

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Genetik

Die Rolle von STAT3 in der TLR vermittelten Signalkaskade

Stefan Dreher

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. S. Scherer
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl
	2. Univ.-Prof. Dr. C. J. Kirschning (Universität Duisburg-Essen)
	3. Univ.-Prof. Dr. D. Haller

Die Dissertation wurde am 19.05.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 05.08.2009 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	11
1. Einleitung	17
1.1. Angeborene und adaptive Immunität	17
1.2. Mustererkennungsrezeptoren	18
1.3. Toll-like Rezeptoren	19
1.3.1. Entdeckung der Familie der Toll-like Rezeptoren	21
1.3.2. Struktur der Toll-like Rezeptoren	22
1.4. Ligandenerkennung durch Toll-like Rezeptoren	23
1.4.1. TLR1/TLR2/TLR6	23
1.4.2. TLR3	24
1.4.3. TLR4	24
1.4.4. TLR5	24
1.4.5. TLR7 und TLR8	25
1.4.6. TLR 9	25
1.4.7. TLR 11	25
1.5. Signalgebung durch Toll-like Rezeptoren	28
1.5.1. MyD88	29
1.5.2. MAL/TIRAP	31
1.5.3. TRIF	32
1.5.4. TRAM/TIRP/TICAM-2	33
1.5.5. SARM	33
1.5.6. Negative Regulation der TLR Signalgebung	35
1.5.7. PI3K/AKT/mTOR	36
1.6. Zytoplasmatische Mustererkennungsrezeptoren	38
1.6.1. RIG-I like Rezeptors (RLRs)	38
1.6.2. NOD-like Rezeptoren	41
1.7. STATs	45

1.7.1.	STAT Familie.....	45
1.7.2.	STAT3.....	47
1.8.	Ziel der Arbeit	48
2.	Material und Methoden	49
2.1.	Material.....	49
2.1.1.	Geräte	49
2.1.2.	Chemikalien	50
2.1.3.	Enzyme.....	52
2.1.4.	Kitsysteme.....	53
2.1.5.	Puffer und Lösungen	53
2.1.6.	Größenstandards	59
2.1.7.	Oligonukleotide	60
2.1.8.	Vektoren.....	63
2.1.9.	Antikörper und Antikörperkonjugate	67
2.1.10.	Medien.....	69
2.1.11.	Stämme.....	73
2.1.12.	Zelllinien	73
2.1.13.	Mäuse	74
2.2.	Molekularbiologische Methoden	75
2.2.1.	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	75
2.2.2.	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	76
2.2.3.	Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	77
2.2.4.	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	77
2.2.5.	Restriktionsverdau von Nukleinsäuren.....	77
2.2.6.	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	78
2.2.7.	Ligation von DNA-Fragmenten	78
2.2.8.	Mutagenese- und Splice-PCR.....	79
2.2.9.	TA-Klonierung	80
2.2.10.	DNA-Sequenzierung	80
2.2.11.	Herstellung einzelsträngiger <i>Carrier</i> -DNA zur Hefetransformation.....	81
2.2.12.	Hitzeschocktransformation von <i>E. coli</i>	81
2.2.13.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	81
2.2.14.	Phenol/Chloroformextraktion	82
2.2.15.	Ethanolpräzipitation	82
2.3.	Proteinchemische Methoden.....	83
2.3.1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	83
2.3.2.	Western Blot / Immunoblot.....	84
2.3.3.	Co-Immunpräzipitation	85
2.4.	Zellbiologische Methoden	87
2.4.1.	Kultivierung von HEK 293 Zellen	87

2.4.2.	Kultivierung von RAW 264.7 Zellen	87
2.4.3.	Kultivierung von MEF- Zellen	87
2.4.4.	Gewinnung von murinen primären Knochenmarksmakrophagen (BMDM)	88
2.4.5.	Calcium-Phosphat Transfektion von HEK 293 Zellen	88
2.4.6.	Transfektion von MEF-Zellen und RAW 264.7 Makrophagen	89
2.4.7.	Transfektion von Phoenix Eco Zellen	89
2.4.8.	Gewinnung von Zelllysaten für proteinchemische Analysen	89
2.4.9.	Gewinnung nukleärer Extrakte	90
2.4.10.	Luciferase Reportergenassay	90
2.4.11.	ELISA	92
2.4.12.	Das Hefe-Zwei-Hybrid-System	93
2.4.13.	Herstellung von kompetenten <i>S. cerevisiae</i> zur Transformation	95
2.4.14.	Transformation von <i>S. Cerevisiae</i>	95
2.4.15.	Blau-Weiß Interaktionsanalyse	96
2.4.16.	Chromatin-Immunopräzipitation/ChIP	96
2.4.17.	Inflammasom-Aggregation	98
2.4.18.	Retrovirale Transduktion von Knochenmarksmakrophagen	98
2.4.19.	cDNA-Microarray	100
2.4.20.	RNA Isolation	100
2.4.21.	cDNA-Synthese	101
2.4.22.	RT-qPCR	101
3.	Ergebnisse	103
3.1.	Charakterisierung von STAT3 als neuer Interaktionspartner von TLR2 und MyD88	103
3.1.1.	Hefe-Zwei-Hybrid-Screen	103
3.1.2.	Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionsstudien	103
3.1.3.	Hefe-Zwei-Hybrid gestützte Identifikation der Bindungsdomänen von STAT3 und TLR2	105
3.1.4.	Ligandeninduzierte Interaktion von TLR2, TLR3 und TLR4 mit STAT3	106
3.1.5.	MyD88 unabhängige Assoziation von STAT3 und TLR2	107
3.1.6.	Interaktion von STAT3 mit MyD88	108
3.2.	Charakterisierung der TLR vermittelten STAT3 Aktivierung	109
3.2.1.	Schnelle STAT3 Serin-Phosphorylierung durch TLR Aktivierung	109
3.2.2.	TLR induzierte STAT3 Serin-Phosphorylierung erfolgt unabhängig von der Tyrosin-Phosphorylierung	111
3.2.3.	TLR induzierte STAT3 Serin-Kinasen	112
3.2.4.	Die TLR vermittelte STAT3 Serin-Phosphorylierung ist abhängig von mTOR	113
3.2.5.	IKK β Blockade unterdrückt die STAT3 Serin-Phosphorylierung	114
3.2.6.	mTOR Überexpression verstärkt die TLR induzierte STAT3-Serin-Phosphorylierung in HEK 293 Zellen	115
3.2.7.	Serin-phosphoryliertes STAT3 dissoziiert vom MyD88 Komplex	116

3.2.8.	Hemmung der mTOR vermittelten Dissoziation von STAT3 und MyD88 durch Überexpression von TSC2.....	116
3.2.9.	TLR Stimulation bedingt die Assoziation von STAT3 und mTOR	117
3.2.10.	STAT3-MyD88 Interaktionsverhalten ist unbeeinflusst von S6K.....	118
3.2.11.	Nukleäre Akkumulation von STAT3 nach TLR Stimulation	119
3.3.	TLR induzierte, STAT3 abhängige Genexpression	121
3.3.1.	STAT3 vermittelte Genexpression - GeneArray	121
3.3.2.	TLR induzierte PAI2 mRNA Aufregulation erfolgt abhängig von STAT3.....	123
3.3.3.	Vergleichende PAI-2 Protein Expression	123
3.3.4.	TLR aktiviertes STAT3 bindet an den PAI-2 Promotor und initiiert Genaktivierung..	124
3.4.	Effekte STAT3 vermittelter Genexpression	126
3.4.1.	Caspase-1 Aktivierung durch STAT3 Defizienz	126
3.4.2.	Spezifische Aktivierung des AIM2 und NALP3 Inflammasoms	127
3.4.3.	Charakterisierung der für LPS Induktion relevanten Inflammasom- Komponenten	128
3.4.4.	Verstärkte Caspase-1 Aktivierung durch LPS Stimulation in <i>Stat3^{-/-}</i> BMDM	129
3.4.5.	Inhibitorvermittelte Verstärkung der IL-1 β Sekretion.....	131
3.4.6.	PAI-2 Aufregulation unabhängig von autokriner Tyrosin-Phosphorylierung	131
3.4.7.	IL-1 β Sekretion ist unbeeinflusst von retroviraler STAT3-S727A Transduktion	132
3.4.8.	Überexpression von PAI-2 reduziert die Sekretion von IL-1 β in STAT3	133
	defizienten Makrophagen	
3.4.9.	Zytoplasmatische PRRs induzieren keine STAT3 Serin-Phosphorylierung.....	134
3.5.	Charakterisierung der PAI-2 abhängigen Regulation von Caspase-1	135
3.5.1.	PAI-2 defiziente Makrophagen zeigen erhöhte IL-1 β und IL-1 α Sekretion	135
3.5.2.	PAI-2 Defizienz führt zu verstärkter Caspase-1 Aktivität.....	136
3.5.3.	Caspase-1 Abhängigkeit der IL-1 β Sekretion in PAI-2 defizienten BMDM	137
3.5.4.	Erhöhter Serum IL-1 β Spiegel in <i>PAI2^{-/-}</i> Mäusen nach LPS-Injektion.....	137
3.6.	Der Mechanismus der PAI-2 vermittelten Inflammasom- Inhibition	138
3.6.1.	Selektive Interaktion von PAI-2 mit den NALPs 2 und 4	138
3.6.2.	PAI-2 interagiert mit der ASC-Pyrin Domäne	139
3.6.3.	ASC - PAI-2 Assoziation unterdrückt die Interaktion von NALP3 - ASC	140
3.6.4.	Die Koexpression von PAI-2 inhibiert dosisabhängig die Assoziation von	
	ASC und NALP3.....	141
3.6.5.	Endogene Interaktion von PAI-2 und ASC	142
3.6.6.	PAI-2 hemmt die Sekretion von ASC und NALP3 abhängig freigesetztem	
	IL-1 β im Überexpressionsmodell	142
4.	Diskussion	145
4.1.	Die Rolle von STAT3 in der TLR vermittelten Signalkaskade	145
4.1.1.	Interaktion von STAT3 mit den intrazellulären Domänen von TLRs im Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	146

4.1.2.	Ligandeninduzierte Interaktion von TLR2, TLR3 und TLR4 mit STAT3	148
4.1.3.	STAT3 Interaktion mit dem Adaptermolekül MyD88	149
4.1.4.	TLR Stimulation vermittelt STAT3 Serin-Phosphorylierung.....	150
4.1.5.	mTOR ist die TLR getriebene STAT3 Serin-Kinase.....	151
4.1.6.	Die mTOR vermittelte Serin-Phosphorylierung von STAT3 induziert die Dissoziation von STAT3 aus dem MyD88 Komplex	152
4.1.7.	mTOR interagiert mit dem MyD88 Signalkomplex	153
4.1.8.	TLR aktiviertes STAT3 akkumuliert im Zellkern	153
4.1.9.	Die TLR induzierte PAI-2 Expression ist abhängig von STAT3-Ser727.....	155
4.1.10.	Erhöhung der Caspase-1 Aktivität durch STAT3 Defizienz	156
4.1.11.	Die TLR abhängige Aufregulation von PAI-2 erfolgt unabhängig von der STAT3 Tyrosin-Phosphorylierung	159
4.1.12.	Die Punktmutation von STAT3 S727A resultiert in erhöhter Freisetzung von IL-1 β	160
4.1.13.	Die Überexpression von PAI-2 revertiert den IL-1 β Phänotyp STAT3 defizienter Zellen.....	161
4.1.14.	Zytoplasmatische PRRs induzieren nicht die Serin-Phosphorylierung von STAT3	161
4.2.	Die Rolle von PAI-2 bei der Suppression von Caspase-1 Aktivierung	162
4.2.1.	PAI-2 Defizienz korreliert mit verstärkter IL-1 β Sekretion	162
4.2.2.	PAI-2 Bindung an ASC blockiert die Bildung des Inflammasoms	164
4.3.	Der TLR-vermittelte mTOR-STAT3-PAI-2 Signalweg als Kontrollmechanismus	165
	von Caspase-1 Aktivierung.....	165
Zusammenfassung		169
Literaturverzeichnis		171
Danksagung		187
Erklärung		188

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell des ligandeninduzierten Heterodimers aus TLR1 und TLR2	28
Abbildung 2: TLR vermittelte Signaltransduktion	34
Abbildung 3: TLR abhängige Aktivierung von mTOR	38
Abbildung 4: Signaltransduktionsereignisse zytoplasmatischer Nukleinsäurerezeptoren	40
Abbildung 5: NALP Inflammasom abhängige Prozessierung von IL-1 β	45
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Hefe-Zwei-Hybrid Versuchs	95
Abbildung 7: Interaktion von STAT3 mit den intrazellulären Domänen diverser TLRs	104
Abbildung 8: Selektive Interaktion von STAT3 mit Einzelmodul-deletierter TLR2icd, bzw. TLR2icd mit Deletionsmutanten von STAT3.....	106
Abbildung 9: Interaktion von STAT3 mit TLRicd.	107
Abbildung 10: MyD88 unabhängige Interaktion von hTLR2 mit STAT3	107
Abbildung 11: Interaktion von STAT3 mit MyD88	108
Abbildung 12: Stimulation von TLR2 oder 4 induziert schnelle STAT3-S727 Phosphorylierung	109
Abbildung 13: TLR 4 vermittelte STAT3 Serin- Phosphorylierung unabhängig von	
<i>de novo</i> Proteinsynthese	110
Abbildung 14: TLR induzierte STAT3 Serin-Phosphorylierung ist abhängig von den zentralen	
TLR-Adapter- und Signalmolekülen	111
Abbildung 15: TLR induzierte Serin-Phosphorylierung von STAT3 ist unabhängig vom Tyrosin- Phosphorylierungsstatus des Proteins.....	112
Abbildung 16: MEK1 Blockade hemmt TLR induzierte Serin-Phosphorylierung von STAT3	113
Abbildung 17: TLR vermittelte STAT3 Serin-Phosphorylierung ist abhängig von mTOR	114
Abbildung 18: AKT Aktivierung erhöht TLR abhängige STAT3 Serin-Phosphorylierung	114
Abbildung 19: IKK β Blockade hemmt TLR vermittelte STAT3 Serin-Phosphorylierung	115
Abbildung 20: Verstärkung der TLR2 induzierten STAT3 Serin-Phosphorylierung durch Expression von mTOR.....	115
Abbildung 21: mTOR-Überexpression induziert die Dissoziation von STAT3 und MyD88.....	116
Abbildung 22: TSC2 Expression inhibiert mTOR Effekte auf MyD88-STAT3 Interaktion	117
Abbildung 23: TLR Stimulations-abhängige Assoziation von mTOR und STAT3	118
Abbildung 24: p70/S6K unabhängige Assoziation von STAT3 und MyD88.....	118
Abbildung 25: Nukleäre Akkumulation von STAT3 nach TLR Aktivierung	119
Abbildung 26: TLR induziertes STAT3-S727 akkumuliert im Zellkern	120
Abbildung 27: <i>PAI2</i> mRNA Aufregulation ist abhängig von STAT3	123
Abbildung 28: Expression von PAI-2 ist abhängig von TLR induziertem STAT3 Phospho-S727	124
Abbildung 29: TLR aktiviertes STAT3 bindet an den <i>PAI-2</i> Promotor	125
Abbildung 30: mTOR-STAT3 abhängige <i>PAI2</i> -Promotor Aktivierung induziert Reportergenaktivierung ..	126

Abbildung 31: STAT3 Defizienz führt zur verstärkten Freisetzung Caspase-1 abhängiger Zytokine auf TLR4 Stimulation.....	127
Abbildung 32: STAT3 Defizienz führt zur verstärkten Freisetzung von IL-1 β auf NALP3 und AIM2 abhängige Aktivierung von Caspase-1	128
Abbildung 33: Inflammasom und Caspase-1 abhängige, LPS induzierte, IL-1 β Freisetzung	129
Abbildung 34: STAT3 defiziente BMDM aktivieren auf Stimulation mit LPS verstärkt Caspase-1	130
Abbildung 35: Erhöhung der IL-1 β -Freisetzung durch Inhibition von STAT3 Serin-Phosphorylierung	131
Abbildung 36: TLR induzierte PAI-2 Expression ist unabhängig von autokrin induziertem STAT3 Phospho-Y705).....	132
Abbildung 37: LPS induzierte IL-1 β Sekretion ist abhängig von STAT3 Serin-Phosphorylierung	133
Abbildung 38: PAI-2 Expression hemmt LPS abhängige IL-1 β Freisetzung in STAT3..... defizienten Zellen.....	133
Abbildung 39: Stimulation zytoplasmatischer PRRs führt nicht zur Induktion von STAT3 S727 Phosphorylierung.....	135
Abbildung 40: Verstärkte Freisetzung Caspase-1 abhängiger Zytokine aus PAI-2 ^{-/-} Knochenmarksmakrophagen	136
Abbildung 41: PAI-2 vermittelte Hemmung der AIM2 abhängigen Caspase-1 Aktivierung	137
Abbildung 42: Caspase-1 vermittelt die PAI-2 abhängige Sekretion von IL-1 β	137
Abbildung 43: LPS induziertes Serum- IL-1 β aber nicht Serum-IL-6 PAI-2 abhängig reguliert.....	138
Abbildung 44: Selektive Interaktion von PAI-2 mit den NALPs 2 und 4	139
Abbildung 45: Interaktion von PAI-2 mit der Pyrindomäne von ASC	139
Abbildung 46: PAI-2 - ASC Interaktion unterdrückt die Assoziation von NALP3 und ASC140	
Abbildung 47: PAI-2 verhindert Assoziation von NALP3 und ASC	141
Abbildung 48: Kompetitive Interaktion von PAI-2 und NALP3 mit ASC	141
Abbildung 49: Interaktion von endogenem ASC und PAI-2 in Makrophagen	142
Abbildung 50: PAI-2 Expression hemmt ASC und NALP3 aber nicht Caspase-8 abhängige Sekretion von IL-1 β im Überexpressionsmodell	143
Abbildung 51: Keine direkte Beeinflussung von Caspase-1 Aktivität durch PAI-2.....	143
Abbildung 52: Modell der frühen Interaktionsereignisse von STAT3 mit TLRicd und MyD88.....	166
Abbildung 53: Schematische Übersicht der der Rolle von Serin-phosphoryliertem STAT3 in TLR vermittelter Signalübertragung.....	168

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Toll-like Rezeptor Liganden.....	27
Tabelle 2: Oligonukleotide	63
Tabelle 3: Leervektorem.....	64
Tabelle 4: Vektorkonstrukte	67
Tabelle 5: Antikörper und Antikörperkonjugate.....	68
Tabelle 6: Differentielle Genexpression auf TLR Stimulation in Wildtyp und STAT3 ^{Δmye} BMDM.....	122

Abkürzungsverzeichnis

A

AD	Aktivierungsdomäne
AKT	Proteinkinase B (PKB)
AIM2	<i>absent in melanoma 2</i>
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
AP-1	aktivierendes Protein 1
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosin Triphosphat

B

BD	Bindedomäne
BMDM	Knochenmarksmakrophagen (<i>bone marrow derived macrophages</i>)
bp	Basenpaar (<i>base pair</i>)
BSA	Bovines Serum Albumin
BTK	Brutons Tyrosin Kinase

C

CARD	Caspase-Rekrutierungsdomäne
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
cds	kodierende Sequenz
CMV	Cytomegalovirus
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>

D

DAI	DNA-abhängiger Aktivator von IRFs
DC	Dendritische Zellen (<i>dendritic cells</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxytrinukleotide
dsRNA	doppelsträngige (<i>double stranded</i>) Ribonukleinsäure
DTBP	Dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidate
DTT	Dithiothreitol

E

ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence Technique</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraacetat
EGTA	Ethylen-Glykol-tertraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>

F

FADD	<i>FAS-associated death domain</i>
FCS	fötales Kälber- (<i>calf</i>) Serum
FL	Volllänge (<i>full length</i>)

G

G/C	Guanosin/Cytosin
GSK4	Glycyl-Seryl-Tetralysin
GTP	Guanosintriphosphat

H

HA	Hemagglutinin
HBS	<i>HEPES-buffered Saline</i>
HCMV	humanes Cytomegalovirus
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
h.i.	hitzeinaktiviert
HMGB1	<i>high mobility group box 1 protein</i>
HSP	Hitzeschockprotein (<i>heat shock protein</i>)
HRP	Meerrettich (<i>Horse Radish</i>) Peroxidase

I

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I κ B	Inhibitor von NF- κ B
IKK	Inhibitor von NF- κ B Kinase
IL	Interleukin
IL-R	Interleukin-Rezeptor
i.p.	intraperitoneal
IPAF	ICE-Protease aktivierender Faktor

IRAK	Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulatorischer Faktor
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif</i>
J	
JAK	Janus assoziierte Kinase
JNK	JUN N-terminale Kinase
K	
KD	Kinase-inaktiv (<i>kinase deficient</i>)
kDa	Kilodalton
L	
LB	Luria Bertoni
LiAc	Lithium Acetat
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine Rich Repeat</i>
LTA	Lipoteichonsäure (<i>lipoteichoic acid</i>)
M	
MAL	<i>MyD88-adaptor like</i>
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPKKK	MAPK Kinase Kinase
MDA5	Melanoma-Differenzierungs-assoziiertes Gen 5
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
N	
NAP1	NAK-assoziiertes Protein 1
NALP	NACHT-, LRR- und Pyrin-Domänen enthaltende Proteine
NEMO	<i>NF-κB Essential Modulator</i>
NF κ B	nukleärer Faktor κ B
NGS	normales Ziegen (<i>goat</i>) Serum
NOD	Nukleotidbinde-Oligomerisierung-Domäne
NP-40	Nonident P-40

P

Pam ₃ CSK ₄	Tripalmityl-Cysteinyl-Seryl-Tetralysin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen assoziiertes molekulares Muster (<i>pattern</i>)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBT	PBS-Tween
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pDC	plasmacytoide dendritische Zellen
PEG	Polyethylen Glykol
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PKC	Protein kinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly(I:C)	Polyinosin/Polycytosin
PRR	Mustererkennungsrezeptor (<i>pattern recognition receptor</i>)

R

RIG-I	Retinsäure-induzierbares Gen I
RING	<i>really interesting new gene</i>
RIP	Rezeptor-interagierendes Protein
RLR	<i>RIG-I-Like Receptor</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
rpm	Rotationen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)

S

SAP	<i>Shrimps Alkaline Phosphatase</i>
SARM	steriles α - und Armadillo-HEAT-Motiv-enthaltendes Protein
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	<i>Synthetic Dropout</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SOCS1	<i>supressor of cytokine signalling 1</i>
ST2	<i>suppressor of tumorigenicity 2</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
ssRNA	einzelsträngige (<i>single-stranded</i>) Ribonukleinsäure

T

TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraacetat
TAB	<i>TGF-β-activated kinase binding protein</i>
TAK	<i>TGF-β-activated kinase</i>
TAE	Tris Acetat EDTA
TBK	<i>TNF-receptor-associated factor-family-member-associated NF-κB activator binding kinase</i>
TE	Tris-Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraacetat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor
TIRAP	<i>TIR-domain-containing adaptor protein</i>
TICAM	<i>TIR-domain-containing adaptor molecule</i>
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor molecule inducing IFN-β</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan

U

UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i>
UBC	<i>Ubiquitin conjugating enzyme</i>
UEV	<i>Ubiquitin conjugating enzyme E2 variant</i>
Ura	Uracil
UV	ultraviolett

V

v/v	<i>volume per volume</i>
-----	--------------------------

W

wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>

X

X-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
-------	---

Aminosäuren werden gemäß Standard Nomenklatur abgekürzt:

A	Ala	Alanin
R	Arg	Arginin
N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat
C	Cys	Cystein
Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutamat
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleuci
L	Leu	Leucin
K	Lys	Lysin
M	Met	Methionin
F	Phe	Phenylalanin
P	Pro	Prolin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
V	Val	Valin

Nukleotide wurden gemäß IUPAC wie folgt abgekürzt:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

1. Einleitung

1.1. Angeborene und adaptive Immunität

Alle lebenden Organismen, von Bakterien bis hin zu Wirbeltieren verfolgen Strategien zur Verteidigung gegen Infektionen. Die Gesamtheit der Verteidigungsmechanismen eines Lebewesens wird zusammenfassend als Immunsystem bezeichnet.

Das hochspezialisierte Immunsystem der höherentwickelten Vertebraten gliedert sich in zwei miteinander wechselwirkende Arme - der evolutionär alten und schnellen angeborenen Immunität sowie der spezifischeren, jedoch zeitlich verzögerten, erworbenen Immunität. Über beide erkennt das Immunsystem eindringende Mikroorganismen als „nicht-selbst“, bekämpft sie und bietet Schutz vor Neuinfektion mit dem gleichen Erreger. Beide Zweige des Immunsystems erkennen mikrobielle Eindringlinge auf verschiedene Weisen.

Die eine Auslösung einer Immunantwort vermittelnden Rezeptoren sowohl der adaptiven wie auch der angeborenen Immunität binden, im Gegensatz zu anderen zellulären Rezeptoren, nicht endogene, sondern exogene Liganden. Während die Rezeptoren der angeborenen Immunität konservierte Bestandteile mikrobieller Zellen, wie Zellwandbestandteile, Flagellin oder Nukleinsäuren, so genannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns, PAMPs*) (Medzhitov and Janeway, 1997) erkennen, zeichnet sich die adaptive Immunität durch eine auf zufällige Genrekombination in B- und T-Lymphozyten - Immunglobulin und T-Zell-Rezeptorgene - basierende hohe Diversität und Spezifität aus. Die Kombination beider Erkennungsstrategien maximiert die Effizienz des Immunsystems. Durch das Immunsystem ausgelöste Kollateralschäden tragen zur Immunpathologie einer Infektion bei. Durch seine Fokussierung auf spezifische Antigene beseitigt das erworbene Immunsystem eingedrungene Erreger. Da sie zufällig generiert sind, unterscheiden die Rezeptoren der erworbenen Immunität nicht zwischen „fremd“ und „selbst“. Folglich wird durch die Elimination „selbst“-erkennender Rezeptoren eine Interaktion mit wirtseigenen Bestandteilen weitestgehend unterbunden. Keimbahnkodierte Rezeptoren zur Identifikation konservierter Strukturen unterschiedlicher Erreger sind ein zentrales Element der angeborenen Immunität. Ihr Ziel ist die Begrenzung stattfindender Infektionen. Für die adaptive Immunität hingegen sind zufällig generierte, klonal exprimierte Rezeptoren charakteristisch, unter deren Beteiligung Infektionen terminiert werden. Erst durch die Verbindung beider Strategien wird ein größtmöglicher Schutz vor Pathogenen bei gleichzeitigem Ausschluss der „Falsch-Erkennung“ wirtseigener Komponenten gewährleistet. Die unterschiedliche Spezifität der Erkennungsstrategien beider Komponenten des Immunsystems steht im Einklang mit

deren jeweiligen Funktion: Die angeborene Immunität bildet die vorderste Linie der Wirtsverteidigung bei Vertebraten gegen die Invasion von Pathogenen. Die beteiligten Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems sind Makrophagen, dendritische Zellen (*Dendritic Cells; DCs*), sowie Granulozyten. T- und B-Zellen vermitteln als Eckpfeiler der adaptiven Immunität die höherspezifische Bekämpfung eingedrungener Mikroorganismen.

1.2. Mustererkennungsrezeptoren

Wie bereits beschrieben beruht die angeborene Immunität auf evolutionär konservierten Rezeptoren, den so genannten Mustererkennungsrezeptoren (*PRRs; pattern recognition receptors*), die hochkonservierte mikrobielle Strukturen erkennen und es so dem Wirt ermöglichen, ein breites Spektrum an Pathogenen jederzeit und ohne zeitraubende Optimierung durch somatische Mutationen zu erkennen. Gemäß ihrer zellulären Lokalisation sind Mustererkennungsrezeptoren in drei Hauptgruppen unterteilbar: lösliche, membranständige und zytoplasmatische Rezeptoren.

Eine weitere Unterteilung in Familien erfolgt gemäß ihrer Struktur und/ oder Funktion. Allgemein gefasst erkennt jeder Rezeptor ein bestimmtes Spektrum von Mikroorganismen entsprechend seiner individuellen Spezifitäten für molekulare Muster. Leukozyten erkennen Pathogene über diese Rezeptoren direkt (nicht-opsoniert) oder indirekt (opsoniert). Einige Rezeptoren, wie beispielsweise der Komplementrezeptor 3 (CR3) erkennt sowohl opsoniertes und nicht-opsoniertes Pathogen im Serum. Die Erkennung von Pathogenen erfolgt derentfolge membranär, z.B. in Vakuolen, oder im Zytoplasma. Nach der Erkennung vermitteln einige Rezeptoren, wie TLRs, Mannose Rezeptoren, Komplement Rezeptoren, Scavenger Rezeptoren und Dectin-1 die Aufnahme von Mikroorganismen durch Phagozytose (Ehekowitz et al., 1990; Doyle et al., 2004; Brown et al., 1991; Peiser et al., 2000). Der Abbau phagozytierter Mikroorganismen hängt z.B. von der Verringerung des phagosomalen pH-Werts, der Freisetzung hydrolytischer Enzyme und toxischer Metaboliten. Die Induktion von Effektormechanismen obliegt spezifischen Rezeptoren, wie Dectin-1 und FcγRs (IgG Rezeptor). Die PAMP Erkennung induziert auch inflammatorische Antworten - darunter die Produktion von Zytokinen und Chemokinen. Die Aktivierung und Rekrutierung von Effektorzellen zum Infektionsherd führt letztendlich über Antigenpräsentation zur Initiierung der adaptiven Immunität. Obwohl erstere vorwiegend von Toll-like Rezeptoren (TLRs) induziert wird, können Nicht-TLRs als Corezeptoren der PAMP-Erkennung zur Immunantwort beitragen. CD36 bindet beispielsweise mikrobielle Diacylglyceride und bringt sie in räumliche Nähe von TLR2-TLR6 Heterodimere (Hoebe et al., 2005). CD 14 bindet Lipopolysaccharide als Corezeptor des TLR4-MD2 Komplexes.

Dectin-1 ist der einzige bekannte membranständige Nicht-TLR Rezeptor, der intrazelluläre Signalgebung induziert. Als ein NK-Zell-Rezeptor ähnliches C-Typ Lektin vermittelt er die Erkennung von Pilzinfektionen und neben der Bindung von Pilzbestandteilen deren Aufnahme und Abbau, sowie die Produktion von Zytokinen und Chemokinen (McGreal et al., 2005). In das Plasma der Zelle eingedrungene PAMPs binden zytoplasmatische Rezeptoren. Diese intrazellulären Rezeptoren werden in zwei Gruppen eingeteilt. Die Mitglieder der RLR (*RIG-I-like receptor*) Familie sind für die Erkennung zytoplasmatischer Fremd-RNA verantwortlich. Zwei Vertreter dieser Familie, RIG-I (*Retinoic acid inducible gene 1*) und MDA5 (*melanoma differentiation associated protein-5*) vermitteln bei Virusinfektion die Produktion von Typ 1 Interferonen. Die zweite Gruppe umfasst die Familie der NLRs (*NOD-like receptors*), die sich in NOD- (Nukleotidbinde-Oligomerisierungsdomäne) Rezeptoren und NALPs (NACHT-, LRR- und Pyrin-Domänen enthaltende Proteine) untergliedert. Während NOD-Proteine die intrazelluläre Erkennung mikrobieller Peptide vermitteln und über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren direkt die *de novo* Proteinsynthese beeinflussen können, sind andere NLRs an der Prozessierung und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β , IL-18 und IL-33 beteiligt (Martinon et al., 2002). In den Abschnitten (1.3. und 1.6.) wird detaillierter sowohl auf die Rolle der membranständigen TLRs, als auch der zytoplasmatischen RLRs und NLRs eingegangen.

1.3. Toll-like Rezeptoren

Wie bereits 1989 von C.A. Janeway postuliert, erkennt das angeborene Immunsystem hochkonservierte molekulare Strukturen, sogenannten PAMPs, welche ausnahmslos von Mikroorganismen produziert werden. Die Detektion von Fremdbestandteilen zeigt dem Wirt das Eindringen von Pathogenen an. Die Erkennung der PAMPs erfolgt durch Gruppen verschiedener Mustererkennungsrezeptoren (*PRRs; pattern recognition receptors*).

In den späten 1990iger Jahren erweiterte die Entdeckung der Toll-ähnlichen Rezeptoren (*Toll-like receptors, TLRs*), einer Familie hochkonservierter membranständiger Rezeptoren (Beutler and Rietschel, 2003; Janeway and Medzhitov, 2002) maßgeblich das Verständnis der PRR-vermittelten angeborenen Immunität. TLRs spielen eine elementare Rolle bei der Initiierung einer wirksamen Wirtsabwehr gegen Pathogene. Vermittelt wird dies durch die Erkennung von PAMPs gramnegativer Bakterien (Poltorak et al., 1998), grampositiver Bakterien (z. B. Lipoteichonsäure, LTA (Schwandner et al., 1999)), Mykobakterien (Glykolipide (Opitz et al., 2001)), als auch von Viren (ssRNA (Heil et al., 2004) und dsRNA (Alexopoulou et al., 2001)). Als membranständige Rezeptoren finden sich TLRs sowohl an der Zelloberfläche, wie auch in subzellulären Kompartimenten, wie zum Beispiel dem Endosom. TLRs sind in vielen Zelltypen exprimiert, unter

anderem in nonhematopoetischen epithelialen sowie in Zellen des Endothels. Die meisten Zelltypen exprimieren jedoch nur einzelne dieser Rezeptoren. Zellen hematopoetischen Ursprungs, wie Makropagen, Neutrophile und dendritische Zellen exprimieren das größte Spektrum an TLRs. Bis dato wurden in Säugern 13 unterschiedliche TLRs identifiziert, 10 beim Menschen, sowie 13 in der Maus (Beutler, 2004). Die TLRs 1-9 sind zwischen Mensch und Maus konserviert, während TLR10 nur im Menschen zu finden und TLR11 lediglich in der Maus funktional ist. Während Liganden und Signalübertragungswege der TLRs 1-9 und 11 bekannt sind, bleiben die biologischen Rollen der TLRs 10, 12 und 13 offen. Die Ligandenbindung durch TLRs initiiert zelluläre Signaltransduktionskaskaden, die in der Aktivierung und Translokation von Transkriptionsfaktoren münden. Diese induzieren die Produktion und Sekretion proinflammatorischer Mediatoren, wie z.B. Tumornekrosefaktor (TNF), Interferon (IFN), Interleukin (IL)-1 und (IL)-6, reaktive Sauerstoffspezies, sowie die Expression kostimulatorischer Moleküle (wie B7.1/2 und CD40) und antigenpräsentierender Moleküle (Haupthistokompatibilitätskomplex I, MHC I). TLR aktivierte dendritische Zellen vermitteln durch ihre Antigenprozessierung und -präsentation sowie Expression kostimulatorischer Moleküle nach Wanderung in sekundäre lymphatische Organe die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen und induzieren dadurch die adaptive Immunität (Akira et al., 2001; Iwasaki and Medzhitov, 2004; Kaisho and Akira, 2003; Pasare and Medzhitov, 2004; Schnare et al., 2001). Somit sind TLRs wichtige Auslöser der adaptiven Immunität.

Die TLR vermittelte Immunantwort ist jedoch neben schützenden auch mit negativen Auswirkungen für den Wirt verbunden. Eine unkontrollierte Aktivierung von TLRs, zum Beispiel aufgrund einer systemischen Infektion, kann zu einer Übersättigung des Organismus mit antiinflammatorischen Zytokinen führen. Dieser „Zytokinsturm“ und die damit verbundenen Reaktionen des Organismus, wie Erweiterung der Blutgefäße, Erhöhung der Körpertemperatur oder die Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies können im Wirt zu Gewebe- und Organschädigungen mit fatalem Ausgang führen (Riedemann, Guo et al 2003). Beispielhaft ist hier der TLR4 und 2 vermittelte gramnegative septische Schock (Cohen, 2002). Ebenfalls diskutiert wird die Rolle von TLRs bei der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten wie beispielsweise systemischem Lupus erythematoses (SLE) (Christensen et al., 2005; Ehlers et al., 2006; Leadbetter et al., 2002; Yu et al., 2006), Diabetes mellitus Typ I (Kolek et al., 2004; Mohammad et al., 2006; Zipris et al., 2005; Zipris et al., 2007), chronischen Entzündungen wie Asthma (Eisenbarth et al., 2002; Redecke et al., 2004) oder Arthritis (Hirschfeld et al., 1999; Sobek et al., 2004).

Neben der Erkennung mikrobieller PAMPs wird auch die Stimulation von TLRs durch endogene Liganden diskutiert. Eine der jüngsten Publikation impliziert TLR2 und 6 in der Erkennung des Proteoglycans Versican, einem Bestandteil der extrazellulären Matrix. Die so induzierte TNF α Ausschüttung verstärkt im Modell das metastasierende Wachstum des „Lewis Lungen Karzinoms“ (*Lewis Lung Carcinoma, LLC*) (Kim et al., 2009). Weitere beschriebene endogene Liganden für TLR2 und bzw. oder TLR4 sind Hitzeschockproteine wie HSP60, HSP70 und gp96 (Vabulas et al.,

2002a; Vabulas et al., 2002b), HMGB1 (high mobility group box 1 protein) (Park et al., 2004; Tian et al., 2007), Hyaluronsäure (Taylor et al., 2004; Termeer et al., 2002), Fibronectin (Okamura et al., 2001) und Fibrinogen (Smiley et al., 2001) sowie nekrotische Zelltrümmer (Leemans et al., 2005; Li et al., 2001; Shishido et al., 2003). TLR7 und 9 stehen im Verdacht durch die Erkennung endogener Nukleinsäuren einen entscheidenden Beitrag zur Pathogenese von SLE zu leisten. Aufgrund der Möglichkeit der Verunreinigung mit mikrobiellen Bestandteilen werden einige der beschriebenen Liganden angezweifelt (Gao und Tsan, 2003a; Gao and Tsan, 2003b; Rifkin et al., 2005).

1.3.1. Entdeckung der Familie der Toll-like Rezeptoren

Der Terminus TOLL bezieht sich ursprünglich auf einen membranständigen Rezeptor, der verantwortlich für die Entwicklung der dorsoventralen Polarität in *Drosophila melanogaster* Embryonen ist (Anderson et al., 1985; Hashimoto et al., 1988). Spätere Versuche erweiterten sein Wirkungsspektrum auf die Abwehr von Pilzinfektionen in der adulten Fliege (Lemaitre et al., 1996). Jedoch ist der Ligand für Toll in der Immunantwort kein mikrobielles Produkt selbst und Toll ist demzufolge kein Mustererkennungsrezeptor. Toll wird in der Immunantwort über jenen extrazellulären Liganden aktiviert, welcher auch für die Entwicklung der dorsoventralen Polarität verantwortlich ist (Levashina, et al., 1999). Dieser Ligand ist das proteolytische Spaltprodukt von Spätzle, dessen Gen einen Wachstumsfaktor der Cystein-Knoten Familie kodiert. Die Bindung des endogenen Spaltproduktes von Spätzle führt in der Fruchtfliege, vermittelt über die Adaptorproteine Tube und Pelle, zur Degradation von Cactus und der Translokation des Rel-Transkriptionsfaktors Dorsal in den Zellkern (Belvin und Anderson, 1996).

Die Erkenntnis, dass die intrazelluläre Domäne des humanen IL-1-Rezeptors (IL-1R) sowie an der Signalgebung durch IL-1R beteiligte Moleküle homolog zu der intrazellulären Domäne von Toll, beziehungsweise zu Signalmolekülen des Toll-Signalweges sind (Gay, 1991; O'Neill und Greene, 1998), der IL-1R jedoch nicht direkt an der Erkennung von extrazellulären PAMPs beteiligt ist, gab den Anstoß zur Suche nach weiteren Homologen zu Toll in Säugern. Datenbankanalysen ermöglichten bis 1998 die Identifizierung und Klonierung von fünf Toll-like Rezeptoren in Säugern (Rock et al., 1998). Für einen Vertreter der Toll-like Rezeptor Familie, humanen Toll (später als TLR4 bezeichnet) konnte, wie zuvor bereits für den IL-1R die Induktion des zu Dorsal homologen Transkriptionsfaktors nukleärer Faktor κ B (NF- κ B) gezeigt werden (Medzhitov et al., 1997). Diese Befunde bestätigten die Vermutung, dass Toll-like Rezeptoren an der Immunantwort beteiligt sein könnten. Jedoch war zu diesem Zeitpunkt ihre genaue Funktion noch offen. Erst die Identifikation spezifischer Liganden der einzelnen Toll-like Rezeptoren erbrachte den Durchbruch bezüglich ihrer genauen Bedeutung in der Immunantwort (Kirschning et al., 1998; Yang et al., 1998).

1.3.2. Struktur der Toll-like Rezeptoren

Alle TLRs sind, analog zu Toll in *Drosophila melanogaster*, transmembranäre Glycoproteine vom Typ I, die strukturell in drei Domänen unterteilt werden:

Eine N-terminale Ektodomäne mit einer unterschiedlichen Zahl an sich wiederholenden Leucinreichen Bereichen, eine die Zellmembran durchspannende Transmembran-Domäne sowie eine C-terminale, intrazelluläre Domäne. Die extrazelluläre Domäne setzt sich aus 19 bis 25 aufeinanderfolgenden Leucinreichen Motiven (leucine rich repeats, LRRs) der Konsensussequenz LxxLxxLxLxxN (L: Leucin, x: beliebige Aminosäure, N: Asparagin) zusammen (Kobe & Kajava 2001). Jedes Motiv hat eine Länge von 24 bis 29 Aminosäuren. Einige dieser Motive sind jedoch nur LRR-ähnlich, da die konservierten Leucine teilweise durch andere hydrophobe Aminosäuren (AS) ersetzt sind (Konsensussequenz: XØXXØXXXXFXLX; Ø: hydrophobe Aminosäure). Die LRRs sind am C-Terminus der extrazellulären Domäne von einer LRR C-terminalen Cysteinreichen (LRRCT), sich an die Transmembrandomäne anschließenden, Domäne flankiert. Es wird vermutet, dass nicht-konsensus LRRs, welche Insertionen nach den Aminosäuren 10 und 15 enthalten, für die Ligandenspezifität der einzelnen TLRs verantwortlich sind (Bell et al., 2003). Einschübe nach der 10. Aminosäure sollen so eine Ligandenbindungsstelle an der konkaven Oberfläche von TLRs generieren, Insertionen an AS-Position 15 für die Bildung von Bindungsstellen an der konvexen Oberfläche verantwortlich sein. Jede LRR setzt sich aus einem β -Faltblatt und einer α -Helix zusammen, welche über Schleifen miteinander verbunden sind. Ursprünglich wurde vermutet, dass die TLR LRR Domäne eine hufeisenförmige Struktur einnimmt und die Ligandenbindung an der konkaven Oberfläche erfolgt. Die erfolgreiche Kristallisation der extrazellulären Domäne revidierte jedoch diese Vermutung der Ligandenbindung. Es zeigte sich, dass, analog zu anderen bekannten Strukturen LRR-Motive enthaltender Proteine, die 23 rechtshändigen, solenoiden LRRs eine hufeisenförmige Struktur bilden. In der gelösten Form als Dimer vorliegend sind die beiden Untereinheiten des TLR3 Seite an Seite zueinander orientiert. Als Bindestelle für die negativ geladene dsRNA wird eine Anhäufung positiv geladener Aminosäuren an der konvexen Außenfläche der beiden Ektodomänen angenommen (Choe et al., 2005.). Die intrazelluläre Domäne der TLRs wird aufgrund ihrer Homologie zu der intrazellulären Domäne des IL-1R als Toll/IL-1R- (TIR) Domäne bezeichnet (Bowie und O'Neill, 2000). Die Größe der TIR-Domäne variiert zwischen den einzelnen Rezeptoren, umfasst jedoch in etwa 200 Aminosäuren. Innerhalb der TIR-Domäne finden sich drei hoch konservierte Bereiche, welche von essentieller Bedeutung für die Signalgebung durch die Rezeptoren sind (Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999). Von besonderem Interesse ist die sogenannte BB-Schleife (*BB-loop*). C3H/HeJ Mäuse weisen hier eine Punktmutation auf. Der Austausch eines Prolins durch ein Histidin innerhalb dieser Region führt zu einem strukturell intakten, jedoch funktional inaktiven TLR4. Die erfolgreiche Kristallstrukturanalyse der intrazellulären Domänen des humanen TLR1

und TLR2 zeigte eine aus je fünf alternierenden α -Helices und β -Strängen bestehende globuläre Struktur (Xu et al., 2000).

