsmutanten mit Mutationen in der C-terminalen konservierten Domäne der Rezeptoren dagegen zeigten eine stark reduzierte Oberflächenexpression (siehe IV2.1.1), obwohl sich die unterschiedlichen Genprodukte auf Ebene von Gesamt-RNS bzw. Gesamt-Protein in ihrer Syntheserate nicht unterscheiden (Rupp, 2000).

Ein ähnliches Phänomen wurde kürzlich für den IL-1RI von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben. Bei der Untersuchung der Oberflächenexpression von IL-1-Rezeptor-Mutanten zeigte sich, dass Punktmutation in allen konservierten Bereichen zu einer Verminderung der Oberflächenexpression führen (Slack et al., 2000). Diese Befunde stellen frühere Mutationsanalysen des IL-1RI in Frage, die definierten Punktmutationen funktionelle Bedeutung für die Signaltransduktion zugeschrieben hatten (Heguy et al., 1992; Kuno et al., 1993; Leung et al., 1994), da die entsprechenden Rezeptormutanten nicht auf der Oberfläche lokalisieren.

In den folgenden Signalketten-Analysen wurden deshalb nur diejenigen Rezeptoren und Deletionsmutanten verwendet, die nachweislich auf der Zellmembran lokalisiert sind.

Aktivierung des T1-Signalweges

Als Nachweis für eine Aktivierung des T1-Signalweges wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B gemessen, ein gemeinsames Merkmal der Signalketten aller Mitglieder der TIR-Familie. Verschiedene Mitglieder dieser Familie können alleine schon durch transiente Überexpression der Rezeptoren aktiviert werden (Muzio et al., 1998).

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, führte die Überexpression des murinen IL-1-Rezeptors zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der NF- κ B-Aktivität in transient transfizierten HEK 293T Zellen. Dagegen hatte die Überexpression des T1-Rezeptors keinerlei Einfluss auf die basale Aktivität des Transkriptionsfaktors (siehe Abb. 13). HEK 293T-Zellen tragen endogenen IL-1-Rezeptor und sind IL-1-responsiv. Sie exprimieren demnach alle Komponenten dieser Signalkaskade. Als Grund für die fehlende NF- κ B-Aktivierung nach Überexpression des T1-Rezeptors wäre beispielsweise das Fehlen eines entsprechenden accessorischen Proteins oder eines anderen essentiellen Signaltransmitters denkbar, zumal zytometrisch gezeigt wurde, dass die Zellen keinen membranständigen T1-Rezeptor tragen (siehe Abb. 6).

Eine alternative Möglichkeit zur Aktivierung von homodimerisierende Rezeptoren ist die erzwungene Dimerisierung („Cross-linking“) mit spezifischen Antikörpern. Einen Hinweis darauf, dass dieser Ansatz auch für den T1-Rezeptor Erfolg verspricht liefert die Beobachtung der durch den T1-spezifischen Antikörper „3E10“ vermittelten Induktion der Synthese von TH2-typischen Zytokinen in aktivierten TH2-Zellen (Meisel et al., 2001). In transient transfizierten HEK 293T Zellen war jedoch weder durch die Behandlung mit löslichem, noch mit immobilisiertem 3E10-Antikörper eine Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch den T1-Rezeptors zu beobachten. In einem alternativen Ansatz wurde die extrazelluläre Domäne des T1-Rezeptors durch ein FLAG-Epitop ersetzt (siehe IV2.1) und das „Cross-linking-Experiment“ mit einem Anti-FLAG-Antikörper wiederholt. Interessanterweise führte die Überexpression des FLAG/T1M-Konstruktes alleine zu einer leichten, aber signifikanten Induktion von NF- κ B, die bei der Verwendung des Deletionskonstruktes FLAG/T1M Δ 372, dem fast die komplette zytoplasmatische Domäne fehlt, nicht zu beobachten war (Abb. 14). Dieser Befund spricht für die Funktionalität der isolierten zytoplasmatischen Domäne des T1-Rezeptors. Er deutet weiter darauf hin, dass die Funktion der zytoplasmatischen Domäne des T1-Rezeptors in Abwesenheit des Liganden von dessen extrazellulärer Domäne inhibiert wird. Eine mögliche Erklärung für diese inhibitorische Aktivität der extrazellulären Domäne wäre etwa eine Bindungsstelle für einen Inhibitor. Das Ausmaß der NF- κ B Induktion nach Überexpression des FLAG/T1M-Konstruktes war für eine weitere Analyse der Signalkette zu gering und konnte auch nach „cross-linking“ des FLAG/T1M-Konstruktes nicht weiter induziert werden. Aus diesem Grunde war auch dieser Ansatz für die weiteren Studien nicht geeignet.

Als dritte Variante wurde deshalb die Verwendung eines chimären Rezeptors (ILT1), bestehend aus der extrazellulären Domäne von IL-1RI und der intrazellulären Region von T1M (siehe Abb. 8), untersucht. Reporteranalysen in HEK 293T-Zellen ergaben, dass das chimäre Rezeptorkonstrukt ILT1 wie der IL-1-Rezeptor IL-1-abhängig NF- κ B aktivieren (siehe Abb. 15). Die zytoplasmatische Domäne von T1 ist für die ILT1-vermittelte NF- κ B-Induktion essentiell, da das Deletionskonstrukt ILT1 Δ 372, dem fast die komplette zytoplasmatische Domäne fehlt, nicht in der Lage war den Transkriptionsfaktor zu aktivieren. Es zeigte sich sogar, dass die IL-1-induzierte NF- κ B-Aktivierung des endogenen huIL-1RI durch das Deletionskonstrukt inhibiert wurde.

Zudem findet eine Interaktion zwischen dem IL-1R accessorischen Protein und dem chimären T1-Rezeptor statt. Die Cotransfektion von IL-1R AcP erhöhte vor allem den IL-1R- bzw. ILT1-vermittelten basalen NF- κ B-Spiegel. Das accessorische Protein ist aber nicht der limitierende Faktor der Signalkaskade, da die NF- κ B-Induktion in IL-1-induzierten Zellen nicht signifikant erhöht werden konnte. Ein anderes Mitglied der Signalkaskade scheint limitierend zu sein. Zusammengefasst ergaben die umfangreichen Vorarbeiten, dass eine Aktivierung der zytoplasmatischen Domäne des T1-Rezeptors nur bei Verwendung des chimären ILT1-Rezeptors möglich war. Dieser wurde für die detaillierten Analysen der weiteren Signalleitung verwendet.