1.4. Ligandenerkennung durch Toll-like Rezeptoren

Seit der Entdeckung der TLRs ist die Zuordnung spezifischer Agonisten zu jedem Mitglied der Rezeptorfamilie ein zentraler Gegenstand der Forschung.

1.4.1. TLR1/TLR2/TLR6

TLR2 wird mit der Erkennung einer großen Anzahl unterschiedlicher mikrobieller Bestandteile in Verbindung gebracht. TLR2 defiziente Makrophagen zeigen sich hyporesponsiv auf Stimulation sowohl mit Zellwandkomponenten grampositiver Bakterien als auch mit Peptidoglycan von *Staphylococcus aureus* (Takeuchi et al. 2000). Das außerordentlich breite Ligandenspektrum von TLR2 erklärt sich zumindest teilweise durch die Bildung von Heterodimeren zwischen TLR2 und TLR1 sowie TLR2 und TLR6 (Ozinsky et al. 2000, Wyllie et al. 2000). Weitere Liganden könnten durch die postulierte Heterodimerisierung mit TLR10 erkannt werden.

Eine Reihe von Lipoproteinen, unter ihnen jene von Mycobakterien und Meningokokken wurden als Liganden für TLR2/TLR1 Heterodimere beschrieben (Takeuchi et al. 2002, Wetzler 2003). TLR2/TLR1-Dimere sind zudem für die zelluläre Reaktion auf triacylierte bakterielle Lipoproteine (Aliprantis et al., 1999) sowie auf Pam₃CSK₄, ein synthetisches bakterielles Lipoprotein-Analogon, verantwortlich (Takeuchi et al., 2002).

Dimere aus TLR2 und TLR6 hingegen binden diacylierte Lipopeptide wie z.B. MALP-2 (*2-kDa macrophage-activating lipopeptide*), ein von Mykoplasmen produziertes Lipopeptid (Takeuchi et al., 2001). Neben der Bildung von Heterodimeren mit TLR1 und TLR6 wird die Signalübertragung über TLR2/TLR2 Homodimere als auch die Bildung von Heterodimeren mit „Nicht-TLR“ Molekülen diskutiert. Liganden, die TLR2 abhängige Zellreaktionen auch in Abwesenheit von TLR1 und TLR6 induzieren sind Lipoteichonsäure (LTA), ein Bestandteil grampositiver Zellwände, Lipoarabinomannan aus der Zellwand von Mycobakterien, atypisches LPS aus *Legionella*, *Leptospira interrogans*, *Porphyromonas gingivitis* und *Bordetella* sowie Porine der äußeren Membran von *Neisseria* (Schwandner et al., 1999; Werts et al., 2001; Massari et al. 2002; Wetzler 2003). In Abhängigkeit von CD14 wurde die Erkennung von enterobakteriellem LPS gezeigt (Spiller et al., 2007). Neben bakteriellen PAMPs wurden auch Moleküle aus Pilzen und Protozoen als TLR2 Liganden beschrieben. So induziert Zymosan, eine Mischung aus Glykanen,

Mannan, Proteinen, Chitin und Glykolipiden extrahiert aus der Zellmembran von Pilzen, TLR2/TLR6 vermittelte Signalübertragung (Kataoka et al. 2002, Underhill et al. 1999a). Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anker und Glycoinositolphospholipide aus dem Protozoen *Trypanosoma cruzi* induzieren ebenfalls TLR2 abhängige Immunantworten (Campos et al. 2001).

1.4.2. TLR3

Doppelsträngige RNA (*double-stranded RNA*; dsRNA) wurde lange Zeit als virales PAMP impliziert da sie im Laufe vieler viraler Infektionen produziert wird. Die Expression des humanen TLR3 in HEK 293 führt zur Responsivität auf Stimulation mit gereinigter dsRNA als auch mit Polyinosinic-Polycytidylic acid (poly(I:C)). TLR3 defiziente Mäuse zeigen zudem verminderte Immunantworten auf Applikation dieser Liganden (Alexopoulou et al. 2001). Jedoch stellt TLR3 nicht den einzigen PRR für die Erkennung viraler Infektionen dar. So zeigen einige Publikationen die TLR3 unabhängige Erkennung viraler dsRNA über die Helikasen RIG-I und MDA5 zwei cytoplasmatisch lokalisierte PRRs (Andrejeva et al. 2004, Yoneyama et al. 2004). Während die virusinduzierte Produktion von Typ-I Interferonen in einigen Zellen, wie Fibroblasten und konventionellen DCs komplett unabhängig von TLR3 und seinem Adapter TRIF sind (Honda et al. 2003), erkennen plasmazytoide dendritische Zellen RNA Viren ausschließlich über TLR3 und das Adaptermolekül TRIF (Kato et al. 2005).

1.4.3. TLR4

TLR4 vermittelt die Erkennung von LPS, einer Glykolipid Komponente der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (Poltorak et al., 1998). Zur LPS induzierten Immunantwort bedarf es jedoch der Anwesenheit des akzessorischen, LPS bindenden Proteins MD-2. Zur weiteren Signalverstärkung trägt die Expression des Corezeptors CD14 bei (Fitzgerald et al., 2004). Weitere TLR4 Liganden beinhalten Lipid A Analoga (Lien et al. 2000), Taxol (Perera et al. 2001), mycobakterielle Bestandteile (Means et al. 1999), *Aspergillus fumigatus* (Mambula et al. 2002), *Cryptococcus neoformans* kapsuläre Polysaccharide (Shoham et al. 2001), sowie das synthetische trimyristoylierte Acylhexapeptid Myr₃CSK₄ (Spiller et al., 2007).

1.4.4. TLR5

Flagellin, ein monomerer Bestandteil bakterieller Flagellen, ist der einzig beschriebene Ligand für TLR5 (Hayashi et al., 2001). Dabei erkennt TLR5 eine hochkonservierte, zentrale Kernstruktur von

Flagellin die essentiell für den Aufbau des Protofilaments und die bakterielle Motilität ist (Smith et al. 2003).

1.4.5. TLR7 und TLR8

Humaner TLR7 und TLR8 sowie muriner TLR7 vermitteln die Reaktion auf synthetische Analoga von Guanodin-Nukleosiden wie Imiquimod (R837) oder Resiquimod (R848) (Jurk et al., 2002). TLR7 und humaner TLR8 erkennen außerdem Guanodin- und Uridin-reiche einzelsträngige (*single-stranded*, ss) virale RNA (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Lund et al., 2004). Vergleichbar der Funktion von TLR3 führt die Aktivierung dieser Rezeptoren zur Produktion von Typ-I Interferonen, die einen essentiellen Bestandteil der antiviralen angeborenen Immunität darstellen.

1.4.6. TLR 9

TLR9 vermittelt die Erkennung unmethylierter 2'-desoxyribo-Cytidin-Phosphat-Guanodin (CpG) DNA-Motive (Hemmi et al., 2000). Unmethylierte CpG DNA findet sich hauptsächlich in bakteriellen und viralen Genomen. Genome von Vertebraten zeichnen sich einerseits durch eine geringe Frequenz an CpG Motiven aus, andererseits weisen diese Motive eine hohe Methylierungsrate auf und entgehen so unter physiologischen Bedingungen einer Erkennung durch TLR9. Neben DNA wird die TLR9 abhängige Erkennung von Hemozoin, einem hydrophoben Häm Polymer und Resultat des Abbaus von Hämoglobin durch Malaria Parasiten, diskutiert. Möglicherweise sind diese Befunde jedoch auf die Kontamination mit DNA zurückzuführen.

1.4.7. TLR 11

TLR11 defiziente Mäuse zeigen sich empfänglich auf Infektion mit uropathogenem *Escherichia coli* (Zhang et al, 2004). Obwohl der genaue Ligand nicht bekannt ist deuten Versuche darauf hin, dass TLR11 eine Protein Komponente zu erkennen scheint. Die Erkennung des Protozoons *Toxoplasma gondii* erfolgt TLR11 abhängig über Profilin-ähnliches Protein (Yarovinsky et al.,2005).

Liganden für TLR 10 des Menschen sowie die TLRs 12 und 13 der Maus sind bis heute nicht identifiziert. Die Speziespezifität von TLRs ist immer wieder Mittelpunkt kontroverser Diskussionen, insbesondere im Fall der Nukleotidrezeptoren TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9.

Neben strukturellen Unterschieden zwischen wirtseigenen und fremden Nukleinsäuren scheint die Rekrutierung dieser Liganden zu den endosomalen Kompartments eine entscheidende Rolle zu spielen. So ist die intrazelluläre endosomale Expression von TLR9 wohl die Grundvoraussetzung für die Unterscheidung zwischen selbst- und fremd-DNA. Im Gegensatz zu mikrobieller DNA findet sich Wirts DNA unter normalen Umständen nicht im endosomalen Kompartimenten (Barton et al. 2006). Analog finden sich TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 in den Endosomen (Ahmad-Nejad et al., 2002; Heil et al., 2004; Latz et al., 2004), während TLR1, TLR2 und TLR4 auf der Zelloberfläche exprimiert sind. Dies steht in Einklang mit der extrazellulären Lokalisation der durch sie erkannten Liganden.

TLRs	Liganden	Ursprung der Liganden
TLR2/1	Triacylierte Lipopeptide (Pam3CSK4)	Bakterien, Mycobakterien
	lösliche Faktoren OspA Porin PorB	<i>Neisseria meningitites</i> <i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoprotein/Lipopeptide	div. Pathogene
	Diacylierte Lipopeptide (Pam2CSK4, MALP2SK4) Peptidoglycan Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Modulin Glycoinositolphospholipide Glycolipide Porine Zymosan atypisches LPS atypisches LPS Hsp70 Hyaluronan Antigengemische LcrV Lyso-Phosphatidylserin Virusbestandteile Hemagglutinin	synthetisch grampositive Bakterien grampositive Bakterien Mycobakterien <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria meningitidis</i> Pilze <i>Leptispira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> wirtseigen wirtseigen z.B. <i>Propionibakterium acnes</i> Yersinia <i>Schistosoma mansoni</i> Herpes simplex virus, Varizella-Zoster-Virus, Cytomegalovirus Masern Virus
TLR2/6	Diacylierte Lipopetide	Mycoplasmen
TLR3	PolyI:C, dsRNA	Viren
TLR4	LPS	Gram-negative Bakterien
	Flavolipin ER-112022;E5564, E5531 Taxol Hsp60 Hsp60 Hsp70 TypIII Extradomäne A von Fibronektin Oligosaccharide der Hyaluronsäure Fibrinogen Polysaccharid Fragmente von Heparansulfat α A Crystallin und HSPB8 virale Hüllproteine	<i>Flavobakterium meningosepticum</i> synthetisch Pflanzen <i>Chlamydia pneumoniae</i> wirtseigen wirtseigen wirtseigen wirtseigen wirtseigen wirtseigen wirtseigen RSV, MMTV
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR7	Imidazoquinoline (Imiquimod, R-848)	synthetisch
	Bropirimine Guanosin Analoga ssRNA	synthetisch synthetisch RNA Viren
TLR8	R-848	synthetisch
	virale ssRNA	RNA Viren
TLR9	unmethylierte CpG DNA	Bakterien, Viren, Hefe, Insekten
	Chromatin-IgG Komplexe Hemozoin	wirtseigen <i>Plasmodium</i>
TLR10	-	
TLR11	Profilin-ähnliche Strukturen	<i>Toxoplasma gondii</i>
	unbekannter Ligand	Uropathogene Bakterien
TLR12	-	
TLR13	-	

Tabelle 1: Toll-like Rezeptor Liganden. Gay NJ and Monique Gangloff M, Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands *Annu. Rev. Biochem.* 2007. 76:141–65

1.5. Signalgebung durch Toll-like Rezeptoren

Ligandenerkennung durch TLRs führt zur Induktion intrazellulärer Signalkaskaden, welche letztendlich in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, Mitgliedern der IRF (*Interferon regulatory factor*) Familie, AP-1 (aktivierendes Protein 1), SRF (*serum response factor*) und CREB (*cAMP response element binding protein*) gipfeln. Nach Translokation in den Zellkern und folgender spezifischer Promotorbindung induzieren diese Transkriptionsfaktoren die Produktion proinflammatorischer Zytokine, reaktiver Sauerstoffspezies sowie die Expression antigenpräsentierender und kostimulatorischer Moleküle. Letztere stellen speziell auf DCs einen essentiellen Schritt für die Induktion pathogenspezifischer adaptiver Immunantworten dar.

Die Schlüsseldomäne in der TLR Signalgebung ist die Toll/Interleukin-1 (IL-1) Rezeptor (TIR) Domäne. Sie findet sich sowohl am zytoplasmatischen Ende aller TLRs als auch an den an der Signalkaskade beteiligten Adaptermolekülen (O’Neill 2003). Es wird vermutet, dass unstimulierte TLRs als prä-assemblierte Dimere niedriger Affinität vorliegen (Bell et al., 2006; Ozisnky et al., 2000). Ihre Stimulation führt zur Annäherung der zytoplasmatischen TIR Domänen. Diese neu geschaffene Plattform ermöglicht die Rekrutierung intrazellulärer Adaptermoleküle.

Für TLR 9 wurde gezeigt, dass durch Ligandenbindung hervorgerufene Konformationsänderungen konstitutiv vorliegender TLR9 Homodimere zur Annäherung der zytoplasmatischen TIR Domänen führt (Latz et al., 2007). Erst die Annäherung beider TIR Domänen sowie deren Neuorientierung ermöglicht die Rekrutierung des Adaptermoleküls MyD88. Es wird vermutet, dass die ligandeninduzierte Konformationsänderung zufällige, durch Kollision zweier TLR9 Monomere hervorgerufene, Signalübertragungen verhindern soll.

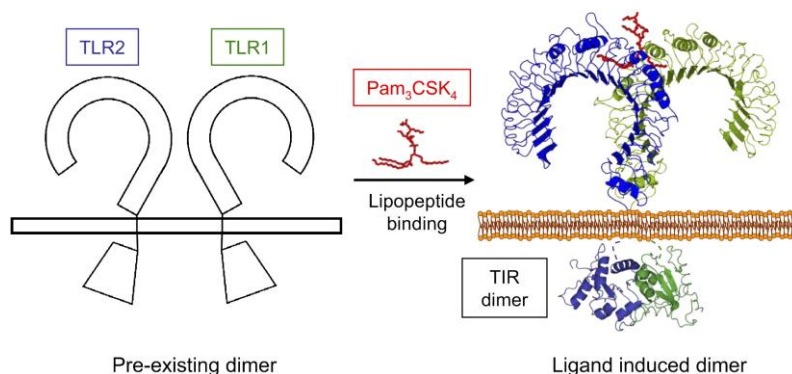


Abbildung 1: Modell des ligandeninduzierten Heterodimers aus TLR1 und TLR2. Gemäß der Röntgenstrukturanalyse der Ektodomäne der TLR 1 und 2 (Jin et al., 2007), sowie der TIR Domänen (Gautam et al., 2006; Xu et al., 2000) generierte Darstellung der nach Stimulation dimerisierten Vollängenproteine. Die Struktur des vorgeformten Dimers ist unbekannt und nur schematisch gezeigt. Die ligandeninduzierte Annäherung der als prä-assemblierte Dimere vorliegenden TLRs führt zur Annäherung der zytoplasmatischen TIR Domänen. Bei gleichzeitiger über die Ektodomänen vermittelter Konformationsänderung kommt es so zur Ausbildung einer Interaktionsplattform für zytoplasmatische Adaptermoleküle. (Abbildung aus: Jin et al., 2007, Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide)

Initiales Ereignis für TLR Signalübertragungsereignisse ist die Interaktion der aktiven Rezeptor-TIR Domäne mit den TIR-Domänen zytoplasmatischer Adapterproteine. Bis heute sind fünf Adaptormoleküle beschrieben, welche analog zu den Rezeptoren, mit denen sie interagieren, eine TIR-Domäne besitzen (O'Neill et al., 2003).

Zu ihnen zählen MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*), TRIF/TICAM1 (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β ; TIR-containing adaptor molecule-1*), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), MAL (*MyD88-adaptor-like*, auch TIRAP (*TIR-domain-containing adaptor protein*) genannt) und SARM (steriles α - und Armadillo-Motiv-enthaltendes Protein). Die einzelnen Adaptermoleküle sind spezifisch für individuelle TLRs und vermitteln so die Spezifität der jeweilig induzierten Immunantworten.

1.5.1. MyD88

MyD88 wurde ursprünglich als ein Gen beschrieben, das im Zuge der finalen Differenzierung M1D+ myeloider Vorläufer induziert wird („MyD“ steht hier für myeloide Differenzierung und 88 für die gelistete Nummer des induzierten Gens) (Lord et al., 1990). Später wurde seine Beteiligung an der Typ 1 IL-1 Rezeptor vermittelten Signalübertragung gezeigt (Hultmark, 1994; Muzio et al., 1997; Wesche et al., 1997). Untersuchungen an MyD88 defizienten Mäusen lenkten die Aufmerksamkeit auf eine Beteiligung an TLR vermittelter Signalübertragung (Kawai et al., 1999; Takeuchi et al., 2000) und untermauerten so erste Befunde, die bereits auf eine solche Rolle verwiesen (Medzhitov et al., 1998; Muzio et al., 1998). So sind MyD88 defiziente Mäuse nicht in der Lage, auf TLR2, TLR4, TLR5, TLR7 und TLR9 Liganden zu reagieren.

MyD88 lässt sich in zwei strukturell und funktionell relevante Bereiche untergliedern. Während sich der C-Terminus durch starke Homologien zu den cytoplasmatischen Regionen der IL-1 Rezeptorfamilie auszeichnet und demnach als TIR Domäne bezeichnet wird, bildet der N-terminale Bereich eine so genannte Todesdomäne (*death domain; DD*). Nach Stimulation von TLRs bindet MyD88 über homotypische TIR-TIR Domänen Interaktion an den Rezeptorkomplex (Dunne et al., 2003). Die aus TIR-Domäne-TIR-Domäne- und Todesdomäne-Todesdomäne-Interaktionen hervorgehende Ausbildung von MyD88 Homodimeren führt zur Rekrutierung und Aktivierung mehrerer Mitglieder der IRAK- (IL-1R-assozierte Kinase) Familie. Die Bindung von IRAK4 an MyD88 über ihre jeweiligen Todesdomänen vermittelt die anschließende Rekrutierung und Phosphorylierung von IRAK1 (Burns et al., 2003; Medzhitov et al., 1998; Muzio et al., 1997; Suzuki et al., 2002). Aktiviertes IRAK1 autophosphoryliert N-terminale Aminosäurereste und rekrutiert TRAF6 (TNF-Rezeptor-assoziierter Faktor 6) an den MyD88/IRAK4/IRAK-1 Komplex. Dimerisiertes TRAF6 löst sich zusammen mit IRAK1 aus dem Komplex und interagiert mit den Ubiquitylierungsfaktoren UBC13 (*ubiquitin-conjugating enzyme 13*) und UEV1A (*ubiquitin-*

conjugating enzyme E2 variant 1). Ubiquitinyliertes TRAF6 bindet einen Komplex bestehend aus TAK1 (*transforming growth factor- β -activated kinase-1*) und den Adaptermolekülen TAB1 (*TAK1-binding protein 1*) und TAB2 oder TAB3 (Deng et al., 2000; Shibuya et al., 1996; Sun et al., 2004; Takaesu et al. 2000).

TAK1, TAB2 und TAB3 werden durch die Interaktion mit TRAF6 phosphoryliert, IRAK1 wird an der Zellmembran degradiert und der verbleibende Komplex ins Zytosol entlassen. Die Aktivierung von TAK1 erfolgt zum einen durch TRAF6 vermittelte Ubiquitinylierung von TAK1, wobei TRAF6 als E3 Ubiquitin-Ligase fungiert, und über seine RING (*really interesting new gene*)-Finger-Domäne UBC13 (*ubiquitin-conjugating enzyme 13*) und UEV1A (*ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1*) bindet (Wang et al., 2001). Zum anderen wird TAK1 durch TAB1 aktiviert. TAK1 vermittelt durch Phosphorylierung die Aktivierung des IKK- (*Inhibitor of NF- κ B-kinase*) Komplexes bestehend aus IKK- α , IKK- β und IKK- γ . Dieser Komplex wiederum induziert durch Phosphorylierung von I κ B (Inhibitor von NF- κ B) die Aktivierung von NF- κ B (Karin and Ben-Neriah, 2000). I κ B bindet im Cytosol Dimere der NF- κ B Familie (p65 (REL-A), REL-B, zytoplasmatisches REL, p50 und p52) und verhindert so deren Translokation in den Zellkern. Die IKK-Komplex vermittelte Phosphorylierung von I κ B induziert dessen Degradation und ermöglicht so die nukleäre Translokation der NF- κ B Dimere. TAK1, zur Familie der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen-Kinasen-Kinasen (MAPKKK) gehörend, aktiviert zudem Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) wie JNK (Jun N-terminale Kinase (Yamaguchi et al., 1995)) und induziert die Aktivierung des Transkriptionsfaktor AP-1. MyD88 spielt eine entscheidende Rolle bei der durch TLR7, TLR8 und TLR9 initiierten und durch Transskriptionsfaktoren der IRF-Familie (Interferon regulatorischer Faktor) vermittelten Induktion von Typ-I Interferonen. Eine zentrale Rolle bei der Induktion von IFN- α kommt IRF7 zu (Honda et al., 2005; Kawai et al., 2004; Honda et al., 2004). Die Aktivierung und Phosphorylierung von IRF7 durch IRAK1 erfolgt in einem Komplex bestehend aus MyD88, IRAK1, IRAK4, TRAF6 und IRF7 (Hochrein et al., 2004; Uematsu et al., 2005).

MyD88 interagiert des Weiteren mit den IRFs 1 und 5. Während IRF5 vor allem für die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-12 und TNF α verantwortlich zu sein scheint (Takaoka et al., 2005), wird IRF1 impliziert, in der Produktion von Typ-I Interferonen eine Rolle zu spielen (Negishi et al, 2006; Schmitz et al., 2006). Die Induktion von IRF1 ist abhängig von IFN- γ . Möglicherweise ein Grund für die zellaktivierende Wirkung dieses Zytokins.

TRAF3 scheint ebenfalls eine elementare Rolle bei der durch die TLRs 7, 8 und 9 vermittelten Induktion von IFN- α über IRF7 zu spielen (Häcker et al., 2006; Oganessian et al., 2006). Neben seiner Rolle im MyD88 abhängigen Signalweg wird außerdem eine Beteiligung an der TRIF vermittelten Signalübertragung durch die TLRs 3 und 4 diskutiert. Neben der Involvierung in TIR vermittelten Signalkaskaden wurde für MyD88 ein alternativer, TIR unabhängiger, Signalweg

beschrieben. Nach Interaktion mit dem Interferon- γ Rezeptor 1 (IFN γ R1) induziert das Adaptermolekül über die Rekrutierung von MLK3 (*mixed-lineage kinase 3*) die Aktivierung von p38 (Sun and Ding, 2006).

1.5.2. MAL/TIRAP

MAL/TIRAP wurde als zweites Mitglied der Familie der TIR-Domänen enthaltenden Adaptermoleküle entdeckt (Horng et al., 2001; Fitzgerald et al., 2001). Als molekulare Brücke vermittelt es die Interaktion der TLRs 2 und 4 mit dem Adaptermolekül MyD88 (Horng et al., 2002; Yamamoto et al., 2002). Eine dominant negative Version von MAL inhibiert selektiv TLR4 vermittelte Signaltransduktion, zeigt jedoch keinerlei negative Effekte auf die IL-1R Stimulation. Studien mit Knockout Mäusen belegten diese Befunde. Während sich keine Abnormitäten in TLR9 und IL-1 vermittelter Signalübertragung zeigten, wiesen MAL-defiziente Mäuse, analog zu MyD88-defizienten Mäusen, auf LPS Stimulation hin eine deutlich verzögerte Aktivierung von NF- κ B und MAPK auf. Vergleichbar mit MyD88 zeigte sich die durch TLR4 induzierte Aktivierung von IRF3 als unabhängig von MAL. Diese Befunde, zusammen mit der Erkenntnis, dass MAL für die Signaltransduktion durch TLR2 essentiell ist (Horng et al., 2002), begründeten dessen Gruppierung in den MyD88 abhängigen Signalweg. Dabei fungiert es als Verbindungsmolekül zwischen TLR 2 und 4 einerseits und MyD88 andererseits (Kagan and Medzhitov, 2006).

Die im N-Terminus lokalisierte Bindedomäne ermöglicht die Assoziation mit Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphatmolekülen der inneren Zellmembran. MyD88 bindet selbst nicht an TLR4, interagiert jedoch mit MAL gebunden an den Rezeptor. Grund hierfür könnte die elektrostatische Oberfläche der einzelnen TIR-Domänen sein. Während die Oberflächen der TIR Domänen sowohl von MyD88 als auch von TLR4 positiv geladen sind, ist jene von MAL negativ geladen was eine Interaktion begünstigen würde (Dunne et al., 2003). Neben seiner Funktion als Verbrückungsmolekül wird eine Rolle von MAL als TRAF6 rekrutierendes Molekül diskutiert (Mansell et al., 2004).

BTK (*Bruton's Tyrosin kinase*) induzierte Tyrosin Phosphorylierung von MAL führt zu einer Verstärkung der Phosphorylierung der NF- κ B Untereinheit p65 (Doyle et al., 2005; Gray et al., 2006; Jefferies et al., 2003; Liljeroos et al., 2007). Durch Phosphorylierung aktiviertes MAL wird negativ reguliert durch seine SOCS-1 (*suppressor of cytokine signaling 1*) vermittelte Degradation (Mansell et al., 2006; Nakagawa et al., 2002).

Die Regulation von MAL durch Caspase-1 wird ebenfalls diskutiert. So wurde gezeigt, dass die Caspase-1 abhängige Prozessierung des Adaptermoleküls Voraussetzung für die Aktivierung von NF- κ B zu sein scheint (Miggin et al., 2007).

1.5.3. TRIF

Auf Aktivierung der meisten TLRs zeigen MyD88 defiziente Zellen deutliche Beeinträchtigungen in der Zytokinproduktion (Adachi et al., 1998; Takeda et al., 2003). Stimulation mit TLR4 Liganden induziert jedoch weiterhin, wenngleich deutlich verzögert, die Aktivierung von NF- κ B und MAPK (Kawai et al., 1999). Weiterhin resultiert die Stimulation der TLRs 3 und 4 in der MyD88 unabhängigen Aktivierung von IRF3 und folgend in der Produktion von IFN- β (Covert et al., 2005). Diese Befunde nährten die Theorie der Existenz einer MyD88 unabhängigen TLR-Signalkaskade und führten zur Identifikation und Charakterisierung von TRIF (*TIR domain-containing adapter inducing IFN- β*)/TICAM-1 (*TIR-containing adapter molecule-1*). TRIF ist ein sowohl an der Induktion proinflammatorischer Zytokine durch NF- κ B als auch an der Produktion von IFN- β über IRF3 beteiligtes Adaptermolekül (Yamamoto et al., 2002; Akira et al., 2001; Hoebe et al., 2003; Hoshino et al., 2002; Yamamoto et al., 2003a). Trotz intensiver Studien ist der Mechanismus der TRIF induzierten Aktivierung von NF- κ B und IRF3 nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass TRIF über NAP1 (*NAK-associated protein 1*) mit TBK1 (Sasai et al., 2005) und möglicherweise TRAF3 interagiert. Die Ausbildung eines Komplexes bestehend aus TRIF, TBK1, IRF3 und möglicherweise IKK ϵ ist für die spezifische Phosphorylierung und Aktivierung von IRF3 verantwortlich (Fitzgerald et al., 2003).

Die TRIF vermittelte Induktion von NF- κ B erfolgt über zwei getrennte Signalwege, die ihren Ursprung im N- beziehungsweise C-Terminus des Adaptermoleküls haben. N-terminal vermittelte Rekrutierung von TRAF6 induziert Aktivierung von NF- κ B nicht jedoch die von IRF3 (Sato et al., 2003; Jiang et al., 2004). Ein im C-Terminus lokalisiertes RIP (*receptor-interacting protein*) Bindungsmotiv (*RHLM, RIP homotypic interaction motif*) zeichnet sich verantwortlich für die Rekrutierung von RIP1 und RIP3. Aktiviertes RIP1 führt zur Freisetzung des NF- κ B Komplexes sowohl nach Stimulation von TLR3 als auch von TLR4 (Cusson-Hermance et al., 2005). RIP3 hingegen stellt einen Negativregulator des TRIF-RIP1-NF- κ B Signalweges dar (Meylan et al., 2004).

Neben den oben genannten Signalwegen wird die TRIF abhängige Induktion von IRF5 diskutiert. So ist in IRF5 defizienten Makrophagen auf poly(I:C) Stimulation hin die Produktion von IL-6, TNF und IL-12 deutlich reduziert (Takaoka et al., 2005). Ein weiterer über TRIF induzierter Signalweg führt über RIP1, FADD und Caspase-8 zur Aktivierung von Apoptose (Han et al., 2004; Ruckdeschel et al., 2004). TRIF aktivierte Caspase-8 führt weiterhin zur direkten, Caspase-1 unabhängigen Prozessierung und Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β (Maelfait et al., 2008).

1.5.4. TRAM/TIRP/TICAM-2

Wie MAL ist das Adaptermolekül TRAM, auch TIRP (*TIR domain-containing protein*) oder TICAM-2 (*TIR-containing adapter molecule-2*) genannt in die Signalübertragung bestimmter TLRs involviert. Studien belegen die Beteiligung von TRAM an der TLR4 vermittelten Aktivierung von IRF3 (Fitzgerald et al., 2003; Yamamoto et al., 2003; Oshiumi et al., 2003). Mittels Hefe 2 Hybrid Interaktionsstudien konnte die exklusive Interaktion von TRAM mit der zytoplasmatischen Domäne von TLR4 nicht jedoch mit jenen der TLRs 2 und 5-9 gezeigt werden. Weitere Befunde implizieren TRAM in TLR4 mediierte Rekrutierung von TRIF und die Aktivierung von IRF3, sowie die verzögerte Induktion von NF- κ B. TLR3 - TRIF Signaltransduktion zeigt sich unbeeinflusst von der Abwesenheit von TRAM. Zwei posttranslationale Modifikationen beeinflussen die Funktionalität von TRAM. Die konstitutive Myristoylierung des N-Terminus von TRAM ermöglicht dessen Assoziation mit der Zellmembran und so die Kolokalisation mit TLR4 (Rowe et al., 2006). Die Protein Kinase PKC ζ , eine tragende Komponente LPS vermittelter Signalübertragung in Makrophagen, induziert die Serin-Phosphorylierung von TRAM und trägt so zu dessen Aktivierung bei (McGettrick et al., 2006).

1.5.5. SARM

SARM (steriles a- und Armadillo-HEAT-Motiv-enthaltendes Protein) ist das fünfte und letzte TIR-Domänen enthaltende Adapterprotein dem eine Beteiligung an TLR vermittelter Signalübertragung nachgewiesen werden konnte. Ursprünglich wurde SARM als ein humanes Gen identifiziert, welches ein Ortholog zu einem Protein aus *Drosophila melanogaster* darstellt (Mink et al, 2001). Erst zu einem späteren Zeitpunkt wurde erkannt, dass SARM über eine TIR Domäne verfügt. Diese Erkenntnis, zusammen mit dem Wissen, dass in *C. elegans* nur zwei TIR-Domänen enthaltende Proteine codiert sind (TOL-1 und TIR-1) und letzteres das Orthologe zu SARM darstellt, lenkten die Vermutung auf eine Beteiligung von TIR-1 an der Immunität des Wurms (Couillault et al., 2004). Studien bestätigten eine Rolle von TIR-1 bei der Abwehr von Pilzinfektionen in *C.elegans*. Lange Zeit war die Funktion von humanem SARM unbekannt. Überexpressionsexperimente zeigten, dass SARM, im Gegensatz zu den anderen Adaptermolekülen, nicht in der Lage war, NF- κ B zu induzieren (Liberati et al., 2004). Erst in jüngerer Zeit konnte die Rolle von SARM als Negativregulator der NF- κ B und IRF Aktivierung gezeigt werden (Carty et al., 2006). So führt die Expression von SARM zur spezifischen Blockade TRIF vermittelter Transkriptionsfaktoraktivierung. MyD88 induzierte Signalwege zeigten sich unbeeinflusst.

Der inhibitorische Effekt scheint auf der direkten Interaktion von TRIF und SARM zu beruhen. Wenngleich der genaue Mechanismus der inhibitorischen Wirkung von SARM nicht bekannt ist, scheint die Komplexbildung aus TRIF und SARM die Rekrutierung von Effektormolekülen wie RIP1, TRAF6 und TBK1 an TRIF zu unterbinden.

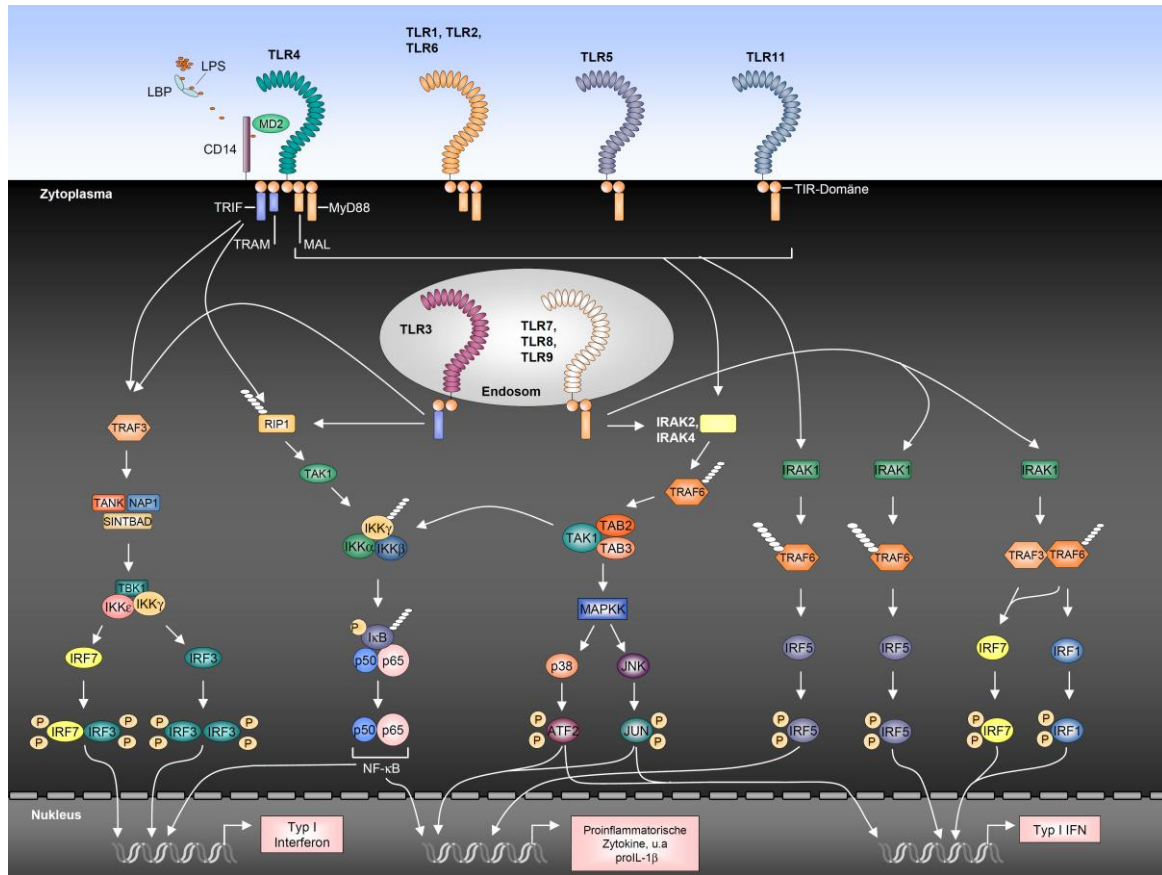


Abbildung 2: TLR vermittelte Signaltransduktion. TLRs sind Typ-I Transmembranrezeptoren lokalisiert in der Plasmamembran oder endosomalen Kompartimenten. Ligandenbindung führt zu TIR-TIR interaktionsabhängiger Rekrutierung von Adaptermolekülen. TLR5, 7, 8, 9 und 11 vermittelte Signalgebung erfolgt ausschließlich über MyD88, während die TLRs 1, 2 und 6 zusätzlich MAL rekrutieren. TLR3 überträgt Signale unabhängig von MyD88 und MAL über TRIF. TLR4 verwendet MAL und TRAM zur Rekrutierung von MyD88 und TRIF. Abhängig von MyD88 erfolgt die Aktivierung von IRAK2 und IRAK4. Diese assoziieren mit und aktivieren TRAF6, welches über K63-gebundene Polyubiquitinylierung TAK1 induziert. TAK1 wiederum aktiviert den IKK-Komplex welcher IκB phosphoryliert und somit für dessen Ubiquitinylierung und proteasomalen Abbau markiert. Freigesetztes NF-κB transloziert in den Zellkern und induziert die Expression distinkter Zielgene. TAK1 kontrolliert weiterhin die Aktivierung des MAPK Signalweges. RIP1 vermittelt die TRIF abhängige Aktivierung von NF-κB. Die TRIF abhängige Induktion von TRAF3 führt über die Assoziation mit TBK1 und IKKε zur Aktivierung von IRF3 und IRF7 und resultiert in der Expression von Typ I Interferonen. Die TLRs 7, 8 und 9 aktivieren neben NF-κB über MyD88 auch die IRFs 1, 5 und 7. In plasmazytoiden DCs ist IRF7 ein essentieller Faktor der Produktion von Typ I Interferonen, während diese in konventionellen DCs abhängig von IRF1 und IRF5 erfolgt. Nahezu alle TLRs, ausgenommen TLR3, induzieren IRF5 abhängig von MyD88 und IRAK1. ATF2, activating transcription factor 2; IκB, inhibitor of NF-κB; IFN, interferon; IKK, IκB kinase; IL, Interleukin; IRAK, IL-1 receptor associated kinase; IRF, IFN regulatory factor; JNK, JUN N-terminal kinase; LBP, LPS-binding protein; LPS, lipopolysaccharide; MAL, MyD88-adaptor-like protein; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MAPKK, MAPK kinase; MyD88, myeloid differentiation primary-response gene 88; NAP1, NAK-associated protein 1; NF-κB, nuclear factor-κB; SINTBAD, similar to NAP1 TBK1-binding protein, TAB, TAK1-binding protein 1; TAK, TGFβ-activated kinase; TANK, TRAF-family-member-associated NF-κB activator; TBK, TANK-binding kinase; TIR, Toll/IL-1 receptor; TRAF, TNF-receptor-associated factor; TRAM, TRIF-related adapter molecule; TRIF, TIR-domain-containing adapter protein inducing IFN-β. Modifiziert übernommen aus: Latz, E. und Fitzgerald, KA, Innate immunity: sensing and signalling. *Nat Rev Immunol.*, 2008.

1.5.6. Negative Regulation der TLR Signalgebung

TLR Aktivierung stellt ein zweischneidiges Schwert dar. Während es einerseits gilt die angeborene Immunität anzutreiben und die adaptive Immunität in der Pathogenabwehr zu unterstützen, gilt es andererseits einer möglichen Überaktivierung und damit einer Schädigung des Wirtsorganismus entgegenzuwirken. Fehlgeleitete TLR induzierte Immunantworten sind in die Pathogenese einer Reihe von Autoimmun-, chronischer- und Infektionsbedingter Krankheiten involviert. Zur ständigen Balance des Immunsystems zwischen Aktivierung und Inhibierung zur Vermeidung unangemessener weil schädigender Entzündungsreaktionen, bedarf es der strikten Kontrolle TLR induzierter Signalgebung. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von TLR Negativregulatoren identifiziert, die sich in der Spezifität, aber auch in der Lokalisation ihres Wirkens unterscheiden.

Lösliche Rezeptorisformen (*soluble TLR*; sTLR) von TLR4 und TLR2 unterbinden Rezeptor-Korezeptor Interaktionen (Iwami et al., 2000; LeBouder et al., 2003) und inhibieren so TLR vermittelte Signalgebung. Für sTLR2 wurde die Interaktion mit sCD14 einem Korezeptor von TLR2 und TLR4 gezeigt (Iwaki et al., 2003).

Eine Reihe intrazellulärer Regulatoren greift an unterschiedlichen Punkten in die TLR Signalkaskade ein und inhibiert so die Produktion proinflammatorischer Faktoren. MyD88s (MyD88 short) eine Spleiß-Variante von MyD88, welcher die für die Interaktion mit IRAK4 notwendige Interdomäne fehlt, verhindert die Rekrutierung von IRAK4 an den Rezeptorkomplex und wirkt so als Negativregulator der NF- κ B Aktivierung (Burns et al., 2003). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 zeigt sich durch MyD88s jedoch nicht beeinträchtigt (Janssens et al., 2003).

IRAKM verhindert die Bildung des IRAK1-TRAF6 Komplexes. Dies erfolgt durch Blockade der Dissoziation von IRAK1 und IRAK4 aus dem Rezeptorkomplex, entweder durch Stabilisierung des TLR-MyD88-IRAK4 Komplexes oder aber durch Inhibierung der Phosphorylierungen von IRAK4 und IRAK1. IRAKM defiziente Makrophagen zeigen auf TLR4 und TLR9 Aktivierung hin deutlich erhöhte Werte an proinflammatorischen Zytokinen (Kobayashi et al., 2002). Zwei Spleiß-Varianten von IRAK2, einem weiteren Vertreter der IRAK Familie, IRAK2c und IRAK2d, beiden ist das Fehlen der Todesdomäne gemein, unterdrücken LPS induzierte NF- κ B Aktivierung (Hardy et al., 2004). SOCS1 unterbindet LPS abhängige Aktivierung von NF- κ B wahrscheinlich über IRAK1 (Kinjyo et al., 2002; Nakagawa et al., 2003). TOLLIP (*Toll-interacting protein*) ist ein weiterer Negativregulator TLR vermittelter NF- κ B Aktivierung. Neben der Interaktion mit einigen Vertretern der TIR Superfamilie, unter ihnen TLR2 und TLR4 (Burns et al., 2000; Bulut et al., 2001), bindet TOLLIP an IRAK1. Eine gegenseitige Regulation der beiden Interaktoren wird diskutiert. So reguliert TOLLIP die Autophosphorylierung von IRAK1, andererseits induziert IRAK1 die Phosphorylierung von TOLLIP, was möglicherweise ein Dissoziationssignal für TOLLIP aus dem Komplex mit IRAK darstellt (Zhang et al., 2002). A20 blockiert TLR vermittelte

Signalübertragung durch Deubiquitylierung von TRAF6 (Boone et al., 2004). Da TRAF6 ein integraler Bestandteil der Signalkaskaden aller TLRs ist, stellt A20 den einzigen Negativregulator dar, der sowohl MyD88 abhängige, als auch - unabhängige Signalwege kontrolliert.

Ein weiterer elementarer Negativregulationsmechanismus wird durch Transmembranproteine vermittelt. ST2L, ein Typ-1 Transmembranprotein mit drei extrazellulären Immunglobulin ähnlichen Domänen, sowie einer zytoplasmatischen TIR Domäne, supprimiert IL-1 sowie TLR 2, 4 und 9 induzierte NF- κ B Aktivierung (Brint et al., 2004; Wald et al., 2003). Durch Rekrutierung der Adaptermoleküle MyD88 und MAL, nicht aber von TRIF an die cytoplasmatische Domäne von ST2L werden spezifisch Signalkomponenten der MyD88 abhängigen Signalkaskade entzogen, die Signalgebung so reduziert. SIGIRR (*single immunoglobulin IL-1R-related molecule*), ein weiteres TIR Domäne enthaltendes Transmembranprotein, beeinflusst ebenfalls IL-1, IL-18 und TLR vermittelte NF- κ B Aktivierung (Garlanda et al., 2004; Diehl et al., 2004). Während die Interaktion mit TLR4, IRAK und TRAF6 gezeigt ist, bleibt der genaue Regulationsmechanismus offen (Wald et al., 2004). TRAILR (*Tumor Necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor*), ein Rezeptor der TNF Superfamilie, inhibiert TLR vermittelte Effekte durch Stabilisation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und blockiert so die nukleäre Translokation von NF- κ B (Diehl et al., 2004). Die Regulation der Expression der Rezeptoren selbst stellt eine weitere Möglichkeit der Inhibierung von TLRs dar. Erreicht wird diese einerseits durch gezielten Abbau der Rezeptoren nach Ubiquitylierung, andererseits durch Inhibierung der Genexpression selbst. TRIAD3A, zur Gruppe der RING-Finger E3 Ligasen gehörend, bindet spezifisch die cytoplasmatischen Domänen von TLR4 und TLR9 um deren Ubiquitylierung und folgend deren Abbau zu vermitteln (Chuang et al., 2004).

Einflussnahme auf die Genexpression von TLRs erfolgt durch antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β (*transforming growth factor- β*). TGF- β 1 reduziert TLR Signalgebung durch Unterdrückung der Expression von TLR, aber auch durch die Degradation von MyD88 (McCartney-Francis et al., 2004; Naiki et al., 2005).

1.5.7. PI3K/AKT/mTOR

Ein weiterer zentraler TLR induzierter Signalweg gewann in letzter Zeit deutlich an Gewichtung: die über PI3K (*Phosphoinositol 3-Kinase*) und AKT vermittelte Aktivierung von mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*). Für TLR2 ist die Rekrutierung und Bindung von Rac-1 und der p85 Untereinheit von PI3K gezeigt (Arbibe et al., 2000). Die Assoziation erfolgt dabei über die SH2 Domäne der regulatorischen Untereinheit mit spezifischen phosphorylierten Tyrosinen der TIR-Domäne des TLRs. Weitere Studien beschreiben die Interaktion von PI3K mit dem Adaptermolekül MyD88 (Ojaniemi et al., 2003; Gelman et al., 2006; Laird et al., 2009). Die

katalytische Untereinheit der membran-nah gebundenen PI3K phosphoryliert PIP₂ (Phosphatidy-Inositol-4,5-Bisphosphat). Das resultierende Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Triphosphat (PIP₃) bewirkt als „*second messenger*“ die Membranrekrutierung und Aktivierung weiterer Kinasen, unter anderem von AKT (auch PKB, *protein kinase B*), PDK1 (*Phosphoinositide dependent kinase 1*) und PTEN (*Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10*) (Klippel et al., 1997; Franke et al., 1997). Aktiviertes AKT phosphoryliert und hemmt den aus TSC1 und TSC2 bestehenden TSC-Komplex (*Tuberous Sclerosis Complex*). Die Phosphorylierung von TSC1 resultiert in der Induktion des GTPase aktivierenden Proteins TSC2 und folgend in der Aktivierung der Ras verwandten GTPase Rheb (*Ras Homolog Enriched in Brain*). Aktives Rheb vermittelt die Aktivierung von mTOR (auch FRAP, *FKBP 12-rapamycin-associated protein*). Aktiviertes mTOR kontrolliert die Protein Synthese durch direkte Phosphorylierung und Inaktivierung des mRNA-Translation unterdrückenden Proteins 4E-BP1 (*4E-binding protein 1*) und durch Phosphorylierung und Aktivierung der S6Kinase (S6K1 oder p70S6K). Das Makrolid-Antibiotikum Rapamycin bildet einen Komplex mit FKBP (*FK506 Binding Protein*) 12 und inhibiert die Aktivität des mTORC1 Komplexes bestehend aus mTOR, Raptor (*regulatory associated protein of mTOR*) und dem Adapterprotein mLST8 durch Hemmung der Interaktion von Raptor mit diesem Komplex (Chiu et al., 1994; Sabatini et al., 1994; Oskiro et al., 2004). Raptor ist verantwortlich für die Rekrutierung von S6K1 (*protein S6 kinase*) und 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein-1*) (Haven et al., 2002; Umi et al., 2002).

Verschiedene Studien beschreiben eine proinflammatorische Rolle von PI3K (Arbibe et al., 2000; Sizemore et al., 1999). Demnach erfolgt die Transaktivierung von NF- κ B unabhängig von der Degradation von I κ B α , aber abhängig von PI3K-Signalweg-vermittelter Phosphorylierung von p65. Analog dazu erhöhte die pharmakologische Blockade von PI3K in einem polybakteriellen Sepsismodell die Mortalität infolge der verstärkten Produktion und Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-12 und TNF α (Williams et al., 2004). Für mTOR Inhibition wurde, auf Stimulation mit den Liganden für TLR4 und TLR9 hin, die verminderte Produktion von Typ-I Interferonen, als auch die Reduktion der IL-10 Expression beschrieben (Weinstein et al., 2000; Cao et al., 2008, Schmitz et al., 2008). Die Applikation von Rapamycin resultiert in der Hemmung der Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF7. Cao et al. begründen dies mit der von mTOR und S6K abhängigen Interaktion des Adaptermoleküls MyD88 mit der zytoplasmatischen TIR Domäne von TLR9. Gegenteilige Effekte sind für Rapamycin behandelte Monocyten beschrieben. Die erhöhte Produktion der Zytokine IL-12 und IL-6 wird hier auf die verstärkte Phosphorylierung und Degradation von I κ B α und die resultierende verstärkte nukleäre Translokation von NF- κ B zurückgeführt (Guka und Machman, 2002; Weichhart et al., 2008). Insgesamt deuten die bisherigen Studien auf unterschiedliche PI3K regulierte Signalwege, abhängig vom Zelltyp und Organismus hin (Hazeki et al., 2007).

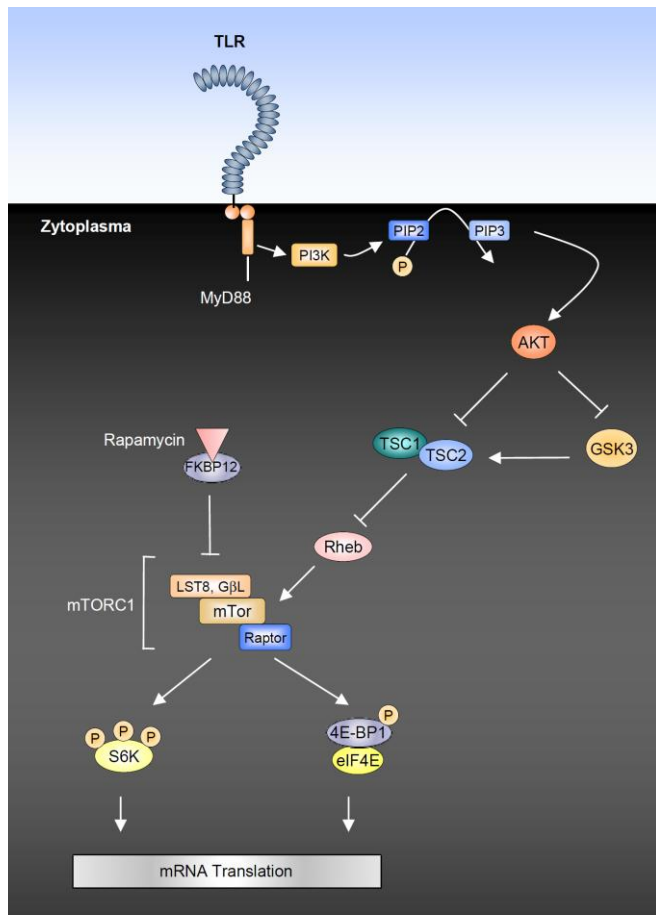


Abbildung 3: TLR abhängige Aktivierung von mTOR. TLR aktivierte PI3K aktiviert über PIP2 Phosphorylierung AKT. AKT Inhibition des Negativregulators GSK3 führt zur Hemmung des aus TSC1 und TSC2 bestehenden TSC Komplexes. Die inhibierende Wirkung des TSC Komplexes auf Rheb wird aufgehoben, die GTPase induziert. Rheb aktiviert den aus mTOR, LST8 /GβL) und Raptor bestehenden Komplex mTORC1. mTORC1 rekrutiert und phosphoryliert S6K und 4E-BP. S6K induziert mRNA Translation, während 4E-BP Phosphorylierung zur Freisetzung des Cap-bindenden Proteins eIF4E und zur verstärkten Bildung von Translations-Initiations-Komplexen Cap-abhängig regulierter mRNAs führt. 4E-BP1, *eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein-1*; AKT, *protein kinase B*; GβL, *mammalian LST8/G-protein β-subunit like protein*; mLST8/GβL *mammalian LST8/G-protein β-subunit like protein*; mTOR, *mammalian Target of Rapamycin*; PI3K *phosphatidylinositol-3-kinase*; PIP₂, *phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate*; PIP₃, *phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*; Raptor, *regulatory associated protein of mTOR*; Rheb, *Ras-homolog-enriched-in-brain*; S6K1, *protein S6 kinase*; TSC, *Tuberous Sclerosis Complex*.

1.6. Zytoplasmatische Mustererkennungsrezeptoren

Die Pathogenerkennung durch Toll-like Rezeptoren erfolgt entweder an der Zelloberfläche, oder in lysosomalen/endosomalen Kompartimenten. Für die Erkennung und Reaktion auf ins Zytoplasma eingedrungene Pathogene sind spezielle, zytoplasmatisch lokalisierte Mustererkennungsrezeptoren verantwortlich. Die bis heute bekannten Rezeptoren lassen sich in zwei Gruppen zusammenfassen: RLRs (RIG-I like Receptors) und NLRs (*NOD-like receptors*).

1.6.1. RIG-I like Rezeptors (RLRs)

Cytoplasmatisch vorliegende virale dsRNA entzieht sich der Erkennung durch endosomal lokalisierten TLR3. Tatsächlich begegnen viele Zellen einer viralen Infektion mit TLR3 unabhängiger Produktion von Typ-I Interferonen, jenen essentiellen Mediatoren antiviraler Immunantworten. Fibroblasten und cDCs zeigten TLR unabhängige Produktion von Typ-1

Interferonen (Kato et al., 2005). Diese Befunde führten zur Identifikation einer weiteren Gruppe von PRRs, den cytoplasmatisch lokalisierten RLRs (*RIG-I like Rezeptors*).

Die RLRs umfassen eine Familie cytoplasmatischer Proteine bestehend aus drei Mitgliedern, RIG-I (auch DDX58), MDA5 (auch Helicard oder IFH1) und LGP2 (*laboratory of physiology-2*) (Yoneyama et al., 2004; Kang et al., 2002; Yoneyama et al., 2004b; Rothenfusser et al., 2005). RIG-I und MDA5 setzen sich aus zwei N-terminalen CARD Domänen (*caspase-recruitment domains*), einer DExD/H Box RNA Helikase Domäne sowie einer C-terminalen Repressor Domäne (RD) zusammen. LGP2 zeichnet sich durch das Fehlen der CARD Domäne aus und wird als Negativregulator von RIG-I und MDA-5 impliziert (Venkataraman et al., 2007). RLRs erkennen cytoplasmatisch vorliegende virale RNA. Während MDA5 dsRNA (ds: *double stranded*) erkennt, unter anderem poly(I:C), erfolgt RIG-I induzierte Produktion von Typ-I Interferonen vorwiegend auf Stimulation mit ssRNA (ss: *single stranded*). dsRNA findet sich sowohl in Zellen infiziert mit dsRNA Viren als auch als Zwischenprodukt im Replikationszyklus von ssRNA Viren, nicht jedoch in nicht-infizierten Wirtszellen. Einzelsträngige virale RNA zeichnet sich, im Gegensatz zu wirtseigener RNA, durch das Fehlen von Kappenstrukturen am 5' Ende aus. Die freiliegenden Triphosphatreste am 5' Ende der RNA sind so für die spezifische Erkennung wirtsfremder RNA verantwortlich (Hornung et al., 2006). Weitere Veröffentlichungen beschreiben die längenspezifische Erkennung doppelsträngiger RNA durch beide Rezeptoren (Kato et al., 2008). So erkennt RIG-I exklusiv dsRNAs bis zu einer Länge von 1kb, während größere Nukleinsäurefragmente ausschließlich der Erkennung durch MDA5 unterliegen. Für RIG-I konnte die direkte Interaktion der RNA-Liganden mit der basischen Oberfläche der RD-Domäne gezeigt werden (Cui et al., 2008; Takahashi et al., 2008). Die Erkennung viraler RNA durch RLRs führt zur Induktion spezifischer Signalkaskaden die in der Induktion sowohl des Transkriptionsfaktors NF- κ B als auch in der Aktivierung der IRFs 3 und 7 enden. Nach Ligandenbindung assoziieren RIG-I und MDA5 über CARD-CARD Domänen Interaktion mit dem Adapterprotein IPS-1 (*IFN- β promotor stimulator-1*, auch Cardif (*CARD adapter inducing IFN- β*) genannt (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005). IPS-1 rekrutiert und bindet TRADD (*TNFR-associated death domain*) (Michallet et al., 2008). Der sich weiter ausbildende Komplex umfasst FADD (Fas-associated death domain-containing protein), RIP1 (*recetor interacting protein 1*) und TRAF3 (*TNF-receptor associated factor 3*). Die nachfolgend aktivierten Kinasen TBK1 (*TRAF family member-associated NF- κ B activator* (TANK) *binding kinase 1*) und IKK-I (*inducible I κ B kinase*, auch IKK ϵ) vermitteln die Phosphorylierung von IRF3 und IRF7 (Fitzgerald et al., 2003; Perry et al., 2004; Hemmi et al., 2004). Die phosphorylierungsaktivierten IRFs translozieren als Homo- oder Heterodimere in den Zellkern und induzieren dort durch spezifische Promotorbindung die Produktion von Typ-I Interferonen (Honda et al., 2005; Honda et al., 2006). RLR induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B erfolgt ebenfalls abhängig von IPS-1, TRADD und

FADD. Die Interaktion von FADD mit den Caspasen-8 und -10 zeigt sich elementar für die Aktivierung von NF-κB (Takahashi et al., 2006).

Wie eben für virale RNA beschrieben, gibt es Befunde für die TLR unabhängige Erkennung viraler DNA. So induziert zytoplasmatische DNA die Produktion von Typ-1 Interferonen, unabhängig von MyD88, TRIF und IPS-1, jedoch abhängig von den Signalmolekülen TBK1 und IKK-i (Stockinger et al., 2004; Ishii et al., 2006). In neuerer Zeit wurden einige Moleküle als potentielle zytoplasmatische Rezeptoren viraler DNA impliziert. Eine Studie zeigt, dass DAI (DNA abhängiger Aktivator von IRFs), der bereits als Z-DNA bindendes Protein bekannte Rezeptor ZBP1 (*Z-DNA binding protein 1*, oder DLM-1), für die DNA-induzierte Produktion von Typ-I Interferonen verantwortlich sein soll (Takaoka et al., 2007). Die Bindung von dsDNA an DAI führt zur Aktivierung von IRF3 durch direkte Interaktion von TBK1 und IRF3.

Einen weiteren Rezeptor für zytoplasmatische DNA stellt das jüngst identifizierte Protein AIM-2 (*absent in melanoma 2*) dar (Roberts et al., 2009; Hornung et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Bürckstümmer T et al., 2009). Seine Hauptfunktion besteht in der Aktivierung von Caspase-1. Zu klären bleibt, ob dieser Rezeptor in der Lage ist, die Produktion von Typ-I Interferonen zu induzieren.

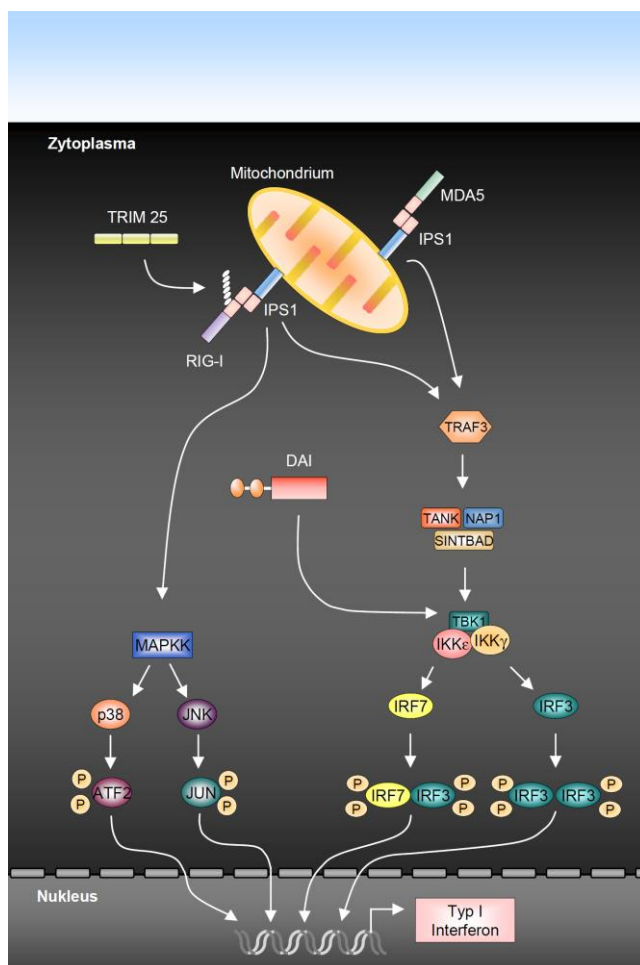


Abbildung 4: Signaltransduktionsereignisse zytoplasmatischer Nukleinsäurerezeptoren. Die Erkennung zytoplasmatischer Fremd-RNA erfolgt über zwei Mitglieder der RLR Familie: RIG-I und MDA5. Die E3-Ubiquitin-Ligase TRIM25 induziert die Ubiquitinierung von RIG-I und gewährleistet somit dessen Funktionalität. Die Assoziation mit dem mitochondrial verankerten Adaptermolekül IPS1 erfolgt über die CARD Domäne der RLRs. IPS1 bindet an die E3-Ubiquitin Ligase TRAF3 und aktiviert die IKK-verwandten Kinasen TBK1 und IKKε. Diese phosphorylieren und aktivieren die IRFs 3 und 7 und induzieren so die Expression von Typ I Interferonen. Die Aktivierung der MAPK p38 und JNK erfolgt IPS1 abhängig. Die Erkennung zytoplasmatisch vorliegender Fremd-DNA wird, unter anderem, von DAI (auch ZBP1) vermittelt. Die Aktivierung von TBK1 führt zur Phosphorylierung und Induktion von IRF3. ATF2, *activating transcription factor 2*; CARD, *caspase-recruitment domain*; DAI, *DNA-dependent activator of IRFs*; IFN, *interferon*; IKK, *IκB kinase*; IPS1, *IFNβ-promotor stimulator 1*; JNK, *JUN N-terminal kinase*; MDA5, *melanoma differentiation-associated gene 5*; NAP1, *NAK-associated protein 1*; RIG-I, *retinoic acid-inducible gene 1*; RLR, *RIG-I like receptors*; SINTBAD, *similar to NAP1 TBK1-binding protein*; TAB, *TAK1-binding protein 1*; TANK, *TRAF-family-member-associated NF-κB activator*; TBK, *TANK-binding kinase*; TIR, *Toll/IL-1 receptor*; TRAF, *TNF-receptor-associated factor*; TRIM25, *tripartite-motif-containing 25*. Modifiziert übernommen aus: Latz, E. und Fitzgerald, KA, *Innate immunity: sensing and signalling. Nat Rev Immunol.*, 2008.

1.6.2. NOD-like Rezeptoren

In das Zytoplasma eingedrungene PAMPs entziehen sich der Erkennung durch TLRs. Eine Reihe zytoplasmatischer PRRs ist für die Erkennung zytoplasmatisch vorliegender PAMPs verantwortlich. Zu ihnen wird die Familie der NLRs (*NOD-like receptors*) gerechnet. Aktuell umfasst die Familie der NLRs 23 Mitglieder im Menschen und 34 in der Maus. Diese sind in zwei Hauptgruppen unterteilbar: NOD- (Nukleotidbinde-Oligomerisierungsdomäne) Rezeptoren und NALPs (NACHT-, LRR- und Pyrin-Domänen enthaltende Proteine). Kleine Untergruppen bilden NAIP (*Neuronal apoptosis inhibitory protein*), IPAF (*ICE -protease activating factor*) und CIITA (Ye et al, 2008; Dostert et al., 2008; Mariathasan et al., 2007). Die spezifische Struktur der NLRs umfasst eine zentrale Nukleotid-Bindedomäne, genannt NACHT-Domäne. Sie ist N-Terminal von einer Protein Bindedomäne (CARD (*caspase-recruitment domain*), PYD (*pyrin domain*) oder BIR (*Baculovirus IAP repeat*) flankiert. C-Terminal findet sich eine LRR Domäne. Die Nomenklatur dieser Moleküle setzt sich aus dem Begriff NLR sowie dem Anhang P oder C für die Bezeichnung der respektiven Protein-Interaktionsdomäne PYD oder CARD zusammen. NAIPs enthalten BIR Domänen.

Die ersten NLRs denen eine Rolle bei der zytoplasmatischen Erkennung von PAMPs nachgewiesen werden konnte, waren NOD1 und NOD2. Beide erkennen bakterielle Produkte. Während für NOD1 das Peptidoglykan-Derivat γ -D-glutamyl-meso-diaminopimeliv Säure (iE-DAP) beschrieben ist, fungiert NOD2 als Sensor für MDP (Muramyl Dipetid) einem Peptidoglykanbestandteil sowohl grampositiver als auch gramnegativer Bakterien (Inohara et al., 2003).

Auf LRR abhängige Ligandenerkennung bilden NODs Oligomere, die zur raschen Rekrutierung und CARD-CARD vermittelten Bindung der Serin/Threonin Kinase RIP2 (*receptor interacting protein 2*, auch RICK genannt) führen (Meylan et al., 2005; Park et al., 2007). Die Bindung von IKK an den Komplex bestehend aus NOD1-RIP2, beziehungsweise NOD2-RIP2, führt zur Aktivierung von NF- κ B und MAPK (Girardin et al., 2001; Strober et al., 2006). Studien implizierten die Ubiquitylierung von RICK als essentiellen Schritt für die Rekrutierung von TAK1 einer für die Aktivierung von MAPK elementaren Kinase (Hasegawa et al., 2008; Hitotsumatsu et al., 2008). Während die Ubiquitylierung von RICK im NOD2 abhängigen Signalweg abhängig von der E3 Ligase TRAF6 zu sein scheint, wird sie in NOD1 induzierter Signalgebung bevorzugt durch TRAF2 und TRAF5 vermittelt. Einen weiteren Unterschied stellt die exklusiv über NOD1 induzierte Aktivierung von JNK dar (Girardin et al., 2006).

NALPs

Einige NALPs, aber auch IPAF und NAIP, sind in die Aktivierung proinflammatorischer Prozesse involviert. Dies erfolgt durch Bildung eines großen heterogenen Multiproteinkomplexes, dem sogenannten Inflammasom. Diese Komplexe setzen sich allgemein aus NALP1, NALP2 oder NALP3 dem Adaptermolekül ASC (*apoptosis associated speck -like protein containing a CARD*) und der Cystein Protease Caspase-1 zusammen. Letztere wird durch die Komplexbildung aktiviert und prozessiert durch Spaltung die zytosolisch vorliegenden Pro-Formen der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-18 und IL-33. Bis heute ist die Bildung dreier NALP abhängiger Inflammasomen beschrieben, die mehr oder weniger gut charakterisiert sind.

Das NALP1 induzierte Inflammasom war das erste, dem ein direkter Ligand, MDP (Muramyl Dipeptid), zugewiesen werden konnte (Faustin et al., 2007; Bruey et al., 2007). Als einziges NALP über eine C-terminale CARD Domäne verfügend, rekrutiert NALP1 Caspase-5 in den Proteinkomplex (Martinon et al., 2004). Auch die direkte Interaktion und Aktivierung von und mit Caspase-1 wurde gezeigt. Die Rekrutierung des Adaptermoleküls ASC an die N-terminale PYD Domäne trägt zur Verstärkung der NALP1 induzierten Caspase-1 Induktion bei. Die Aktivierung des NALP1 Inflammasoms wird durch direkte Bindung der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X1 mit dem Rezeptor inhibiert.

Das NALP3 Inflammasom stellt das am besten charakterisierte Inflammasom dar. Seine Aktivierung wird durch eine Reihe chemisch und strukturell unterschiedlicher Stimuli induziert. Biochemische Untersuchungen zeigen die Assoziation von NALP3 mit ASC, CARDINAL und Caspase-1 als Bestandteile des NALP3 Inflammasoms (Martinon et al., 2002; Agostini et al., 2004). Die funktionelle Bedeutung von CARDINAL ist bis heute nicht bekannt und fragwürdig, da beispielsweise kein Homolog von CARDINAL in der Maus bekannt ist, folglich die Bildung des murinen NALP3 Inflammasoms ohne CARDINAL erfolgt. Eine Vielzahl von Studien zeigen die NALP3 abhängige Aktivierung von Caspase-1 auf eine Vielzahl von mikrobiellen als auch nicht-mikrobiellen Stimuli hin. Neben der Erkennung klassischer PAMPs werden zunehmend mehr Liganden für NALPs impliziert, die nicht unmittelbar auf Pathogenbestandteile zurückzuführen sind. Vielmehr handelt es sich hier um wirtseigene Komponenten, wie Proteine, die aufgrund von Modifikation oder Fehllokalisation auf die Aufhebung der zellulären Integrität schließen lassen und so als Gefahrensignale, so genannte DAMPs (*danger associated molecular patterns*) Immunantworten induzieren. LPS und hohe Mengen extrazellulären ATPs, letztere hervorgerufen durch zellulären Stress, führen zu NALP3 abhängiger Caspase-1 Aktivierung (Mariathasam et al., 2006; Sutterwala et al., 2006). Dabei vermittelt ATP durch Bindung an den P2X7 Rezeptor die Bildung von Pannexin-1 Kanälen in der Zellmembran (Pelegriin et al., 2006; Pelegriin et al., 2007). Eine Reihe weiterer Membranporen induzierender Substanzen ist für NALP3 abhängige Caspase-1 Aktivierung beschrieben. Dazu zählen das bakterielle Kalium Ionophor Nigericin und bakterielle

porenformende Toxine wie Listeriolysin O aus *Listeria monocytogenes*, Aerolysin aus *Aeromonas hydrophila* und *Staphylococcus aureus* Hemolysin (Gurcel et al., 2006). Weitere NALP3 Inflammassom aktivierende Substanzen sind bakterielle RNA und die antiviralen Imidazoquinoline R837 und R848 (Kanneganti et al., 2006; Kanneganti et al., 2006b). Studien jüngerer Zeit zeigten die Aktivierung des NALP3 Inflammassoms durch Kristallstrukturen wie Harnsäurekristalle und Kalzium Pyrophosphat Dihydrat, den Verursachern der Gicht (Martinon et al., 2003). Kristalline Silizium und Asbeststrukturen wirkten ebenso induzierend auf NALP3 abhängige IL-1 β Sekretion wie beispielsweise das Adjuvanz Aluminium Hydroxid (Alum) oder das an der Pathogenese von Alzheimer beteiligte fibrilläre Amyloid- β (Dostert et al., 2008; Cassel et al., 2008; Hornung et al., 2008; Eisenbarth et al., 2008; Halle et al., 2008).

Obwohl eine Vielzahl von Substanzen mit der Aktivierung des NALP3 Inflammassoms in Verbindung gebracht werden, bleibt der genaue Ligand für NALP3 weiter unbekannt. Es wird vermutet, dass die bisher beschriebenen Induktoren lediglich einen Mechanismus in Gang setzen der in die Aktivierung des Inflammassoms mündet. Zwei grundlegende Theorien zum Mechanismus der durch Porenbildung vermittelten Aktivierung des NALP3 Inflammassoms werden diskutiert: Einerseits könnte die Zerstörung der Zellmembran zur Modifikation oder Freisetzung endogener Moleküle führen (Ogura et al., 2006; Sutterwala et al., 2007). Andererseits wird der durch Membrandurchlässigkeit vermittelte Eintritt mikrobieller Moleküle in das Zytosol diskutiert (Kanneganti et al., 2007). Kürzlich wurde gezeigt, dass die kristallinduzierte Zerstörung von Lysosomen zur Freisetzung von Cathepsin B führt und so zur NALP3 abhängigen Induktion von Caspase-1 beiträgt (Hornung et al., 2008). Ob Cathepsin B selbst ein Ligand von NALP3 ist, oder aber durch proteolytische Aktivität direkt oder indirekt Einfluss auf den Inflammassomkomplex nimmt, bleibt zu klären. Zwei weitere Ereignisse werden ebenfalls als essentieller Bestandteil NALP3 vermittelter Inflammassombildung gewertet. Dieses sind der Ausstrom intrazellulären Kaliums aus der Zelle und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Pétrili et al., 2007; Cruz et al., 2007; Dostert et al., 2008, Cassel et al., 2008). Ihre genaue Funktion bleibt jedoch zu klären. Andere NLRs wie z.B. IPAF (ICE-Protease aktivierender Faktor) vermitteln die Reaktion auf zytoplasmatisch vorliegendes Flagellin (Miao et al., 2006; Franchi et al., 2006). Durch die Rekrutierung von ASC und die Assemblierung des Inflammassoms kommt es zur Aktivierung von Caspase-1 und der daraus resultierende Prozessierung und Freisetzung von IL-1 β , IL-18 und IL-33. Die Aktivierung des IPAF-Inflammassoms führt des Weiteren zur schnellen Induktion von Zelltod. Dieser ist, im Gegensatz zur Regulation von IL-1 β , unabhängig von ASC. Die Entkopplung beider Mechanismen beruht möglicherweise auf der Interaktion mit einer weiteren Caspase, eventuell direkt über die N-terminale CARD Domäne von IPAF (Mariathasan et al., 2004). Für IPAF konnte die Interaktion mit weiteren NLRs gezeigt werden. Für den C-Terminus des Flagellins von *Legionella pneumophila* wurde gezeigt, dass die wahrscheinlich ligandeninduzierte Interaktion von

IPAF und NAIP5 die Voraussetzung für die Bildung eines Inflammasoms ist (Zamboni et al., 2006; Lightfield et al., 2008). Das jüngste Mitglied der Familie der inflammasominduzierenden Proteine ist das Pyrin-Domänen enthaltende Protein AIM2 (Roberts et al., 2009; Hornung et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Bürckstümmer T et al., 2009). Die AIM2 abhängige Erkennung zytoplasmatischer DNA führt zur Bildung eines ASC abhängigen Inflammasoms und folgend zur Induktion von Caspase-1, sowie zum DNA-Virus vermittelten Zelltod. In Überexpressionsversuchen konnte die AIM2-ASC abhängige Induktion eines NF- κ B Reportergens gezeigt werden (Hornung et al., 2009). Inwiefern AIM2 tatsächlich an der Induktion der Genexpression proinflammatorischer Zytokine oder gar an der Produktion der für die Virusabwehr notwendigen Typ-I Interferone beteiligt ist, bleibt zu klären. Aufgrund des breiten Spektrums an NALP Liganden und der Existenz einer Vielzahl weiterer, bisher in ihrer Funktion unbekannter NLRs wird die Bildung weiterer NLR-NLR Rezeptorkomplexe vermutet. Neben der Prozessierung spezieller Zytokine und der Induktion von Zelltod, beispielsweise der Caspase-1 abhängigen Pyroptose wird auch die direkte Genaktivierung durch NALPs diskutiert. Als möglich wird auch die direkte TLR induzierte Aktivierung von NLRs, beispielsweise durch ROS betrachtet. Obwohl bisher noch keine TLR initiierte NLR aktivierende Signalkaskade identifiziert werden konnte, ist ein anderer Synergismus zwischen TLR und NLR vermittelter Immunantworten unbestritten. So stellt die TLR abhängigen Genexpression und Akkumulation von pro-IL-1 β , pro-IL18 und proIL-33 im Zytoplasma die Grundvoraussetzung für Inflammasom vermittelte Prozessierung und Sekretion dieser proinflammatorischen Zytokine dar. Inwieweit dabei TLRs auch für die Regulation der Expression Inflammasom-beteiligter Komponenten verantwortlich sind, ist noch offen.

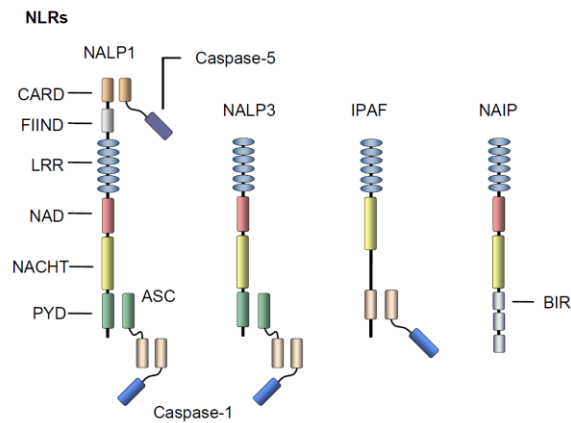
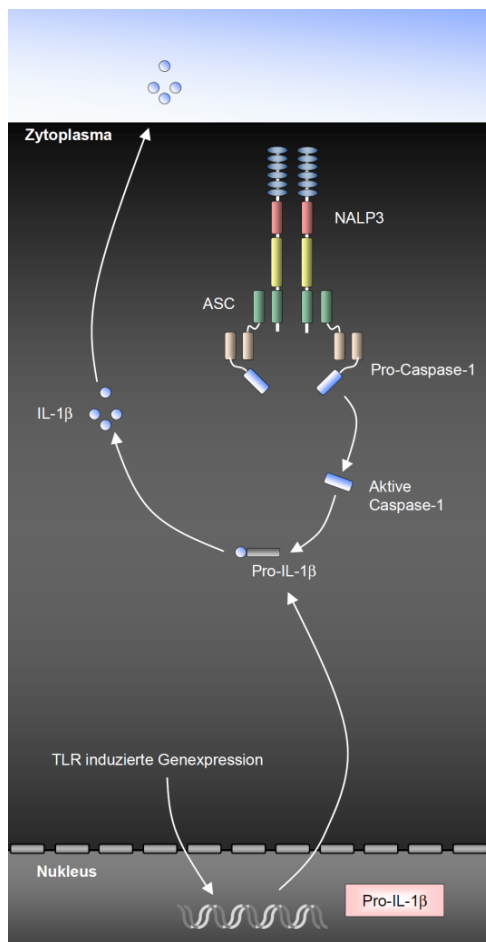


Abbildung 5: (A) NALP Inflammasom abhängige Prozessierung von IL-1 β . NALP3 Aktivierung induziert die Assoziation mit dem Adaptermolekül ASC. ASC rekrutiert und bindet Pro-Caspase-1. Autokatalytisch gespaltene Caspase-1 katalysiert die proteolytische Prozessierung und Aktivierung von Pro-IL-1 β . (B) Strukturelle Unterschiede zwischen ausgewählten Vertretern der NLR Familie. ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD; BIR, baculoviral IAP repeat; CARD, caspase-recruitment domain; FIIND, function-to-find domain; IPAF, ICE-protease activating factor; LRR, leucine rich repeat; NACHT, domain present in NAIP, CIITA, HET-E and TP1; NALP, NACHT-, LRR- and PYD-domain containing protein; NAIP, neuronal apoptosis inhibitory protein. Modifiziert übernommen aus: Latz, E. und Fitzgerald, KA, Innate immunity: sensing and signalling. *Nat Rev Immunol.*, 2008.

1.7. STATs

Für die Kommunikation und Koordination immunrelevanter Zellen bei der Organisation von Immunantworten ist eine Reihe löslicher Mediatoren verantwortlich. Weitreichende Kommunikation zwischen Zellen wird allgemein durch Zytokine vermittelt. Die Signalübertragung vieler Zytokine erfolgt über die Zelloberflächenrezeptoren-vermittelte Aktivierung von STATs (*signal transducer and activator of transcription*).

1.7.1. STAT Familie

Die Familie der STATs enthält sieben Mitglieder in Vertebraten: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 (Levy et al., 2002). STAT Proteine werden in fünf funktionelle Motive unterteilt: eine N-terminale Dimerisierungsdomäne, eine für Protein - Protein Interaktion relevante Coiled-Coiled Domäne, eine zentrale DNA Bindedomäne, eine SH2 Domäne (*SRC homology*) und eine C-terminale Transaktivierungsdomäne. Aktivierung von STATs durch

Tyrosin-Phosphorylierung führt, über Tyrosin-SH2 Domänen Wechselwirkung, zur Ausbildung von Dimeren und zur nukleären Translokation und spezifischen Promotorbindung. Obwohl nicht aktivierte STATs ebenfalls in der Lage sind Homodi- oder tetramere auszubilden, ist es nur der Tyrosin-phosphorylierte Struktur möglich, an die spezifischen Konsensussequenzen der Zielgene zu binden (Becker et al., 1998; Chen et al., 1998; Mao et al., 2005; Neculai et al., 2005). Jedoch wird die Möglichkeit diskutiert, dass unphosphorylierte STATs ebenfalls befähigt sind, regulierend in die Expression bestimmter Gene einzugreifen. So ist die Interaktion aus unphosphoryliertem STAT1 und IRF1 verantwortlich für die konstitutive Expression von LMP2 (*low molecular mass polypeptide 2*) (Chatterjee-Kishore et al., 2000).

Die Regulation einiger Mitglieder der STAT Familie, STAT1, STAT3, STAT4, STAT5a und STAT5b erfolgt zusätzlich über die Phosphorylierung eines spezifischen, in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne lokalisierten Serins (Horvath et al., 2000). Beschrieben ist die Serin abhängige Erhöhung Tyrosin vermittelter Genexpression, wobei die Serinphosphorylierung weder für die nukleäre Translokation benötigt wird noch die Promotorbindung beeinflusst (Wen et al., 1997; Wen et al., 1995). Vielmehr scheint die durch Serin Phosphorylierung verbesserte Rekrutierung und Interaktion mit transkriptionsregulierenden Co-Aktivatoren, wie p300 und CBP (*cAMP responsive-element-binding protein (CREB) binding protein*) zur Verstärkung der Histon Acetylierung und einer Neuorganisation der Chromosomenstruktur zu führen (Varinou et al., 2003).

Die Aktivierung von STATs erfolgt vornehmlich durch rezeptorgebundene Tyrosin-Kinasen der JAK (Janus Kinasen) Familie. Vier Vertreter dieser Familie sind bekannt (JAK1, JAK2, JAK3 und TYK2) und in ihrer spezifischen Interaktion mit Zytokinrezeptoren beschrieben. Ihre ligandeninduzierte Aktivierung vermittelt die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Rezeptordomäne und initiiert so die Rekrutierung und Phosphorylierung des STAT Proteins (Greenlund et al., 1995).

Auch G-Protein gekoppelte Rezeptoren induzieren JAK abhängige STAT Aktivierung beispielsweise durch Bindung von RANTES (Wong et al., 1998). Möglich ist auch die Phosphorylierung von STATs durch nicht rezeptorgebundene onkogene Tyrosin Kinasen. Diese durch chromosmale Translokation generierten Kinasen, wie v-Src oder BCR-ABL sind meist viralen Ursprungs und für die Aktivierung von STAT3 und STAT5 beschrieben (Bowman et al., 2000; Danial et al., 2000).

1.7.2. STAT3

STAT3 wurde 1994 als APRF (*acute phase response factor*) kloniert (Akira et al., 1994). Die Aktivierung durch IL-5, IL-6, IL-10, IL-11, EGF (*epidermal growth factor*), LIF (*leukemia inhibitory factor*), Oncostatin M und CNF (*ciliary neurotrophic factor*) führt zur schnellen Tyrosin-Phosphorylierung durch rezeptorassoziierte JAK-Kinasen (Lutticken et al., 1994). Aktives STAT3 induziert als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen, deren Produkte beispielsweise die Proliferation, das Überleben, die Differenzierung oder die Entwicklung der Zelle kontrollieren. Verstärkung erfährt die STAT3 vermittelte Genexpression durch zusätzliche Serin-Phosphorylierung des Moleküls. Dabei wurden, abhängig von den auslösenden Zytokinen und Wachstumsfaktoren, verschiedene für die STAT3 Serin Phosphorylierung verantwortliche Kinasen beschrieben (Ceresa et al. 1997; Wierenga et al. 2003; Kojima et al. 2005). So vermittelt Insulin induzierte Signalübertragung die MEK abhängige Serin-Phosphorylierung von STAT3. Weitere beschriebene STAT3 Serin Kinasen sind, je nach zellulärem Kontext, PKC (Protein Kinase C), JNK, ERK1/2 und mTOR (Decker und Kovarik, 2000; Rajan et al., 2003).

Weiterhin wurde gezeigt, dass als Antwort auf bestimmte PAMPs, aber auch Stressoren, wie beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) oder UV Bestrahlung, STAT3 auch ohne vorhergehende Tyrosin-Phosphorylierung an Serin 727 phosphoryliert werden kann (Lim und Cao, 1999).

Die genaue Rolle der Serin Phosphorylierung von STAT3, speziell jener in Abwesenheit der Tyrosin-Phosphorylierung, bleibt jedoch offen. Ein ähnlicher Mechanismus der verstärkten Co-Aktivatorproteinbindung, wie schon für STAT1 beschrieben, wird vermutet. Beschrieben ist ebenfalls eine direkte Einflussnahme der Serin-Phosphorylierung auf den Grad der Tyrosin-Phosphorylierung des Moleküls (Chung et al., 1997).

Einen weiteren Regulationsmechanismus für STAT3 stellt die Acetylierung der Aminosäure Lysin an Position 685 dar. So konnte gezeigt werden, dass die zytokininduzierte Acetylierung kritisch für die Bildung stabiler STAT3 Dimere und somit durch verbesserte DNA Bindung regulierend auf die Transkription bestimmter Gene wirkt (Yuan et al., 2005). Alternatives Splicing des STAT3 Genproduktes resultiert in der Expression zweier Isoformen, STAT3 α und STAT3 β (Caldenhoven et al., 1996). Überexpressionsexperimente als auch Untersuchungen an STAT3 β defizienten Mäusen zeigten eine Rolle von STAT3 β als Negativregulator STAT3 vermittelter Genexpression. Neben seiner Rolle als Transkriptionsfaktor wurde STAT3 als Adaptermolekül beschrieben. Nach Bindung an einen konservierten Bereich des zytoplasmatischen Restes des IFNAR1 (Interferon 1 Rezeptor) und Interferon abhängiger Tyrosin Phosphorylierung erfolgte die Rekrutierung und folgende Aktivierung der regulatorischen Untereinheit der PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) an STAT3 (Pfeffer et al., 1997).