Bei der Identifizierung und Untersuchung der T1-induzierten Signalkaskaden wurde der Schwerpunkt auf Signalwege gelegt, die an der Signalleitung anderer Mitglieder der TIR-Familie beteiligt sind. Zu diesen zählen vor allem der Transkriptionsfaktor NF- κ B und die MAP-Kinasen.

3. Die T1-induzierte NF- κ B-Signalkette

Beteiligung der Signaltransmitter MyD88 und TRAF6

MyD88 ist ein Mitglied der TIR-Familie, stellt jedoch wegen der fehlenden Transmembrandomäne eine Ausnahme dar. Außer der C-terminalen TIR-Domäne trägt MyD88 am N-Terminus eine „death domain“ (DD). Über die TIR-Domäne findet die Bindung an den Rezeptorkomplex statt (Muzio et al., 1997). Das DD-Motiv stellt eine Aktivierungsdomäne dar und aktiviert die ebenfalls an den Rezeptorkomplex gebundene Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase (IRAK). Death domain-tragende Signaltransmitter wie MyD88 stellen wichtige Faktoren bei der NF- κ B-Aktivierung dar.

Auch die TNF-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B findet über ein solches Protein statt (TRADD; TNF-R1-associated death domain protein) (Hsu et al., 1995; Hsu et al., 1996).

Der Signaltransmitter MyD88 ist auch an der IL1-induzierten NF- κ B-Aktivierung beteiligt. Dominant negatives MyD88 C, dem die aktivierende "death domain" fehlt (Hacker et al., 2000), hemmt in HEK 293T-Zellen die IL-1-induzierte NF- κ B-Aktivierung über den chimären T1-Rezeptor. Die gleiche konzentrationsabhängige Hemmung ist in IL-1RI-transfizierten Zellen zu beobachten. Auf die TNF-induzierte NF- κ B-Aktivierung hatte MyD88 C jedoch keinen Einfluss, was die Spezifität der Reaktion zeigt (siehe Abb. 17 und Abb. 18).

Die NF- κ B-Induktion durch zahlreiche Zytokine wird durch Mitglieder der TRAF-Familie vermittelt. Bisher sind sechs Mitglieder (TRAF1-6) identifiziert und kloniert worden. Drei der TRAF-Signaltransmitter stehen in Zusammenhang mit der NF- κ B-Aktivierung. TRAF2 und TRAF6 beispielsweise spielen eine Rolle bei der TNF- bzw. IL-1-induzierten NF- κ B-Aktivierung (Rothe et al., 1994; Rothe et al., 1995; Muzio et al., 1997; Cao et al., 1996).

TRAF6 ist ebenfalls an der IL1-induzierten NF- κ B-Aktivierung beteiligt. Reportergenanalysen mit dominant negativem TRAF6, dem die für die Aktivierung essentielle N-terminale Domäne fehlt (Hacker et al., 2000), zeigten eine konzentrationsabhängige Hemmung der IL-1-induzierten NF- κ B-Aktivierung durch die Rezeptoren IL1 und IL-1RI. Dagegen hatte es keinen Einfluss auf die TNF-induzierte NF- κ B-Aktivierung (siehe Abb. 19 und Abb. 20).

Bei der Durchführung der Experimente wurde beobachtet, dass sich bei den Versuchen zur Inhibierung der NF- κ B-Aktivität durch dominant-negatives TRAF6 (TRAF6 C) die β -Galaktosidaseaktivität, die normalerweise als Transfektionskontrolle diente, stark veränderte, während sie bei allen übrigen Versuchen vergleichbar war (siehe Abb. 21). Die Expression der Rezeptorkonstrukte jedoch war unverändert. Dieses Phänomen wurde hier nicht näher untersucht. Die Experimente mit dem TRAF6 C-Konstrukt wurden jedoch ohne Berücksichtigung der β -Galaktosidaseaktivität ausgewertet.

Die Rolle des NF- κ B-Inhibitors I κ B

NF- κ B liegt im nichtinduzierten Zustand gebunden an seinen Inhibitor I κ B im Zytoplasma vor. Der Inhibitor maskiert das Kernlokalisierungssignal des Transkriptionsfaktors und verhindert die Translokation in den Kern. Nach der Induktion des Signalweges wird der Inhibitor durch die I κ B-Kinase (IKK) phosphoryliert und daraufhin ubiquitinmarkiert. Die Markierung dient als Signal für den proteolytischen Abbau durch das 26S-Proteasom (zusammengefasst in Karin und Ben-Neriah, 2000). Wie es zur Aktivierung der I κ B-Kinasen kommt ist noch weitgehend unklar.

Durch Western-Blot-Analysen mit einem I κ B-spezifischen Antikörper konnte gezeigt werden, dass nach Aktivierung des chimären T1- und des IL-1-Rezeptors ein Abbau des Inhibitors stattfindet. Der Abbau war bereits nach 5minütiger Induktion mit IL-1 α nachweisbar und nach 60 min fast vollständig. Ein vergleichbares Bild bot sich aber bei den Kontrollexperimenten, bei denen lediglich der Leervektor pRc/CMV transfiziert wurde (siehe Abb. 22). Der Abbau des Inhibitors könnte demnach durch die Aktivierung des endogenen IL-1-Rezeptors der HEK 293T-Zellen induziert sein.

Diese Vermutung wurde experimentell durch Blockierung des endogenen humanen IL-1-Rezeptors bestätigt (siehe Abb. 24). Durch die Behandlung der Zellen mit dem blockierenden Antikörper Anti-huIL-1RI konnte der IL1- bzw. mIL-1R-induzierte I κ B-Abbau vollständig inhibiert werden. Die Behandlung der Zellen mit einem irrelevanten Antikörper führte dagegen zu keiner Verminderung des I κ B-Abbaus. In der humanen Zelllinie HEK 293T unterscheiden sich anscheinend die NF- κ B-Signalwege abhängig davon, ob sie durch den endogenen humanen IL-1RI oder die murinen Rezeptorkonstrukte IL1 bzw. IL-1RI induziert werden.