1.8. Ziel der Arbeit

Das zentrale Ereignis in TLR vermittelter Signalgebung ist die Rekrutierung der Adapterproteine MyD88 und TRIF an die zytoplasmatischen TIR-Domänen aktivierter TLRs. Die Zahl weiterer, bisher als Interaktoren dieser Domänen beschriebene Proteine ist gering. Die Identifikation neuer, bisher unbekannter TIR-bindender Proteine könnte Hinweise auf die selektiv über die einzelnen TLRs induzierten Signalwege und die daraus resultierende abweichende Genexpression liefern, aber auch zum besseren Verständnis zelltypabhängiger Abweichungen im TLR vermittelten Genexpressionsmuster beitragen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung eines neuen, bisher unbekanntes Interaktors mit der zytoplasmatischen Domäne von TLRs und die Identifikation seiner Funktion in der TLR induzierten Signalgebung. Das zu charakterisierende Protein, STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*), war in noch unveröffentlichten Studien bei der Durchsichtung einer cDNA Genbank nach bislang unbekanntes Interaktionspartnern der intrazellulären Domäne des humanen TLR1 mithilfe des LexA Hefe-Zwei-Hybrid Systems, gefunden worden. In einem ersten Schritt sollte die gefundene Interaktion mittels des Hefe-Systems bestätigt und gegebenenfalls auf weitere TLRs erweitert werden. Die so gewonnenen Befunde sollten hinsichtlich der Übertragbarkeit auf Säugerzellen untersucht und mögliche Interaktionen mittels Co-Immunopräzipitation verifiziert werden. Weiterhin galt es die Rolle von STAT3 im Kontext von TLR vermittelter Signalgebung zu klären. Dazu zählten die Gruppierung des Proteins in bisher bekannte TLR abhängige Signalkaskaden, sowie die Identifikation möglicher aktivierender Moleküle, wie Kinasen, als auch die Klärung der funktionellen Relevanz der detektierten Interaktionen. Neben der Identifikation der auf TLR Stimulation STAT3 abhängig induzierten Gene mittels GeneArray wurde die Bedeutung eines der Kandidaten, PAI-2, im zellulären Kontext erfasst und seine Effekte mechanistisch analysiert. Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde führen zur Positionierung von STAT3 in die unmittelbar durch TLR Aktivierung vermittelte Signalgebung und zeigen seine Rolle als wichtiger Regulator der angeborenen Immunität.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

BioFuge fresco	Heraeus
MegaFuge 1.RS	Heraeus
CyAn ADP LX9 Analyzer	DakoCytomation
Electrophoresis Mighty Small SE250 Vertikal	Hoefler
Elektroporator Gene Pulser	Bio-Rad
Entwicklermaschine Western	AGFA
ELISA Reader Sunrise	Tecan
ELISA Washer	Skatron
FUJI Medical Röntgenfilm	FujiFilm
Gefriertruhe -20°C	Siemens
Gefrierschrank -80°C	Barka
Kühlschrank	Liebherr
Agarose Gel Dokumentation	BioRad
Heizblock Dri-Block DB 2D	Techne
Inkubator HeraCell 240	Heraeus
Mikroskop Zeiss IDO3	Zeiss
Multikanalpipetten	ThermoLabsystems
Multistep Pipette	Eppendorf
Nanodrop [®] ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab
Neubauer Zählkammer	Roth
Orion Microplate Luminometer	Berthold
pH-meter Multical	WTW
Pipetten	Gilson
Pipetboy acu	Integra Biosciences
Plastikzubehör	Nunc, Falcon, BD, Eppendorf
Netzgerät Power Pac 200	Amersham/Bio-Rad
Orbitalschüttler Rotator OV3	Biometra
SDS-PAGE Gelkammer	Amersham

Semi-dry Blotting Apparatur	BioRad
Sterilbank	Heraeus
Thermocycler Trio Thermoblock	Biometra
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Vortexer Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	Lauda
Whatman Papier	Schleicher & Schuell

2.1.2. Chemikalien

Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung 30% 29:1	Roth
Accutase	PAA
Ac-WEHD-CHO	Sigma
Adenosin-5'-Triphosphat (ATP)	Calbiochem
Agarose (Electrophoresis Grade)	Invitrogen
AKT VII Inhibitor	Calbiochem
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma
Ampicillin	Sigma
Bacto-Agar	BD
BAY 117082	Calbiochem
β -Glycerolphosphat	Sigma
β -Mercaptoethanol	Gibco
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
Bromphenolblau	Roth
CpG1668	TIB MolBiol
Desoxytrinukleotide (dNTPs)	Fermentas
D-Galactosamin	Sigma
Difco Hefe Stickstoff Basis	BD
Dimethylsulfid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dulbecco PBS	Biochrom
D-Luciferin	PJK
DTBP	Pierce
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ($\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma
EGTA	Sigma
Ethanol absolut 99,8% (v/v)	Apotheke des MRI

Ethidiumbromid	Roth
FCS	PAA
Flagellin	Invivogen
G418 (Neomycin)	PAA
Galactose	Sigma
Glucose	Sigma
Glycerol	Sigma
HEPES	Sigma
4-Hydroxy Tamoxifen	Sigma
Isopropanol	Apotheke des MRI
Interferon- γ , murin, rekombinant	Peptotec
Kanamycin	Sigma
L-Adenin Hemisulfat L-Arginin HCl	Sigma
L-Histidin HCl Monohydrat	Sigma
L-Isoleucin	Sigma
Lithiumacetat	Sigma
L-Leucin	Sigma
L-Lysin HCl	Sigma
L-Phenylalanin	Sigma
L-Threonin	Sigma
L-Tryptophan	Sigma
L-Valin	Sigma
L-Zell konditioniertes Medium	eigene Herstellung
LPS <i>E. coli</i> O111:B	Sigma
LPS <i>S. minnesota</i> Re595	Sigma
LY294002	Calbiochem
Methanol	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Roth
Milchpulver	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumfluorid (NaF)	Merck
NGS	Invitrogen
Nonident P-40 (IGEPAL CA-630)	Sigma
Pam ₂ CSK ₄ (Di-palmitoyl-cysteinyl-seryl-tetralysin)	EMC Microcollections
Pam ₃ CSK ₄ (Tri-palmitoyl-cysteinyl-seryl-tetralysin)	EMC Microcollections
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma

PBS Dublecco	Biochrom
PD98059	Calbiochem
Penicillin/Streptomycin	PAA
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma
poly(I:C)	Invivogen
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche
Propidiumiodid (PI)	Invitrogen
Rapamycin	Calbiochem
Raffinose	Fluka
Resiquimod (R848)	Coley Pharmaceuticals
Reporter Lysepuffer	Promega
RPMI-Medium	PAA
SB202190	Calbiochem
SDS	Merck
Streptavidin-HRP	R&D Systems
TEMED	Sigma
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma
Tris	Roth
Trinatriumvanadatetrihydrat (Na_3VO_4)	Sigma
Tris Hydrochlorid	Roth
Tween 20	Sigma
U0126	Sigma
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid)	Fermentas
z-VAD	Sigma

2.1.3. Enzyme

Shrimps Alkalische Phosphatase	Fermentas
T4 DNA Ligase	Fermentas
AccuTaq LA DNA Polymerase	Sigma
Pfu DNA Polymerase	Fermentas
GoTaq DNA Polymerase	Promega
Herkulase II	Stratagene

Alle verwendeten Restriktionsenzyme sowie die dazugehörigen Puffern wurden von der Firma Fermentas bezogen.

2.1.4. Kitsysteme

ELISA-Kits	R&D Systems
Liga Fast Rapid DNA Ligation System	Fermentas
NucleoBond Xtra Maxi Plus	Macherey-Nagel
OptEIA TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences Wizard
Plus peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	peqLab
peqGOLD Gel Extraction Kit	peqLab
pGEM-T Vector System	Promega
SV Minipreps DNA Purification Systems	Promega
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
WesternBlot Chemoluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer

2.1.5. Puffer und Lösungen

Alle Puffer wurden mit Millipore Q destilliertem Wasser hergestellt.

<i>PBS</i>	10 g/l pH 7,4	Dulbecco PBS
<i>Ampicillin</i>	100 mg/ml	in 50% Ethanol/H ₂ O bidest.
<i>Kanamycin</i>	10 mg/ml	in H ₂ O bidest.
<i>Neomycin (G418)</i>	60 mg/ml	in H ₂ O bidest.

2.1.5.1. Polymerase-Puffer

AccuTaq LA DNA Polymerase Puffer (10 x)	Sigma
Pfu DNA Polymerase Puffer mit MgSO ₄ (10 x)	Fermentas
GoTaq Polymerase-Puffer (5 x)	Promega

2.1.5.2. Puffer für Agarose-Gelelektrophorese

<i>6 x Ladepuffer</i>	100 mg/l	Bromphenolblau
	100 mg/l	Xylenecyanol
	30% (v/v)	Glycerol
<i>TAE-Puffer</i>	40 mM	Tris-Acetat pH 8,3
	1 mM	EDTA

2.1.5.3. *Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese*

<i>5 x Auftragspuffer</i>	200 mM	Tris-HCl pH 6,8
	400 mM	DTT
	10% (w/v)	SDS
	16% (v/v)	Glycerol
	2 g/l	Bromphenolblau
<i>Trenngel-Puffer</i>	1,5 M	Tris-HCl pH 8,8
<i>Sammelgel-Puffer</i>	2 M	Tris-HCl pH 6,8
<i>Laemmli-Laufpuffer</i>	2,9 g/l	Tris-HCl pH 8,3
	14,4 g/l	Glycin
	1 g/l	SDS

2.1.5.4. *Puffer für Western Blot*

<i>PBT</i>	1 x	PBS
	0,05% (v/v)	Tween 20
<i>Transfer-Puffer</i>	5,8 g/l	Tris
	2,9 g/l	Glycin
	20% (v/v)	Methanol
<i>Blocking-Puffer</i>	1 x PBT	
	3% (v/v)	NGS
	50 g/l	Trockenmilchpulver
<i>Stripping-Puffer</i>	100 mM	Glycin
	10 mM	β -Mercaptoethanol
	pH 2,75	
<i>10 x Tris-Glycin</i>	58 g/l	Tris
	29 g/l	Glycin

2.1.5.5. *Puffer für Zelllyse, Crosslinking und Co-Immunopräzipitation*

<i>Lyse-Puffer 20-150 mM NaCl</i>	50 mM	HEPES pH 7,6
	20 - 150 mM	NaCl
	1 mM	DTT
	1 mM	Na ₂ EDTA
	1 mM	EGTA
	0,5 % (v/v)	Nonident P-40
	10 % (v/v)	Glycerol
	20 mM	β-Glycerolphosphat
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	0,4 mM	PMSF
	1 Tablette	Protease Inhibitor Cocktail (EDTA frei)
	1 mM	NaF

<i>Waschpuffer 20-200 mM NaCl</i>	50 mM	HEPES pH 7,6
	20 - 200 mM	NaCl
	1 mM	DTT
	1 mM	Na ₂ EDTA
	0,5 % (v/v)	Nonident P-40
	10 % (v/v)	Glycerol
	0,4 mM	PMSF
	1 mM	EGTA

<i>Crosslinking-Puffer</i>	1 x	PBS
	1 mM	MgCl ₂
	0,01 % (w/v)	DTBP

2.1.5.6. *Quellpuffer Inflammasomaggregation*

<i>Puffer K</i>	20 mM	HEPES pH 7,5
	10 mM	KCl
	1,5 mM	MgCl ₂
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	0,1 mM	PMSF
	1 Tablette	Protease inhibitor cocktail (EDTA frei)

2.1.5.7. *Puffer für Chromatin-Immunopräzipitation/ChIP*

<i>Run on Lysis Puffer</i>	10 mM	Tris-HCl pH 7,5
	10 mM	NaCl
	3 mM	MgCl ₂
	0,5 % (v/v)	NP-40
	1 mM	PMSF (frisch zugeben)
<i>MNase Puffer</i>	10 mM	Tris-HCl pH 7,5
	10 mM	NaCl
	3 mM	MgCl ₂
	1 mM	CaCl ₂
	4 % (v/v)	NP-40
	1 mM	PMSF (frisch zugeben)
<i>IP Dilution Puffer</i>	20 mM	Tris-HCl pH 8,0
	2 mM	EDTA
	1 % (v/v)	Triton X-100
	150 mM	NaCl
	1 Tablette	Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-frei)
<i>ChIP Wash 1</i>	20 mM	Tris-HCl pH 8,0
	2 mM	EDTA
	1 % (v/v)	Triton X-100
	150 mM	NaCl
	1 mM	PMSF (frisch zugeben)
<i>ChIP Wash 2</i>	20 mM	Tris-HCl pH 8,0
	2 mM	EDTA
	1 % (v/v)	Triton X-100
	0,1 % (w/v)	SDS
	500 mM	NaCl
	1 mM	PMSF (frisch zugeben)
<i>ChIP Wash 3</i>	10 mM	Tris-HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA
	0,25 M	LiCl

MATERIAL UND METHODEN

	0,5 % (v/v)	NP-40	
	0,5 % (w/v)	Deoxycholat	
	1 mM	PMSF (frisch zugeben)	
<i>TE Puffer</i>	10 mM	Tris-HCl	
	1 mM	EDTA	
	pH 8,0		
<i>Elutions Puffer</i>	25 mM	Tris-HCl pH 7,5	
	5 mM	EDTA pH 8,0	
	0,5 % (w/v)	SDS	
<i>Phenol/Chloroform Lösung</i>	25:24:1 (v/v/v)	Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol	
<i>Proteininhibitorlösung</i>	1 Tablette	EDTA freier Proteininhibitor	(Roche)
	1 ml	H ₂ O bidest.	
2.1.5.8. <i>Puffer und Lösungen für Luciferase Reporter Assays</i>			
<i>1 x Reporter Lyse-Puffer</i>	1 ml	5 x Reporter Lysis Buffer	(Promega)
	4 ml	1 x PBS	
<i>Renilla-Substrat</i>	1,1 M	NaCl	
	2,2 mM	Na ₂ EDTA	
	220 mM	KHPO ₄	
	1,3 mM	NaN ₃	
	440 µg/ml	BSA	
	1,43 µM	Coelenterazin, pH 5,0	
<i>Luciferase-Substrat</i>	470 µM	D-Luciferin	
	270 µM	Coenzym A	
	33,3 mM	DTT	
	530 µM	ATP	
	1,07 mM	(MgCO ₃)4Mg(OH) ₂	
	2,67 mM	MgSO ₄	
	20 mM	Tricine	
	0,1 mM	Na ₂ EDTA	
	pH 7,8,	im Dunkeln lagern	

2.1.5.9. *Puffer und Lösungen für ELISA*

<i>PBT</i>	1 x	PBS
	0,05% (v/v)	Tween 2

<i>ELISA Blocking-Puffer</i>	1 x	PBS
	50 g/l	Sucrose
	10 g/l	BSA
	50 mg/l	NaN ₃

<i>Reagent Diluent</i>	1 x	PBS
	10 g/l	BSA

<i>Stopp-Lösung</i>	1 M	H ₂ SO ₄
---------------------	-----	--------------------------------

2.1.5.10. *Puffer Hefeauflschluss*

<i>ACK Lysing Buffer</i>	0,15 M	NH ₄ Cl
	10 mM	KHCO ₃
	0,1 mM	Na ₂ EDTA
	pH 7,2 - 7,4	

<i>Auflschlusspuffer</i>	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	2%	Triton
	1%	SDS

2.1.5.11. *Puffer für die Transformation von S. cerevisiae*

<i>Stocklösungen</i>	10x TE	0,1 M Tris-HCl
	10 mM	EDTA
	pH 7,5	

<i>10x LiAc</i>	1 M	LiAc
	pH 7,5	(einstellen mit verdünnter Essigsäure)

MATERIAL UND METHODEN

<i>50 % PEG</i>	50% (w/v)	PEG 3350 Polyethylenglycol, <i>avg. mol. wt.</i> = 3350 in H ₂ O (sterilfiltriert)
<i>TE/LiAc</i>	1x 1x in	TE LiAc H ₂ O bidest.
<i>PEG/LiAc</i>	50 % 1 x 1 x	PEG TE LiAc

2.1.5.12. Puffer und Lösungen für die Zellkultur

<i>1 x Trypsin-EDTA</i>	5 ml 45 ml	10 x Trypsin-EDTA PBS	PAA
<i>100 x Penicillin-Streptomycin</i>			PAA
<i>100 x Antibiotikum/Antimycotikum</i>			PAA
<i>Neomycin (G418)</i>	60 mg/ml in	H ₂ O bidest.	
<i>2 x HBS</i>	10 g/l 16 g/l 0,74 g/l 0,21 g/l pH 7,1	HEPES NaCl KCl Na ₂ HPO ₄	

2.1.6. Größenstandards

<i>DNA-Größenstandard</i>	Gene Ruler 1kb DNA Ladder	Fermentas
<i>Protein-Größenstandard</i>	PageRuler™ Plus Prestained Proteinladder	Fermentas

2.1.7. Oligonukleotide

Alle Primer für PCR- und Sequenzierungsreaktionen wurden von MWG-Biotech bezogen. Die lyophilisierte DNA wurde in H₂O bidest. gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt. Die nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide fanden in dieser Arbeit Verwendung:

ChIP

Primer	Sequenz
PromPAI-2_F	5'-GTTGAGCTCGTTAGAATTATTTTCAGATTATTATTCCTG-3'
PromPAI-2_RC	5'-CGGAGATCTAAGCTTGCCCTGGATTCACTAGAGATG-3'
Arg2_ChIP_F	5'-CAAGAGGACACTGATGGGG-3'
Arg2_ChIP_RC	5'-GAATTTGCCCGTGGAGGAG-3'

Phosphorylierungsmutanten STAT3

Primer	Sequenz
hSTAT3_S727D_F	5'-CAATACCATTGACCTGCCGATGGACCCCCGCACTTTAGTTCAT TGATGC-3'
hSTAT3_S727D_RC	5'-CATCAATGAATCTAAAGTGCGGGGGTCCATCGGCAGGTCAAT GGTATTGC-3'
hSTAT3_S727A_F	5'-CAATACCATTGACCTGCCGATGGCCCCCGCACTTTAGATT C-3'
hSTAT3_S727A_RC	5'-GAATCTAAAGTGCGGGGGGCCATCGGCAGGTCAATGGTATT G-3'
hSTAT3_Y705F_F	5'-CCAGGTAGCGCTGCCCCATTCCTGAAGACCAAGTTTATCTGTG TGAC-3'
hSTAT3_Y705F_RC	5'-GGTCACACAGATAAACTTGGTCTTCAGGAATGGGGCAGCGCT ACCTG-3'

Deletionsmutanten STAT3

Primer	Sequenz
hSTAT3dint_F	5'-CCAGATTATGCCTCTCCCGAATTCGCCAGCAAGGGGGCCAG-3'
hSTAT3dint_RC	5'-TGGCCCCCTTGCTGGGCGAATTCGGGAGAGGCATAATCTGGC-3'

hSTAT3dalpha_F	5'-CTACAGACTGCAGCCACTGCGGCCTTTGTGGTGGAGCGGC-3'
hSTAT3dalpha_RC	5'-CCGCTCCACCACAAAGGCCGAGTGGCTGCAGTCTGTAG-3'
hSTAT3dbind_F	5'-CGTGGAGCTGTTTAGAACTTAATGAAAAGTTACATCCTGGCCCTT TGGAACGAAG-3'
hSTAT3dbind_RC	5'-CGTTCCAAAGGGCCAGGATGTA ACTTTTCATTAAGTTTCTAAACAGCTCCACG-3'
hSTAT3dSH2_F	5'-GGACAATATCATTGACCTTGTGAAAAAGAATATCCTGGTGTCTCCA CTGGTC-3'
hSTAT3dSH2_RC	5'-CCAGTGGAGACACCAGGATATTCTTTTTTCACAAGGTCAATGATATT GTCCAG-3'
hSTAT3dtail_F	5'-CATGGGCTATAAGATCATGGATGCTACCCTCGAGAAGCTTTGGACT TCTTCGC-3'
hSTAT3dtail_RC	5'-GGCGAAGAAGTCCAAAGCTTCTCGAGGGTAGCATCCATGATCTT ATAGCCCATG-3'

Klonierung STAT3 in retroviralen Vektor

Primer	Sequenz
hSTAT3_pMSCV_Mig R1_F	5'-CTCTAGGCGCCGGAATTAGATCTCTCGAGATGGCCCAA TGAATCAGCTAC-3'
hSTAT3_pMSCV_Mig R1_RC	5'-GGAGAGGGGCGGAATTCTCACATGGGGGAGGTAGCG-3'

Umklonierung STAT3d in pRK7

Primer	Sequenz
hSTAT3 total R_pRK7	5'-GAATTCGCGGCCGCCTATCACATGGGGGAGGTAGCGC-3'
hSTAT3 dtail R_pRK7	5'-GAATTCGCGGCCGCCTAGGTAGCATCCATGATCTTATA GCCCATG-3'
hSTAT3 F_pRK7	5'-GAGGACTTGAATGGGTCGACAATGGCCCAAT GGAATCAGCTACAG-3'
hSTAT3 F_dint_pRK7	5'-GAGGACTTGAATGGGTCGACAATGGCCAGCAAGGGGGCCAG-3'

MATERIAL UND METHODEN

Hefe-Zwei-Hybrid

Primer	Sequenz
MyD88_pEG202_RC	5'-GACTCGAGCGGCCGCCATGGCTAGAGTCAGGGCAGGGACA AGGCCTT-3'
Mut9_pEG202_RC	5'-CAGGTAGCGCTGCCCCATAGGTCTTGGTGTTTATTATC-3'
hSTAT3_pEG202_F	5'-CCGTCGACCATGGCGGCCGCTCGCCCAATGGAATCAGCTACAG CAGC-3'
hSTAT3_pJG4-5_RC	5'-TGG CGA AGA AGT CCA AAG CTT CTC GAG TCA CAT GGG GGA GGT AGG GGC AC -3'
pEG202_TLR2icd_F	5'-CGACTGGCTGGAATTCCCGGGGCGTTTCCATGGCCTGTGGTAT- 3'
pEG202_TLR2icd_R	5'-CAGGTCTGACTCGAGCGGCCGCTAGGACTTTATCGCAGCTCT-3'

Subklonierung

Primer	Sequenz
Gal4_F	5'-GACTCGAGGTCGACAATGAAGCTACTGTCTTCTAT CG-3'
Gal4_RC	5'-CTCTGTCGACCTCGATACAGTCAACTGTCTTTG-3'
FP_pRK7_F	5'-GAATGGGTCGACAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3'
FP_pRK7_RC	5'-GAATTCTGTGACCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGA G-3'
mSerpinb2_F	5'-GACTCGAGGTCGACAATGGAAGAACTTTCCATGGC-3'
mSerpinb2_R	5'-GTAGATTCTCCTCACCTAAGAATTCGCGGCCGCCTCGAGGA-3'

Deletionsmutanten hASC

Primer	Sequenz
hASK-PYD_F	5'-GACTCGAGGTCGACAATGGGGCGCGCGCGC-3'
hASK-PYD_RC_2	5'-TCCTCGAGGCGGCCGCTCACGCCTGCAGCTGCCCCG-3'
hASK_CARD_F	5'-GACTCGAGGTCGACACAGGCCCTCCTCAGTCG-3'
hASK-CARD_RC	5'-TCCTCGAGGCGGCCGCTCAGCTCCGCTCCAGGTC-3'

Genotypisierung

Primer	Sequenz
<i>STAT3 flox/flox</i>	
Primer 1:	5'-ATTGGAACCTGGGACCAAGTGG-3'
Primer 2:	5'-ACATGTACTTACAGGGTGTGTGC-3'
<i>Mx1-Cre</i>	
Primer 1:	5'-GGACATGTTTCAGGGATCGC-CAGGCG-3'
Primer 2:	5'-GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG-3'
<i>IKKβ flox/flox</i>	
IKKb_F	5'-GGAGAGAAGACAAACATAGTG-3'
IKKb_wt_R	5'-GTGTCATCCTTGTAGCCATAGT-3'
IKKb_KO_R	5'-GGGAACTTCCTGACTAGGGG-3'

RT-PCR

Primer	Sequenz
<i>TNF</i>	
069 mTNFa5forward	5'-AAAATTCGAGTGACAAGCCTGTAGC-3'
072 mTNFrev2	5'-GTGGGTGAGGAGCACGTAG-3'
<i>b-Aktin</i>	
mbeta-aktin/abbott5	5'-ACCCACACTGTGCCCATCTAC-3'
mbeta-aktin/abbott3	5'-AGCCAAGTCCAGACGCAGG-3'
<i>PAI-2</i>	Mm_Serpinb2_1_SG QuantiTect Primer Assay (200) (QT01052345) Qiagen

Tabelle 2: Oligonukleotide

2.1.8. Vektoren

Tabelle 3 enthält die für die Klonierung von eukarytischen Expressionskonstrukten verwendeten Leervektoren.

Plasmid	Marker	Beschreibung	Referenz
pEG202	HIS3, ampR, ADH Prom, ADH Term, ADH Term	Köderplasmid Hefe-Zwei-Hybrid	Origene
pJG4-5	TRP1, ampR, Gal1 Prom, ADH Term	Genbankplasmid (Zielvektor) Hefe-Zwei-Hybrid	Origene
pSH18-34	URA3, ampR, 8LexAop,lacZ	Reporterplasmid Hefe-Zwei-Hybrid (hohe Sensitivität) 6x LexA Bindestellen	Origene
pFlagCMV-1	P CMV, PSV40, hGH pA, preprotrypsin leader, f1 ori, ampR, Flag	Expressionsvektor mit Preprotrypsin-Leader und Flag-Epitop am 5'-Ende der MCS	Sigma
pRK7	P CMV, PSV40, P SP6, SV40 pA, pUC ori, Flag, lacZ, lacI, ampR	Expressionsvektor mit Flag-Epitop am 5'-Ende der MCS	U. Schindler
pGL-2	f1 ori, luc, SV40 pA, ori, ampR	Reporterplasmid mit Luciferasegen, ohne Promotor	Promega
pMSCV-MigRI	5' LTR, GFP, IRES, 3' LTR, pUC ori, ampR	Retroviraler Expressionsvektor mit IRES site	

Tabelle 3: Leervektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektorkonstrukte sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Vektor	Beschreibung	Referenz
pMyc-CMV-1 hTLR2	Enthält die Vollängen-cds von hTLR2 (ohne Leadersequenz). Die Klonierung erfolgte über NotI und BamHI.	C.Kirschning, H.Wesche
pFlag-CMV-1 hTLR2	Enthält die Vollängen-cds von hTLR2 (ohne Leadersequenz). Die Klonierung erfolgte über NotI und BamHI.	C.Kirschning, H.Wesche
pFlag-CMV-1 hTLR3	Enthält die Vollängen-cds von hTLR3 (ohne Leadersequenz). Die Klonierung erfolgte über NotI und SalI.	C.Kirschning, H.Wesche
pFlag-CMV-1 hTLR4	Enthält die Vollängen-cds von hTLR4 (ohne Leadersequenz). Die Klonierung erfolgte über NotI und SalI.	C.Kirschning, H.Wesche
pRK7-Flag hMyD88	Enthält die Vollängen-cds von hMyD88. Die Klonierung erfolgte über SalI und NotI.	C.Kirschning, H.Wesche
pRK7-Myc hMyD88	Enthält die Vollängen-cds von hMyD88. Die Klonierung erfolgte über SalI und NotI.	C.Kirschning, H.Wesche
pBEN20-Flag hMyd88 1-133	Enthält die cds von hMyD88 (bp: 1-399). Die Klonierung erfolgte über EcoRI und BamHI.	F.Schmitz
pBEN20-Flag hMyd88 1-151	Enthält die cds von hMyD88 (bp: 1-453). Die Klonierung erfolgte über EcoRI und BamHI.	F.Schmitz
pBEN20-Flag hMyd88 151-296	Enthält die cds von hMyD88 (bp: 453-888). Die Klonierung erfolgte über EcoRI und BamHI.	F.Schmitz
pBEN20-HA hMyd88	Enthält die Vollängen-cds von hMyD88. Die Klonierung erfolgte über EcoRI und BamHI.	S. Dreher

pRK7-Flag hSTAT3	Enthält die Vollängen-cds von hSTAT3. Die Klonierung erfolgte über SalI und NotI.	S. Dreher
pRK7-Myc hSTAT3	Enthält die Vollängen-cds von hSTAT3. Die Klonierung erfolgte über SalI und NotI.	C.Kirschning, H.Wesche
pRK7-Flag hSTAT3 S727A	Enthält die Vollängen-cds von Serin727 mutiertem hSTAT3. Die Substitution erfolgte mittels Mutagenese-PCR.	S. Dreher
pRK7-Flag hSTAT3 Y705F	Enthält die Vollängen-cds von Tyrosin705 mutiertem hSTAT3. Die Substitution erfolgte mittels Mutagenese-PCR.	S. Dreher
pRK7-Flag YFP hSTAT3	Enthält ein YFP-hSTAT3 Fusionskonstrukt. Die Klonierung von YFP erfolgte über SalI.	S. Dreher
pRK7-Flag YFP hSTAT3 S727A	Enthält ein YFP-hSTAT3 S727A Fusionskonstrukt. Die Klonierung von YFP erfolgte über SalI.	S. Dreher
pRK7-Flag Gal4 hSTAT3	Enthält ein Gal4-hSTAT3 Fusionskonstrukt. Die Klonierung der Gal4 DBD 1-147 erfolgte über SalI.	S. Dreher
pRK7-Flag Gal4 hSTAT3 S727A	Enthält ein Gal4-hSTAT3 S727A Fusionskonstrukt. Die Klonierung der Gal4 DBD 1-147 erfolgte über SalI.	S. Dreher
pRK7-Flag Gal4 hSTAT3 Y705F	Enthält ein Gal4-hSTAT3 Y705A Fusionskonstrukt. Die Klonierung der Gal4 DBD 1-147 erfolgte über SalI.	S. Dreher
pRK7-HA- S6K1-WT	Enthält die Vollängen-cds von S6K1 aus Ratte. Die Klonierung erfolgte über XbaI und EcoRI.	J. Blenis
pRK7-HA- S6K1-KR	Enthält die Vollängen-cds von S6K1 aus Ratte. Kinase-inaktivität wurde durch die Substitution K100R erzeugt.	J. Blenis
pRK5-Myc- mTor	Enthält die Vollängen-cds von mTOR aus Ratte. Die Klonierung erfolgte über ClaI und XbaI.	D.M. Sabatini
pRK5-Myc- mTOR KD	Enthält die Vollängen-cds von Kinase-inaktivem (Asp 2338 Ala) mTOR aus Ratte. Die Klonierung erfolgte über ClaI und XbaI.	D.M. Sabatini
pcDNA3 Flag TSC2	Enthält die Vollängen-cds von hTSC2. Die Klonierung erfolgte über BamHI und XbaI.	D.J. Kwiatkowski
pBEN20-Flag ASC	Enthält die Vollängen-cds von hASC.	S. Dürr, T. Mietke
pRK7-Flag ASC PYD	Enthält die cds von hASC (bp:1-260). Die Klonierung erfolgte über SalI und NotI.	S. Dreher
pRK7-Flag ASC CARD	Enthält die cds von hASC (bp: 261-588). Die Klonierung erfolgte über SalI und NotI.	S. Dreher
ASC-Myc	Enthält die Vollängen-cds von hASC.	J.C. Reed
pCMV Sport mIL-1 β	Enthält die Vollängen-cds von m proIL-1 β .	
pFlag-CD4-TLR4	Enthält ein Fusionskonstrukt aus CD4 und zytoplasmatischer TLR4icd	R. Medzhitov
pcDNA3-Myc NALP1	Enthält die Vollängen-cds von hNALP1.	J.C. Reed
pCMV6 NALP2	Enthält die Vollängen-cds von hNALP2.	J.C. Reed
pcDNA3-Myc NALP3	Enthält die Vollängen-cds von hNALP3.	J.C. Reed
pcDNA3-Myc NALP4	Enthält die Vollängen-cds von hNALP4.	J.C. Reed

pBEN20-Flag Caspase-1	Enthält die Vollängen-cds von hCasp1.	S. Dürr, T. Mietke
pRK7-Flag mPAI-2	Enthält die Vollängen-cds von mPAI-2. Die Klonierung erfolgte über SalI und NotI.	S. Dreher
pRK7-Myc mPAI-2	Enthält die Vollängen-cds von mPAI-2. Die Klonierung erfolgte über SalI und NotI.	S. Dreher
pMSCV-MigR1 hSTAT3	Enthält die Vollängen-cds von hSTAT3. Die Klonierung erfolgte über XhoI.	S. Dreher
pMSCV-MigR1 hSTAT3 S727A	Enthält die Vollängen-cds von Serin727 mutiertem hSTAT3.	S. Dreher
pEG202-hTLR1icd	Enthält hTLR1icd (cnds: 545 bp). Die Klonierung erfolgte über EcoRI und XhoI.	S. Dreher
pEG202-hTLR2icd	Enthält hTLR2icd (cnds: 526 bp). Die Klonierung erfolgte über EcoRI und XhoI.	S. Dreher
pEG202-hTLR4icd	Enthält hTLR2icd (cnds: 500 bp). Die Klonierung erfolgte über EcoRI und XhoI.	S. Dreher
pEG202-hTLR7icd	Enthält hTLR7icd (cnds: 565 bp). Die Klonierung erfolgte über EcoRI und XhoI.	M. Weitkunat
pEG202-hTLR8icd	Enthält hTLR8icd (cnds: 571 bp). Die Klonierung erfolgte über EcoRI und XhoI.	M. Weitkunat
pEG202-hTLR10icd	Enthält hTLR10icd (cnds: 512 bp). Die Klonierung erfolgte über EcoRI und XhoI.	S. Dreher
pEG202- TLR2icd ΔβA-α1	Enthält das um die bp 1896-2004 verkürzte hTLR2icd. Die Klonierung erfolgte über EcoRI und XhoI.	S. Dreher
pEG202- TLR2icd ΔβB-α2	Enthält das um die bp 2010-2100 verkürzte hTLR2icd. Die Klonierung erfolgte über EcoRI und XhoI.	S. Dreher
pEG202- TLR2icd ΔβC-α3	Enthält das um die bp 2082-2175 verkürzte hTLR2icd. Die Klonierung erfolgte über EcoRI und XhoI.	S. Dreher
pEG202- TLR2icd ΔβD-α4	Enthält das um die bp 2175-2280 verkürzte hTLR2icd. Die Klonierung erfolgte über EcoRI und XhoI.	S. Dreher
pEG202- TLR2icd ΔβE-α5	Enthält das um die bp 2283-2352 verkürzte hTLR2icd. Die Klonierung erfolgte über EcoRI und XhoI.	S. Dreher
pJG4-5 hSTAT3	Enthält die Vollängen -cnds von hSTAT3. Die Klonierung erfolgte über EcoRI und XhoI.	S. Dreher
pJG4-5 Δint	Enthält das um die bp 1-366 verkürzte hSTAT3. Die Deletion erfolgte mittels <i>splice-PCR</i> ..	S. Dreher
pJG4-5 Δalpha	Enthält das um die bp 414 - 957 verkürzte hSTAT3. Die Deletion erfolgte mittels <i>splice-PCR</i> ..	S. Dreher
pJG4-5 Δbind	Enthält das um die bp 963 - 1722 verkürzte hSTAT3. Die Deletion erfolgte mittels <i>splice-PCR</i> ..	S. Dreher
pJG4-5 ΔSH2	Enthält das um die bp 1746 - 1989 verkürzte hSTAT3. Die Deletion erfolgte mittels <i>splice-PCR</i> ..	S. Dreher
pJG4-5 Δtail	Enthält das um die bp 1898 - 2310 verkürzte hSTAT3. Die Deletion erfolgte mittels <i>splice-PCR</i> ..	S. Dreher
pEG202-MyD88	Enthält die Vollängen -cnds von hMyD88. Die Klonierung erfolgte über EcoRI und XhoI.	S. Dreher
pJG4-5-MyD88	Enthält die Vollängen -cnds von hMyD88. Die Klonierung erfolgte über EcoRI und XhoI.	S. Dreher

pEFBOS-Flag hMD-2	Enthält die Vollängen-cds von hMD2	K. Miyake
p6 NF-κB-TK-Luc	Enthält das Reportergen für Luciferase hinter einem Block aus 6 NF-κB Bindungsstellen.	
Gal4-UAS-Luc	Enthält ein Gal4 sensitives Luciferasekonstrukt	K.A.Fitzgerald
pGL-2 PAI-2	Enthält das Reportegen Luciferase vor dem Kernpromotor (GXP_150249) von PAI2. Die Klonierung erfolgte über SacI und BglII.	S. Dreher
phRL-null	Enthält das Co-Reportergen Renilla Luciferase	Promega

Tabelle 4: Vektorkonstrukte

2.1.9. Antikörper und Antikörperkonjugate

Die in dieser Arbeit im Western Blot (WB) oder zur Immunopräzipitation verwendeten Antikörper, Antiseren und Meerrettich Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP)- Antikörper-Konjugate sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Name	Antigen	Konj	Spezies	Verd.	Hersteller	Verw.
Poly-rabbit-αFlag	Flag-Epitop	-	Kaninchen	1:1000	Sigma	WB /IP
Poly-rabbit-αMyc	Myc-Epitop	-	Kaninchen	1:2000	Sigma	WB /IP
Mono-mouse-αMyc	Myc-Epitop	-	Maus	1:1000	Invitrogen	WB
Mono-mouse-αHA	Hemagglutinin	-	Maus	1:1000	Santa Cruz	WB
Mono-mouse-αSTAT3	Maus STAT3	-	Maus	1:1000	BD Biosciences	WB
Mono-mouse-αSTAT3	Maus STAT3	-	Maus	1:1000	Cell Signaling	WB
Mono-rabbit-αSTAT3	Maus STAT3	-	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	WB/IP
Mono-mouse-αPS727-STAT3	Phospho Ser 727 STAT3	-	Maus	1:1000	BD Biosciences	WB
Mono-mouse-αPY702-STAT3	Phospho Tyr 705 STAT3	-	Maus	1:1000	BD Biosciences	WB
Mono-mouse-αP-p70/S6K	Phospho Thr 389 p70/S6K	-	Maus	1:1000	Cell Signaling	WB
Poly-rabbit-αp70/S6K	Human p70/S6K	-	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	WB
Mono-rabbit-αPp38	Phospho Thr180/Tyr 182 p38	-	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	WB
Poly-rabbit-αp38	Human p38	-	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	WB

MATERIAL UND METHODEN

Poly-rabbit- α Pp42/44	Phospho Thr202/Tyr204 p42/44	-	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	WB
Poly-rabbit- α mTOR	Maus mTOR	-	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	WB
Poly-rabbit- α PmTOR(Ser2448)	Phospho Ser 2448 mTOR	-	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	WB
Poly-rabbit- α PmTOR(Ser2481)	Phospho Ser 2481 mTOR	-	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	WB
Mono-rabbit- α PAKT	Phospho Ser 473 AKT	-	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	WB
Mono-mouse- α PTyr (PY100)	Phospho Tyr	-	Maus	1:1000	Cell Signaling	WB
Poly-rabbit- α Casp1	Maus Caspase 1	-	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz	WB
Mono-goat- α IL-1b	Maus IL-1 β	-	Ziege	1:1000	R&D	WB/ELISA
cleaved Casp3	Spaltstelle Caspase-3	-	Kaninchen	1:1000	Abcam	Konfokal
mPAI-2	Maus PAI-2	-	Kaninchen	1:1000	D. Ginsburg	WB/IP
NALP2	Human NALP2/PAN1	-	Kaninchen	1:1000	JC. Reed	WB
Poly- α mTLR2	Maus TLR2	-	Kaninchen	1:1000	Eurogentec	WB
Mono-mouse- α T2.5	Maus + Human TLR2	-	Maus		G. Meng	IP
Mono-mouse- α T2.10	Maus TLR2	-	Maus		G. Meng	IP
GAPDH	Maus GAPDH	-	Maus	1:1000	Cell Signaling	WB
β -Aktin	Maus β -Aktin	-	Maus	1:1000	Santa Cruz	WB
α -Actinin	Maus α -Actinin	-	Maus	1:1000	Santa Cruz	WB
Poly-rabbit- α Histon H1	Human HistonH1	-	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz	WB
Poly-rabbit- α p65	Human p65	-	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz	WB
ASC rat	Maus ASC	-	Ratte		VM Dixit	IP
Poly-mouse- α ASC	Maus ASC	-	Kaninchen	1:1000	VM Dixit	WB
Poly- α rabbit-HRP	Kaninchen IgG	HRP	Ziege	1:5000	Dianova	WB
Poly- α mouse-HRP	Maus IgG	HRP	Zeige	1:5000	Dianova	WB
Poly- α goat-HRP	Ziege IgG	HRP	Esel	1:5000	Santa Cruz	WB

Tabelle 5: Antikörper und Antikörperkonjugate

2.1.10. Medien

2.1.10.1. Zellkulturmedien

<i>HEK 293 Medium</i>	1 x DMEM	PAA
<i>10% FCS</i>	10% (v/v) FCS	PAA
	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA
<i>HEK 293 Medium</i>	1 x DMEM	PAA
<i>2% FCS</i>	2% (v/v) FCS	PAA
	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA
<i>HEK 293 Medium</i>	1 x DMEM	PAA
<i>10% FCS</i>	10% (v/v) FCS	PAA
<i>mit G418</i>	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA
	1% (v/v) G418	PAA
<i>RAW 264.7 Medium</i>	1 x RPMI	PAA
<i>10% FCS</i>	10% (v/v) FCS	PAA
	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA
<i>RAW 264.7 Medium</i>	1 x RPMI	PAA
<i>2% FCS</i>	2% (v/v) FCS	PAA
	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA
<i>BMDM Medium</i>	1 x DMEM	PAA
<i>10% FCS</i>	10% (v/v) FCS	PAA
	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA
	0,035% (v/v) β -Mercaptoethanol	PAN

MATERIAL UND METHODEN

<i>BMDM Medium</i>	1 x DMEM	PAA
<i>2% FCS</i>	2% (v/v) FCS	PAA
	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA
	0,035% (v/v) β -Mercaptoethanol	PAN
<i>BMDM Differenzierungsmedium</i>	1 x DMEM	PAA
	10% (v/v) L-Zellüberstand	
	10% (v/v) FCS	PAA
	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA
	0,035% (v/v) β -Mercaptoethanol	PAN
<i>MEF Medium</i>	1 x DMEM	PAA
<i>10% FCS</i>	10% (v/v) FCS	PAA
	1% (v/v) Penicillin-Streptomycin	PAA
	1% (v/v) Antibiotikum/Antimycotikum	PAA
	0,035% (v/v) β -Mercaptoethanol	PAN
<i>Phoenix E Medium</i>	1 x DMEM	PAA
<i>10% FCS</i>	10% (v/v) FCS	PAA
<i>Gefriermedium</i>	10% (v/v) DMSO	Sigma
	90% (v/v) FCS	PAA

2.1.10.2. Bakterienmedien

LB ₀ (Luria-Bertani)- Medium	10 g/l	Bacto-Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
	20 g/l	Agar (für Platten)
	pH 7,0	(NaOH)
	Autoklavieren	
LB-Amp-Medium	10 g/l	Bacto-Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl

	20 g/l	Agar (für Platten)
	pH 7,0	(NaOH)
	Autoklavieren, nach Abkühlen Zugabe von 50 mg/l Ampicillin	
LB-Kana-Medium	10 g/l	Bacto-Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
	20 g/l	Agar (für Platten)
	pH 7,0	(NaOH)
	Autoklavieren, nach Abkühlen Zugabe von 10 mg/l Kanamycin	

2.1.10.3. Hefemedien

10x *DropOut*-Lösung

Die *DropOut*-Lösung enthält die für die Hefe essentiellen Aminosäuren. Je nach Zusammensetzung kann auf Hefezellen, die durch Transformation mit entsprechenden Plasmiden zur Synthese bestimmter Aminosäuren befähigt sind, selektiert werden.

L-Adenin Hemisulfat	200 mg/l
L-Arginin HCl	200 mg/l
L-Histidin HCl Monohydrat	200 mg/l
L-Isoleucin	300 mg/l
L-Leucin	1000 mg/l
L-Lysin HCl	300 mg/l
L-Phenylalanin	500 mg/l
L-Threonin	2000 mg/l
L-Tryptophan	200 mg/l
L-Valin	1500 mg/l

Die je nach gewünschtem Selektionsdruck zusammengestellten Aminosäuren werden in H₂O bidest gelöst und autoklaviert. Die Haltbarkeit der *DropOut*-Lösung beträgt bei 4°C etwa 1 Jahr.