In zahlreichen Untersuchungen wurde ein alternativer Zytokin-induzierter Signalweg zur NF- κ B-Aktivierung über die Induktion der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) beschrieben (Reddy et al., 1997). Sizemore et al. zeigten 1999 zudem, dass dies unabhängig vom Abbau des Inhibitors I κ B möglich ist. Anscheinend bindet die regulatorische Untereinheit der PI3K (p85) an das accessorische Protein und dies führt zur Aktivierung der katalytischen Untereinheit (p110). Sie zeigten außerdem, dass die Überexpression von konstitutiv aktivem p110 oder Akt (PI3K-activated protein kinase) zur Phosphorylierung und Transaktivierung des Transkriptionsfaktors führt (Sizemore et al., 1999). Die direkte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors könnte eine Konformationsänderung des Proteins bewirken und so die Translokation in den Kern ermöglichen (Zusammenfassung in Schmitz et al., 2001).

Dieser Weg scheint allerdings in unserem System keine Rolle zu spielen, da der PI3K-Inhibitor LY 294002 weder in ILT1- noch in IL-1R-transfizierten HEK-293T-Zellen die NF- κ B-Induktion inhibierte (siehe Abb. 26). Auch die stromabwärts der PI3K liegende Kinase Akt wurde weder durch ILT1 noch durch IL-1RI IL-1-abhängig aktiviert (siehe Abb. 27).

Für einen Erklärungsversuch wären weitere Untersuchungen erforderlich. Beispielsweise ob eine direkte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors stattfindet, da es Anhaltspunkte auf einen derartigen alternativen NF- κ B-Signalweg gibt (zusammengefasst in Schmitz et al., 2001).

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B setzt sich jeweils aus zwei Mitgliedern der Familie der Rel-Transkriptionsfaktoren zusammen. Verschiedene NF- κ B-Dimere zeigen unterschiedliche Bindungsaffinitäten für die κ B-Konsensussequenz und unterscheiden sich außerdem in ihrer Fähigkeit die Transkription zu initiieren (Übersicht in Miyamoto and Verma, 1995; Ghosh et al., 1998; Attar et al., 1997). Welche Rel-Transkriptionsfaktoren durch T1 induziert werden wäre eine weitere interessante Fragestellung, zumal bereits gezeigt werden konnte, dass die Bildung der NF- κ B-Dimere durch Transfektion von Rezeptoren aus verschiedenen tierischen Systemen beeinflusst werden kann. Nach der Transfektion der murinen fibroblastischen Zellen C127 mit humanem IL-1RI konnte neben dem normalerweise in diesen Zellen vorkommenden heterogenen NF- κ B-Dimer p50/p65 ein homodimerer Komplex (p65/p65) nachgewiesen werden (Laye et al., 1998). Weiterführende Untersuchungen waren im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr durchführbar.

4. Induktion der MAPK

Da die MAP-Kinasen durch die Überexpression des T1-Rezeptors nicht induzierbar waren (Ergebnisse nicht gezeigt) wurde auch zur Untersuchung der MAPK-Signalwege der IL-1-induzierbare chimäre T1-Rezeptor ILT1 verwendet.

Durch Western-Blot-Analysen mit phospho-spezifischen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass über die Rezeptoren ILT1 und IL-1RI in HEK 293T-Zellen IL-1 α -abhängig die drei wichtigsten MAP-Kinasen, p38, JNK und p44/42 aktiviert werden. Phosphorylierte Kinasen konnten in der Regel bereits nach einer 5minütigen Induktion nachgewiesen werden, erreichten bei ca. 15 min ihren Höhepunkt und nahmen bei längerer Induktion wieder ab um nach ca. einer Stunde wieder auf dem Ausgangsniveau zu sein.

Wie bei der Untersuchung der NF- κ B-Aktivierung wurden die MAP-Kinasen auch in den Kontrollzellen durch den endogen vorhandenen humanen IL-1-Rezeptor induziert. Durch die Transfektion der Rezeptorkonstrukte ILT1 und IL-1RI konnte dieser Wert aber signifikant und reproduzierbar erhöht werden.

Die Aktivierung der MAP-Kinase p44/42 findet über die MAPK-Kinasen MKK1/2 statt, da die Behandlung von HEK 293T-Zellen mit den MKK1/2-spezifischen Inhibitoren PD 98059 bzw. UO 126 die IL-1 α -induzierte NF- κ B-Aktivierung durch die Rezeptoren ILT1 und IL-1RI vollständig inhibierte.

Die stromaufwärts der MAPKK liegenden Signaltransmitter sind weitgehend unbekannt. Es gibt es immer mehr Anhaltspunkte für eine direkte Verbindung zwischen dem MAPK- und dem I κ B/IKK-Signalweg, wie sie z.B. für MEKK1-3 und TAK1 gezeigt werden konnte (Lee et al., 1997; Meyer et al., 1996; Zandi et al., 1999; Zhao und Lee, 1999; Ninomiya-Tsuji et al., 1999; Sakurai et al., 1998; Sakurai et al., 1999; Wang et al., 2001). Lee et al., konnten 2000 zeigen, dass die Behandlung von Zellen mit LPS zur TAK 1-abhängigen Induktion der Kinasen p38, JNK, PKB/Akt und IKK β führt. Auch für Mitglieder des NF- κ B-Signalweges konnten Verbindungen zu den MAP-Kinasen nachgewiesen werden. TRAF6 beispielsweise scheint sowohl an der Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B, als auch an der Aktivierung der p54-MAP-Kinase (JNK) beteiligt zu sein (Ishida et al., 1996; Song et al., 1997; Karin and Delhase, 1998). Auch Li et al., konnten 2001 zeigen, dass sich der NF- κ B- und der JNK-Signalweg bei IRAK oder stromaufwärts von IRAK trennen (Li et al., 2001).

Dies konnte im hier untersuchten System aber nicht eindeutig bestätigt werden. Die Aktivierung der MAP-Kinasen p44/42 und JNK durch die Rezeptoren ILT1 und IL-1RI konnte in HEK 293T-Zellen durch dominant negative Varianten der Signalmoleküle MyD88 und TRAF6 zwar leicht inhibiert werden, doch war diese Hemmung auch nach Induktion durch EGF zu beobachten und scheint daher nicht spezifisch zu sein.