10 x BU Salzlösung	70 g/l	Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O
	30 g/l	NaH ₂ PO ₄
	pH 7,0, autoklavieren	

MATERIAL UND METHODEN

5 x M9 Salze	15 g/l	KH ₂ PO ₄	
	2,5 g/l	NaCl	
	64 g/l	NaHPO ₄ · 7 H ₂ O	
	5 g/l	NH ₄ Cl	
	autoklavieren		
YPD-Medium	50 g/l	YPD-Fertigmedium	(Sigma)
	20 g/l	Agar (nur bei Platten)	
	autoklavieren		
SD/Glu-Medium	6,7 g/l	Hefe-Stickstoff-Basis ohne AS	(BD)
	100 ml	entsprechende 10 x <i>DropOut</i> -Lösung	
	20 g/l	Agar (nur bei Platten)	
	850 ml	H ₂ O bidest	
	pH 5,8, autoklavieren, nach dem Abkühlen auf 55°C ad		
	2% w/v	Glucose	
SD/Gal/Raf/X-Gal	6,7 g/l	Hefe-Stickstoff-Basis ohne AS	(BD)
	20 g/l	Agar	
	100 ml /l	entsprechende 10 x <i>DropOut</i> -Lösung	
	725 ml	H ₂ O bidest	
	autoklavieren, nach dem Abkühlen auf 55°C ad		
	2% w/v	Galactose	
	1% w/v	Raffinose	
	1x	BU Salze	
	80 mg/l	X-Gal	
<i>M9-Medium</i>	200 ml	5 x M9 Salze	
	2 mM	MgSO ₄	
	0,1 mM	CaCl ₂	
	20 g/l	Agar (nur für Platten)	
	690 ml	H ₂ O bidest	

Autoklavieren, nach dem Abkühlen auf etwa 55°C ad

2% w/v	Glucose
100 ml	- Trp 10 x <i>DropOut</i> solution
50 mg/l	Ampicillin
1 mM	Thiamine-HCl

2.1.11. Stämme

2.1.11.1. *Escherichia coli*

Stamm	Eigenschaft
DH 5 α (Invitrogen)	<i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , (rK-mK+) <i>supE44</i> THI-1, <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> , NalR), <i>relA1</i> , (<i>lacZYA-argF</i>) U169(f80 <i>lacZdM15</i>)
XL10-Gold (Stratagene)	Tet ^R , Δ (<i>mcrA</i>)183, Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi</i> -(1, <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , Hte [F ^c <i>proAB</i> <i>lacI^qZAM15</i> , Tn10 (Tet ^R), Amy Cam ^R
KC8 (BD Bioscience)	<i>hsdR</i> , <i>leuB600</i> , <i>trpC9830</i> , <i>pyrF::Tn5</i> , <i>hisB463</i> , <i>lacΔX74</i> , <i>strA</i> , <i>galU</i> ,K

2.1.11.2. *Saccharomyces cerevisiae*

EGY 48	MATa <i>trp1</i> , <i>his3</i> , <i>ura3</i> , <i>leu2:6LexAop-LEU2</i>
--------	---

2.1.12. Zelllinien

Humane embryonale Nierenzellen 293 (*human embryonic kidney cells*, **HEK 293**) (ATCC-Nr. CRL-1573). Bei HEK 293 Zellen handelt es sich um adhärenz wachsende, fibroblastenähnliche Zellen. In dieser Arbeit fanden hauptsächlich transient transfizierte HEK 293 Zellen Verwendung.

RAW 264.7 Makrophagen (ATCC-Nr. TIB-71). Die RAW 264.7 Zelllinie ist eine murine, Monozyten/Makrophagen-ähnliche Zelllinie, welche aus mit dem Abelson Murine Leukemia Virus infizierten Tumoren gewonnen wurde.

Embryonale Mausfibroblasten (mouse embryonic fibroblasts, MEF). MEF Zellen sind immortalisierte aus den Embryonen (E12-E14) von Mäusen gewonnene adhären wachsende Fibroblasten. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden durch Langzeitgeneration immortalisiert.

Phoenix Eco Verpackungszelllinie. Bei der Phoenix Eco Verpackungszelllinie handelt es sich um HEK 293T Zellen die ein retrovirales Provirus tragen. Diese wurden durch stabile Integration der die viralen Strukturproteine und Enzyme *gag-pol* und *envelope* exprimierenden Konstrukte erzeugt. Die proviralen Gene beinhalten als Selektionsmarker die Resistenzgene für Hygromycin (*gag-pol*) und Diphtherietoxin (*envelope*).

2.1.13. Mäuse

Alle Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen in den Tierställen des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München gehalten. Die verwendeten Tiere, mit Ausnahme der IL-10^{-/-} und ihrer entsprechenden Kontrollgruppe, waren mindestens neunmal auf den genetischen Hintergrund von C57/BL6 zurückgekreuzt worden. IL-10 defiziente Mäuse befanden sich auf dem C3H/HeN Hintergrund. Für Untersuchungen zur Abwesenheit von STAT3 und IKK β fanden konditionale Knockout-Mäuse Verwendung. STAT3 ^{Δ Mye} bezeichnet die unter Kontrolle des myeloiden LysM Promotors stehende gewebsspezifische Deletion von STAT3. Die IFN- β abhängige, Mx-Promotor vermittelte, Expression der Cre-Rekombinase in STAT3 ^{Δ} und IKK β ^{Δ} Mäusen wurde durch die zweimalige, um fünf Tage versetzte intraperitoneale Injektion von 1mg/kg poly(I:C) induziert. Die Analyse der Tiere erfolgte 14 Tage nach der Erstapplikation.

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die 1983 entdeckte Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren zur exponentiellen Amplifikation von definierten DNA-Abschnitten. Die PCR nutzt die Fähigkeit von DNA-Polymerasen, DNA zu duplizieren. Ausgangspunkt hierfür ist ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit freiem 3'-OH Ende, welcher dem Gegenstrang entsprechend komplementär verlängert werden kann. Durch den Einsatz sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer), welche antiparallel zueinander an einen komplementären DNA-Abschnitt binden können, ist es so möglich, eine bestimmte DNA Sequenz spezifisch zu vervielfältigen.

Bei den durchgeführten PCR Reaktionen fanden je nach Anforderungskriterium unterschiedliche Polymerasen Verwendung. Für Klonierungsansätze wurde auf Polymerasen mit verringerter Fehlerrate, sowie für die Amplifikation spezifischer Gene aus cDNA auf Polymerasen mit zusätzlich erhöhter Prozessivität zurückgegriffen. In der Regel wurde eine hitzestabile Taq Polymerase mit *Proof-Reading* Aktivität (AccuTaq LA DNA Polymerase, Sigma) eingesetzt. In einigen Fällen wurde eine hitzestabile Pfu DNA Polymerase (Fermentas) verwendet, die durch ihre zusätzliche 5'-3' Exonucleaseaktivität eine besonders geringe Mutationsrate aufweist. Für Genotypisierungs-PCR Reaktionen wurde eine standardmäßige Taq-Polymerase ohne *Proof-Reading*-Aktivität eingesetzt.

Ein typisches PCR-Programm lässt sich in mehrere Schritte unterteilen. Im ersten Schritt erfolgt die initiale Hitzedenaturierung der DNA Matrize bei 95°C. Die nachfolgenden Schritte aus Denaturierung bei 95°C, *Annealing* (Primeranlagerung an das DNA Template) bei 48°-58°C und Elongation, bzw. Synthese bei 68°-72°C je nach Polymerase werden als Zyklus bis zu 38 mal wiederholt. Ein abschließender finaler Elongationsschritt bei 68°-72°C dient zur Vervollständigung teilsynthetisierter Produkte.

Die genaue Annealing-Temperatur orientiert sich an der Schmelztemperatur des eingesetzten Primerpaars. In der Regel wird sie 2°C unterhalb der errechneten Schmelztemperatur der Primer angesetzt. Die Berechnung erfolgt nach der Formel $T_M = 2n(A/T)+4n(G/C)$. Das Temperatur-optimum für neukonstruierte Primer sollte im Bereich von 48°C - 58°C liegen, die Temperaturdifferenz zwischen *Forward*- und *Reverse*- Primer nicht mehr als 2°C betragen. Die Elongationszeit errechnet sich aus der Amplifikationsrate der eingesetzten Polymerase und des zu synthetisierenden DNA-Abschnittes. Für die AccuTaq LA DNA Polymerase sowie den Taq Polymerase-Mix wurde von einer Syntheserate von 1 kb pro Minute, für die Pfu DNA Polymerase von einer Syntheserate von 0,5 kb pro Minute ausgegangen. Die Reaktionen wurden in einem

Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt. Ein typisches PCR-Programm setzte sich aus folgenden Zyklen zusammen:

1.	initiale Denaturierung	95°C	1 min
2.	Denaturierung	95°C	30 sec
3.	Annealing	48°-58°C	45 sec
4.	Elongation	68°-72°C	1 min-x min
5.	Nachsynthese	68°-72°C	4 min-7 min
6.	Lagerung	4°C	

Die Schritte 2 bis 4 wurden dabei je nach Versuchsanforderung und zu erwartende Amplifikations-effizienz 28-38 mal wiederholt. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5 µl	10 x Reaktionspuffer	
100 ng	Matrizen-DNA	
2 µl	Forward-Primer	(10 µM)
2 µl	Reverse-Primer	(10 µM)
2 µl	dNTP-Mix	(10 mM)
1 µl	Polymerase	(1 U/µl)
∑ 50 µl	H ₂ O bidest.	

2.2.2. Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse und Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die DNA elektrophoretisch in Agarosegelen aufgetrennt. Dazu wurde, abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA, eine 0,7-1,5% Agarose-Lösung in TAE-Puffer hergestellt, aufgeköcht, nach dem Abkühlen auf ca. 50°C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 300 µg/l) versetzt und in das Bett einer horizontalen Gelkammer gegossen. (Biorad) Die Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen geladen (maximales Endvolumen 25 µl) und bei einer Spannung von 130 V (Feldstärke: 10 V/cm) für 30 bis 40 Minuten aufgetrennt. Als Laufpuffer fand TAE-Puffer Verwendung.

Die Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte durch Anregung der Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids mittels UV-Licht der Wellenlänge 254 nm. Die Gele wurden mithilfe einer Geldokumentationsstation der Firma BioRad analysiert und photographiert. Die Auswertung der Banden erfolgte durch Vergleich mit einem auf dem Gel aufgetragenen 1kb-DNA-Größenstandard (Fermentas).

2.2.3. Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Elektrophoretisch aufgetrennte, sich als solitäre Bande darstellende, PCR Produkte, bzw. durch Restriktionsverdau linearisierte Vektoren oder geschnittene DNA Fragmente wurden aus dem Agarosegel extrahiert und durch Aufreinigung von Gel-, Salz-, Protein- oder DMSO- Rückständen befreit.

Die Identifikation der sich nach vollendetem Gellauf als distinkte Bande darstellenden DNA-Fragmente erfolgte unter intensitätsreduziertem UV-Licht. Die betreffende Bande wurde mittels eines Skalpells ausgeschnitten und anschließend mit einem Agarosegel-Isolations-Kitsystem (2.1.4) gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.4. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte spektralphotometrisch über die Extinktion bei 260 nm. Eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Durch Protein-Verunreinigung hervorgerufene Messungenauigkeiten werden durch die zusätzliche Absorptionsmessung bei 280 nm identifiziert. Der Quotient $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ gibt Auskunft über den Grad der Proteinkontamination. Er beträgt bei sehr reiner DNA 1,8 und verringert sich mit zunehmender Verunreinigung. Die Absorptionsmessung erfolgte mit einem NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer der Firma peqLab.

2.2.5. Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Restriktionsendonukleasen des Typs II erkennen und spalten spezifische DNA-Sequenzen. Diese vorwiegend palindromischen Erkennungssequenzen bestehen meist aus vier, sechs oder acht Basenpaaren. Je nach Schnittverhalten des Enzyms entstehen glatte (*blunt*) oder, durch einen versetzten Schnitt bedingt, einige Basen lange Überhänge an den gespaltenen Stellen, sogenannte „klebrige“ Enden (*sticky ends*). Diese Enden können dann an Fragmente mit passenden Überhängen paaren.

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden nach Angaben des Herstellers im jeweiligen idealen Reaktionspuffer eingesetzt und für 2 Stunden bei der für die Aktivität des eingesetzten Enzyms idealen Temperatur (für die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme stets 37°C) inkubiert. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2 µl	10 x Reaktionspuffer	
1 µg	DNA	
0,5 µl	5'-Restriktionsenzym	(10 U/µl)
0,5 µl	3'-Restriktionsenzym	(10 U/µl)
Σ20 µl	H ₂ O bidest.	

2.2.6. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Vermeidung spontaner Religation geschnittener Vektoren, wurden die 5'-Phosphatgruppen der gespaltenen Enden durch das Enzym Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) entfernt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte für 2 Stunden bei 37°C. Aufgrund der guten Pufferverträglichkeit kann die SAP auch direkt dem Restriktionsverdau zugegeben werden. Ein typischer Dephosphorylierungsansatz sah folgendermaßen aus:

2 µl	10 x SAP-Reaktionspuffer	
5 µg	DNA	
1 µl	SAP	(1 U/µl)
Σ20 µl	H ₂ O bidest.	

2.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur kovalenten Verknüpfung von überhängenden komplementären oder glatten doppelsträngigen DNA-Fragmenten können durch das Enzym T4-DNA-Ligase Esterbindungen zwischen den freien 3'-OH und 5'-Phosphatgruppen der einzelnen Fragmente geknüpft werden. Um ein spontanes Rezyklieren des geschnittenen Vektors zu unterbinden, sollte dieser in dephosphoryliertem, die zu integrierende DNA (*Insert-DNA*) hingegen in phosphoryliertem Zustand vorliegen. Standardmäßig fand für alle Ligationsreaktionen das *Liga Fast Rapid™ DNA Ligation System* der Firma Fermentas Verwendung. Gemäß Herstellerangaben bestand ein Standard-Ligationsansatz aus:

4 µl	5 x <i>Rapid Ligation Buffer</i>
x µg	Vektor-DNA
y µg	<i>Insert-DNA</i>
1 µl	T4 DNA Ligase (1 U/µl)
Σ20 µl	H ₂ O bidest.

Die Ligationsansätze wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert, beziehungsweise sofort in kompetente Bakterien transformiert. Die eingesetzte Menge an Vektor-DNA lag bei etwa 30 bis 100 ng. Das zu integrierende *Insert* wurde in drei- bis zehnfachem molaren Überschuss eingesetzt.

2.2.8. Mutagenese- und *Splice*-PCR

Die sogenannte *Splice*-PCR stellt eine elegante Methode zur Subklonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren dar. Hierbei wird auf die bei der klassischen Subklonierung elementaren Schritte des Restriktionsverdau und der Ligation verzichtet. Vielmehr agiert das zu integrierende DNA-Fragment, aufgrund seiner zum Zielvektor komplementären, etwa 20 Basenpaare umfassenden Überhänge, als Primer. Nach Anlagerung an den Vektor wird so der *Insert*-Primer in der folgenden Synthesephase um die komplette Vektorsequenz ergänzt.

Dem gleichen Prinzip folgend wurden Deletions- und Punktmutanten einzelner Gene erstellt. Die hier verwendeten Primer wurden vollständig synthetisiert (MWG-Biotech). Der für Deletionsreaktionen verwendete Primer setzte sich aus etwa 20 Basenpaaren der die das 5'- und 3'-Ende des zu deletierenden Bereichs flankierenden komplementären Sequenz des Gens zusammen. Die Schmelztemperatur der beiden kombinierten Bereiche sollte dabei um nicht mehr als 2°C abweichen.

Für Punktmutanten fanden Primer Verwendung welche die betreffende, zu mutierende Stelle, zu beiden Seiten um etwa 20 Basenpaare überspannten. Mittig wurde das modifizierte Codon integriert. Analog zur *Splice*-PCR wurde, nach Anlagerung der Primer, die vollständige Vektorsequenz synthetisiert.

Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

5 µl	10x Reaktionspuffer	
1 µl	Matrizen-DNA	(100 ng/µl)
4 µl	Primer (PCR-Produkt)	(0,1 µM)
1 µl	dNTP-Mix	(2,5 mM)
1 µl	<i>Pfu-Turbo</i> DNA-Polymerase	(1 U/µl)
Σ 50 µl	H ₂ O bidest.	

Die Inkubation erfolgte in einem *thermocycler* der Firma Biometra. Folgende Programmierung fand Verwendung:

1.	initiale Denaturierung	95°C	2 min
2.	Denaturierung	95°C	1 min
3.	Annealing	48°-58°C	45 sec
4.	Elongation	68°C	x min
5.	Nachsynthese	68°C	x + 1 min
6.	Lagerung	4°C	

Die Synthesedauer ergab sich aus den Leistungsdaten der verwendeten Polymerase und der Größe des zu amplifizierenden Vektors inklusive Fragment. Für Reaktionen der *Pfu*-Polymerase wurde mit einer Syntheserate von 1kb pro Minute gerechnet.

2.2.9. TA-Klonierung

Für die effiziente Klonierung von PCR-Produkten, die mit Hilfe von *Taq*-Polymerase generiert wurden, fand das *pGEM-T Vector System Kit* der Firma Promega Verwendung. Durch *Taq*-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte zeichnen sich durch einzelne an das 3'-Ende fusionierte einzelne Desoxyadenosinmonophosphate aus. In einem einzelnen Ligationsschritt ist es so möglich, diese Fragmente in einen linearisierten, an den freien 5'-Enden um einzelne Desoxythymidinreste ergänzten Vektor zu klonieren. Gemäß Herstellervorgaben setzte sich ein Ligationsansatz wie folgt zusammen:

5 µl	2x <i>Rapid Ligation Buffer</i>	
1 µl	pGEM®-T Easy Vector	(50ng)
1-3 µl	PCR-Produkt	
1 µl	T4 DNA Ligase	(3U/µl)
Σ10 µl	H ₂ O bidest.	

Der Reaktionsansatz wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und folgend sofort in kompetente Bakterien transformiert.

2.2.10. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung subklonierter DNA erfolgte durch die Firma MWG-Biotech, Ebersberg.

2.2.11. Herstellung einzelsträngiger *Carrier*-DNA zur Hefetransformation

Die Zugabe von *Carrier*-DNA bei Hefetransformationen erhöht die Aufnahme von Plasmid-DNA in die Zelle. Zur Steigerung der Effizienz sollte *Carrier*-DNA einzelsträngig und die eingesetzten Fragmente möglichst groß sein.

Für die hier verwendete Methode wurde 1 g Lachssperma-DNA in TE-Puffer zu einer Endkonzentration von 10 mg/ml verdünnt. Zum vollständigen Lösen wurde der Ansatz über Nacht bei 4°C gerührt, nachfolgend sonifiziert (30 s, 75% Intensität) und die DNA-Lösung mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die Fällung erfolgte durch Zugabe von Natrium-Actetat und Ethanol (2.2.15). Das Präzipitat wurde in TE-Puffer zu einer Endkonzentration von 5 mg/ml resuspendiert. Nach Kochen der Probe für 2-3 Minuten wurde der Ansatz auf Eis gekühlt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.12. Hitzeschocktransformation von *E. coli*

Die Hitzeschocktransformation ist ein Verfahren, um Plasmid-DNA in chemisch-kompetente *E.coli*-Zellen einzubringen. Hierzu wurden 25µl chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen (Stamm DH5α) mit 10-100 ng Plasmid-DNA (Maximalvolumen 5 µl) gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Folgend wurde der Ansatz für 45 sec einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen, 2 min auf Eis gekühlt, mit 1 ml auf 37°C vorgewärmten LB₀-Medium versetzt und für 1 h unter konstantem Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (13000 g, 1 min) werden 800 µl des überstehenden Mediums abgenommen, das Zellsediment im verbliebenen Medium resuspendiert und zu einem Volumen von 100-200 µl auf das entsprechende Selektionsmedium (je nach verwendetem Selektionsmarker Ampicillin oder Kanamycin haltiges LB-Medium) ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

Für die Transformation von *Splice*-PCR Produkten wurden 40 µl kompetente *E. coli* XL10-Gold Zellen (*Stratagene*), sowie 5 µl des eingegengten PCR Produktes eingesetzt. Die Inkubations- und Regenerationsschritte wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt.

2.2.13. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die hier verwendete Methode zur Plasmidisolierung basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und der selektiven Adsorption der DNA auf eine Silica-Gel Membran unter Hochsalzbedingungen. Nach Reinigung der DNA von interferierenden Substanzen wie zellulären Proteinen, RNA oder Metaboliten erfolgt die Elution unter Niedersalzbedingungen.

Minipräparation

Für Minipräparationen fand das peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I der Firma peqLab Verwendung. Hierzu wurde eine einzelne Kolonie von Plattenkulturen eines das jeweilige Plasmid tragenden Stammes in 3 ml LB_{Amp}- oder LB_{Kana}-Medium überführt und über Nacht unter konstantem Schütteln (180 rpm) bei 37°C inkubiert. 2 ml der Zellsuspension wurden durch Zentrifugation (13 000 rpm, 1 min, RT) sedimentiert und entsprechend den Herstellerangaben aufgearbeitet. Die Elution erfolgte in einem Volumen von 100 µl H₂O bidest.

Maxipräparation

Für Maxipräparationen wurden Klone von Plattenkulturen oder Glycerolstocks in 250 ml LB_{Amp} oder LB_{Kana} Medium gelöst und über Nacht bei 37°C unter konstantem Schütteln (180 rpm) inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen mittels Zentrifugation sedimentiert (6000 g, 15 min, 4°C). Die Plasmidaufreinigung erfolgte mittels des *NucleoBond Xtra Maxi Plus* Systems der Firma Macherey-Nagel gemäß den Angaben des Herstellers. Die gefällte Plasmid-DNA wurde in 200 - 400 µl H₂O bidest. gelöst.

2.2.14. Phenol/Chloroformextraktion

Für die Reinigung nukleinsäurehaltiger Lösungen von kontaminierenden Proteinen fand die Phenol/Chloroform Extraktion Verwendung. Die Nukleinsäure-Lösung wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt und durch Vortexen gemischt. Zur verbesserten Phasentrennung wurde der Ansatz für 10 min bei 13000 g und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige, die Nukleinsäuren enthaltende Phase wurde vorsichtig abgenommen und weiterverarbeitet.

2.2.15. Ethanolpräzipitation

Zur Fällung von Nukleinsäuren aus wässriger Lösung, wurde diese mit 2,5 Volumen 100 % Ethanol, sowie 1/10 Volumen 3 M Na-Acetatlösung (pH 5,2) versetzt. Die Präzipitation erfolgte entweder über Nacht bei -80°C oder für eine Stunde bei -20°C. Das durch Zentrifugation (13000 g, 10 Min, 4°C) sedimentierte DNA-Präzipitat wurde vom Überstand befreit und zur Reinigung von überschüssigem Salz mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung bei 55°C wurde das Präzipitat in H₂O bidest. gelöst.

2.3. Proteinchemische Methoden

2.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen wurden denaturierende SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Das Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) bindet an Proteine proportional zu deren molarer Masse (etwa ein Molekül SDS pro zwei Aminosäurereste) und bewirkt die Dissoziation, Entfaltung und Solubilisierung komplexer Proteinmoleküle oder- komplexe. Im elektrischen Feld wandern die von dem negativ geladenen SDS umgebenen Proteine in Richtung Anode und werden so aufgrund größenbedingt unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Die in dieser Arbeit angewandte Methode nach *Laemmli* bedient sich eines diskontinuierlichen Polyacrylamidgels, welches sich aus einem unteren Polyacrylamid-Trenngel unterschiedlicher Konzentration und einem oberen Sammelgel aus 2% Polyacrylamid zusammensetzt. Die Gele setzten sich wie folgt zusammen:

Sammelgel:

2% (w/v)	Acrylamid 30% (29:1)
0,125 M	Tris-HCl (pH 6,8)
0,25% (w/v)	SDS

Trenngel:

7-15% (w/v)	Acrylamid 30% (29:1)
3,75 M	Tris-HCl (pH 8,8)
0,1%	SDS

Zum Polymerisationsstart wurden jeweils 5 µl TEMED und 25 µl (Sammelgel) bzw. 50 µl (Trenngel) 10% APS in H₂O bidest. zugegeben. Das Trenngel wurde nach Polymerisationsstart in eine Vertikalkammer (Dicke: 1,0 mm Laufstrecke: 5 cm Mini-Protein-Gel, Biotech) gegossen und zur Ausbildung einer geraden Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Polyacrylamids (nach etwa 30 min) und Entfernen des Isopropanols wurde Sammelgel luftblasenfrei überschichtet und ein Taschenkamm eingesetzt.

Das polymerisierte Gel wurde in eine Elektrophoresekammer MIGHTY SMALL SE250 VERTIKAL der Firma Hoefer eingesetzt und durch Einfüllen von Laemmli-Laufpuffer mit Kathode und Anode verbunden.

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen in 5x Auftragspuffer gelöst und für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach Zentrifugation für 20 sek bei 13000 g wurden die Überstände der Proben in die Geltaschen des Sammelgels geladen. Bis zum Eintritt der Proben ins Trenngel erfolgte die Auftrennung bei einer Spannung von 80 V, anschließend wurde diese auf 120 V erhöht. Als Längenstandard wurde der *Precision Plus Prestained Marker* der Firma Fermentas aufgetragen. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die erwünschte Auftrennung der Proteinbanden des Längenstandards erreicht war.

2.3.2. Western Blot / Immunoblot

Der Western Blot ist ein Verfahren zur elektrophoretische Übertragung der in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteinbanden zum spezifischen und äußerst sensitiven Nachweis eines Proteins durch Bindung eines spezifischen Antikörpers (*Immuno-Blot*).

Nach vollendeter SDS-PAGE wurden das Sammelgel abgetrennt und gemäß der Größe des Trenngels eine Nitrozellulosemembran sowie 6 Stücke Whatmanpapier zurechtgeschnitten und kurz in Transferpuffer getränkt. Der Transfer der Proteine erfolgte in einer *semi-dry-blot* -Apparatur der Firma BioRad. Drei mit Transferpuffer befeuchtete Stücke Whatman-Papierfilter wurden in der Apparatur exakt übereinander angeordnet. Es folgten die ebenfalls befeuchtete Nitrocellulose, das Gel, sowie weitere drei Lagen in Transferpuffer getränkte Whatman-Papierfilter. Der Transfer erfolgt durch eine angelegte Stromstärke von 1,2 mA/cm² Gelfläche (64 mA je Gel). Entsprechende der Größe der zu übertragenden Proteine variierte die *Blot-Zeit* von 50 min bis zu 2 Stunden.

Nach Beendigung des *Blot*-Vorgangs wurde die Membran, zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, für mindestens 1 h bei 4°C in *Blocking*-Lösung inkubiert. Die Inkubation der Membran im nach Herstellerangaben verdünnten Primärantikörpers erfolgte bei 4°C über Nacht. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers wurde die Membran dreimal für 10 min mit 1 x PBT gewaschen. Folgend wurde die Membran mit einem zweiten, gegen den Primärantikörper gerichteten, Meerrettich-Peroxidase konjugierten Antikörper inkubiert. Dieser wurde ebenfalls gemäß der Angaben des Herstellers in *Blocking*-Lösung verdünnt und für mindestens 1 h bei 4°C auf der Membran belassen.

Nach viermaligem Waschen für 5 min mit 1 x PBT sowie zweimaligem Waschen für 5 min mit PBS wurde die Membran für 1 min dem Peroxidasesubstrat (ECL *Plus* Reagenz, Perkin Elmer) ausgesetzt und nach kurzem Antrocknen unter Lichtausschluss auf einem Röntgenfilm der Firma FujiFilm exponiert. Die Belichtungszeiten ergaben sich aus der Stärke des jeweiligen Signals. Das Prinzip der ECL-Methode ("*enhanced chemiluminescence*") beruht auf der Kopplung des sekundären Antikörpers mit einer Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP). Die

Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazidion) zu 5-Aminophthalsäure durch H_2O_2 . Die dabei freiwerdende Energie wird in Form von Licht abgegeben (Chemolumineszenz) und führt so zu einer örtlichen Belichtung des Films. Alle Inkubations- und Waschschriffe erfolgen bei Raumtemperatur.

2.3.3. Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation ist eine Methode zum Nachweis intrazellulärer Protein-Protein-Interaktionen. Je nach Verfügbarkeit spezifischer Antikörper können sowohl Interaktionen zwischen endogenen Proteinen, wie auch zwischen überexprimierten, Epitop-markierten Proteinen untersucht werden.

Das Prinzip der Co-Immunopräzipitation beruht auf der Bindung eines der zu analysierenden Proteine an einen spezifisch gegen dieses Protein gerichteten Antikörper. Wird dieser anschließend durch Fc-bindende Proteine gekoppelt an *Agarose-Beads*, gebunden, so werden sowohl die antikörpergebundenen als auch die mit ihm assoziierten Proteine präzipitiert.

In dieser Arbeit wurde sowohl die Interaktion von in HEK 293-Zellen überexprimierten, Epitop-markierten Proteinen, als auch die Assoziation endogener Proteine analysiert. Für die Untersuchung überexprimierter Proteine wurden 2×10^6 HEK 293 Zellen in 9 cm Zellkulturschalen ausgesät und transient transfiziert (2.4.5). 48 bis 60 h nach Transfektion wurden (wahlweise nach zuvor erfolgter Stimulation) die Zellüberstände abgenommen und unter Inkubation auf Eis, die Zellen mit 5 ml eiskaltem PBS von den Platten gespült. Die durch Zentrifugation (230 g, 5 min, 4°C) sedimentierten Zellen wurden wahlweise direkt in eiskaltem Lysispuffer aufgenommen oder, zur Verstärkung transientser Interaktionen in 1 ml *Crosslinking*-Puffer resuspendiert und für mindestens 1 h unter konstantem Drehen bei 4°C inkubiert.

Für die Quervernetzungsreaktion fand der homobifunktionelle, membrängängige Crosslinker DTBP (Dimethyl 3,3'-dithiobis-propionimidate) Verwendung. Dieses Molekül ist in der Lage, über seine flankierenden Imidoester primäre Amine kovalent zu binden und so miteinander interagierende Proteine quervernetzen. Zur Beendigung der *Crosslinking*-Reaktion wurden 20 µl einer 1 M Tris-HCl Lösung, pH 7,5, hinzugegeben. Die primären Aminogruppen der Puffersubstanz reagieren dabei mit den reaktiven Gruppen des DTBP und bewirken so dessen Abpufferung. Folgend wurden die Zellen für 10 min sedimentiert (2000 g, 4°C), in 1 ml Lyse-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach abschließender Zentrifugation für 10 min (13000 g, 4°C) wurden die sedimentierten Zelltrümmer verworfen und 50 µl des zytoplasmatischen proteinhaltigen Überstandes abgenommen und zur späteren Analyse bei -20°C gelagert. Das verbleibende Zelllysat wurde wahlweise mit 18 µl Agarose-Beads-gekoppelter Antikörper oder mit einer Mischung aus 1 µg Präzipitationsantikörper und 20 µl *Protein G Plus*

Agarose Beads versetzt und unter Rotation über Nacht bei 4°C inkubiert. Folgend wurden die an die *Agarose-beads* gebundenen Moleküle durch Zentrifugation (13000 g, 20 sek, 4°C) sedimentiert, der Überstand verworfen und die Präzipitate weitere fünf Mal in einem großen Volumen Waschpuffer gewaschen. Der Salzgehalt des Waschpuffers richtete sich nach dem eingesetzten Lyse-Puffer als auch nach der zu erwartenden Stringenz der Kopräzipitation. Dabei interferieren hohe Salzkonzentrationen mit schwachen Bindungen und erhöhen so die Spezifität der Protein-Protein Interaktion. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Präzipitate in 50 µl Waschpuffer aufgenommen und der Crosslinker durch Zugabe von 10 µl 1M DTT und 30 minütiger Inkubation bei 37°C gespalten. Die Erhöhung der DTT Konzentration auf 100-150 mM bewirkt die Spaltung der internen Disulfidbrücken des Crosslinkers - die kovalente Verknüpfung der quervernetzten Proteine wird gelöst, die Proteine gemäß ihrer Größe in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

Für die Analyse endogener Protein-Protein wurden RAW264.7 Makrophagen, bzw. J774 Makrophagen in 15 cm Zellkulturschalen ausgesät. Nach Erreichen von 75% Konfluenz wurden die Zellüberstände, nach vorangegangener Stimulation, abgenommen und die Zellen unter Inkubation auf Eis in 10 ml eiskaltem PBS mit einem Spatel von der Platte gekratzt. Die weitere Verarbeitung der Zellen erfolgte gemäß dem Vorgehen bei HEK 293 Zellen.

Für die Interaktionsstudien in primären Knochenmarksmakrophagen wurden 45×10^6 Zellen auf 15 cm Zellkulturschalen ausgesät und nach 12h Vorstimulation mit TLR4 Ligand analog den RAW 264.7 Makrophagen von den Platten genommen und prozessiert.

2.4. Zellbiologische Methoden

2.4.1. Kultivierung von HEK 293 Zellen

Die Kultivierung von HEK 293 Zellen erfolgte auf 15 cm Zellkulturschalen in HEK 293 Medium 10% FCS (2.1.10.1) bei 37°C, 6% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90% herangezogen und dann gesplittet. Bei Erreichen der entsprechenden Zelldichte wurde der Überstand abgesaugt, die adhärennten Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und folgend mit 5 ml 1 x Trypsin in PBS von der Zellkulturschale gelöst. Der Trypsin-Verdau wurde durch Zugabe von 5 ml HEK 293 Medium 10% FCS gestoppt und die Zellen gründlich resuspendiert. 20 % der Zellen wurden auf eine neue Zellkulturschale überführt und mit HEK 293 Medium 10% FCS auf ein Volumen von 25 ml gebracht.

Für längerfristige Lagerung von HEK 293 Zellen wurden diese auf 15 cm Zellkulturschalen bis zu einer nahezu konfluenten Zelldichte herangezogen und wie zuvor beschrieben von der Platte gelöst. Nach Zentrifugation (230 g, 5 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen, die sedimentierten Zellen in 4 ml Gefriermedium (2.1.10.1) aufgenommen und zu je 1 ml in Cryo-Röhrchen aliquotiert. Nach anfänglicher Lagerung bei -20°C für 2 h wurden die Zellen für 12-24 h bei -80°C gelagert und folgend für die dauerhafte Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff transferiert.

2.4.2. Kultivierung von RAW 264.7 Zellen

RAW 264.7 Zellen wurden auf 15 cm Zellkulturschalen in RAW 264.7 Medium 10% FCS bei 37°C, 6% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Stabil exprimierende Zellen wurden analog in RAW 264.7 Medium 10% FCS mit G418 gehalten. Für die Arbeit mit den leicht durch den Kontakt mit Glaspipetten zu aktivierenden RAW 264.7 Makrophagen fanden ausschließlich sterile Plastikpipetten Verwendung. Analog zu den HEK 293 Zellen wurden die Zellen bis zu einer annähernden Konfluenz herangezogen und dann gesplittet. Die nur schwach-adhärennten Zellen wurden dazu in 5-10 ml Restmedium von der Platte gespült, zu 10-20 % auf eine frische Zellkulturschale überführt und mit RAW 264.7 Medium 10% auf ein Volumen von 20 ml gebracht.

2.4.3. Kultivierung von MEF- Zellen

Die Kultivierung von MEF-Zellen erfolgte auf 15 cm Zellkulturschalen in MEF Medium 10% FCS bei 37°C, 6% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Nach Erreichen von 80-90% konfluentem Wachstum

wurden die Zellen gesplittet. Hierzu wurde der Überstand abgesaugt, die adhärenen Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und analog den HEK 293 Zellen mit Trypsin von der Zellkulturschale gelöst. Nach Stoppen des Trypsin-Verdau durch Zugabe von BMDM/MEF Medium 10% FCS wurden die Zellen gründlich resuspendiert und zu 20% auf eine frische Zellkulturschale überführt. Das Volumen wurde durch Zugabe von frischem BMDM/MEF Medium 10 % FCS auf 20 ml ergänzt.

2.4.4. Gewinnung von murinen primären Knochenmarksmakrophagen (BMDM)

Zur Untersuchung genspezifischer Unterschiede *in vitro* fanden primäre murine aus Knochenmarkszellen ausdifferenzierte Makrophagen (BMDM, *bone marrow derived macrophages*) Verwendung. Dazu wurden Mäuse des gewünschten Genotyps durch zervikale Dislokation getötet, die Extremitäten freigelegt und durch Spülen der Röhrenknochen der vorderen und hinteren Extremitäten mit BMDM/MEF Medium 10% FCS murine Knochenmarkszellen gewonnen. Die isolierten Zellen wurden durch Zentrifugation (230 g, 5 min, 4°C) pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 10 ml BMDM Differenzierungsmedium resuspendiert. Die Knochenmarkszellen wurden auf 3-4 unbeschichteten 15 cm Petrischalen ausgesät, das Volumen mit BMDM Differenzierungsmedium auf 20 ml eingestellt. Die Inkubation und Ausdifferenzierung der Zellen erfolgte für eine Woche bei 37°C, 6% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Nach drei Tagen wurden 10 ml Zellüberstand abgenommen und durch 15 ml frisches Medium ersetzt. Nach insgesamt sieben Tagen wurde der Überstand abgesaugt, die adhärenen Zellen einmal mit PBS gewaschen und folgend mit 5 ml Accutase-Lösung versetzt. Nach kurzer Inkubation bei 37°C (5-10 min) wurden die Zellen von der Platte gespült und zu 5 ml BMDM Medium 10% FCS gegeben. Die Platten wurden nach Zugabe von 5 ml BMDM Medium 10% FCS ein weiteres Mal gespült, die Zellen vereint und durch Zentrifugation (230 g, 5 min, RT) geerntet. Das Zellpellet wurde in frischem BMDM Medium 10% FCS resuspendiert, die Zellen gezählt und entsprechend der gewünschten Zelldichte und je nach Zielsetzung in BMDM Medium 10% FCS, bzw. 2% FCS ausgesät.

2.4.5. Calcium-Phosphat Transfektion von HEK 293 Zellen

Die Transfektion von HEK 293 Zellen erfolgte nach der Calcium-Phosphat Methode. Diese Technik beruht auf der Bindung von DNA an das in einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat ausfallende Calciumphosphat. Die so entstandenen Kristalle werden von eukaryotischen Zellen durch Endozytose aufgenommen.

Für die Transfektion in 9 cm Zellkulturschalen wurden 2×10^6 HEK 293 Zellen ausgesät. Die Transfektion erfolgte frühestens 4 Stunden nach dem Aussäen. Hierzu wurden 430 µl steriles H₂O

bidest. vorgelegt und durch Zugabe von 5 bis 15 µg Plasmid DNA, sowie 63,5 µl 2 M CaCl₂ komplementiert. Die Mischung wurde unter stetem Mischen auf einem Vortexer zu 500 µl 2 x HBS getropft. Der Transfektionsansatz wurde folgend in einzelnen Tropfen auf die vorbereiteten HEK 293 Zellen pipettiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen, die weitere Analyse der Zellen nach 40-60 h post Transfektion. Die Transfektion von Zellen in kleineren Zellkulturschalen erfolgte analog nach entsprechender Reduktion des Transfektionsansatzes.

2.4.6. Transfektion von MEF-Zellen und RAW 264.7 Makrophagen

Die Transfektion von MEF-Zellen und RAW 264.7 Makrophagen erfolgte unter Verwendung des kationischen Polymers *TurboFect* der Firma Fermentas. Diese Methode beruht auf der Komplexierung der positiv geladenen verzweigten Polymere mit der zu transfizierenden DNA. Die so gebildeten Aggregate werden dann von den Zielzellen aufgenommen. Die Transfektion erfolgte gemäß der Angaben des Herstellers.

2.4.7. Transfektion von Phoenix Eco Zellen

Die Transfektion der Virusverpackungszelllinie Phoenix Eco erfolgte mittels GeneJuice[®] (Novagen) Transfektionsreagenz. Das hier verwendete Verfahren zeichnet sich durch hohe Effizienz bei äußerst geringer Zytotoxizität aus und ermöglicht so die mehrfache zeitversetzte Behandlung der gleichen Probe. Die Kombination aus zellulärem Protein sowie einem Polyamin erleichtert die Komplexierung der zu transfizierenden DNA sowie deren Ladungsneutralisation und ermöglichen so den Transfer durch die Zellmembran. Das hoch kationische Polyamin erleichtert den Austritt aus dem Endosom in das Zytoplasma der Zelle. Die Transfektion erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers.

2.4.8. Gewinnung von Zellysaten für proteinchemische Analysen

Die Lyse von Zellen zur späteren Analyse der im Zellysat enthaltenen Proteine bezüglich Expression, Lokalisation oder Aktivierungszustand erfolgte durch Inkubation der Zellen in detergentenhaltigen Puffern (2.1.5.5). Die Lyse transient transfizierter HEK 293 Zellen erfolgte 40 bis 60 h nach Transfektion. Für Untersuchungen zur durch Expression durch Kinasen beeinträchtigen Aktivierung von STAT3 wurden die Zellen 24 h vor Lyse unter Niedrigserum Bedingungen (2% FCS) gesetzt. Nach Stimulation wurde der Überstand abgenommen, die Zellen mit eiskaltem PBS von der Platte gespült und durch Zentrifugation (13000 g, 1 min, 4°C)

sedimentiert. Folgend wurde das Zellpellet in 50 µl 150 mM NaCl Lyse-Puffer resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellysate zentrifugiert (13000 g, 10 min, 4°C), der zytoplasmatische, proteinhaltige Überstand in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, mit 5 x SDS Auftragspuffer versetzt und die Lysate bis zur weitere Verwendung bei -20°C gelagert.

Zur Analyse von Zellysaten aus Knochenmarksmakrophagen wurden 2×10^6 Zellen pro well einer 6 well Platte ausgesät und nach frühestens 4 Stunden weiterverarbeitet. Je nach Versuchsansatz wurde der Serumgehalt im Medium gesenkt. Für die Analyse stimulusspezifischer Signalkaskadenaktivierung wurden die Zellen für wenigstens 12 Stunden in BMDM Medium 2% FCS kultiviert, um etwaige konstitutive Phosphorylierungssignale zu minimieren. Die Lyse der Zellen erfolgte analog dem Protokoll der zuvor beschriebenen HEK 293 Zellen.

2.4.9. Gewinnung nukleärer Extrakte

Zur differenzierten Betrachtung von zytoplasmatisch und nukleär vorliegenden Proteinen wurden 10×10^6 Knochenmarksmakrophagen auf 9 cm Zellkulturschalen ausgesät und für wenigstens 12 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Nach entsprechender Stimulation wurden die Zellen mittels des NUCLEI EZ PREP NUCLEI ISOLATION KIT (Sigma-Aldrich) aufgeschlossen und die Zellkerne separiert. Folgend wurden die isolierten Kerne in 50 µl Totex Puffer 1,5 % Igepal NP40 resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (13000 g, 10 min, 4°C) wurde der die nukleären Proteine enthaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 5 x SDS Auftragspuffer versetzt und bis zur weitere Analyse durch SDS-PAGE bei -20°C gelagert.

2.4.10. Luciferase Reporterassay

Mithilfe des Luciferase Reportersystems ist es möglich, die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors oder eines Promotors in Abhängigkeit von Co-exprimierten Rezeptoren oder Signalmolekülen beziehungsweise spezifischer Stimulation der Zellen zu analysieren.

Im hier verwendeten System ist der auf Aktivierung zu untersuchende Promotor mit dem Luciferasegen der Feuerfliege gekoppelt. Bei Induktion des Promotors durch Bindung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren kommt es zur Transkription des Luciferasegens. Die so an die Stärke der Promotoraktivität gekoppelte Expression der Luciferase kann anschließend anhand der Enzymaktivität quantifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Zelllinien für die Promotoraktivitätsstudien verwendet: HEK 293 Zellen und RAW 264.7 Makrophagen. 1×10^6 HEK 293 Zellen wurden in 200 ml HEK

293 Medium 10 % FCS pro Vertiefung einer 96 well Platte ausgesät und etwa 6 Stunden später mittels Calcium-Phosphat Transfektion transfiziert. Der Transfektionsansatz umfasste das Reporterplasmid *pGL-2-PAI2* sowie den das Co-Reportergen Renilla-Luciferase tragenden Vektor *pHRL-null*. Die Signalstärke der unter Kontrolle des T7 Promotors stehenden Renilla-Luciferase wurde später als Transfektionseffizienz-Kontrolle in die Berechnung der relativen Reporteraktivität mit eingebunden. Ein Transfektionsansatz für eine 96 well Platte setzte sich wie folgt zusammen:

660 µl	H ₂ O bidest.	
90 µl	2 M CaCl ₂	
10 µg	<i>pGL-2-PAI2</i>	(100 ng/well)
6,3 µg	<i>pHRL-null</i>	(6,3 ng/well)
5 µg	<i>pRK5</i> (Leervektor)	(5 ng/well)

zu 750 µl 2 x HBS

Je well wurden 15 µl Transfektionslösung pipettiert. Zur Induktion der TLR Signalkaskade wurden weitere Expressionsplasmide co-transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert, das Medium am Folgetag durch HEK 293 Medium 2% FCS ersetzt und die Zellen für weitere 24 Stunden bebrütet. Zur Analyse der Genaktivität, wurde der Zellüberstand abgesaugt und je Vertiefung 40 µl 1x Reporter Lyse-Puffer zugegeben. Die Lyse erfolgte für 30 min bei RT auf dem Orbitalschüttler. Die Quantifizierung der Luciferaseaktivität erfolgte durch Messung der bei der Umsetzung des Substrates D-Luciferin freigesetzten Photonen. Verwendung fand ein Orion L Microplate Luminometer der Firma Berthold Detection Systems. Die Messung der freigesetzten Lichtquanten erfolgte nach automatischer Injektion von 50 µl Luciferase-Substrat. Analog dazu erfolgt die Quantifizierung der Renilla-Aktivität über die Umsetzung des Substrates Coelenterazin nach Injektion von 50 µl Renilla-Substrat pro Vertiefung. Aufgrund der schlechten Induzierbarkeit des *PAI2*-Promotors nach TLR Stimulation in HEK 293 Zellen wurden RAW 264.7 Makrophagen mit dem Reporter transfiziert. Zu diesem Zweck wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen je Vertiefung einer 24 well Platte ausgesät. Die Transfektion mittels TurboFect erfolgte 6-8 Stunden später. Nach Kultivierung über Nacht wurde das alte Medium durch RAW Medium 2% FCS substituiert, die Zellen abends mit den entsprechend angegebenen Liganden stimuliert und am Folgetag nach Zellyse in 100 µl 1 x Reporter Lyse-Puffer die Aktivität des Promotors gemessen.