Die genaue Funktion des T1-Rezeptors ist weitgehend unklar. Es gibt aber immer mehr Anhaltspunkte auf immunregulatorische Funktionen. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Annahme. Über das chimäre T1-Rezeptorkonstrukt werden die gleichen Signalwege induziert wie durch den transfizierten murinen IL-1RI. Trotzdem bleibt bei der Aufklärung der T1-Funktion die Schwierigkeit des fehlenden Liganden, der auch im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden konnte. Da die Rezeptor/Ligand-Interaktion durch Bindung an rekombinantes T1S/FLAG nicht nachgewiesen werden konnte wäre als nächster Schritt die Suche auf funktioneller Ebene denkbar.

VI Zusammenfassung

Über die Funktion des IL-1R-homologen T1-Rezeptor ist bisher wenig bekannt. Funktionsanalysen gestalten sich vor allem durch das Fehlen eines funktionellen Liganden schwierig. Trotz zahlreicher Versuche in unterschiedlichen Systemen konnte in dieser Arbeit kein funktioneller T1-Ligand identifiziert werden. Der T1-Rezeptor wird, wegen Sequenzhomologien im zytoplasmatischen Bereich, zur TIR-Familie gezählt. Alle Mitglieder der TIR-Familie haben immunregulatorische Funktionen. Auch für T1 konnte bereits gezeigt werden, dass er auf T-Helfer-Zellen des Typs II exprimiert wird und an der Immunantwort durch diese Zellen beteiligt ist. Die Untersuchung der T1-induzierten Signalwege bestätigte die immunregulatorische Funktion von T1. Da der T1-Ligand unbekannt ist wurden die Signalwege mit einem Hybridrezeptor, bestehend aus dem zytoplasmatischen Teil des murinen T1-Rezeptors und dem extrazellulären Teil des mIL-1RI, untersucht. Wie über den Zytokinrezeptor IL-1RI wird über T1 der Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert, der eine Rolle bei zahlreichen inflammatorischen Prozessen spielt. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors über die Mediatoren MyD88 und TRAF6 verläuft, die auch an der IL-1-abhängigen NF- κ B-Aktivierung beteiligt sind. Die PI3K bzw. die stromabwärts liegende Kinase Akt scheinen bei diesem Prozess keine Rolle zu spielen. NF- κ B liegt im nichtinduzierten Zustand gebunden an den Inhibitor I κ B im Zytoplasma vor. Nach der Aktivierung wird der Inhibitor phosphoryliert und durch Bindung von Ubiquitin für den proteolytischen Abbau markiert. Die IL-1-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors über den endogenen humanen IL-1RI von HEK 293T-Zellen findet über den Abbau des Inhibitors statt. Dagegen scheint in dieser Zelllinie die NF- κ B-Aktivierung über den murinen IL-1R bzw. T1 unabhängig von der I κ B-Degradierung zu sein.

Neben dem Transkriptionsfaktor NF- κ B werden in HEK 293T-Zellen über den chimären Rezeptor ILT1, wie über IL-1RI, die MAP-Kinasen p44/42 und die beiden Stresskinasen p38 und JNK induziert, wobei p44/42 über die MAPK-Kinase MKK1/2 aktiviert wird. Bei der Induktion der MAP-Kinasen scheinen die Signaltransmitter MyD88 und TRAF6 eine untergeordnete Rolle zu spielen.

VII Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." *Nature*. **383**(6603):787-93. Review
- Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S. (1998). "Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function." *Immunity*. **9**(1):143-50
- Adler V, Polotskaya A, Wagner F, Kraft AS. (1992). "Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity." *J Biol Chem*. **267**(24):17001-5
- Attar RM, Caamano J, Carrasco D, Iotsova V, Ishikawa H, Ryseck RP, Weih F, Bravo R. (1997). "Genetic approaches to study Rel/NF-kappa B/I kappa B function in mice." *Semin Cancer Biol*. **8**(2):93-101. Review
- Baeuerle PA, Baltimore D. (1996). "NF-kappa B: ten years after." *Cell*. **87**(1):13-20
- Barnes PJ, Karin M. (1997). "Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases". *N Engl J Med*. **336**(15):1066-71. Review
- Bergers G, Reikerstorfer A, Braselmann S, Graninger P, Busslinger M. (1994). "Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor." *EMBO J*. **13**(5):1176-88
- Blumer KJ, Johnson GL. (1994). "Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways." *Trends Biochem Sci*. **19**(6):236-40. Review
- Born TL, Smith DE, Garka KE, Renshaw BR, Bertles JS, 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**(52):41528
- Born TL, Thomassen E, Bird TA, Sims JE. (1998). "Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling." *J Biol Chem*. **273**(45):29445-50
- Bowie A, Kiss-Toth E, Symons JA, Smith GL, Dower SK, 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):10162-7
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. (1999). "Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors." *Science*. **285**(5428):732-6
- Brightbill HD, Modlin RL. (2000). "Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response." *Immunology*. **101**(1):1-10. Review
- Burns K, Martinon F, Esslinger C, Pahl H, Schneider P, Bodmer JL, Di Marco F, French L, Tschopp J. (1998). "MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling." *J Biol Chem*. **273**(20):12203-9
- Cao Z, Henzel WJ, Gao X. (1996). "IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor." *Science*. **271**(5252):1128-31.
- Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. (1996). "TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1." *Nature*. **383**(6599):443-6.