2.4.11. ELISA

Der ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) ist ein antikörpergestütztes Nachweisverfahren zur Detektion und Quantifizierung von Proteinen oder niedermolekularen Verbindungen in Zellüberständen, Zelllysaten oder Seren.

Das Prinzip des in dieser Arbeit verwendeten sogenannten Sandwich-ELISAs basiert auf zwei unabhängigen spezifisch gegen ein Antigen gerichteten Antikörpern. Während ein immobilisierter Antikörper (*coating antibody*) die Bindung des zu detektierenden Antigens vermittelt, erfolgt die Erkennung des Antigens über einen zweiten spezifischen Antikörper (*detection antibody*). Dieser ist direkt oder indirekt mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) gekoppelt und erlaubt die Quantifizierung des gebundenen Antigens über die Umsetzung des chromogenen Peroxidasesubstrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Alle in dieser Arbeit verwendeten ELISA Antikörper wurden von R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA) bezogen.

Zur Analyse der in dieser Arbeit dargestellten Zytokinfreisetzung *in vitro* stimulierter Knochenmarksmakrophagen wurden 2×10^5 Zellen in 200 μ l BMDM Medium 10 % in die Vertiefungen einer 96 well Platte ausgesät. Die Stimulation mit TLR-Liganden oder anderen PAMPs erfolgte wie angegeben. Nach Ablauf der Stimulation wurden die Zellüberstände abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Zur Bestimmung intrazellulärer Zytokinkonzentrationen wurden die vorliegenden Zellen in 10 μ l 150 mM NaCl Lyse-Puffer aufgenommen und für 20 min bei 4°C inkubiert.

Für den spezifischen Nachweis verschiedener Zytokine wurden 96 well ELISA-Platten mit je 50 μ l der entsprechenden Verdünnung des *capture* Antikörpers in PBS beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Es folgte das fünfmalige Waschen in PBT sowie das einstündige Blocken freier Bindestellen mit 50 μ l *Blocking*-Puffer. Nach erneutem Waschen mit PBT wurden entsprechende Verdünnungen der zu untersuchenden Proben in *Reagent Diluent* aufgetragen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anhand einer ebenfalls aufgetragenen Verdünnungsreihe des entsprechenden Zytokinstandards war es später möglich, die sich darstellenden Messwerte zu quantifizieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte das erneute Waschen der Platten in PBT sowie die Zugabe von 50 μ l des biotinylierten Sekundärantikörpers, gelöst in *Reagent Diluent*. Nach weiteren 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten mit PBT gewaschen und HRP-konjugiertes Streptavidin (R&D Systems, 1:200 in *Reagent Diluent*) zugegeben. Nach Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur wurden die Platten gewaschen und 50 μ l TMB-Substrat pro Vertiefung zugegeben. Die Farbentwicklung erfolgte bei Dunkelheit und wurde nach Erreichen ausreichender Signalstärke durch Zugabe von 50 μ l Stopp-Lösung beendet. Die Quantifizierung der umgesetzten Menge an

TMB erfolgte über die Absorption bei 450 nm in einem SunriseTM Microplate Reader der Firma Tecan.

2.4.12. Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist ein auf der biologischen Wechselwirkung bestimmter eukaryotischer Transkriptionsfaktoren basierendes Verfahren zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen. Diese setzen sich aus zwei strukturell und funktionell zu unterscheidenden Domänen zusammen. Eine DNA-bindende Domäne vermittelt die Interaktion mit einer spezifischen *Upstream-Aktivator* Sequenz (UAS) der DNA und positioniert den Transkriptionsfaktor in der Nähe einer Transkriptionseinheit oder eines Promotors. Diese DNA-Bindung des Proteins ist essentiell, für seine Funktion jedoch nicht ausreichend. Erst der durch die Aktivierungsdomäne vermittelte Kontakt mit dem basalen Transkriptionsapparat führt zur Induktion der Transkription.

Das Prinzip des Zwei-Hybrid-Systems beruht auf den besonderen Eigenschaften der beiden Domänen: ihrer funktionalen Komplementarität und Modularität. Die Trennung der beiden Domänen führt zu einem Funktionsverlust der Aktivierungsdomäne: die separate Expression der Funktionsmodule in einer Zelle löst keine Transkription aus. Die Fusion beider Module mit zwei interagierenden Proteinen, beziehungsweise Proteindomänen X und Y, führt zur Kopplung der für die Funktion relevanten Module. Die Wirkung des auf diese Weise rekonstituierten Transkriptionsfaktors ist demnach abhängig von der Interaktionsfähigkeit der Fusions-Proteine. Die Bindung zweier Proteine, die letztlich im Zellkern von Hefezellen lokalisiert sind, wird so durch die Aktivierung der Transkription eines Reportergens, dessen Promotorregion über die für das DNA-Bindemodul spezifische DNA Sequenz verfügt, indirekt messbar.

Im Wesentlichen haben zwei Zwei-Hybrid-Subsysteme weite Verbreitung gefunden: Erstmals 1989 beschrieben, beruht das System nach Fields und Song auf der Verwendung der Funktionsmodule aus dem Gal-4 Protein aus Hefen (Fields und Song, 1989). Brent *et al.* veröffentlichten ein leicht modifiziertes System, welches auch in den folgenden Versuchreihen Verwendung fand. Hierbei ist die DNA-Bindungsdomäne von Gal4 durch ein funktional analoges DNA-bindendes Segment aus dem bakteriellen LexA-Protein ersetzt. Das korrespondierende Reporterplasmid verfügt in seiner Promotorregion über die entsprechenden LexA-Erkennungssequenzen. Die veränderte Promotorregion enthält gegenüber dem Wildtyp keine eigenen Aktivierungssequenzen, welche den Promotor auf einen physiologischen Stimulus (z.B. Galactose) hin aktivierbar machen würden. Die Unzulänglichkeit der basalen Elemente wie TATA-Box für eine nennenswerte Aktivierung der Transkription führt so zu einer selektiven Aktivierung alleinig durch Rekrutierung der entsprechenden Proteine an den LexA-Promotor. Als Reportergen findet das lacZ-Gen aus

Escherichia coli Verwendung, welches für das Enzym β -Galactosidase codiert. β -Galactosidase setzt das Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-Dgalactopyranosid) zu einem blauen Produkt um. Hefezellen die über das aktivierte Reporter gen verfügen lassen sich so durch ihre Färbung identifizieren.

Ein zweites Reporterkonstrukt ist in das Genom des Wirtshefestamms integriert: so steht das *LEU2*-Gen, welches von essentieller Bedeutung für die Biosynthese der Aminosäure Leucin ist, ebenfalls unter der Kontrolle des LexA-Operators. Das *LEU2*-Gen codiert das Enzym β -Isopropylmalat-Dehydrogenase welche für die Synthese von α -Ketoisocaproat, einer unmittelbaren Vorstufe der Aminosäure Leucin verantwortlich ist. So sind nur jene Hefezellen in der Lage zu wachsen, deren Leucinbiosynthese aufgrund der Interaktion der beiden Fusionsproteine aufreguliert ist. Somit ergeben sich zwei Screening Kriterien: Wachstum und Blaufärbung.

Der verwendete Hefestamm EGY 48 (*Saccharomyces cerevisiae*) ist für die Aminosäuren Tryptophan, Uracil, Histidin und Leucin auxotroph. Diese Defizite können durch die Expressionsvektoren bzw. den *LEU2*-Reporter, die essentielle Gene für die Synthese dieser Aminosäuren enthalten, komplementiert werden. Die Transformation der Expressionsvektoren in Hefezellen, beziehungsweise die Interaktion zwischen Köder- und Genbankprotein kann so durch Wachstum auf Medium, welchem die entsprechende Aminosäure fehlt, überprüft werden.

Während sich das LexA-X Fusionsprotein unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Alkoholdehydrogenase Promotors (ADH) befindet, wird die Transkription des B42-Y Fusionsprotein über den durch Galaktose induzierbaren GAL1-Promotor reguliert. In Galaktosehaltigem Medium erfolgt so die Expression der Aktivatorfusionsprodukte. Die jeweiligen mRNA-Stränge werden im Zellkern der Hefezelle transkribiert und im Zytoplasma translatiert. Die Fusionsproteine treten in den Zellkern ein, und die LexA-X Fusion bindet an stromaufwärts der Reporter gene gelegene LexA-Bindungsstellen. Kommt es nun zu einer Interaktion zwischen Köder- und Zielprotein, so werden die Reporter gene induziert und ermöglichen diesem Hefestamm ein Wachstum auf Leucin-freiem Medium und eine Blauverfärbung in einem X-Gal-Versuch

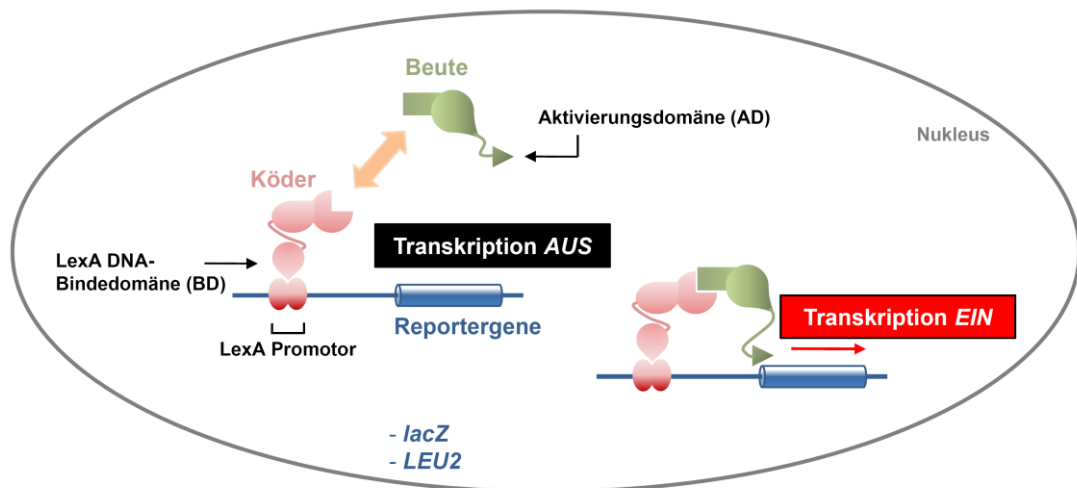


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Hefe-Zwei-Hybrid Versuchs. Die Interaktion der beiden zu testenden Proteine führt zur proximalen Annäherung der DNA-Binde- und der Aktivierungsdomäne. Die Lokalisierung der Aktivierungsdomäne in der Nähe des Transkriptionsstarts führt zur Induktion der Transkription der Reporter gene (*LEU2* und *lacZ*).

2.4.13. Herstellung von kompetenten *S. cerevisiae* zur Transformation

Zur Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* für LiAc-Transformation wurden mehrere Kolonien der Hefe von Kulturplatten abgenommen und in 1 ml des entsprechenden Selektionsmediums resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml des betreffenden Mediums überführt, die Kultur für 16 bis 18 Stunden bei 30°C auf einem Schüttler bei 180 rpm inkubiert. Nach Erreichen der stationären Phase wurden 300 ml frisches Selektionsmedium mit Übernachtskultur beimpft, eine OD_{600} von 0,2 - 0,3 eingestellt. Nach Inkubation bei 30°C und 180 rpm und Wachstum der Zellen bis zu einer OD_{600} von 0,4 - 0,6 wurden diese zentrifugiert (1000 x g, 5 min, RT) und das resultierende Zellsediment in 50 ml sterilem 1 x TE-Puffer gewaschen. Einem weiteren Waschschritt folgend, wurden die sedimentierten Zellen in 1,5 ml einer frisch hergestellten TE/LiAc Lösung resuspendiert und direkt transformiert.

2.4.14. Transformation von *S. Cerevisiae*

Mit Hilfe der LiAc-Transformation kann externe Plasmid-DNA in *S. cerevisiae* etabliert werden. Auf Eis wurden 200 ng Plasmid DNA sowie 100 µg Carrier-DNA gemischt und mit 100 µl der frisch hergestellten kompetenten Zellen vereint. Weiterhin folgten die Zugabe von 600 µl einer frisch angesetzten PEG/LiAc-Lösung, kurzes Vortexen, sowie die Inkubation des Ansatzes auf dem

Schüttler (200 rpm) für 30 Min bei 30°C. Nach Zugabe von 70 µl Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) und Mischen der Lösung durch Inversion folgte ein Hitzeschock für 15 Min bei 42°C, sowie die Inkubation für 2 min auf Eis. Nach Zentrifugation (10000 x g, 10 sec, RT) wurde der Überstand verworfen, die sedimentierten Hefezellen in 500 µl sterilem TE-Puffer aufgenommen und auf entsprechenden Selektionsplatten zu einem Volumen von 200 µl ausgestrichen. Die Wachstumsdauer der Hefen betrug etwa 3 bis 7 Tage.

2.4.15. Blau-Weiß Interaktionsanalyse

Nach Anwachsen der dreifach transformierten Hefezellen auf SD-His-Trp-Ura wurden fünf Einzelklone abgenommen und auf das X-Gal haltige Analysemedium SD-His-Trp-Ura-Leu übertragen. Nach Inkubation bei 30°C für bis zu 7 Tage wurden die Einzelklone auf Blaufärbung und Wachstum analysiert.

2.4.16. Chromatin-Immunopräzipitation/ChIP

Die Chromatin-Immunopräzipitation ist ein Verfahren zur Analyse der Bindungsfähigkeiten distinkter Proteine an spezifische Abschnitte genomischer DNA. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet, um Wechselwirkungen zwischen speziellen Transkriptionsfaktoren und einzelnen Promotorsequenzen nachzuweisen.

Das Grundprinzip beruht auf der Fixierung der zu einem bestimmten Zeitpunkt bestehenden Protein-DNA Bindungen durch Formaldehyd, der Größenreduktion der gebundenen DNA und der Immunopräzipitation des zu untersuchenden Proteins durch Verwendung spezifischer Antikörper. Die so isolierte DNA wird vom Protein gelöst und unter Verwendung sequenzspezifischer Primer mittels PCR hinsichtlich ihrer Identität untersucht.

Im Einzelnen wurden RAW 264.7 Makrophagen auf 15 cm Zellkulturschalen ausgesät und bis 80 % Konfluenz kultiviert. 16 h vor Stimulation wurde die Serumkonzentration des Mediums auf 2 % reduziert. Nach entsprechender Stimulation wurden die Zellen in Medium von den Platten gespült und nach Zugabe von Formaldehyd 37 % (Endkonzentration 1 %) unter gelegentlichem Schwenken für 10 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 5 % (v/v) 2,5 M Glycin wurde die Reaktion gestoppt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die Zellen zentrifugiert (453 x g, 4 min, 4°C), der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen zweimal in 10 ml eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Die Isolation der Nuklei folgte in drei Waschschritten in 10 ml *Run-on-lysis* Puffer (201 x g, 5 min, 4°C). Zur Fragmentierung der genomischen DNA wurden die Zellen in 1,5 ml MNase Puffer 1 mM PMSF resuspendiert, mit 100 U MNase versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Aktivität der MNase wurde durch Zugabe von 30 µl 200 mM EGTA, 10 µl 100 mM

PMSF, 50 µl 50 x Proteininhibitorlösung gestoppt, der Ansatz durch 590 µl MNase Puffer, 200 µl 10 % (w/v) SDS und 80 µl 5 M NaCl komplementiert. Zur vollständigen Fragmentierung wurden die Proben auf Eis 10 min im *Bioruptor*TM (Diagenode) sonifiziert (50 % Zyklus, 50 % Power). Zelluläre Bruchstücke wurden durch Zentrifugation (13000 x g, 20 min, 4°C) sedimentiert, die Überstände zu 800 µl Aliquots weiterverarbeitet. Nach Zugabe von 200 µl *IP Dilution* Puffer erfolgte das *preclearing* der Lysate durch Zugabe von 7 µl normalem Ziegen Serum (*normal goat serum*, NGS; 30 mg/ml) sowie 80 µl der in *IP Dilution* Puffer vorgewaschenen *Protein G-Plus beads* (Santa Cruz). Nach zweistündiger Inkubation unter Rotation bei 4°C wurden die Proben zentrifugiert (13000 x g, 20 sec, 4°C), die abgenommenen Überstände mit 3,5 µl NGS und 80 µl der *beads*- Suspension versetzt und unter Rotation inkubiert (1 h, 4°C). Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die letztmalige Inkubation der Überstände in 80 µl *beads* für 1 h bei 4°C. Von den nach einem letzten Zentrifugationsschritt gewonnenen Überstände wurden 100 µl als *input* Kontrolle abgenommen und bei -20°C gelagert. Die verbleibenden Proben wurden mit Präzipitationsantikörper versehen (Verdünnung 1:100) und unter Rotation über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde der Ansatz nach Zugabe von 100 µl *Protein G-Plus Agarose beads* 3 h inkubiert (Rotation, 4°C), die an die *beads* gebundenen Antikörper Protein Komplexe anschließend dreimalig in *IP Dilution* Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte die Zentrifugation der Proben (2000 x g, 2 min, 4°C). Nach letztmaliger Zentrifugation wurden die in 500 µl *IP Dilution* Puffer aufgenommenen *beads* in SpinX Säulchen (Costar) überführt, nach Rotation für 5 min (RT) abermals zentrifugiert (2000 x g, 2 min, RT) und der Säulendurchfluss verworfen. Es folgten nacheinander Waschschriffe der an der Säulchenmembran zurückgehaltenen *beads* in 500 µl der Pufferlösungen *ChIP Wash 1*, *ChIP Wash 2*, *ChIP Wash 3*, bei jeweiliger Inkubation unter Rotation für 5 min. Nach dreimaligem Waschen 1 x TE wurden die *beads* in 300 µl Elutionspuffer aufgenommen, unter Schütteln bei 65°C für 30 min inkubiert und nachfolgend die proteingebundene DNA durch Zentrifugation (3000 x g, 2 min, RT) in ein frisches Reaktionsgefäß eluiert. Der Elutionsschritt wurde durch Zugabe von 100 µl Elutionspuffer wiederholt, die Protein-DNA Quervernetzung durch Zugabe von 16 µl 5 M NaCl und Inkubation bei 65°C über Nacht aufgehoben. Die Aufreinigung der Eluat-DNA, als auch der zuvor abgenommenen *input* Proben von kontaminierendem Protein erfolgte durch Phenol-Chloroform Extraktion (2.2.14), die Fällung und Aufkonzentration durch nachfolgende Ethanolpräzipitation (2.2.15). Die nach Fällung pelletierte DNA wurde in 30 µl TE-Puffer gelöst und die Konzentration mittels NanoDrop bestimmt. Die Bindung an distinkte DNA Sequenzen wurde unter Verwendung promotorspezifischer Primer mittels PCR analysiert (2.1.7).

2.4.17. Inflammasom-Aggregation

Die Inkubation von Zelllysaten bei 37°C führt zeitabhängig zur Bildung des Inflammasoms und ermöglicht so die Simulation eines durch Aktivierungsreize initialisierten Aggregation der Inflammasomkomponenten (Martinon et al., 2002).

Aufgrund des Fehlens des für ATP induzierte NALP3 Aktivierung essentiellen P2X7 Rezeptors auf HEK 293 Zellen wurde zur Untersuchung stimulationsbedingter Aggregation bestimmter Inflammasombestandteile auf dieses zellfreie System zurückgegriffen. 2×10^6 HEK 293 Zellen wurden auf 9 cm Zellkulturschalen ausgesät und nachfolgend mit je einem Expressionsplasmid der zu untersuchenden Interaktionspartner mittels Calcium-Phosphat-Transfektion transient transfiziert (2.4.5). 60 h nach Transfektion wurden die Zellüberstände abgenommen und die Zellen unter Inkubation auf Eis mit eiskaltem PBS von den Zellkulturplatten gespült. Nach Zentrifugation (230 g, 5 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen in 1 ml hypotonem Puffer K resuspendiert. Nach Aufquellen der für 15 min auf Eis inkubierten Zellen wurde die Membranintegrität durch 15 maliges Passieren der Zellsuspension durch eine G22 Spritze zerstört. Große zelluläre Bruchstücke wurden durch Zentrifugation (13000 x g, 15 sec, 4°C) sedimentiert, die Überstände abgenommen und filtriert (0,45 µm). Die einzelnen Lysate wurden wie angegeben kombiniert und für die angegebenen Zeitpunkte bei 37°C inkubiert. Nach Stimulationsende wurden die Proben auf 4°C gekühlt und 50 µl Lysat als Expressionskontrolle abgenommen. Das verbleibende Zelllysate wurde mit 18 µl *Agarose-beads*-gekoppelter Antikörper versetzt und unter Rotation über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden die an die *Agarose-beads* gebundenen Moleküle durch Zentrifugation (13000 g, 20 sec, 4°C) sedimentiert, der Überstand verworfen und die Präzipitate fünfmalig in Puffer K gewaschen. Bis zur Analyse mittels SDS-PAGE wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.4.18. Retrovirale Transduktion von Knochenmarksmakrophagen

Die retrovirale Transduktion ist eine Methode zum Einbringen von Fremd-DNA in Zellen unter Verwendung von Retroviren. Nach Infektion einer Zielzelle zeigen sich Retroviren in der Lage, ihr einzelsträngiges RNA-Genom in doppelsträngige DNA umzuschreiben und diese in das Genom der Wirtszelle zu integrieren. Der Kontakt mit und die Aufnahme in die Zielzelle wird dabei durch spezifische Bindung des viralen Hüllproteins (*envelope*) an bestimmte, oberflächenassoziierte Rezeptoren vermittelt. Somit entscheidet die Expression des entsprechenden Rezeptors ob eine Zelle vom Virus befallen wird oder nicht. Das in dieser Arbeit verwendete retrovirale System zeichnet sich durch seine Spezifität für murine Zellen aus. So interagiert das ecotrope Oberflächenprotein mit einem Aminosäure-Transporterprotein, das ausschließlich auf Mauszellen exprimiert wird (Wang et al., 1991).

2.4.18.1. *Herstellung der Retroviren*

Die verwendete Virusverpackungszelllinie Phoenix E trägt ein retrovirales Provirus, welches die für die viralen Proteine kodierenden Gene enthält. Wird diese zusätzlich mit einem retroviralen Vektor transfiziert, der neben dem zu transduzierenden Gen das Verpackungssignal ψ enthält, kommt es zur wirtszellvermittelten Produktion und Sekretion retroviraler Partikel.

Zur Erzeugung von Retroviren wurden 2×10^6 Phoenix Eco Zellen in HEK 293 Medium 10 % FCS auf 9 cm Zellkulturschalen ausgesät. Nach etwa 8 Stunden erfolgte, unter Verwendung von GeneJuice, die Transfektion des betreffenden, für das Zielgen codierenden, retroviralen Vektors. Die Transfektionsschritte wurden im Abstand von 12 Stunden wiederholt. 8 Stunden nach der letzten Transfektion wurde der Zellüberstand abgenommen und durch 7 ml frisches Medium Phoenix E 10 % FCS ersetzt. Die Überstände wurden nach 12, 24 und 36 Stunden gesammelt und etwaige Zellen durch Zentrifugation ($1500 \times g$, 5 min, 4°C) sedimentiert. Folgend wurde der Überstand filtriert ($45 \mu\text{m}$) und durch Zugabe von $50 \mu\text{g/ml}$ SCF, $10 \mu\text{g/ml}$ IL-6 und IL-3, sowie $8 \mu\text{g/ml}$ Polybren komplementiert. Die Transduktion der frisch isolierten murinen Knochenmarkszellen erfolgte wie nachfolgend beschrieben.

2.4.18.2. *Transduktion der Knochenmarkszellen*

Aufgrund ihrer Resistenz gegenüber klassischen Transfektionsverfahren wurden murine Knochenmarksmakrophagen mittels retroviraler Transduktion mit Fremd-DNA bestückt. Zu diesem Zweck wurden, wie zuvor beschrieben, murine Knochenmarkszellen isoliert und zu 2×10^6 je well einer 6-well Platte in 2 ml Medium ausgesät. Das verwendete Medium, Phoenix Eco 10 % FCS, wurde durch Zugabe von $50 \mu\text{g/ml}$ SCF, $10 \mu\text{g/ml}$ IL-6 und IL-3, sowie $8 \mu\text{g/ml}$ Polybren vervollständigt. Die Zugabe der Zytokine IL-3 und IL-6 sowie des Stammzellfaktors (*stem cell factor, SCF*) verhindert die Differenzierung der isolierten Knochenmarkszellen und ermöglicht so deren Kultivierung als Vorläuferzellen. Die Ausdifferenzierung zu Knochenmarksmakrophagen erfolgte erst nach der Transduktion. Das Polykation Polybren verbessert die Interaktion zwischen viralem Glycoprotein und zellulärem Rezeptor und trägt somit zur Erhöhung der Transduktionseffizienz bei (Conti et al., 1991; Arcasoy et al., 1997). Die Transduktion der Zellen erfolgte durch dreimalige Zugabe des virushaltigen, aufbereiteten Überstandes, jeweils im Abstand von 12 h. Zur weiteren Erhöhung der Transduktionseffizienz wurden die mit frischen Viren beladenen Zellen für 70 min bei $300 \times g$ und 37°C zentrifugiert. 12 h nach der letzten Virusgabe wurden die transduzierten Zellen von den Platten gespült und einmalig in BMDM Medium 10 % FCS gewaschen. Nach Zentrifugation ($230 \times g$, 5 min, RT) wurden die Zellen in BMDM Differenzierungsmedium resuspendiert und gemäß Beschreibung unter (2.4.4) ausdifferenziert und prozessiert.

2.4.19. cDNA-Microarray

Für die vergleichende Analyse differentiell exprimierter Gene in wurde in Kooperation mit dem Labor von Prof. Roland Lang ein genomweiter *cDNA-Microarray* (Affymetrix 430 2.0) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Knochenmarksmakrophagen von wt und STAT3^{Δmye} stimuliert, die RNA wie beschrieben (2.4.20) isoliert und durch den Kooperationspartner für die Analyse auf dem *Genearray* prozessiert. Die Überprüfung der RNA-Integrität, sowie DNase Verdau, Synthese von cDNA und biotinylierter cRNA, deren Hybridisierung auf dem Genchip erfolgte nach Standardprotokollen. Ebenso die Färbung mit Streptavidin-PE sowie das Scannen des Genearrays.

Die Auswertung und Sichtung der Daten erfolgte mittels *Gene Chip Operating Software (GCOS) 1.2-* und *Data Mining Tool (DMT) 3.1-*Software (Affymetrix). Bei der Auswertung der erhaltenen Expressionsdaten wurde der Fokus auf spezifisch im STAT3-Knockout verringert exprimierte Gene gerichtet.

2.4.20. RNA Isolation

Zum analytischen Vergleich der unterschiedlichen Genexpressionsniveaus wurden 2×10^6 Knochenmarksmakrophagen unterschiedlicher Genotypen auf 6-well Zellkulturplatten in 2 ml BMDM Medium 10 % FCS ausgesät. 12 Stunden vor Stimulation wurde das Medium abgenommen und durch BMDM Medium 2 % FCS ersetzt. Nach Stimulation wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und durch Zugabe von 500 μ l peqGOLD Trifast (peqlab) und 2 minütiges Schwenken aufgeschlossen. Nach Zugabe von 200 μ l Chloroform (Roth) und kurzem Vortexen, sowie Inkubation der Proben für 5 min bei RT erfolgte durch Zentrifugation (13000 x g, 15 min, 4°C) die Trennung der Phasen. Die RNA enthaltende wässrige Phase wurde abgenommen, mit 300 μ l Isopropanol versetzt und die DNA durch Inkubation über Nacht bei 4°C gefällt. Die nach Zentrifugation (13000 x g, 15 min, 4°C) sedimentierte RNA wurde mit 500 μ l Isopropanol versetzt, pelletiert (7500 x g, 8 min, 4°C) und bei RT getrocknet. Folgend wurde die getrocknete RNA in RNase freiem Wasser resuspendiert und zur Verbesserung des Lösungsprozesses für 10 min bei 55°C inkubiert. Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde im NanoDrop gemessen, die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.4.21. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 1,5 µg RNA je Ansatz verwendet. In einem ersten Schritt wurde kontaminierende DNA durch Zugabe von DNase I für 15 min bei RT verdaut. Ein Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

DNase I Verdau

1 µl	10 x Puffer (-MgCl ₂)	(Invitrogen)
0,5 µl	RiboLock RNase Inhibitor (40U/µl)	(Fermentas)
0,4 µl	MgCl ₂ (50mM)	(Invitrogen)
0,5 U	DNase I	(RNase free Roche)
Σ 10µl	DEPC-H ₂ O	

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1µl 12,5 mM EDTA gestoppt, die DNase durch Inkubation des Ansatzes bei 65°C für 15 min inaktiviert. Folgend wurden die auf Eis gelagerten Proben mit je 1 µl Oligo(dt)₁₈ Primer (0,25µg/ml) (Fermentas) versetzt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis verbracht und wie folgt komplementiert:

Reverse Transkription

1µl	10 x Puffer(-MgCl ₂)	(Invitrogen)
1µl	MgCl ₂ (50mM)	(Invitrogen)
1µl	dNTPs (10mM)	(Fermentas)
2µl 0,1M	DTT	(Invitrogen)
Σ 19µl	DEPC-H ₂ O	

Der Ansatz wurde gemischt, für 5 min bei 42°C inkubiert und durch 100U RevertAit M-MuLV Reverse Transkriptase (Fermentas) ergänzt. Die Transkriptionsreaktion erfolgte durch Inkubation für 1 h bei 42°C gefolgt von 15 min bei 70°C zur Inaktivierung des Enzyms. Die generierten cDNAs wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.4.22. RT-qPCR

Die *Real-time quantitative PCR* (RT-qPCR) ist ein auf der Polymerase Kettenreaktion basierendes Verfahren zur Quantifizierung der erhaltenen cDNA. Sie findet vor allem Verwendung bei der Analyse transkriptioneller Aktivität innerhalb einer Zelle. Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonden binden in bestimmten Schritten des PCR-Zyklus an die neu

synthetisierte DNA und ermöglichen, durch Messung der proportional zur Menge der neu amplifizierten DNA zunehmenden Fluoreszenz, die Quantifizierung des PCR-Produktes in Echtzeit. Der in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I bindet an dsDNA (Morrison et al., 1998).

Die Quantifizierung der mRNA-Expression bestimmter Gene erfolgte durch quantitative RT-PCR in einem *Light-cycler 480* (Roche). Der Reaktionsansatz für die Detektion von TNF α und β -Aktin setzte sich wie folgt zusammen:

10 μ l	Master-Mix	(Lightcycler 480 Probes Master 2x; Roche)	
2 μ l	cDNA		
0,6 μ l	je Primer	(20 μ M)	(MWG)
1 μ l	SYBR-Green	(1:500)	(Eugene)
Σ 20 μ l	H ₂ O bidest.		

Der Reaktionsansatz des für die Analyse der PAI-2 Expression verwendeten *QuantiTect Primer Assay* (Qiagen) sah die Verwendung von 2 μ l Primer Assay, bei sonst unveränderten Bedingungen und Mengen vor. Folgende Reaktionsparameter wurden programmiert:

<i>Hotstart</i>			
1.	95°C	10 min	<i>Ramp Rate</i> (°C/sec) 4,4
2.	95°C	15 sec	
3.	58°C	20 sec	
4.	72°C	30 sec	<i>Single Acquisition Mode</i>
5.	45°C	hold 10 sec	<i>Ramp Rate</i> (°C/sec) 1,5

Die Schritte 2 bis 4 wurden als Zyklus 50 mal wiederholt. Nach Beendigung des Laufs wurde mittels der Funktion *AbsQuant/2nd Derivative Max* der C_T (*threshold cycle*) Wert jeder Probe bestimmt und die fache Regulation der einzelnen untersuchten Gene errechnet. Der mRNA Gehalt des *housekeeping*-Gens β -Aktin diente zur Normalisierung der erhaltenen Werte und sollte Abweichungen in den eingesetzten cDNA Mengen ausgleichen. Die Berechnung der fachen Induktion erfolgte nach folgenden Formeln:

$$\Delta C_T = C_T(\text{Gen}) - C_T(\beta\text{-actin})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{stimuliert}) - \Delta C_T(\text{unstimuliert})$$

$$\text{Fache Änderung: } 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung von STAT3 als neuer Interaktionspartner von TLR1 und MyD88

3.1.1. Hefe-Zwei-Hybrid-Screen

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle eines potentiellen neuen TLR-Interaktorproteins in der TLR vermittelten Signalgebung zu untersuchen und es in Bezug auf seine TLR-spezifische Funktion zu charakterisieren. Das zu untersuchende Protein, STAT3 (*signal transducer and activator of transcription*), war in vorangegangener Arbeit bei der Durchsichtung einer cDNA Bibliothek, unter Verwendung des LexA Hefe-Zwei-Hybrid Systems, nach bislang unbekanntem Interaktionspartnern der zytosolischen TIR Domäne des humanen TLR1 als Interaktorprotein identifiziert worden. Verwendung fand eine cDNA Bibliothek aus humanen Leukozyten. Insgesamt wurden $1,5 \times 10^6$ Hefe Transformanten, transfiziert mit bis zu fünf unabhängige cDNAs tragenden Beute-Plasmide, untersucht. Der Screen führte zur Identifikation zweier unabhängiger für STAT3 kodierender cDNA Klone.

3.1.2. Hefe-Zwei-Hybrid-Interaktionsstudien

Die aus dem Screen hervorgegangenen Befunde wurden durch Überprüfung des STAT3 Vollängenproteins hinsichtlich Interaktion mit TLR1 bestätigt.

Hierzu wurde die codierende Sequenz von STAT3 mittels spezifischer Primer amplifiziert und über Splice-PCR in den Beutevektor pJG4-5 subkloniert. Aufgrund redundanter Schnittstellen, sowohl in der *multiple cloning site* des Vektors als auch in der zu klonierenden DNA war eine klassische Subklonierung über Restriktionsschnittstellen nicht möglich. Die erfolgreiche Klonierung wurde über einen Vektorverdau bestätigt und mittels Sequenzierung auf Korrektheit überprüft. Aufgrund der starken Konservierung der TIR-Domäne innerhalb der Familie der Toll-like Rezeptoren, aber auch der TIR-Domänen beinhaltenden Adaptermoleküle, sowie der eher untergeordneten Rolle von TLR1 in der Ligandenerkennung und pathogenvermittelten Signalübertragung wurden sowohl die intrazellulären Domänen weiterer TLRs, als auch das Adapterprotein MyD88 in die Interaktionsstudien einbezogen. Die Subklonierung der zu testenden Bindungspartner erfolgte via PCR Amplifikation der betreffenden Domänen aus für die jeweiligen Vollängenproteine codierenden, Expressionsvektoren. Die Definition der intrazellulären Domäne erfolgte mittels der

SMART-EMBL Online Software (<http://smart.embl-heidelberg.de>). Die Subklonierung in den Hefe-Köder-Vektor erfolgte über Restriktionsverdau und Ligation der entsprechenden kompatiblen DNA Enden. Die zur Amplifikation verwendeten Primer, sowie die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Für die Interaktionsstudien fand das *Matchmaker LexA* Hefe-Zwei-Hybrid-System der Firma Clontech Verwendung. Die bereits das für β -Galaktosidase codierende Reporterplasmid enthaltenden Hefen vom Stamm *Saccharomyces cerevisiae* EGY48 wurden mit dem STAT3 enthaltenden Beuteplasmid (pJG4-5-STAT3wt) transformiert. Nach Selektion der Transformanden durch Plattierung auf SD-Trp-Ura Agar wurden in einem weiteren Transformationsschritt die für die intrazellulären Domänen der TLRs 2, 3, 4, 7, 8, 9 und 10, sowie für MyD88 codierenden Köderplasmide pEG202 in die Zellen eingebracht. Nach Inkubation auf SD-His-Trp-Ura Platten wurden die Transformanden auf X-Gal haltiges SD-His-Trp-Ura-Leu Medium überführt und dadurch hinsichtlich Interaktion der von ihnen überexprimierten Beute-/Köder-proteine untersucht. Als positiv in Bezug auf Protein-Protein Interaktionen wurden jene Klone gewertet, die neben Wachstum auch Blaufärbung aufwiesen.

Die Untersuchungen der Transformanden hinsichtlich der Interaktion der enthaltenen Proteine zeigte Interaktionen mit den intrazellulären Domänen der TLRs 2, 4, 7, 8 und 10 (Abbildung 7). Die Testung der intrazellulären Domänen von TLR3 und TLR9 ergab weder Wachstum noch Blaufärbung. Jedoch zeigten beide Proteine, trotz korrekter Klonierung und Expression (Bachelorarbeit C. Wurzenberger) keine Interaktion mit bekannten Interaktoren, TRIF im Falle von TLR3 und TLR9 im Falle von MyD88 (Daten nicht gezeigt). Möglich wäre in diesem Fall dass die Fehlfaltung beider Proteinfragmente zu vom natürlichen Protein abweichenden Konformationen führen und so das Bindungsverhalten negativ beeinflussen.

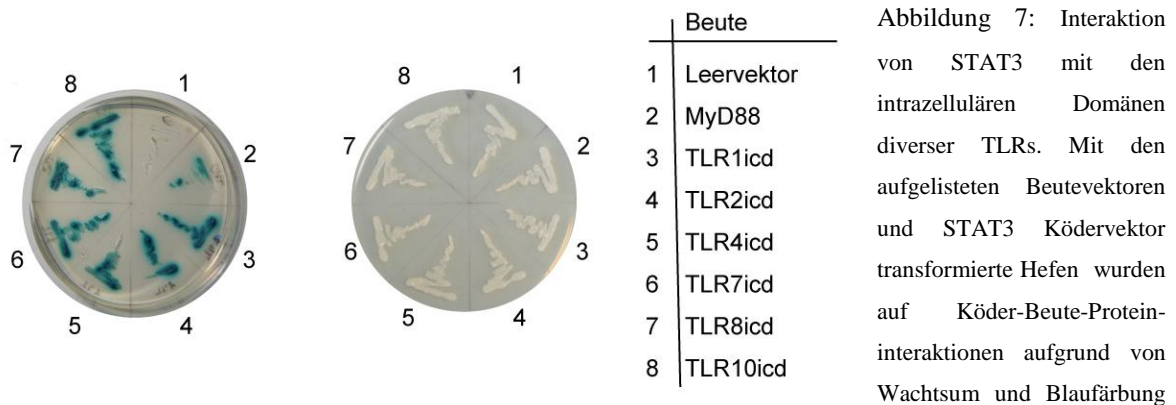


Abbildung 7: Interaktion von STAT3 mit den intrazellulären Domänen diverser TLRs. Mit den aufgelisteten Beutevektoren und STAT3 Ködervektor transformierte Hefen wurden auf Köder-Beute-Protein-interaktionen aufgrund von Wachstum und Blaufärbung auf X-Gal haltigem SD-HIS-TRP-URA-LEU Medium (Darstellung links) analysiert. Die erfolgreiche Transformation aller für die Interaktionsstudien relevanten Vektoren wurde durch Selektion auf SD-HIS-TRP-URA Selektionsmedium bestätigt (Darstellung rechts). (icd, *intracellular domain*, intrazelluläre Domäne)

3.1.3. Hefe-Zwei-Hybrid gestützte Identifikation der Bindungsdomänen von STAT3 und TLR2

In weiteren Hefe-Zwei-Hybrid Studien sollten sowohl die für die Interaktion relevanten Bereiche der intrazellulären Domäne von TLR2, als auch von STAT3 eingegrenzt werden.

Die intrazelluläre Domäne von TLR2 setzt sich aus fünf alternierenden Modulen zusammen, die jeweils ein β -Faltblatt und eine α -Helix enthalten. Auf Interaktion mit STAT3 untersucht wurden Mutanten welchen jeweils eines dieser Module fehlt ($\Delta\beta^A-\alpha^1$ bis $\Delta\beta^E-\alpha^5$). In einem ersten Schritt wurden die verkürzten intrazellulären Domänen mittels PCR aus bereits vorliegenden mutierten Expressionsvektoren amplifiziert und über Restriktionsverdau in das Köderplasmid pEG202 kloniert.

Das STAT3 Protein lässt sich in fünf funktional zu unterscheidende Bereiche gliedern: eine Interaktionsdomäne, eine α -helikale „*Coiled Coil*“ Domäne, eine DNA Bindedomäne, eine SH2 (*src homology*) sowie eine C-terminale Transaktivierungsdomäne. Gemäß der computergenerierten Domänenvorhersage mittels der SMART-EMBL Onlinesoftware wurden fünf Deletionsmutanten konstruiert (Δ int, $\Delta\alpha$, Δ bind, Δ SH2 und Δ tail). Die Mutationen wurden mittels *Splice*-PCR durch spezifische Deletion der betreffenden Domänen im pJG4-5-STAT3wt generiert. Wie zuvor beschrieben wurden die auf Interaktion zu testenden Kandidaten über zwei Transfektionsschritte in die Hefe eingebracht. Nach Selektion der erfolgreichen Transformanten auf SD-His-Trp-Ura Platten wurden diese auf SD-His-Trp-Ura-Leu/+X-Gal Medium überführt und hinsichtlich Wachstum und Blaufärbung analysiert. Hinsichtlich der Untersuchung der für die Interaktion mit STAT3 relevanten Module der zytoplasmatischen Domäne von TLR2 zeigte sich lediglich das Konstrukt aus welchem der $\Delta\beta^C-\alpha^3$ Abschnitt deletiert war, weiterhin in der Lage mit STAT3 zu interagieren. Die um die Module $\Delta\beta^A-\alpha^1$, $\Delta\beta^B-\alpha^2$, $\Delta\beta^D-\alpha^4$ oder $\Delta\beta^E-\alpha^5$ verkürzten zytoplasmatischen Domänen von TLR2 zeigten auf Koexpression mit STAT3 weder Wachstum noch Blaufärbung. Ein identisches Interaktionsverhalten zeigte die Koexpression der TLR2 Mutanten zusammen mit dem Adapterprotein MyD88 (nicht gezeigt).

Von den STAT3 Deletionsmutanten zeigten sich Δ int, Δ bind und Δ SH2 unverändert im Interaktionsverhalten mit TLR2. Die um die Domänen alpha und tail verkürzten STAT3 Proteine hingegen wiesen im Rahmen der Bindungsanalyse mit TLR2 weder Wachstum noch Blaufärbung auf. Dieses Ergebnis gab einen ersten Hinweis auf die möglichen, an der Interaktion mit der intrazellulären Domäne von TLR2 beteiligten Bereiche von STAT3.

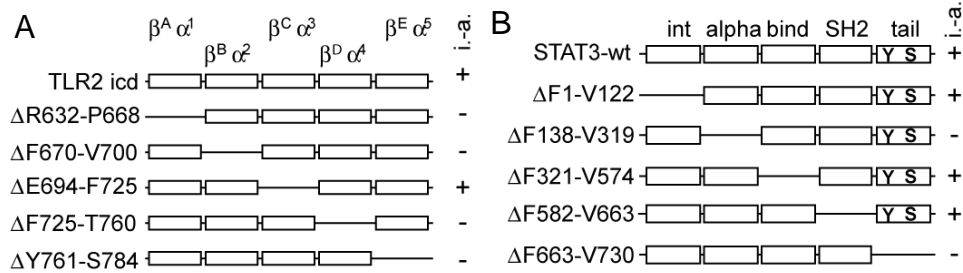


Abbildung 8: Selektive Interaktion von STAT3 mit Einzelmodul-deletierter TLR2icd, bzw. TLR2icd mit Deletionsmutanten von STAT3. Hefen wurden mit (A) STAT3-Beutevektor und TLR2icd-Deletionsmutanten (jede Deletion umfasst eines der β -Faltblatt- α -Helix Module, Δ bezeichnet die deletierten Aminosäuren), oder (B) mit TLR2icd- Ködervektor und STAT3 Wildtyp oder Deletionsmutanten-Beutevektor (int, Interaktion; alpha, Protein-Protein Interaktion; bind, DNA-Bindedomäne; SH2, Dimerisierung; tail, Transaktivierung) transformiert und hinsichtlich Wachstum und Blaufärbung auf analysiert.