- Constant SL, Bottomly K. (1997). "Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches." *Annu Rev Immunol.* **15**:297-322. Review
- Coyle AJ, Lloyd C, Tian J, Nguyen T, Eriksson C, Wang L, Ottoson P, Persson P, Delaney T, Lehar S, Lin S, Poisson L, Meisel C, Kamradt T, Bjerke T, Levinson D, Gutierrez-Ramos JC. (1999). "Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses." *J Exp Med.* **190**(7):895-902
- Croston GE, Cao Z, 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):16514-7
- Dale M, Nicklin MJ. (1999). "Interleukin-1 receptor cluster: gene organization of IL1R2, IL1R1, IL1RL2(IL-1Rrp2), IL1RL1 (T1/ST2), and IL18R1 (IL-1Rrp) on human chromosome 2q." *Genomics.* **57**(1):177-9
- Debets R, Timans JC, Homey B, Zurawski S, Sana TR, Lo S, Wagner J, Edwards G, Clifford T, Menon S, Bazan JF, Kastelein RA. (2001). "Two Novel IL-1 Family Members, IL-1delta and IL-1epsilon, Function as an Antagonist and Agonist of NF-kappaB Activation Through the Orphan IL-1 Receptor-Related Protein 2." *J Immunol.* **167**(3):1440-6
- Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ. (1994). "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." *Cell.* **76**(6):1025-37
- Dinarello CA, Clark BD, Ikejima T, Puren AJ, Savage N, Rosoff PM. (1990). "Interleukin 1 receptors and biological responses." *Yale J Biol Med.* **63**(2):87-93. Review
- Dinarello CA. (1999). "Interleukin-18." *Methods.* **19**(1):121-32. Review
- Dinarello CA. (2000). "Interleukin-18, a proinflammatory cytokine." *Eur Cytokine Netw.* **11**(3):483-6. Review
- Dinarello CA. (2000). "Proinflammatory cytokines." *Chest.* **118**(2):503-8. Review
- Dower SK, Sims JE, Cerretti DP, Bird TA. (1992). "The interleukin-1 system: receptors, ligands and signals." *Chem Immunol.* **51**:33-64. Review
- Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J. (1994). "Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27." *Cell.* **78**(6):1039-49
- Fujita T, Nolan GP, Liou HC, Scott ML, Baltimore D. (1993). "The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers." *Genes Dev.* **7**(7B):1354-63
- Gachter T, Werenskiold AK, Klemenz R. (1996). "Transcription of the interleukin-1 receptor-related T1 gene is initiated at different promoters in mast cells and fibroblasts." *J Biol Chem.* **271**(1):124-9
- Garrington TP, Johnson GL. (1999). "Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways." *Curr Opin Cell Biol.* **11**(2):211-8. Review
- Gayle MA, Slack JL, Bonnert TP, Renshaw BR, Sonoda G, Taguchi T, Testa JR, Dower SK, Sims JE. (1996). "Cloning of a putative ligand for the T1/ST2 receptor." *J Biol Chem.* **271**(10):5784-9
- Gluzman Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." *Cell.* **23**(1):175-82
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol.* **36**(1):59-74

- Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. (1995). "Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1receptor complex." *J Biol Chem.* **270**(23):13757-65
- Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. (2000). "Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6." *J Exp Med.* **192**(4):595-600
- Heguy A, Baldari CT, Macchia G, Telford JL, Melli M. (1992). "Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (IL-1Rs) and the Drosophila toll protein are essential for IL-1R signal transduction." *J Biol Chem.* **267**(4):2605-9
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S.A. (2000). "Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." *Nature.* **408**(6813):740-5
- Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. (1993). "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain." *Genes Dev.* **7**(11):2135-48
- Holtmann H, Enninga J, Kalble S, Thiefes A, Dorrie A, Broemer M, Winzen R, Wilhelm A, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Resch K, Kracht M. (2001). "The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation." *J Biol Chem.* **276**(5):3508-16
- Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV. (1996). "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways." *Cell.* **84**(2):299-308
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. (1995). "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation." *Cell.* **81**(4):495-504
- Ishida T, Mizushima Si, Azuma S, Kobayashi N, Tojo T, Suzuki K, Aizawa S, Watanabe T, Mosialos G, Kieff E, Yamamoto T, Inoue J. (1996). "Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region." *J Biol Chem.* **271**(46):28745-8
- Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ. (1969). "Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells." *J Virol.* **4**(5):549-53
- Kanakaraj P, Ngo K, Wu Y, Angulo A, Ghazal P, Harris CA, Siekierka JJ, Peterson PA, 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):1129-38
- Krasnow SW, Zhang LQ, Leung KY, Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ. (1991). "Tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1, and phorbol myristate acetate are independent activators of NF-kappa B which differentially activate T cells." *Cytokine.* **3**(5):372-9
- Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. (1999). "Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase." *Curr Biol.* **9**(11):601-4
- Karin M, Delhase M. (1998). "JNK or IKK, AP-1 or NF-kappaB, which are the targets for MEK kinase 1 action?" *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(16):9067-9
- Karin M, Ben-Neriah Y. (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity." *Annu Rev Immunol.* **18**:621-63. Review

- Klemenz R, Hoffmann S, Jaggi R, Werenskiold AK. (1989). „The v-mos and c-Ha-ras oncoproteins exert similar effects on the pattern of protein synthesis.” *Oncogene*. **4**(6):799-803
- Klemenz R, Hoffmann S, Werenskiold AK. (1989). „Serum- and oncoprotein-mediated induction of a gene with sequence similarity to the gene encoding carcinoembryonic antigen.” *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86**(15):5708-12
- Knop J, 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):81-5
- Korherr C, Hofmeister R, Wesche H, Falk W. (1997). “A critical role for interleukin-1 receptor accessory protein in interleukin-1 signaling.” *Eur J Immunol*. **27**(1):262-7
- Kojima H, Takeuchi M, Ohta T, Nishida Y, Arai N, Ikeda M, Ikegami H, Kurimoto M. (1998). “Interleukin-18 activates the IRAK-TRAF6 pathway in mouse EL-4 cells.” *Biochem Biophys Res Commun*. **244**(1):183-6
- Kollewe C, Neumann D, Martin MU. (2000). „The first two N-terminal immunoglobulin-like domains of soluble human IL-1receptor type II are sufficient to bind and neutralize IL-1beta.” *FEBS Lett*. **487**(2):189-93
- Kopp E, Medzhitov R, Carothers J, Xiao C, Douglas I, Janeway CA, Ghosh S. (1999). “ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signaltransduction pathway.” *Genes Dev*. **13**(16):2059-71
- Kracht M, Shiroo M, Marshall CJ, Hsuan JJ, Saklatvala J. (1994). “Interleukin-1 activates a novel protein kinase that phosphorylates the epidermal-growth-factor receptor peptide T669.” *Biochem J*. **302** (Pt 3):897-905
- Kropf P, Schopf LR, Chung CL, Xu D, Liew FY, Sypek JP, Muller I. (1999). „Expression of Th2 cytokines and the stable Th2 marker ST2L in the absence of IL-4 during Leishmania major infection.” *Eur J Immunol*. **29**(11):3621-8
- Kumar S, McDonnell PC, Lehr R, Tierney L, Tzimas MN, Griswold DE, Capper EA, Tal-Singer R, Wells GI, Doyle ML, Young PR. (2000). “Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family.” *J Biol Chem*. **275**(14):10308-14
- Kumar S, Minnich MD, Young PR. (1995). “ST2/T1 protein functionally binds to two secreted proteins from Balb/c 3T3 and human umbilical vein endothelial cells but does not bind interleukin 1.” *J Biol Chem*. **270**(46):27905-13
- Kumar S, Tzimas MN, Griswold DE, Young PR. (1997). “Expression of ST2, an interleukin-1 receptor homologue, is induced by proinflammatory stimuli.” *Biochem Biophys Res Commun*. **235**(3):474-8
- Kuno K, Okamoto S, Hirose K, Murakami S, Matsushima K. (1993). “Structure and function of the intracellular portion of the mouse interleukin 1receptor (type I). Determining the essential region for transducing signals to activate the interleukin 8 gene.” *J Biol Chem*. **268**(18):13510-8
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. (1994). “The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases.” *Nature*. **369**(6476):156-60
- Laye S, Lundkvist J, Bartfai T. (1998). “Human/mouse interleukin-1 receptor/receptor accessory protein interactions in IL-1beta-induced NFkappaB activation.” *FEBS Lett*. **429**(3):307-11

- Lee FS, Hagler J, Chen ZJ, Maniatis T. (1997). "Activation of the IkappaB alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway." *Cell*. **88**(2):213-22
- Lee J, Mira-Arbibe L, Ulevitch RJ. (2000). "TAK1 regulates multiple protein kinase cascades activated by bacterial lipopolysaccharide." *J Leukoc Biol*. **68**(6):909-15
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." *Cell*. **86**(6):973-83
- Leung K, Betts JC, Xu L, Nabel GJ. (1994). "The cytoplasmic domain of the interleukin-1 receptor is required for nuclear factor-kappa B signal transduction." *J Biol Chem*. **269**(3):1579-82
- Li H, Tago K, Io K, Kuroiwa K, Arai T, Iwahana H, Tominaga S, Yanagisawa K. (2000). "The cloning and nucleotide sequence of human ST2L cDNA." *Genomics*. **67**(3):284-90
- Li X, Commane M, Jiang Z, 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):4461-5
- Li XH, Fang X, Gaynor RB. (2001). "Role of IKKgamma/nemo in assembly of the Ikappa B kinase complex." *J Biol Chem*. **276**(6):4494-500
- Livingstone C, Patel G, Jones N. (1995). "ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain." *EMBO J*. **14**(8):1785-97
- Lohning M, Grogan JL, Coyle AJ, Yazdanbakhsh M, Meisel C, Gutierrez-Ramos JC, Radbruch A, Kamradt T. (1999). "T1/ST2 expression is enhanced on CD4+ T cells from schistosome egg-induced granulomas: analysis of Th cell cytokine coexpression ex vivo." *J Immunol*. **162**(7):3882-9
- Lohning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC, Levinson D, Radbruch A, Kamradt T. (1998). "T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function." *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**(12):6930-5
- Marshall MS. (1995). "Ras target proteins in eukaryotic cells." *FASEB J*. **9**(13):1311-8. Review
- Martin MU, Falk W. (1997). "The interleukin-1 receptor complex and interleukin-1 signal transduction." *Eur Cytokine Netw*. **8**(1):5-17. Review
- Martin AG, San-Antonio B, Fresno M. (2001). "Regulation of nuclear factor kappa B transactivation. Implication of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C zeta in c-Rel activation by tumor necrosis factor alpha." *J Biol Chem*. **276**(19):15840-9
- McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, Cosman D, Lupton SD, Brunton LL, Grubin CE, Wignall JM, Jenkins NA, Brannan CI, 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):2821-32
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA Jr. (1998). "MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways." *Mol Cell*. **2**(2):253-8
- Meisel C, Bonhagen K, Lohning M, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Radbruch A, Kamradt T. (2001). "Regulation and function of T1/ST2 expression on CD4+ T cells: induction of type2 cytokine production by T1/ST2 cross-linking." *J Immunol*. **166**(5):3143-50

- Meyer CF, Wang X, Chang C, Templeton D, Tan TH. (1996). "Interaction between c-Rel and the mitogen-activated protein kinase kinase signaling cascade in mediating kappaB enhancer activation." *J Biol Chem.* **271**(15):8971-6
- Mitcham JL, Parnet P, Bonnert TP, Garka KE, Gerhart MJ, Slack JL, Gayle MA, Dower SK, Sims JE. (1996). "T1/ST2 signaling establishes it as a member of an expanding interleukin-1 receptor family." *J Biol Chem.* **271**(10):5777-83
- Miyamoto S, Verma IM. (1995). „Rel/NF-kappa B/I kappa B story." *Adv Cancer Res.* **66**:255-92. Review
- Moritz DR, Gheyselinck J, Klemenz R. (1998). "Expression analysis of the soluble and membrane-associated forms of the interleukin-1 receptor-related T1 protein in primary mast cells and fibroblasts." *Hybridoma.* **17**(2):107-16
- Moritz DR, Rodewald HR, Gheyselinck J, Klemenz R. (1998). "The IL-1 receptor-related T1 antigen is expressed on immature and mature mast cells and on fetal blood mast cell progenitors." *J Immunol.* **161**(9):4866-74
- Mosmann TR, Sad S. (1996). "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more." *Immunol Today.* **17**(3):138-46. Review
- Muller S, Hoege C, Pyrowolakis G, Jentsch S. (2001). "SUMO, ubiquitin's mysterious cousin." *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**(3):202-10. Review
- Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, Yang J, Ranganath S, Asnagli H, Afkarian M, Murphy TL. (2000). "Signaling and transcription in T helper development." *Annu Rev Immunol.* **18**:451-94. Review
- Muzio M, Mantovani A. (2001). "The Toll receptor family." *Allergy.* **56**(2):103-8. Review
- Muzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M, Mantovani A. (1998). "The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor6 (TRAF6)." *J Exp Med.* **187**(12):2097-101
- Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. (1997). "IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling." *Science.* **278**(5343):1612-5
- Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K. (1999). "The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway." *Nature.* **398**(6724):252-6
- O'Garra A. (1998). "Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets." *Immunity.* **8**(3):275-83. Review
- O'Neill LA, Dinarello CA. (2000). "The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense." *Immunol Today.* **21**(5):206-9
- Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immuno-deficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Apr; **86**(7):2336-40
- Palsson EM, Popoff M, Thelestam M, O'Neill LA. (2000). "Divergent roles for Ras and Rap in the activation of p38 mitogen-activated protein kinase by interleukin-1." *J Biol Chem.* **275**(11):7818-25
- Pan G, Risser P, Mao W, Baldwin DT, Zhong AW, Filvaroff E, Yansura D, Lewis L, Eigenbrot C, Henzel WJ, Vandlen R. (2001). "IL-1H, an interleukin 1-related protein that binds IL-18 receptor/IL-1Rrp." *Cytokine.* **13**(1):1-7