3.1.4. Ligandeninduzierte Interaktion von TLR2, TLR3 und TLR4 mit STAT3

Obwohl durch entsprechende Kontrollen das Risiko von falsch positiven Befunden aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-System weitestgehend eingegrenzt werden kann, liefern in ihm gewonnene Ergebnisse in der Regel lediglich einen ersten Hinweis auf mögliche neue Interaktionspartner. So wurde versucht die aus dem artifiziellen System des Hefe-Zwei-Hybrid Systems erhobenen Befunde in einem der Physiologie von Immunzellen näherstehenden Modell nachzuvollziehen. Eine etablierte Methode stellt die Co-Immunopräzipitation dar.

Zu diesem Zweck wurden die epitopmarkierten potentiellen Interaktoren in HEK 293 Zellen überexprimiert und mittels Immunopräzipitation hinsichtlich potentieller Co-Immunopräzipitation, beziehungsweise Bindung untersucht. Überexpressionsversuche von Flag-Epitop markierten TLR2, TLR3 und TLR4, letzterer in Kombination mit MD2 exprimiert, zeigten die ligandenabhängige und transiente Bindung von Myc-STAT3 an die zytoplasmatischen Domänen der jeweiligen Rezeptoren. Abbildung 9 zeigt die schnelle Rekrutierung von STAT3 an die mit den jeweiligen spezifischen Stimuli aktivierten Rezeptoren. Während bereits fünf Minuten nach Rezeptorstimulation Assoziation zwischen TLR und STAT3 nachgewiesen werden konnte, war STAT3 bereits nach 15 Minuten wieder vom Rezeptor dissoziiert. Ein ähnliches Resultat ergab die Präzipitation von endogenem TLR2 aus RAW 264.7 Makrophagen. In Analogie zu den Befunden aus den Überexpressionsexperimenten in HEK 293 Zellen zeigte sich die ligandeninduzierte Interaktion von STAT3 mit der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors. Während der Immunoblot in Abbildung 9 bereits fünf Minuten nach Rezeptorstimulation Interaktion erkennen lässt, war das Signal 10 Minuten nach Stimulation bereits nicht mehr nachweisbar.

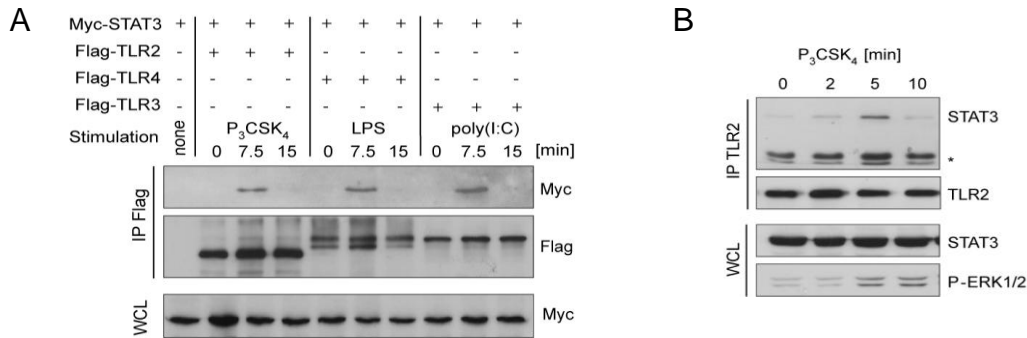


Abbildung 9: Interaktion von STAT3 mit TLRicd. A) Co-Immunopräzipitation von hSTAT3 und den TLRs 2, 3 und 4 nach spezifischer Rezeptorstimulation. HEK 293 Zellen wurden transient mit den entsprechenden angegebenen Expressionsvektoren transfiziert. 60 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit den jeweiligen TLR Agonisten (P₃CSK₄, synthetisches N-terminal triacyliertes Hexapeptid (1 µg/ml); poly(I:C), *polyinosinic-plycytidilic acid* (100ng/ml) ; LPS, Lipopolysaccharid O111:B4 1 µg/ml) für die angegebenen Zeiten stimuliert und folgend, nach Waschen in PBS, mit dem Crosslinker DTBP inkubiert und lysiert. Die Präzipitation aus den Zelllysaten erfolgte mit Flag-Agarose Beads, der Nachweis der Proteine im Immunoblot durch Detektion mit spezifischem Antiserum gegen Flag und Myc. B) Immunopräzipitation endogener Proteine aus RAW 264.7 Makrophagen nach TLR2 spezifischer Stimulation mit P₃CSK₄. Die Detektion von phosphoryliertem ERK1/2 diente der Kontrolle der Zellstimulation. (WCL: *whole cell lysate*; IP: Immunopräzipitation; icd, *intracellular domain*, intrazelluläre Domäne)

3.1.5. MyD88 unabhängige Assoziation von STAT3 und TLR2

Wie unter 3.1.2. beschrieben interagiert STAT3 im Hefe-Zwei-Hybrid-System nicht nur mit den zytoplasmatischen Domänen diverser TLRs, sondern auch mit dem Adaptermolekül MyD88. MyD88 stellt das zentrale Adaptermolekül in nahezu allen TLR vermittelten Signalwegen dar. Mit Ausnahme von TLR3 führt die Stimulation der Rezeptoren zur schnellen Rekrutierung an die zytoplasmatischen TIR-Domänen. Um eine mögliche Beteiligung von endogenem MyD88 an der Interaktion von TLR-TIR und STAT3 auszuschließen, wurden die epitopmarkierten TLR2 und STAT3 in MyD88 defizienten MEF (*mouse embryonic fibroblasts*) Zellen exprimiert und nach spezifischer Rezeptorstimulation der Analyse durch Immunopräzipitation unterzogen.

Abbildung 10 zeigt Immunoblots der Zelllysate und Zeitpunkt-spezifischer Co-Immunopräzipitationen von hSTAT3 mit hTLR2. Der Vergleich von Wildtyp und MyD88 defizienten Zellen zeigt keinen Unterschied hinsichtlich des Rekrutierungsverhaltens von STAT3 an den aktivierten TLR2.

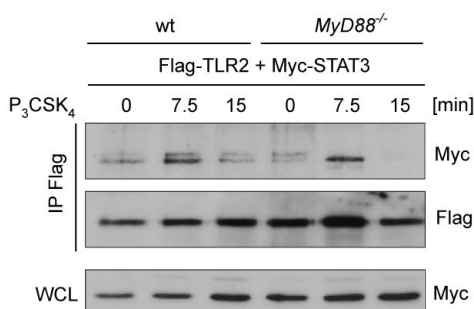


Abbildung 10: MyD88 unabhängige Interaktion von hTLR2 mit STAT3. Co-Immunopräzipitation Epitop-markierter Proteine aus transient transfizierten MEF-Zellen des angegebenen Genotyps. 48 Stunden nach Transfektion mit den aufgeführten Expressionsplasmiden wurden die Zellen stimuliert (P₃CSK₄, 1µg/ml), in eiskaltem PBS gewaschen, mit dem Crosslinker DTBP inkubiert und lysiert. Der Nachweis der aus den Zelllysaten präzipitierten Proteine erfolgte mittels Immunoblot. (WCL: *whole cell lysate*; IP: Immunopräzipitation)

3.1.6. Interaktion von STAT3 mit MyD88

Nachdem von uns gezeigt war, dass die Abwesenheit von MyD88 keinen Einfluss auf die Rekrutierung von STAT3 an den Rezeptor hatte, die Bindungsstudien aus den Hefe-Zwei-Hybrid Experimenten jedoch auf eine Interaktion von MyD88 und STAT3 hindeuteten, wurde dieser Aspekt in weiteren Überexpressionsanalysen untersucht. Die Überexpression von Flag-Epitop markiertem MyD88 sowie Myc-markiertem TLR2 und STAT3 in HEK 293 Zellen zeigte die Interaktion von STAT3 und MyD88 bereits ohne zusätzlichen Stimulus. Durch zusätzliche Toll-like Rezeptor Stimulation kam es zu vermehrter Bindung von STAT3 an MyD88 etwa 20 Minuten nach Rezeptoraktivierung (Abbildung 11). Das MyD88 Protein lässt sich in zwei funktionale Abschnitte unterteilen, die über eine Linkerdomäne verbunden sind: die N-terminale Todesdomäne (DD; *death domain*) sowie die C-terminale TIR-Domäne. Während die TIR-Domäne für Assoziation mit der cytoplasmatischen TIR-Domäne von TLRs verantwortlich ist, interagiert MyD88 über seine Todesdomäne mit „nachgeschalteten“ Signaltransduktionsmolekülen.

Zur Identifikation der für die Interaktion mit STAT3 relevanten Bereiche, wurden verschiedene um die zu untersuchenden Domänen verkürzte Epitop-markierte MyD88-Proteine (MyD88-DD, AS 1-133, MyD88-DD/H, AS 1-151, MyD88-TIR, AS 151-296) zusammen mit Myc-markiertem STAT3 in HEK 293 Zellen exprimiert und mittels Immunopräzipitation auf ihr Bindungsverhalten untersucht. Wie aus dem Immunoblot in Abbildung 11 hervorgeht, zeigten sich alle Deletionsmutanten in der Lage, mit STAT3 zu interagieren.

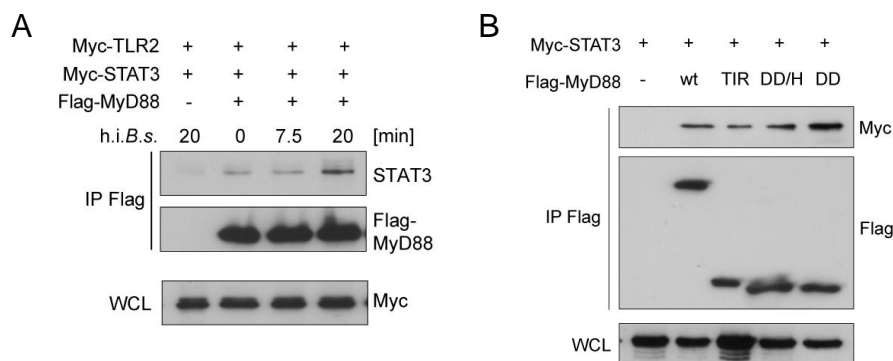


Abbildung 11: Interaktion von STAT3 mit MyD88. (A) Co-Immunopräzipitation von STAT3 und MyD88 aus HEK 293 Zellen. HEK 293 Zellen wurden wie angegeben transfiziert, nach 60 Stunden TLR2 abhängig stimuliert (h.i.B.s.; hitzeinaktivierter *B. subtilis*, 5×10^6 Cfu/ml) und die Zellinteraktion mittels Immunopräzipitation untersucht. (B) Überexpression von MyD88 Wildtyp (wt) oder dreier Deletionsmutanten, jeweils die C-terminale TIR Domäne (TIR), die N-terminale Todesdomäne (DD; *death domain*) oder die Todesdomäne mit Verbindungsdomonäne (DD/H) umfassend, zusammen mit STAT3. Die Interaktionsanalyse erfolgte mittels Immunopräzipitation, der Proteinnachweis mittels Immunoblot. (WCL: *whole cell lysate*; IP: Immunopräzipitation)

3.2. Charakterisierung der TLR vermittelten STAT3 Aktivierung

3.2.1. Schnelle STAT3 Serin-Phosphorylierung durch TLR Aktivierung

Die frühe Interaktion von STAT3 mit Komponenten des TLR Signalweges lies eine Beteiligung von STAT3 an frühen TLR Signaltransduktionsereignissen vermuten.

STAT3, ein Transkriptionsfaktor der nach momentanem Erkenntnisstand vornehmlich in zytokinvermittelte Signalgebung involviert ist, überträgt Signale direkt vom aktivierten Rezeptor in den Zellkern. Die klassische Aktivierung aller STAT Proteine erfolgt, vermittelt durch rezeptorassoziierte Tyrosinkinase, durch Phosphorylierung eines spezifischen Tyrosins im C-Terminus der Proteine. Bisher wurde JAK2 (Janus Kinase 2) als Interaktor von TLR4 beschrieben. TLR4 Aktivierung führte, abhängig von dieser Kinase, zur Rekrutierung und Phosphorylierung von STAT5 (Kimura et al., 2006).

Die Immunoblotanalyse von TLR2 spezifisch stimulierten murinen Knochenmarksmakrophagen zeigte keine Phosphorylierung von STAT3 am relevanten Tyrosin 705, während die Stimulation mit IL-10, wie erwartet, zur Aktivierung des Proteins führte (Abbildung 12). Bereits 10 Minuten nach TLR-Stimulation ließ sich jedoch die STAT3 Serin727-Phosphorylierung nachweisen, die erst nach 40 Minuten wieder an Intensität verlor. Die Aktivierung von ERK1/2 diente als Stimulationkontrolle. Ein vergleichbares Phosphorylierungsverhalten von STAT3 zeigte sich auf Stimulation mit TLR4 Ligand LPS.

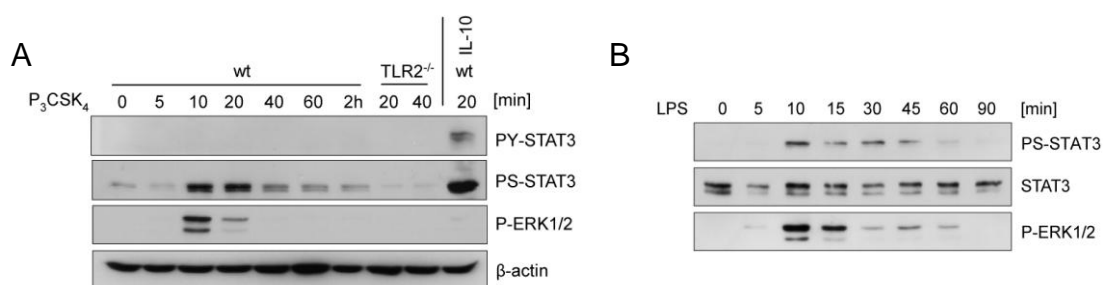


Abbildung 12: Stimulation von TLR2 oder 4 induziert schnelle STAT3-S727 Phosphorylierung. Immunoblotanalyse der Lysate TLR2- (A), beziehungsweise TLR4- (B) spezifisch aktivierter Knochenmarksmakrophagen (je 1 µg/ml Stimulus). IL-10 Stimulation (20 ng/ml) fungierte als Kontrolle für Tyrosin-Phosphorylierung. (wt, Wildtyp oder der angegebene Genotypen; P, phosphoryliert; S, Serin S727; Y, Tyrosin Y705).

Die schnelle Serin-Phosphorylierung von STAT3 lies die Beteiligung von autokrinen Effekten über eine Freisetzung neu gebildeter Zytokine unwahrscheinlich erscheinen. Bestätigt wurde diese Vermutung durch Vorbehandlung der Zellen mit Cycloheximid (CHX), einem Inhibitor der Proteinbiosynthese. Wie in Abbildung 13 dargestellt, erfolgte die TLR abhängige STAT3 Serin-

Phosphorylierung unabhängig von der *de novo* Protein Synthese. Beide, DMSO (Kontrolle) und CHX behandelte Knochenmarksmakrophagen zeigten zu frühen Zeitpunkten ein vergleichbares Aktivierungsmuster auf Stimulation mit LPS hin. Späte STAT3 Serin-Phosphorylierung hingegen war auf sekundäre Signalereignisse zurückzuführen, wie die Inhibierung mit Cycloheximid zeigte.

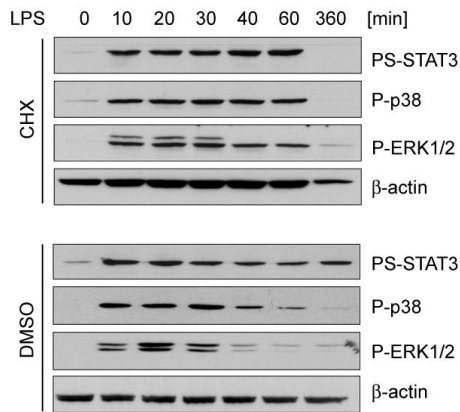


Abbildung 13: TLR 4 vermittelte STAT3 Serin-Phosphorylierung unabhängig von *de novo* Proteinsynthese. 1 h vor TLR4 spezifischer Stimulation für die angegebenen Zeiten wurden BMDM mit Cycloheximid (CHX, 250 µg/ml), beziehungsweise Dimethylsulfoxid (DMSO, Lösungsmittel) behandelt. Die Detektion der Phosphorylierungs-zustände der angegebenen Proteine erfolgte mittels Immunoblot.

Neben TLR2 und TLR4 führte auch die spezifische Stimulation der Toll-like Rezeptoren 3, 5, 8 und 9 zu STAT3 Serin Phosphorylierung. Keiner der TLR Liganden induzierte Tyrosin-Phosphorylierung, wie der Kontrollstimulus IL-10 (Abbildung 12).

TLR Signalkaskaden werden im Wesentlichen über zwei Adaptermoleküle vermittelt: MyD88 und TRIF. TLR induzierte STAT3 Serin-Phosphorylierung war, vergleichbar mit der Aktivierung von MAP-Kinasen, abhängig von diesen zentralen Molekülen. MyD88 defiziente Knochenmarksmakrophagen waren lediglich auf Stimulation mit LPS und poly(I:C) hin in der Lage, STAT3-Serin Phosphorylierung zu induzieren. Dies stand im Einklang mit der alternativen Nutzung von TRIF vermittelter Signaltransduktion durch TLR4 sowie der komplett TRIF abhängigen Signalgebung durch TLR3. Entsprechend zeigten TRIF defiziente Makrophagen lediglich für TLR3 Stimulation weder Aktivierung von STAT3, noch von MAP-Kinasen.

Nach der Bindung an den Rezeptor rekrutiert MyD88 diverse Mitglieder der IRAK (*Interleukin Receptor Associated Kinases*) Familie, allen voran IRAK4. IRAK4 wiederum bindet und aktiviert IRAK1. Eine frühere Publikation implizierte IRAK1 als LPS induzierte Serin-Kinase von STAT3 (Huang et al., 2003). Die Stimulation von IRAK1 defizienten Knochenmarksmakrophagen zeigte, im Vergleich zu Wildtyp-Zellen, keine Abweichung der Zellaktivierungsmuster. Weder die Induktion vom MAP-Kinasen noch die TLR induzierte Serin-Phosphorylierung zeigten sich beeinflusst. IRAK4 defiziente Makrophagen dagegen phosphorylierten lediglich auf Konfrontation mit LPS hin sehr schwach STAT3 Serin727. Die Stimulation der TLRs 2, 3, 5, 7 und 9 führte im IRAK4 Knockout weder zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38, noch zur Serin-Phosphorylierung von STAT3 (Abbildung 8). Die IL-10 induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3 belegte die Vitalität und Stimulierbarkeit der IRAK4^{-/-} Zellen.

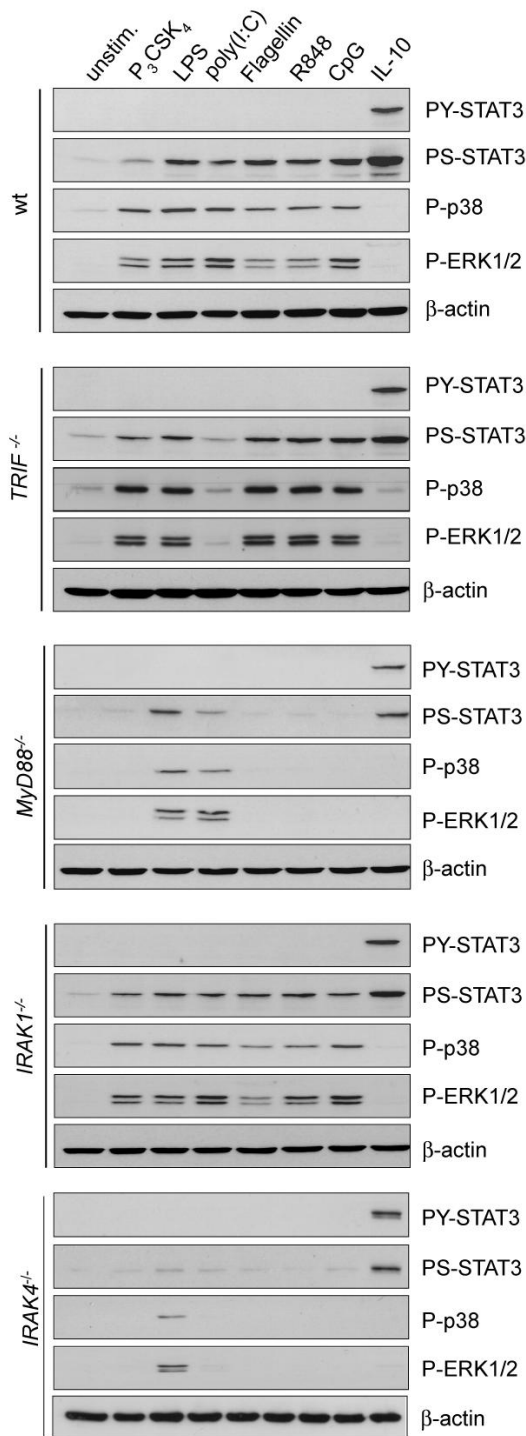


Abbildung 14: TLR induzierte STAT3 Serin-Phosphorylierung ist abhängig von den zentralen TLR-Adapter- und Signalmolekülen. Knochenmarksmakrophagen der aufgeführten Genotypen wurden mit spezifischen Liganden für die TLRs 2 (P₃CSK₄, 1 µg/ml), -3 (poly(I:C), 100 ng/ml), -4 (LPS, 1 µg/ml), -5 (Flagellin, 5 µg/ml), -7 (R848, 1 µg/ml) und -9 (CpG, 1 µM) sowie dem Zytokin IL-10 (20 ng/ml) für 20 min stimuliert. Die Lysate wurden mittels Immunoblot analysiert (P, phosphoryliert; S, Serin S727; Y, Tyrosin Y705).

3.2.2. TLR induzierte STAT3 Serin-Phosphorylierung erfolgt unabhängig von der Tyrosin-Phosphorylierung

Einige Studien beschreiben die durch Serin-Phosphorylierung vermittelte Regulation von STAT3 Tyrosin-Phosphorylierung. Dabei führte die Inhibierung Serin-Phosphorylierung induzierender

Prozesse zur Verstärkung der zeitgleich erfolgenden Tyrosin-abhängigen Aktivierung von STAT3. Inwieweit die durch einen zweiten Liganden induzierte Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3 regulierend auf die von uns beobachtete TLR abhängige Serin-Phosphorylierung des Proteins wirkt, zeigte die sowohl zeitversetzte als auch synchrone Stimulation von Knochenmarksmakrophagen mit STAT3 Tyrosin-Phosphorylierung vermittelndem IFN- γ (Quing et al., 2004) und TLR2 Agonist P₂CSK₄. Wie in Abbildung zu sehen ist, führte die Applikation von IFN- γ zur schnellen Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3, nicht jedoch zur Phosphorylierung seines Serins. Die nachfolgende, beziehungsweise zeitgleich erfolgende, durch TLR Aktivierung induzierte Phosphorylierung des Serins, zeigte sich unabhängig vom Tyrosin-Phosphorylierungsstatus von STAT3. Die Langzeitstimulation mit IFN- γ führte zur deutlichen Aufregulation der STAT3 Expression.

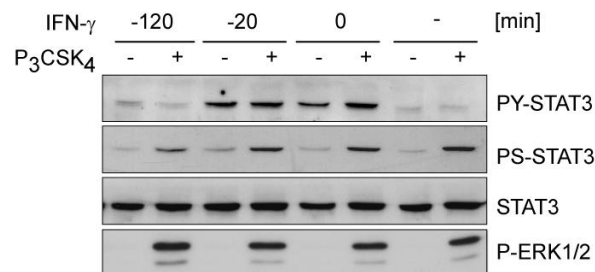


Abbildung 15: TLR induzierte Serin-Phosphorylierung von STAT3 ist unabhängig vom Tyrosin-Phosphorylierungsstatus des Proteins. BMDM wurden zeitversetzt, beziehungsweise synchron mit IFN- γ (20 ng/ml) und TLR2 Agonist (1 μ g/ml) stimuliert. Die Analyse der Phosphorylierungszustände der einzelnen Proteine erfolgte mittels Immunoblot. (P, phosphoryliert; S, Serin S727; Y, Tyrosin Y705)

3.2.3. TLR induzierte STAT3 Serin-Kinasen

Wie die Befunde aus den Vergleichsstudien der defizienten Makrophagen zeigten, erfolgte die TLR induzierte Aktivierung von STAT3 abhängig, sowohl von den zentralen Adaptermolekülen MyD88 und TRIF, als auch abhängig von IRAK4. Eine Beteiligung von IRAK1 als Serin-Kinase von STAT3 konnte ausgeschlossen werden.

Die in den Versuchen mit defizienten Makrophagen auftretende Synchronität der Aktivierung von STAT3 und MAPK ließ auf eine weiter stromabwärts in der Signalkaskade gelegene Serin-Kinase von STAT3 schließen. Diverse Proteine die als Serin-Kinasen von STAT3 beschrieben wurden sind auch Elemente der TLR Signalkaskaden. Die Rolle dieser Proteine wurde durch die Verwendung spezifischer gegen diese Kinasen gerichteter Inhibitoren untersucht.

Wie der Immunoblot in Abbildung 16 zeigt führte die Blockade der MAP-Kinase ERK1/2 durch gezielte Hemmung der sie aktivierenden Kinase MEK1 durch die synthetischen Inhibitoren PD 98059 und U0126 zur Unterdrückung der Serin-Phosphorylierung von STAT3. Die Phosphorylierung von p38 war unbeeinflusst. Die direkte Hemmung der MAP-Kinase p38 durch

den spezifischen Inhibitor SB 202190 hatte keinen Effekt auf die TLR2 vermittelte Serin-Phosphorylierung von STAT3.

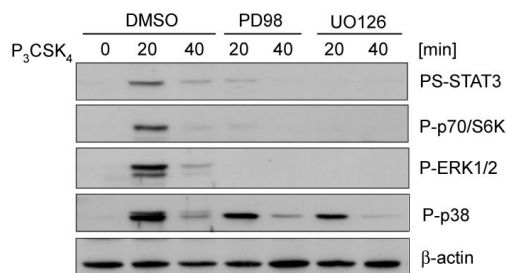


Abbildung 16: MEK1 Blockade hemmt TLR induzierte Serin-Phosphorylierung von STAT3. Nach Vorinkubation mit Inhibitor (DMSO, Dimethylsulfoxid, Lösungsmittel; PD, PD98059, (20 µM) und UO, UO126 (10 µM) MEK1 Inhibitoren) für 1 h wurden Knochenmarks-makrophagen TLR2 spezifisch stimuliert, lysiert und die Phosphorylierungszustände bestimmter Proteine mittels Immunoblot analysiert.

3.2.4. Die TLR vermittelte STAT3 Serin-Phosphorylierung ist abhängig von mTOR

Eine Reihe von Veröffentlichungen der jüngeren Zeit beschrieben die Beteiligung von mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) an der TLR vermittelter Signalübertragung. Die Regulation von mTOR erfolgt durch einen großen, aus TSC1/TSC2 (*tuberous sclerosis complex*) bestehenden, Proteinkomplex. Dieser integriert eine Vielzahl unterschiedlicher Aktivierungs- und Inhibierungssignale und wirkt als Negativregulator der mTOR aktivierenden GTPase Rheb. Die Hemmung des Komplexes führt zur Aktivierung von Rheb und damit zur Aktivierung von mTOR. Eine Vielzahl von Kinasen ist in die Phosphorylierung - und dadurch Inhibierung - von TSC1/2 involviert, unter anderem ERK1/2.

Die durch die vorherigen Inhibierungsversuche erhobenen Befunde, zusammen mit der in der Literatur beschriebenen Rolle von mTOR als Serin-Kinase von STAT3 (Rajan et al., 2003), sowie die Beteiligung von ERK1/2 an der Regulation von TSC1/TSC2 (Schmitz et al., 2008) (Abbildung 17) führte uns zu der Frage nach der möglichen Involvierung von mTOR in die TLR vermittelter STAT3 Serin-Phosphorylierung.

Die Verwendung spezifischer, gegen die Kinasen der klassischen mTOR induzierenden Signalkaskade gerichteten Inhibitoren zeigte neben der ausbleibenden Phosphorylierung von p70/S6K, einem direkten Zielprotein von mTOR, auch deren Einfluss auf die P₃CSK₄ vermittelte Serinphosphorylierung von STAT3 (Abbildung 17). Die Hemmung von mTOR mit dem spezifischen Inhibitor Rapamycin beeinflusste dabei neben p70/S6K lediglich die Phosphorylierung von STAT3, nicht jedoch die Aktivierung von in der Signalkaskade stromaufwärts gelegener AKT oder ERK1/2. Die Blockade der in den mTOR Signalweg involvierten Kinasen AKT und PI3K führte ebenfalls zur Unterdrückung der Serin-Phosphorylierung von STAT3.

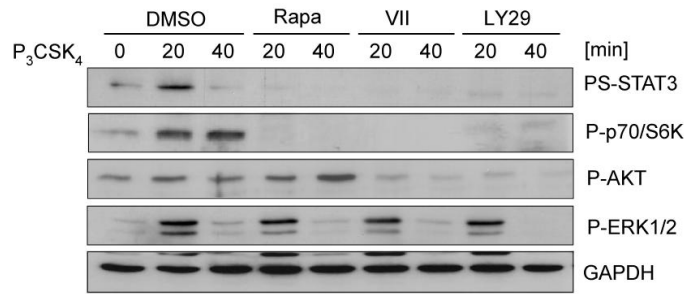


Abbildung 17: TLR vermittelte STAT3 Serin-Phosphorylierung ist abhängig von mTOR. Mit Inhibitor vorbehandelte (DMSO, Dimethylsulfoxid, Lösungsmittelkontrolle; Rapa, Rapamycin (250 nM); VII, AKT Inhibitor (10 μM); LY29, PI3K Inhibitor (10 μM)) Knochenmarksmakrophagen wurden TLR2 spezifisch stimuliert (P₃CSK₄ (1 μg/ml)) und ihre Lysate mittels Immunoblot untersucht. (P, phosphoryliert; S, Serin S727; Y, Tyrosin Y705; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase).

Zur Validierung der Resultate der Inhibitoranwendungen untersuchten wir ein transgenes Tamoxifen induzierbares AKT-System. In aus transgenen tmaAKT/Cre Mäusen gewonnenen Makrophagen führt die Zugabe des Östrogenanalogons Tamoxifen, unabhängig von der Aktivität vorgeschalteter Kinasen, zur Membranassoziation und so zur Aktivierung einer AKT-Chimäre (Kohn et al., 1998).

Die Behandlung der transgenen Zellen mit steigenden Dosen Tamoxifen führte lediglich zu einer minimalen Aktivierung der STAT3 Serin-Phosphorylierung. Die zusätzliche Stimulation mit dem TLR2 Agonisten P₃CSK₄ zeigte im Immunoblot eine deutliche Verstärkung sowohl der STAT3 Serin Phosphorylierung, als auch der Aktivierung des mTOR Zielproteins p70/S6K.

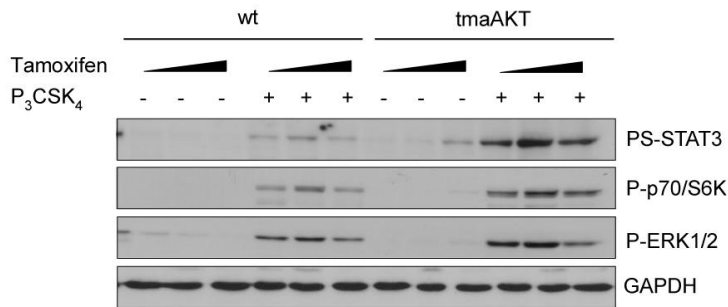


Abbildung 18: AKT Aktivierung erhöht TLR abhängige STAT3 Serin-Phosphorylierung. Knochenmarksmakrophagen wurden zwei Stunden vor TLR2 spezifischer Stimulation (P₃CSK₄, 1 μg/ml) für 20 min mit steigenden Mengen von Tamoxifen (100, 250 und 1000 nM) vorbehandelt. Die Detektion der aktivierten Proteine erfolgte mittels Immunoblot. (P, phosphoryliert; S, Serin S727; Y, Tyrosin Y705; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase; wt, Wildtyp; tmaAKT, Tamoxifen induzierbares AKT).

3.2.5. IKKβ Blockade unterdrückt die STAT3 Serin-Phosphorylierung

Die IκB-Kinasen (IKK) phosphorylieren spezifisch IκB und aktivieren somit NF-κB. Ein Vertreter dieser Familie, namentlich IKKβ, wurde ebenfalls als inhibierende Kinase für TSC1 beschrieben (Lee et al., 2007).

Fraglich war der Einfluss der IKK β Inhibierung auf die TLR induzierte mTOR Aktivierung und die Serin-Phosphorylierung von STAT3 ausüben würde. Die Verwendung eines spezifischen Inhibitors für IKK β führte zur dosisabhängigen Reduktion der TLR2 vermittelten Serin-Phosphorylierung von STAT3 während die Aktivierung von ERK1/2 nicht beeinflusst wurde. Die ausbleibende Degradation von I κ B illustrierte die Effizienz des Inhibitors. Dementsprechend reagierten IKK β defiziente Knochenmarksmakrophagen: sie wiesen, im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen, eine deutlich verminderte Aktivierung von STAT3 und p70/S6K auf. Die Phosphorylierung von p38 bewegte sich in Zellen beider Genotypen auf einem identischen Niveau.

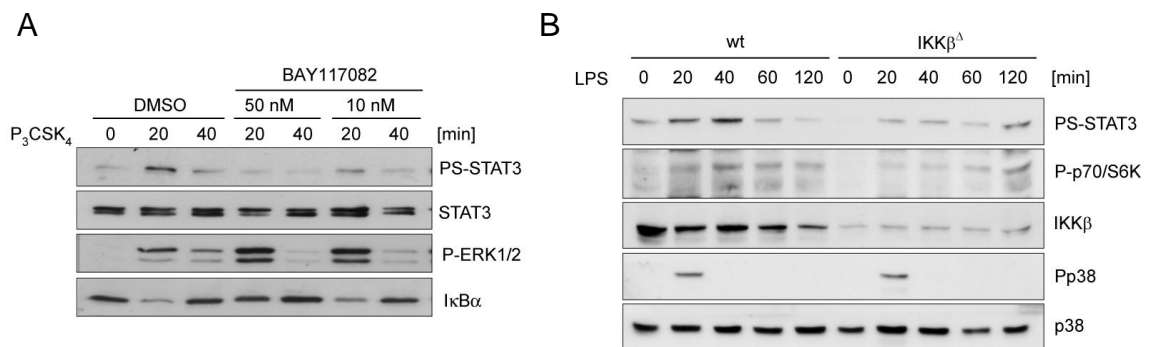


Abbildung 19: IKK β Blockade hemmt TLR vermittelte STAT3 Serin-Phosphorylierung. Lysate (A) inhibitorvorbehandelter (DMSO, Dimethylsulfoxid, Lösungsmittel; BAY117082, IKK β Inhibitor), TLR2 spezifisch stimulierter, BMDM, beziehungsweise (B) TLR abhängig aktivierter BMDM der angegebenen Genotypen wurden mittels Immunoblot analysiert.

3.2.6. mTOR Überexpression verstärkt die TLR induzierte STAT3-Serin-Phosphorylierung in HEK 293 Zellen

Wie zuvor gezeigt induziert die Aktivierung von TLRs in Makrophagen die mTOR-abhängige Serin-Phosphorylierung von STAT3. HEK 293 Zellen zeigten nach Stimulation von transient transfiziertem TLR2 einen im Immunoblot nicht detektierbaren Anstieg von Phospho-Serin-STAT3 (Abbildung 13). Die Transfektion von mTOR in steigenden Mengen führte zur dosisabhängigen Verstärkung des Signals auf TLR2 Aktivierung. Die Überexpression von mTOR induzierte keine Serin-Phosphorylierung von STAT3 in Abwesenheit einer Aktivierung des kotransfizierten TLR2.

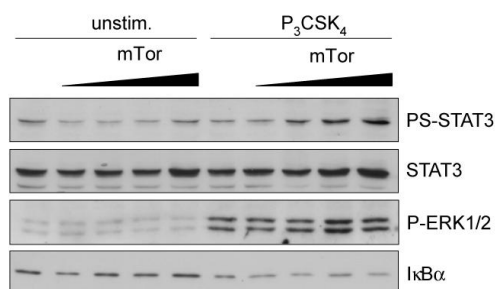


Abbildung 20: Verstärkung der TLR2 induzierten STAT3 Serin-Phosphorylierung durch Expression von mTOR. TLR2 exprimierende HEK 293 Zellen wurden transient mit steigenden Mengen (Dreieck, 1, 4, 16 und 64 ng) von mTOR-Expressionsplasmid transfiziert, nach 60 Stunden für 20 min mit TLR2 Ligand P₃CSK₄ (1 μ g/ml) stimuliert und die Lysate mittels Immunoblot analysiert.

3.2.7. Serin-phosphoryliertes STAT3 dissoziiert vom MyD88 Komplex

Wir zeigten die Interaktion zwischen MyD88 und mTOR (Schmitz et al., 2008). Die zeitliche Konvergenz zwischen der Phosphorylierung von STAT3 am Serin727 und der Interaktion des Proteins mit MyD88, zusammen mit der bereits gezeigten Assoziation von mTOR mit STAT3 führte uns zu der Frage, inwieweit die Serin-Phosphorylierung die Interaktion von MyD88 und STAT3 beeinflussen könnte.

Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche STAT3 Phosphorylierungsmutanten sowohl zusammen mit Flag markiertem MyD88, als auch aktivem oder Kinase inaktivem mTOR in HEK 293 Zellen überexprimiert. Die Präzipitation von MyD88 resultierte in der Co-Immunpräzipitation von Wildtyp STAT3. Die zusätzliche Expression von Kinase-inaktivem mTOR führte zu einer Verstärkung der Interaktion der beiden Proteine. In Gegenwart von Kinase-aktivem mTOR hingegen war keine Bindung von MyD88 an STAT3 nachweisbar. Die Tyrosin-Phosphorylierungs-defizienten Mutanten von STAT3 interagierten sowohl in Abwesenheit von überexprimiertem mTOR, als auch in der Gegenwart der inaktiven Form. Spezifisch für die Serin-Mutante von STAT3 (S727A) zeigten wir die Interaktion mit MyD88 selbst bei Überexpression von aktivem mTOR.

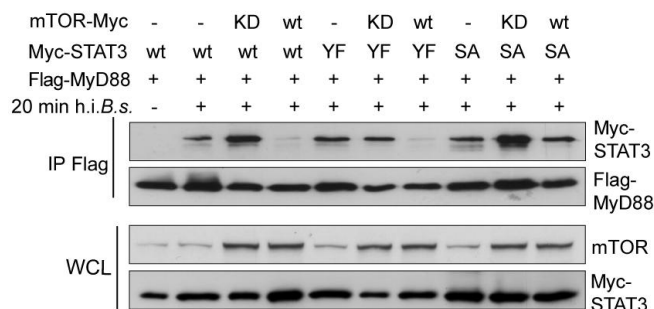


Abbildung 21: mTOR-Überexpression induziert die Dissoziation von STAT3 und MyD88. HEK 293 Zellen wurden transient mit TLR2 Expressionsplasmid (nicht gezeigt) sowie den angegebenen Expressionsvektoren transfiziert und nach 60 Stunden stimuliert (h.i.B.s. 5×10^5 Cfu/ml). Die Präzipitation aus den Zelllysaten erfolgte mit Flag-Agarose-beads, der Nachweis der Proteine erfolgte im Immunoblot durch Detektion mit spezifischem Antiserum gegen die Epitope Flag und Myc sowie mTOR (h.i.B.s. hitzeinaktivierter *B.subtilis*; wt, Wildtyp; KD, kinase dead, kinasetote Punktmutation; SA, S727 substituiert durch A; YF, Y705F substituiert durch F; (-), nicht transfiziert; (+), transfiziert; IP, Immunpräzipitation; WCL, whole cell lysate, Ganzzelllysate)

3.2.8. Hemmung der mTOR vermittelten Dissoziation von STAT3 und MyD88 durch Überexpression von TSC2

Wie zuvor gezeigt, bewirkte die Aktivität von mTOR die Dissoziation von STAT3 und MyD88. Fraglich war, ob die Koexpression einer hemmenden Komponente der mTOR vorgeschalteten Signalkaskade regulierend auf die durch aktives mTOR hervorgerufenen Effekte wirken würde. Erwartungsgemäß resultierte die Kotransfektion des Negativregulators TSC2 in der Stabilisierung

des STAT3-MyD88 Komplexes. Während bei mTOR Anwesenheit keine Interaktion zwischen MyD88 und STAT3 detektiert wurde, führte die zusätzliche Expression von TSC2 zur verstärkten Bindung von STAT3 an MyD88.

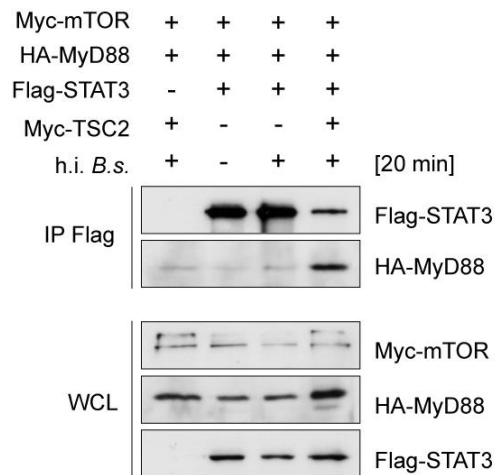


Abbildung 22: TSC2 Expression inhibiert mTOR Effekte auf MyD88-STAT3 Interaktion. HEK 293 Zellen wurden transient mit den angegebenen Expressionskonstrukten und hTLR2 Expressionsvektor transfiziert. 60 h nach Transfektion wurden die Zellen stimuliert (h.i.B.s. 5×10^5 CfU/ml), mit Crosslinker DTBP für 1h inkubiert und lysiert. Die Präzipitate wurden wie beschrieben erstellt im Immunoblot analysiert (h.i. *heat inactivated*, hitzeinaktiviert; (-), nicht transfiziert; (+), transfiziert; IP, Immunopräzipitation; WCL, *whole cell lysate*, Ganzzelllysat)

3.2.9. TLR Stimulation bedingt die Assoziation von STAT3 und mTOR

Die Interaktion zwischen mTOR und STAT3 wurde beschrieben (Rajan et al., 2003). Wir fragten, ob TLR Stimulation zur Assoziation beider Proteine führen könnte. Die Überexpression von Myc-markiertem mTOR zusammen mit Flag-STAT3 in TLR2 exprimierenden HEK 293 Zellen resultierte in der ligandenabhängigen Assoziation beider Proteine. Interessanterweise korrelierte der Interaktionszeitpunkt mit der Bindung von STAT3 an MyD88 (Abbildung 23; vergleiche Abbildung 10).

Zur Übertragung der Interaktionsbefunde in ein physiologischeres Modell, wurde die Assoziation endogener Proteine in Makrophagen untersucht. Aufgrund fehlender Verfügbarkeit eines zuverlässigen, gegen MyD88 gerichteten Antikörpers, untersuchten wir stabil mit Flag-markiertem MyD88 Expressionsplasmid transfizierte RAW264.7 Makrophagen. Die Stimulation mit dem TLR2 Liganden P₃CSK₄ führte bereits nach 10 Minuten zur Interaktion sowohl von mTOR als auch von STAT3 mit MyD88 (Abbildung 23). Die Transienz der Bindung zeigte sich in der schnellen Dissoziation beider Proteine vom MyD88.