- Parnet P, Garka KE, Bonnert TP, Dower SK, Sims JE. (1996). "IL-1Rrp is a novel receptor-like molecule similar to the type I interleukin-1 receptor and its homologues T1/ST2 and IL-1R AcP." *J Biol Chem.* **271**(8):3967-70
- Pastorino JG, Tafani M, Farber JL. (1999). "Tumor necrosis factor induces phosphorylation and translocation of BAD through phosphatidylinositol-3-OH kinase-dependent pathway." *J Biol Chem.* **274**(27):19411-6
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." *Science.* **282**(5396):2085-8
- Prechtel D, Harbeck N, Berger U, Hofler H, Werenskiold AK. (2001). "Clinical relevance of T1-S, an oncogene-inducible, secreted glycoprotein of the immunoglobulin superfamily, in node-negative breast cancer." *Lab Invest.* **81**(3):159-65
- Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR. (1991). "Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases." *Nature.* **353**(6345):670-4
- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." *J Biol Chem.* **270**(13):7420-6
- Reddy SA, Huang JH, Liao WS. (1997). "Phosphatidylinositol 3-kinase in interleukin 1 signaling. Physical interaction with the interleukin 1 receptor and requirement in NF-kappaB and AP-1 activation." *J Biol Chem.* **272**(46):29167-73
- Reddy SA, Huang JH, Liao WS. (2000). "Phosphatidylinositol 3-kinase as a mediator of TNF-induced NF-kappa B activation." *J Immunol.* **164**(3):1355-63
- Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M. (1997). "Identification and characterization of an IkappaB kinase." *Cell.* **90**(2):373-83
- Riedl C. (2001). "Struktur und Funktion des murinen CGRP-Rezeptors." Dissertation der Technischen Universität, München
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. (1998). "A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll." *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(2):588-93
- Rossler U, Thomassen E, Hultner L, Baier S, Danescu J, Werenskiold AK. (1995). "Secreted and membrane-bound isoforms of T1, an orphan receptor related to IL-1-binding proteins, are differently expressed in vivo." *Dev Biol.* **168**(1):86-97
- Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. (1995). "TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40." *Science.* **269**(5229):1424-7
- Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV. (1994). "A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor." *Cell.* **78**(4):681-92
- Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR. (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPK/kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." *Cell.* **78**(6):1027-37
- Ruhstorfer S. (2001). "Die Funktion des Mastzellrezeptors T1 bei der Tumorabwehr im Modell des murinen K12-Osteosarkoms." Dissertation der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München

- Rupp B, Lohning M, Werenskiold AK. (2000). "Reversible expression of tryptases in continuous L138.8A mast cells." *Eur J Immunol.* **30**(10):2954-61
- Rupp B, Rossler U, Lowel M, Werenskiold AK. (1995). "High level expression of the IL-1 receptor related T1 receptor in insect cells." *Biochem Biophys Res Commun.* **216**(2):595-601
- Rupp B. (2000). „Etablierung eines *in vitro*-Modells der Mastzellendifferenzierung zu Untersuchung der T1-Funktion.“ Dissertation der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Saccani S, Polentarutti N, Penton-Rol G, Sims JE, Mantovani A. (1998). "Divergent effects of LPS on expression of IL-1 receptor family members in mononuclear phagocytes *in vitro* and *in vivo*." *Cytokine.* **10**(10):773-80
- Saklatvala J, Rawlinson LM, Marshall CJ, Kracht M. (1993). "Interleukin 1 and tumour necrosis factor activate the mitogen-activated protein(MAP) kinase kinase in cultured cells." *FEBS Lett.* **334**(2):189-92
- Sakurai H, Miyoshi H, Toriumi W, Sugita T. (1999). "Functional interactions of transforming growth factor beta-activated kinase 1 with IkappaB kinases to stimulate NF-kappaB activation." *J Biol Chem.* **274**(15):10641-8
- Sakurai H, Shigemori N, Hasegawa K, Sugita T. (1998). "TGF-beta-activated kinase 1 stimulates NF-kappa B activation by an NF-kappaB-inducing kinase-independent mechanism." *Biochem Biophys Res Commun.* **243**(2):545-9
- Schmitz ML, Bacher S, Kracht M. (2001). „IkB-independent control of NF-κB activity by modulatory phosphorylations." *TRENDS in Biochemical Sciences.* **26**(3):186-190
- Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. (1977). „Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma." *Int J Cancer.* **19**(5):621-6
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. (1999). "Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2" *J Biol Chem.* **274**(25):17406-9
- Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM, et al. (1988). "cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily." *Science.* **241**(4865):585-9
- Sizemore N, Leung S, Stark GR. (1999). "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit." *Mol Cell Biol.* **19**(7):4798-805
- Slack JL, Schooley K, Bonnert TP, Mitcham JL, Qwarnstrom EE, Sims JE, 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):4670-8
- Smith DE, Renshaw BR, Ketchem RR, Kubin M, Garka KE, Sims JE. (2000). "Four new members expand the interleukin-1 superfamily." *J Biol Chem.* **275**(2):1169-75
- Song HY, Regnier CH, Kirschning CJ, Goeddel DV, Rothe M. (1997). "Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclearfactor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2." *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(18):9792-6
- Sweet MJ, Leung BP, Kang D, Sogaard M, Schulz K, Trajkovic V, Campbell CC, Xu D, Liew FY. (2001). "A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by st2/t1 via inhibition of toll-like receptor 4 expression." *J Immunol.* **166**(11):6633-9

- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. (2000). „A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment.” *Cell*. **100**(6):655-69
- Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, Adachi O, Yoshida N, Kishimoto T, Okamura H, Nakanishi K, Akira S. (1998). “Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice.” *Immunity*. **8**(3):383-90
- Thomassen E, Bird TA, Renshaw BR, Kennedy MK, Sims JE. (1998). “Binding of interleukin-18 to the interleukin-1 receptor homologous receptor IL-1Rrp1 leads to activation of signaling pathways similar to those used by interleukin-1.” *J Interferon Cytokine Res*. **18**(12):1077-88
- Thomassen E, Kothny G, Haas S, Danescu J, Hultner L, Dormer P, Werenskiold AK. (1995). “Role of cell type-specific promoters in the developmental regulation of T1, an interleukin 1 receptor homologue.” *Cell Growth Differ*. **6**(2):179-84
- Tominaga S, Kuroiwa K, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, Komatsu N. (1999). “Presence and expression of a novel variant form of ST2 gene product in human leukemic cell line UT-7/GM.” *Biochem Biophys Res Commun*. **264**(1):14-8
- Tominaga S, Yokota T, Yanagisawa K, Tsukamoto T, Takagi T, Tetsuka T. (1992). “Nucleotide sequence of a complementary DNA for human ST2.” *Biochim Biophys Acta*. **1171**(2):215-8
- 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, Kurimoto M. (1997). “Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor.” *J Biol Chem*. **272**(41):25737-42
- Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. (1999). “The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens.” *Nature*. **401**(6755):811-5
- van Dam H, Wilhelm D, Herr I, Steffen A, Herrlich P, Angel P. (1995). “ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents.” *EMBO J*. **14**(8):1798-811
- Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. (2001). “TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK.” *Nature*. **412**(6844):346-51
- Wang D, Baldwin AS Jr. (1998). “Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529.” *J Biol Chem*. **273**(45):29411-6
- Werenskiold AK, Hoffmann S, Klemenz R. (1989). “Induction of a mitogen-responsive gene after expression of the Ha-ras oncogene in NIH 3T3 fibroblasts.” *Mol Cell Biol*. **9**(11):5207-14
- Werenskiold AK, Prechtel D, Harbeck N, Hofler H. (2000). „Tumor-associated overexpression of the soluble T1-S receptor in lymphnode-negative breast cancer.” *Diagn Mol Pathol*. **9**(1):26-34
- Werenskiold AK, Rossler U, Lowel M, Schmidt J, Heermeier K, Spanner MT, Strauss PG. (1995). “Bone matrix deposition of T1, a homologue of interleukin 1 receptors.” *Cell Growth Differ*. **6**(2):171-7
- Werenskiold AK, Schmidt J, Rupp B, Gossner W, Hofler H. (1999). “Suppression of T1-receptor expression by antisense RNA abrogates differentiation of osteogenic osteosarcoma cells.” *Lab Invest*. **79**(5):529-36

- Werenskiold AK. (1992). "Characterization of a secreted glycoprotein of the immunoglobulin superfamily inducible by mitogen and oncogene." *Eur J Biochem.* **204**(3):1041-7
- Wesche H, Gao X, Li X, Kirschning CJ, Stark GR, Cao Z. (1999). "IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase(IRAK) family." *J Biol Chem.* **274**(27):19403-10
- Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. (1997). "MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex." *Immunity.* **7**(6):837-47
- Wesche H, Korherr C, Kracht M, Falk W, Resch K, 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):7727-31
- Wesche H, Resch K, Martin MU. (1998). "Effects of IL-1 receptor accessory protein on IL-1 binding." *FEBS Lett.* **429**(3):303-6
- Wesche H, Neumann D, Resch K, Martin MU. (1996). "Co-expression of mRNA for type I and type II interleukin-1 receptors and the IL-1 receptor accessory protein correlates to IL-1 responsiveness." *FEBS Lett.* **391**(1-2):104-8
- Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B. (1994). "The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor." *Cell.* **78**(6):1101-15
- Williams MJ, Rodriguez A, Kimbrell DA, Eldon ED. (1997). "The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in Drosophila host defense." *EMBO J.* **16**(20):6120-30
- Woronicz JD, Gao X, Cao Z, Rothe M, Goeddel DV. (1997). "IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK." *Science.* **278**(5339):866-9
- Xu D, Chan WL, Leung BP, Hunter D, Schulz K, Carter RW, McInnes IB, Robinson JH, Liew FY. (1998). "Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th)type 1 but not Th2 cells." *J Exp Med.* **188**(8):1485-92
- Xu D, Chan WL, Leung BP, Huang F, Wheeler R, Piedrafita D, Robinson JH, Liew FY. (1998). "Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells." *J Exp Med.* **187**(5):787-94
- Yamamoto Y, Yin MJ, Gaynor RB. (2000). "IkappaB kinase alpha (IKKalpha) regulation of IKKbeta kinase activity." *Mol Cell Biol.* **20**(10):3655-66
- Yamin TT, Miller DK. (1997). "The interleukin-1 receptor-associated kinase is degraded by proteasomes following its phosphorylation." *J Biol Chem.* **272**(34):21540-7
- Yanagisawa K, Naito Y, Kuroiwa K, Arai T, Furukawa Y, Tomizuka H, Miura Y, Kasahara T, Tetsuka T, Tominaga S. (1997). "The expression of ST2 gene in helper T cells and the binding of ST2 protein to myeloma-derived RPMI8226 cells." *J Biochem (Tokyo).* **121**(1):95-103
- Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, Tetsuka T, Tominaga S. (1993). "Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type1." *FEBS Lett.* **318**(1):83-7
- Yao Z, Diener K, Wang XS, Zukowski M, Matsumoto G, Zhou G, Mo R, Sasaki T, Nishina H, Hui CC, Tan TH, Woodgett JP, Penninger JM. (1997). "Activation of stress-activated

- protein kinases/c-Jun N-terminal protein kinases(SAPKs/JNKs) by a novel mitogen-activated protein kinase kinase." *J Biol Chem.* **272**(51):32378-83
- Zandi E, Karin M. (1999). "Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the I κ B kinase complex." *Mol Cell Biol.* **19**(7):4547-51. Review
- Zhao Q, Lee FS. (1999). "Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor- κ B through I κ B kinase- α and I κ B kinase- β ." *J Biol Chem.* **274**(13):8355-8
- Zhang G, Ghosh S. (2001). "Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity" *J Clin Invest.* **107**(1):13-9. Review
- Zoller MJ, Smith M. (1987). "Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template." *Methods Enzymol.* **154**:329-50