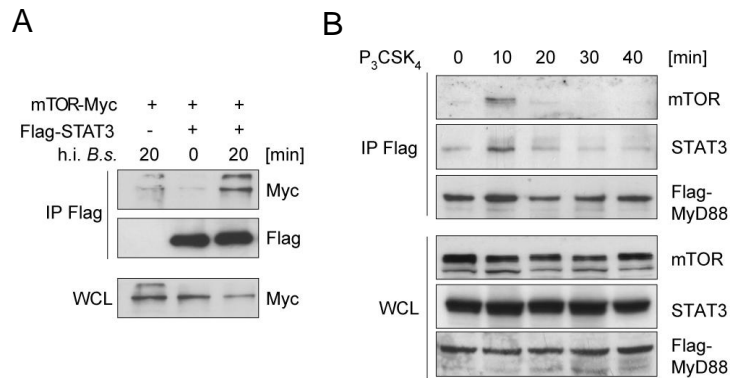


Abbildung 23: TLR Stimulations-abhängige Assoziation von mTOR und STAT3. Co-Immunopräzipitation aus (A) transient mit hTLR2 (nicht gezeigt) und wie angegeben transfizierten HEK 293, beziehungsweise (B) stabil Epitop-markiertes MyD88 exprimierende RAW264.7. Zellen wurden stimuliert, in PBS gewaschen und mit dem Crosslinker DTBP inkubiert. Die Präzipitation aus den Zelllysaten erfolgte mit Flag-Agarose Beads, die Analyse der Proteine im Immunoblot. (h.i.B.s, hitzeinaktivierter *B.subtilis* (5x 10⁶Cfu/ml); (-), nicht transfiziert; (+), transfiziert; IP, Immunopräzipitation; WCL, whole cell lysate, Ganzzelllysat)

3.2.10. STAT3-MyD88 Interaktionsverhalten ist unbeeinflusst von S6K

Innerhalb der TLR Signalkaskade spielen mTOR abhängig aktivierte Kinasen eine wichtige Rolle (Cao et al., 2008). Von besonderer Bedeutung ist hierbei die direkt von mTOR aktivierte p70/S6K. Um eine Beteiligung dieser Kinase an TLR vermittelter STAT3 Aktivierung auszuschließen, erfolgte die Transfektion und Überexpression in HEK 293 Zellen. Weder die gemeinsam mit STAT3 und MyD88 exprimierte Kinase-aktive, noch die Kinase-inaktive Form der S6 Kinase beeinflussten die Assoziation von MyD88 mit STAT3. Ferner zeigte sich die S6 Kinase nicht in der Lage, mTOR vermittelte Dissoziation von STAT3 und MyD88 zu blockieren (Abbildung 23 B).

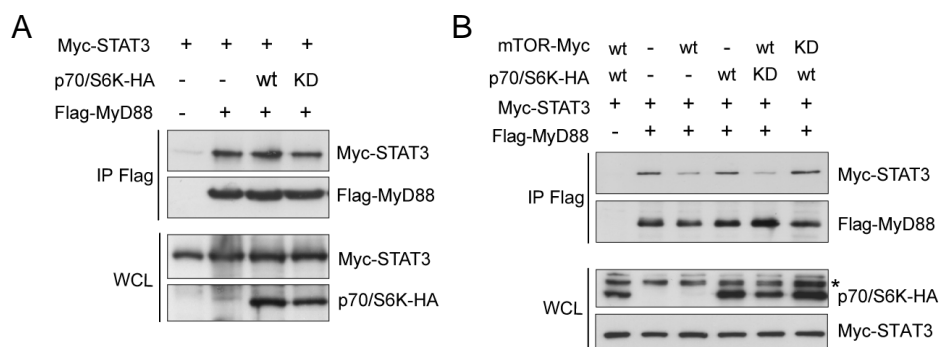


Abbildung 24: p70/S6K unabhängige Assoziation von STAT3 und MyD88. (A) und (B): transient mit den angegebenen Expressionsplasmiden und hTLR2 (B nicht gezeigt) transfizierte HEK 293 Zellen wurden (A) unstimuliert, oder (B) stimuliert mit TLR2 Agonist P₃CSK₄ (1µg/ml) für 20 min, lysiert, Flag-epitop markiertes MyD88 präzipitiert und im Immunoblot auf Interaktion ausgewertet. (wt, Wildtyp; KD, kinase dead, kinaseinaktiv; (-), nicht transfiziert; (+), transfiziert; IP, Immunopräzipitation; WCL, whole cell lysate, Ganzzelllysat)

3.2.11. Nukleäre Akkumulation von STAT3 nach TLR Stimulation

Nach der Identifikation der für STAT3 relevanten Serin-Kinase in TLR vermittelter Signalgebung fragten wir nach der Rolle von STAT3 in der Signalgebung von Toll-like Rezeptoren. Als wichtiger Transkriptionsfaktor von Zytokin-induzierten Signalen transloziert Tyrosin-phosphoryliertes STAT3 nach Dimerisierung vom Zytoplasma in den Zellkern um nach Bindung spezifischer DNA-Motive Genexpression zu induzieren. Deshalb fragten wir nach dem Potential TLR-vermittelter STAT3 Serin-Phosphorylierung, die Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors zu induzieren.

Die Extraktion und folgende Lyse von Zellkernen TLR2 spezifisch aktivierter Makrophagen zeigte die verstärkte nukleäre Akkumulation von STAT3 bereits 45 min nach Stimulation. Die IL-6 vermittelte, Tyrosin-Phosphorylierungs-abhängige, Kernlokalisierung von STAT3 diente als Positivkontrolle. Die Detektion von zytoplasmatischem STAT3 erbrachte identische Expressionsniveaus. Die Translokation der NF- κ B Untereinheit p65 erfolgte auf Stimulation mit P₃CSK₄, nicht jedoch auf Behandlung mit IL-6. Die Immunodetektion des Histons H1 illustrierte gleiche Mengen an eingesetzten Kernlysaten.

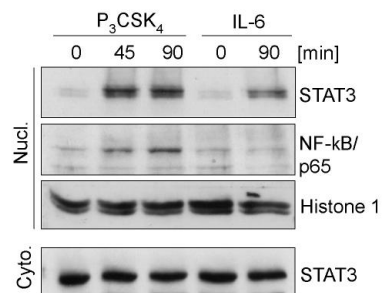


Abbildung 25: Nukleäre Akkumulation von STAT3 nach TLR Aktivierung. BMDM wurden wie angegeben stimuliert (P₃CSK₄ (1 μ g/ml), IL-6 (20 ng/ml)), die zytoplasmatischen und nukleären Fraktionen separiert und im Immunoblot analysiert (Cyto, *cytoplasmic*, zytoplasmatisch; Nucl, *nuclear*, nukleär).

Nachfolgend fusionierten wir Phosphorylierungs-defiziente Punktmutanten von STAT3 mit der N-terminalen Bindedomäne von Gal4. Bei stimulationsbedingter Translokation des exprimierten Konstruktes in den Zellkern vermag die Gal-Domäne an den *Gal4*-Promotor zu binden und ein Reporter gen zu induzieren. Die Koexpression eines unter Gal4-Regulation stehenden Luciferasegens ermöglichte Untersuchungen der Kerngängigkeit des jeweiligen Fusionskonstruktes. Die Überexpression der Gal4-fusionierten STAT3 Phosphorylierungsmutanten zusammen mit dem Reporter gen zeigte die durch den TLR2 Agonist P₂CSK₄ induzierte Translokation von Wildtyp-STAT3 in den Zellern. Die Substitution des Serins an Aminosäureposition 727 durch Alanin hob die Reporter genaktivierung auf, was indikativ für eine fehlende Kerngängigkeit war. Die Tyrosin-Phosphorylierungsmutante (Y705F) hingegen translozierte ebenso effektiv wie das Wildtyp-Protein. Die Hemmung der STAT3 Serin-

Phosphorylierung durch die spezifische Blockade von MEK1 führte zu einer verminderten Kernlokalisierung aller STAT Konstrukte (Abbildung 26).

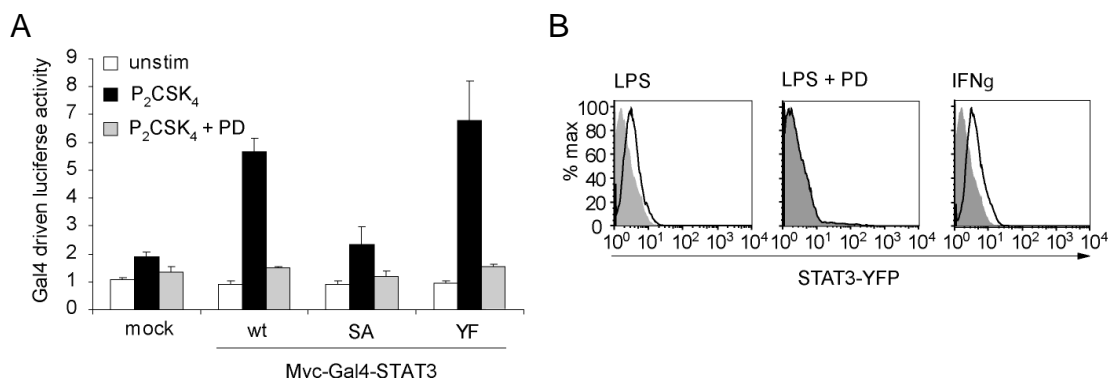


Abbildung 26: TLR induziertes STAT3-S727 akkumuliert im Zellkern. (A) RAW 264.7 Makrophagen wurden, wie aufgeführt, transient mit einem *Gal4*-Promotor getriebenen Luciferasekonstrukt sowie STAT3-Gal4 TD Fusionskonstrukten transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen, nach Vorinkubation mit PD (PD98059, MEK Inhibitor, (10 μ M)), für 10 h TLR2 abhängig stimuliert (P₂CSK₄ (1 μ g/ml) und die Reporteragenaktivität gemessen. (B) RAW 264.7 Makrophagen wurden transient mit STAT3-YFP Fusionskonstrukt transfiziert, die Zellen nach 24 Stunden wie angegeben für 60 min stimuliert. Die nach Abschluss der Stimulation (LPS (1 μ g/ml), IFN- γ (25ng/ml) isolierten Zellkerne wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. (wt, Wildtyp; SA, S727 substituiert durch A; YF, Y705F substituiert durch F; TD, Transaktivierungsdomäne)

Ein ähnliches Ergebnis brachte die Analyse von mit YFP-STAT3 transient transfizierten RAW 264.7 Makrophagen. Die FACS Analyse von Zellkernen LPS stimulierter, sowie transient mit STAT3-YFP-Fusionskonstrukt-Expressionsplasmiden transfizierten RAW Makrophagen wies ein im Vergleich zu unstimulierten Zellen erhöhtes YFP- Signal auf. MEK1 Inhibition reduzierte das YFP Signal in den Nuklei auf das Basalniveau. Die Stimulation mit IFN- γ bewirkte eine vergleichbare Erhöhung des nukleären YFP Signals. Diese Daten deuten auf eine erhöhte Akkumulation von Serin-STAT3 im Kern nach TLR Stimulation hin.

3.3. TLR induzierte, STAT3 abhängige Genexpression

3.3.1. STAT3 vermittelte Genexpression - GeneArray

Nachdem wir die Beteiligung von STAT3 an der TLR Signalkaskade gezeigt hatten, sollte die Frage des Einflusses auf TLR vermittelte Genexpression adressiert werden. In einem „globalen“ Ansatz wurden dazu mittels GeneArray die mRNA Expressionsmuster TLR2 spezifisch stimulierter STAT3 defizienter Makrophagen mit jenem von wt Makrophagen verglichen.

Aufgrund seiner Rolle in Zytokin-vermittelter Signalgebung, z.B. in jener des antinflammatorischen IL-10, stellt STAT3 ein zentrales Molekül immunregulatorischer Prozesse dar. Um Seiteneffekte durch sekretierte Botenstoffe auszuschließen, aber auch aufgrund der raschen Aktivierung von STAT3 innerhalb der TLR Signalkaskade wählten wir frühe Stimulationszeitpunkte. STAT3 spielt eine essentielle Rolle in der Embryonalentwicklung. Aufgrund der Mortalität STAT3 defizienter Embryonen am Tag 6 post conceptionem, fanden deshalb konditionelle STAT3 Knockouts Verwendung. Die spezifische Deletion des von loxP Schittstellen flankierten STAT3 Gens erfolgte so erst nach promotorabhängiger Expression der Cre-Rekombinase. Über gewebspezifischer Promotoren war eine auf bestimmte Zellpopulationen beschränkte Expression der Rekombinase möglich. Für den GeneArray fanden Mäuse, beziehungsweise deren Makrophagen Verwendung, deren Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des für myeloide Zellen spezifischen *LysozymM* Promotors steht.

Die Analyse der mRNA aus für 60 Minuten stimulierten Knochenmarksmakrophagen führte zur Identifikation der Gene, die auf TLR2 Aktivierung STAT3 abhängig mindestens zweifach aufreguliert wurden (Tabelle 2). Als am Stärksten reguliertes Gen identifizierten wir *PAI2* (*Plasminogen Activator Inhibitor 2*).

ERGEBNISSE

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	wt unstim	wt P ₃ CSK ₄	STAT3 ^{Δmye} unstim	STAT3 ^{Δmye} P ₃ CSK ₄	Verhältnis wt P ₃ CSK ₄ / STAT3 ^{Δmye} P ₃ CSK ₄
1419082_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 2	Serpib2	7	114	6	13	9,08
1437270_a_at	Cardiotrophin-like cytokine factor 1 (Clcf1), mRNA	Bsf3	9	93	10	19	5,05
1419282_at	chemokine (C-C motif) ligand 12	Ccl12	43	393	21	102	3,87
1450295_s_at	poliovirus receptor	Pvr	41	281	34	83	3,40
1450262_at	Cardiotrophin-like cytokine factor 1	Clcf1	22	63	18	20	3,12
1421473_at	interleukin 1 alpha	Il1a	12	274	13	90	3,04
1451798_at	interleukin 1 receptor antagonist	Il1rn	142	971	106	335	2,90
1423268_at	integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)	Itga5	105	404	73	140	2,89
1419530_at	interleukin 12b	Il12b	12	44	11	15	2,88
1452388_at	heat shock protein 1A	Hspa1a	45	256	50	92	2,78
1460415_a_at	CD40 antigen	Cd40	159	1132	105	419	2,70
1424486_a_at	thioredoxin reductase 1	Txnrd1	94	244	65	93	2,62
1448756_at	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	S100a9	22	61	21	25	2,46
1419816_s_at	ERBB receptor feedback inhibitor 1	Errfi1	106	853	76	371	2,30
1450264_a_at	choline kinase alpha	Chka	82	350	90	153	2,29
1420380_at	chemokine (C-C motif) ligand 2	Ccl2	51	736	46	326	2,26
1426063_a_at	GTP binding protein (gene overexpressed in skeletal muscle)	Gem	9	124	7	56	2,21
1416601_a_at	Down syndrome critical region homolog 1 (human)	Dscr1	76	199	50	91	2,19
1426334_a_at	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	Bcl2l11	163	389	109	181	2,15
1419537_at	transcription factor EC	Tcfec	285	959	257	448	2,14
1419609_at	chemokine (C-C motif) receptor 1	Ccr1	101	207	81	97	2,14
1438841_s_at	arginase type II	Arg2	12	100	18	48	2,10
1425192_at	cDNA sequence BC027373	BC027373	55	179	56	86	2,09
1449473_s_at	CD40 antigen	Cd40	179	1503	147	725	2,07
1449124_at	ral guanine nucleotide dissociation stimulator,-like 1	Rgl1	95	242	74	118	2,05
1418992_at	coagulation factor X	F10	14	63	12	31	2,04
1421228_at	chemokine (C-C motif) ligand 7	Ccl7	20	87	20	42	2,04
1417509_at	ring finger protein (C3HC4 type) 19	Rnf19	130	479	112	236	2,03

Tabelle 6: Differentielle Genexpression auf TLR Stimulation in Wildtyp und STAT3^{Δmye} BMDM. Zellen der angegebenen Genotypen wurden mit TLR2 Agonist P₃CSK₄ (1μg/ml) für 60 min stimuliert, die RNA isoliert und die Genexpressionsmuster mittels Genearray bestimmt. Dargestellt sind die STAT3 abhängig regulierten Gene mit einer mehr als 50% abweichenden Reduktion der Genexpression in STAT3^{Δmye} Zellen.

3.3.2. TLR induzierte *PAI2* mRNA Aufregulation erfolgt abhängig von STAT3

Zur Validierung des per GeneArray erhobenen Befundes in Bezug auf PAI-2 wurden aus dem Knochenmark von Wildtyp und LysMCre $STAT3^{lox/lox}$ (im Weiteren als $STAT3^{\Delta mye}$ bezeichnet) Mäusen generierte Makrophagen für unterschiedliche Zeitpunkte mit TLR2 Agonist stimuliert, die RNA isoliert und die RNA Aufregulation vergleichend mittels *Real-Time PCR* untersucht. Die Analyse der auf das internen Standardgen β -Aktin normalisierten Akkumulation der *PAI2* mRNA Transkripte zeigte eine deutliche STAT3 Abhängigkeit der TLR2 induzierten Aufregulation. Während im Wildtyp nach 90 minütiger Stimulation ein massiver Anstieg der relativen *PAI2* mRNA Expression zu verzeichnen war, blieb die Induktion im $STAT3$ Knockout unverändert zur im Vergleich zum Wildtyp nur geringen Aufregulation nach 60 Minuten Stimulation mit P_3CSK_4 . Die TLR2 induzierte relative Expression der *TNF α* mRNA erfolgte unabhängig von STAT3. Ein dem $STAT3$ Knockout ähnliches *PAI2* Expressionsniveau zeigte die Behandlung von Wildtyp-Makrophagen mit dem MEK Inhibitor PD 98059 (Abbildung 27).

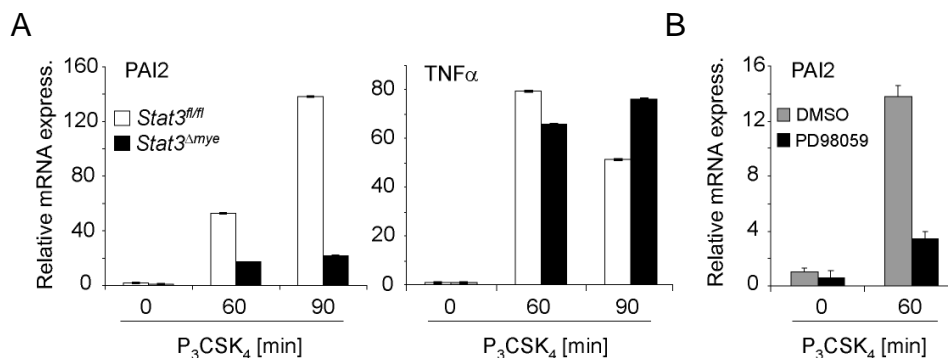


Abbildung 27: *PAI2* mRNA Aufregulation ist abhängig von STAT3. (A und B) BMDM der angegebenen Genotypen wurden, (B) nach Inhibitorvorbehandlung für 1 h (DMSO, Dimethylsulfoxid, Lösungsmittel; PD98059, MEK Inhibitor (10 μ M)) mit TLR2 Agonist P_3CSK_4 (1 μ g/ml) stimuliert und die Akkumulation der spezifischen mRNA mittels *real-time* RT PCR analysiert. $STAT3^{fl/fl}$ bezeichnet die Kontrollzellen ohne Cre-Rekombinase.

3.3.3. Vergleichende PAI-2 Protein Expression

Um die Frage zu adressieren, ob die auf mRNA Ebene beobachtete ausbleibende Aufregulation von PAI-2 auch auf Proteinebene nachvollzogen werden könne, wurden Makrophagen von Wildtyp und $STAT3^{\Delta}$ Mäusen (die Cre-Rekombinase steht hier unter der Kontrolle des IFN- β responsiven Mx1-Promotors) für unterschiedliche Zeitpunkte TLR2 spezifisch stimuliert, lysiert und das PAI-2 Protein durch Verwendung spezifischer Antikörper im Immunoblot detektiert. In wt Makrophagen zeigte sich nach 4 bis 8 Stunden Stimulationsdauer eine deutliche Aufregulation von PAI-2. In $STAT3$ defizienten Makrophagen war zu diesen Zeitpunkten keine PAI-2 Expression nachweisbar (Abbildung 21). Eine Vorbehandlung der Zellen sowohl mit MEK1 als auch mit mTOR

spezifischen Inhibitoren hatte mit STAT3 Defizienz vergleichbare Effekte. Mit Inhibitor behandelte Zellen exprimierten proIL-1 β auf gleichem Niveau wie die Kontrollen, während die Produktion von PAI-2 substantiell gehemmt war.

Die spezifische Blockade der mTOR induzierenden Signalmoleküle Akt und PI3K resultierte ebenfalls in der Blockade TLR2 vermittelter PAI-2 Aufregulation. Vitalität und Stimulierbarkeit der Zellen wurde durch Expressionsanalyse von proIL-1 β nachgewiesen. Dementsprechend führte die Aktivierung von TLR3 und TLR4 ebenfalls zur Expression von PAI-2. Die Stimulation des zytoplasmatischen NOD2 Rezeptors zeigte zwar frühe MAP Kinasen Aktivierung, resultierte jedoch nicht in der Expression von proIL-1 β und PAI-2 (Abbildung 28B).

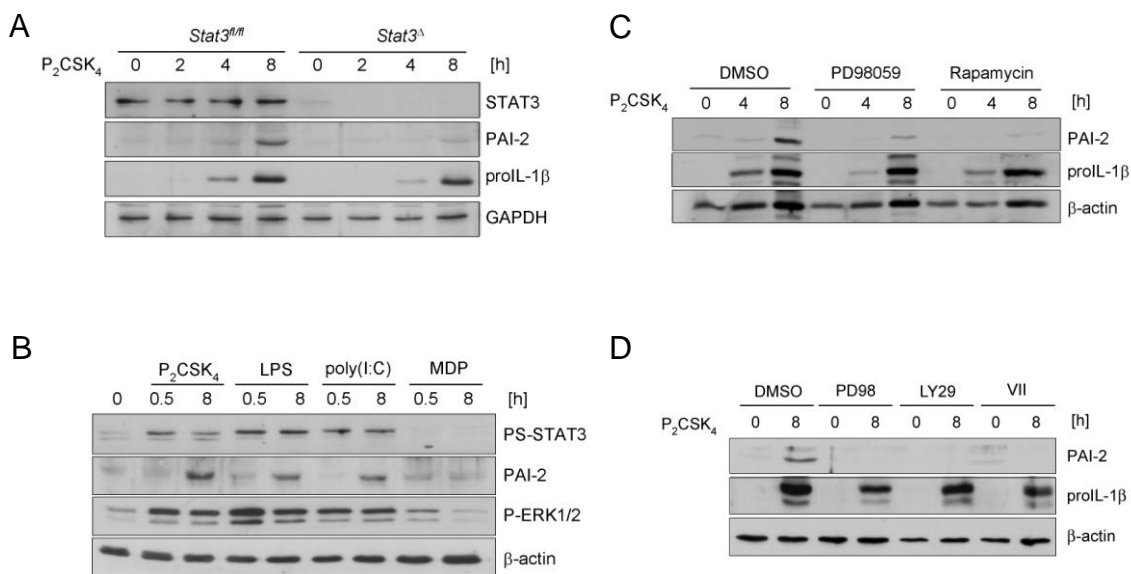


Abbildung 28: Expression von PAI-2 ist abhängig von TLR induziertem STAT3 Phospho-S727. (B-D) Wildtyp BMDM und (A) andere Genotypen wurden wie angegeben stimuliert. Die Behandlung mit Inhibitoren erfolgte 1 h (DMSO, Dimethylsulfoxid, Lösungsmittelkontrolle; PD 98059 (10 μ M), MEK Inhibitor; VII (10 μ M), AKT Inhibitor; LY29 (10 μ M), PI3K Inhibitor) beziehungsweise 3 h (Rapa (250 nM), Rapamycin) vor Stimulation. Die Analyse der Zellysate erfolgte mittels Immunoblot. STAT3^{fl/fl} bezeichnet Kontrollzellen ohne Cre-Rekombinase.

3.3.4. TLR aktiviertes STAT3 bindet an den PAI-2 Promotor und initiiert Genaktivierung

Die schnelle TLR vermittelte Aktivierung von STAT3, dessen nukleäre Translokation sowie die in rascher Folge STAT3 abhängig induzierte Aufregulation der *PAI2* mRNA wiesen auf eine Rolle von STAT3 als TLR getriebener Transkriptionsfaktor hin. Transkriptionsfaktoren binden spezifische Sequenz-Motive in Promotoren. Die Assoziation mit distinkten Promotoren führt so nach Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren sowie DNA Struktur modifizierenden Proteinen wie C/EBP oder p300 zur Rekrutierung der RNA-Polymerase II und zur Initiation der Transkription. Wir fragten nach der möglichen Interaktion von TLR aktiviertem STAT3 mit dem

PAI2 Promotor. Erste computergestützter Analysen mittels Genomatix-Software (<http://www.genomatix.de>) identifizierten keine für eine STAT3 Bindung bekannten DNA-Motive innerhalb der Promotorregion von *PAI2* (Lokus: GXP_150249). Allerdings stützen sich die Kenntnisse der bisherigen durch STAT3 erkannten DNA Sequenzen auf der Interaktion von Tyrosin-aktivierten STAT3 Dimeren.

Die potentielle Bindung von STAT3 an den *PAI2* Promotor wurde durch Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) untersucht. Die Analyse des DNA-Bindungsverhaltens von STAT3 in TLR2 spezifisch stimulierten RAW 264.7 Makrophagen zeigte die stimulationsabhängige Interaktion von STAT3 mit dem *PAI2* Promotor.

Um zunächst die Relevanz der STAT3 Serin-Phosphorylierung bei TLR vermittelter Promotorbindung herauszustellen, wurden die zuvor beschriebenen Myc-markierten STAT3 Serin/Tyrosin Punktmutanten transient in RAW 264.7 Makrophagen transfiziert, die Zellen TLR2 spezifisch aktiviert und die Mutanten durch epitopspezifische Antikörper präzipitiert und mittels ChIP hinsichtlich ihrer Assoziation mit dem Promotor analysiert. Lediglich das native Protein und die Tyrosin-defiziente Form zeigten sich in der Lage, an den Promotor zu binden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Inhibitorversuche interagierte die Serin-Mutante nicht mit dem Promotor (Abbildung 29 A). Die Vorbehandlung der Zellen mit Inhibitoren für MEK1 und mTOR, gleichbedeutend mit der Unterdrückung der Serin-Phosphorylierung von STAT3 führte zur Hemmung der Promotorbindung (Abbildung 29 B). Keinen Einfluss hatte die Behandlung mit dem p38 Inhibitor SB 202190 oder mit dem JAK2 Inhibitor AG490.

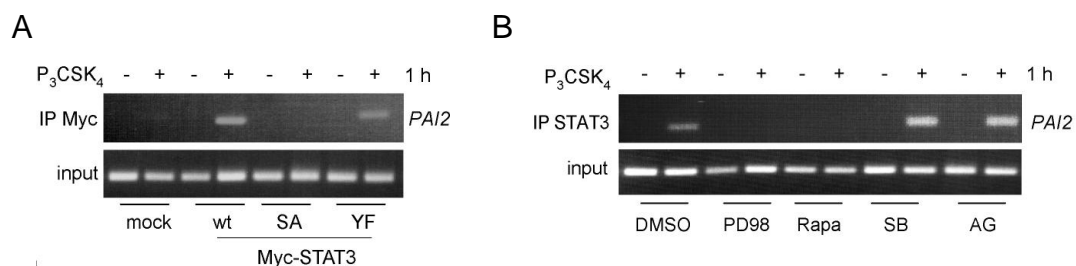


Abbildung 29: TLR aktiviertes STAT3 bindet an den *PAI2* Promotor. Protein-DNA Interaktionsanalyse mittels Chromatin Immunopräzipitation von (A) Epitop-markierten STAT3 Phosphorylierungsmutanten aus transient transfizierten RAW264.7 Makrophagen. 60 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen wie angegeben stimuliert, Protein-DNA Komplexe durch Quervernetzung fixiert, die epitopmarkierten Proteine präzipitiert und die spezifisch isolierte DNA mittels PCR analysiert. (wt, Wildtyp; SA, S727 substituiert durch A; YF, Y705F substituiert durch F). (B) *PAI2* Promotorbindung von endogenem STAT3 aus TLR2 spezifisch stimulierten RAW 264.7 Makrophagen. Inhibitorgabe erfolgte wie angegeben 1 h (PD, PD 98059 (20 μ M), MEK1 Inhibitor; SB, SB 202190 (20 μ M), p38 Inhibitor; AG, AG490 (50 μ M), JAK2 Inhibitor), beziehungsweise 3 h (Rapa, Rapamycin (250 nM), mTOR Inhibitor) vor Stimulation.

Die Induzierbarkeit der für die ChIP Analysen verwendeten Promotorsequenz wurde nachfolgend durch Klonierung in einen Luciferase Reportervektor untersucht. Die Transfektion dieses Konstruktes zusammen mit einer einen konstitutiv aktiven TLR4 simulierenden Chimäre aus CD4 und TLR4 in HEK 293 Zellen resultierte in verstärkter Reporterogenaktivität. Die Inhibierung des

mTOR Signalweges durch die zusätzliche Transfektion steigender Mengen von Kinase-inaktivem mTOR, beziehungsweise von TSC2 führte zur konzentrationsabhängigen Reduktion des Luciferasesignals (Abbildung 30 B).

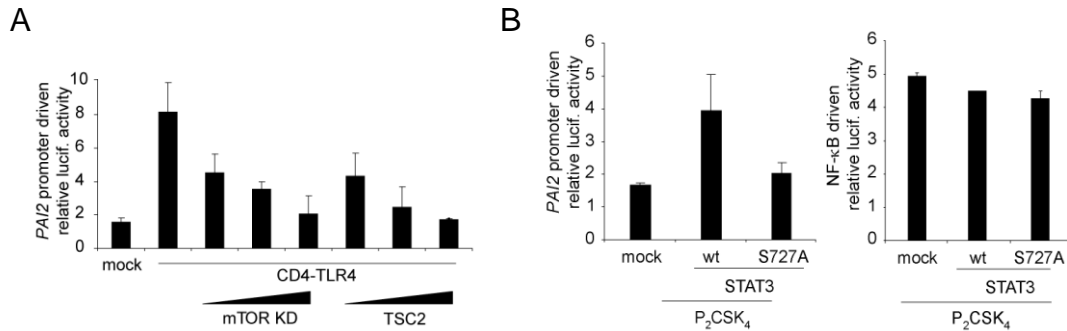


Abbildung 30: mTOR-STAT3 abhängige *PAI2*-Promotor Aktivierung induziert Reporteraktivierung. (A) HEK 293 Zellen wurden transient mit den angegebenen Expressionsplasmiden (Dreieck entspricht 1, 5, und 25 ng pro Vertiefung einer 96 Well Platte) sowie einem *PAI2*-Promotor abhängig Luciferase induzierenden Reporterplasmid transfiziert. Die Luciferaseaktivität wurde 36 h nach Transfektion gemessen. (B) RAW 264.7 Makrophagen wurden mit den aufgeführten Expressionsplasmiden, sowie *PAI2*-Promotor regulierten, beziehungsweise NF-κB regulierten Luciferase Reportergenkonstrukten transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für 12 h mit P_2CSK_4 (1µg/ml) stimuliert und die Luciferaseaktivität in den Zellysaten bestimmt. (wt, Wildtyp; SA, S727 substituiert durch A)

Die ligandenabhängige Aktivierung des *PAI2*-Promotor Reporterkonstruktes zeigte die Transfektion von RAW264.7 Makrophagen. Die zusätzliche Expression von STAT3 führte nach TLR2 Stimulation zu einer deutlichen Verstärkung der *PAI2*-Promotor regulierten Luciferaseaktivität. Die Expression der STAT3 S727A Mutante vermittelte hingegen keine verstärkte Aktivität. Keinen Einfluss hatte die Expression beider STAT3 Konstrukte auf die Aktivierung eines NF-κB abhängigen Promotors (Abbildung 30B).

3.4. Effekte STAT3 vermittelter Genexpression

3.4.1. Caspase-1 Aktivierung durch STAT3 Defizienz

Nachdem wir die Beteiligung von STAT3 an TLR vermittelter, transkriptionell aktivierter Expression von PAI-2 gezeigt hatten, fragten wir nach den Effekten dieser differenziellen Regulation auf den immunmodulatorischen Status der Zelle. Eine jüngere Publikation implizierte PAI-2, ein Homolog von Bcl-2, in die Inhibition von Apoptose und resultierend in die Regulation von Caspase-1 Aktivität und dadurch Prozessierung und Sekretion von IL-1β (Greten et al., 2007). Die Aktivierung von Caspase-1 erfolgt nach Ausbildung großer, zytoplasmatisch lokalisierter

Proteinkomplexe und führt zur Prozessierung von zytoplasmatisch vorliegendem IL-1 β . Die Spaltung des Proteins führt zur sofortigen Freisetzung des aktiven Zytokins aus der Zelle. Die Stimulation von TLR induziert „lediglich“ die Produktion von proIL-1 β , ohne dabei Caspase-1 und IL-1 β Freisetzung zu induzieren. Sollte PAI-2 tatsächlich suprimierend auf die Aktivität von Caspase-1 wirken, so wäre eine Konsequenz der Abwesenheit von PAI-2 eine verstärkte Freisetzung von prozessiertem IL-1 β . Die Stimulation von Knochenmarksmakrophagen mit LPS resultierte im Wildtyp wie erwartet in der Sekretion lediglich sehr geringer Mengen von IL-1 β . STAT3 defiziente Makrophagen setzten deutlich erhöhte Mengen an IL-1 β frei (Abbildung 31). Analog zur Freisetzung von IL-1 β verhielt sich die Sekretion des Zytokins IL-1 α . Selbst kein Substrat von Caspase-1 interagiert IL-1 α dennoch mit dieser und wird über einen unkonventionellen Caspase-1 vermittelten Sekretionsweg aus der Zelle geschleust (Keller, et al., 2008). Um auszuschließen, dass eine Störung der Zellintegrität zur verstärkten Freisetzung der Zytokine im Knockout führte wurde die Konzentration von Lactat Dehydrogenase (LDH) im Zellüberstand gemessen. Überstände von Wildtyp und STAT3 defizienten Makrophagen setzten gleiche Mengen dieses Enzyms frei (Abbildung 31).

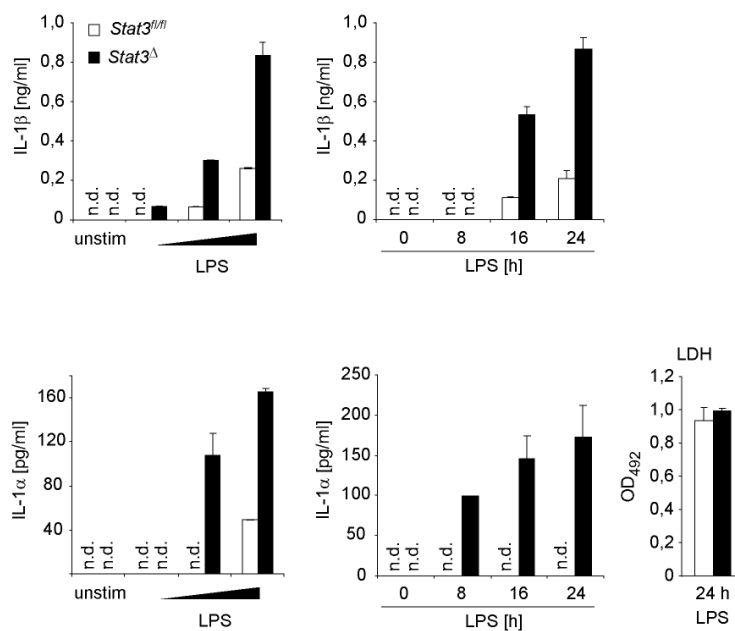


Abbildung 31: STAT3 Defizienz führt zur verstärkten Freisetzung Caspase-1 abhängiger Zytokine auf TLR4 Stimulation. BMDM der angegebenen Genotypen wurden mit steigenden Mengen LPS (10, 100 und 1000 ng) für 24 h, oder mit konstanten Mengen (1000 ng) für unterschiedliche Zeiten stimuliert. Die Konzentration von sekretiertem (A) IL-1 β und (B) IL-1 α im Überstand wurde mittels ELISA bestimmt. Die Zellintegrität wurde anhand der in den Überstand freigegebenen Lactat Dehydrogenase bestimmt. STAT3^{fl/fl} bezeichnet Kontrollzellen ohne Cre.

3.4.2. Spezifische Aktivierung des AIM2 und NALP3 Inflammasoms

Die Aktivierung des Inflammasoms und die daraus resultierende Aktivierung der Caspase-1 wird auf die Erkennung zytoplasmatischer Liganden hin ausgelöst. Inwieweit extrazelluläre PRR Liganden die Aggregation der Inflammasom-Komponenten induzieren ist bisher nicht bekannt. Dies zusammen mit der frühestens nah 16 h detektierbaren LPS induzierten Freisetzung von IL-

IL-1 β führten zur Wahl eines modifizierten Versuchsansatzes, um die Beteiligung spezieller Inflammasom-Typen zu adressieren.

Klassische Inflammasom-Versuche setzen die Notwendigkeit der Kombination zweier unabhängiger Signale voraus. Ein erster, TLR vermittelter Reiz führt zur Aufregulation der proIL-1 β Produktion und Akkumulation des Zytokinvorläufers in der Zelle, während ein zytoplasmatischer Stimulus zur spezifischen Inflammasom Aktivierung führt. So resultiert die Erkennung zytoplasmatisch vorliegender DNA in der AIM2 abhängigen Induktion von Caspase-1 (Hornung et al., 2009), während die Konfrontation mit hohen Dosen ATP zur Induktion des NALP3 Inflammasoms führt (Kanneganti et al., 2005).

Die Vorbehandlung von Zellen mit LPS für drei und sechs Stunden zur Aufregulation von PAI-2 und proIL-1 β , sowie die folgende Transfektion von Plasmid-DNA zur Aktivierung von AIM2, als auch die Stimulation mit ATP resultierten in der Freisetzung des prozessierten Zytokins. Die alleinige Stimulation mit dem TLR4 Liganden induzierte keine detektierbare IL-1 β Freisetzung. Erst die zusätzliche Aktivierung der beiden Inflammasom-Typen resultierte sowohl in Wildtyp-, als auch in STAT3 defizienten Makrophagen in der Freisetzung von IL-1 β .

Während der Knockout bereits nach drei Stunden eine, im Vergleich zum Wildtyp, leicht erhöhte IL-1 β Konzentration im Überstand aufwies, so traten diese Unterschiede mit fortschreitender Stimulationsdauer noch deutlicher hervor (Abbildung 32).

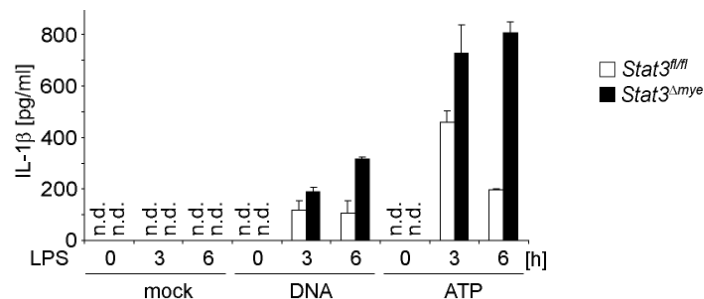


Abbildung 32: STAT3 Defizienz führt zur verstärkten Freisetzung von IL-1 β auf NALP3 und AIM2 abhängige Aktivierung von Caspase-1. Wildtyp BMDM wurden wie angegeben stimuliert. Während der letzten 2 h der Stimulation wurden die Zellen mit DNA (1 μ g endotoxinfreie Plasmid DNA) transfiziert, beziehungsweise mit 5 mM ATP während der letzten 30 Minuten der Stimulation behandelt. Die Analyse der Zellüberstände erfolgte mittels ELISA (n.d., not detected, nicht detektiert).

3.4.3. Charakterisierung der für LPS Induktion relevanten Inflammasom-Komponenten

Dem klassischen Modell zufolge ist Caspase-1 „das“ IL-1 β prozessierende Enzym. Neuere Studien erweitern dieses Modell der IL-1 β Prozessierung und Sekretion. So ist die TRIF abhängig induzierte Caspase-8 in der Lage, NALP unabhängig proIL-1 β zu spalten. In bestimmten Zelltypen

existiert zudem ein alternativer Sekretionsweg von IL-1 β . Dieser beinhaltet die Ausschleusung der pro-Form des Zytokins und seine Prozessierung durch extrazelluläre Proteasen. Die Blockade atypischer IL-1 β Sekretion durch Glycin führte zu keiner Beeinflussung der durch Langzeitstimulation mit LPS induzierten IL-1 β Freisetzung sowohl bei Wildtyp als auch bei STAT3 defizienten Makrophagen (Abbildung 33).

Die Verwendung des pan-Caspase Inhibitors zVAD hemmte nahezu jegliche Sekretion von IL-1 β und bestätigte so die Caspase Abhängigkeit der Prozessierung des Zytokins. Die LPS abhängige Freisetzung von IL-1 β konnte durch die spezifische Blockade von Caspase-1 mit Ac-WEHD-CHO nahezu komplett unterbunden werden. Die Verwendung des allgemeinen Serin-Protease Inhibitors TPCK zeigte ebenfalls eine deutliche Reduktion an im Überstand detektierbaren IL-1 β . Ein für die Aktivierung des NALP3 Inflammasoms essentielles Ereignis ist der Ausstrom zytoplasmatischen Kaliums aus der Zelle. Durch Erhöhung der extrazellulären Kalium Konzentration ist es möglich, diesen Ausstrom zu hemmen und so die Aktivierung des Inflammasoms zu unterbinden. Wie in Abbildung 33 zu sehen ist, führte die Erhöhung der Kaliumkonzentration zum kompletten Verlust LPS vermittelter IL-1 β Freisetzung.

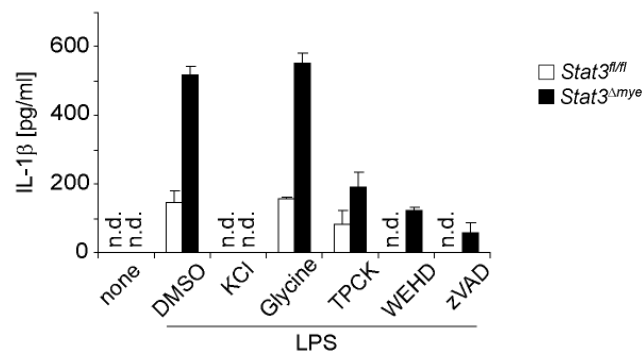


Abbildung 33: Inflammasom und Caspase-1 abhängige, LPS induzierte, IL-1 β Freisetzung. BMDM wurden 30 min vor LPS Stimulation (1 μ g/ml) mit den angegebenen Inhibitoren behandelt (DMSO, Dimethyl Sulfoxid, Lösungsmittel; KCl, Kaliumchlorid, 100 mM; Glycine, 5mM; TPCK, 10 μ M; WEHD, 50 nM; zVAD, 10 μ M). Die Analyse der Zellüberstände erfolgte mittels ELISA. (n.d., not detected, nicht detektiert).

3.4.4. Verstärkte Caspase-1 Aktivierung durch LPS Stimulation in Stat3^{-/-} BMDM

Die Befunde aus den zuvor beschriebenen Inhibitorversuchen ließen auf eine in STAT3 defizienten Zellen verstärkte Aktivierung von Caspase-1 schließen. Die Aktivierung von Caspase-1 führt zur Selbstspaltung des Enzyms und zur Ausbildung von aus den Untereinheiten p10 und p20 gebildeten Heterotetrameren. Diese enzymatisch aktiven Komplexe werden in rascher Folge aus der Zelle geschleust. Aktive Caspase-1, also die Untereinheiten p10 oder p20 sind deshalb im Überstand der Zellen detektierbar. Dort ist ebenfalls prozessiertes und immunologisch aktives IL-1 β (p17) nachweisbar.

STAT3 defiziente Makrophagen setzten auf Stimulation mit LPS für 12 und 24 h, deutlich erhöhte Mengen von prozessiertem IL-1 β frei (Abbildung 34). Damit korrelierte eine deutlich verstärkte Aktivierung von Caspase-1. Der Nachweis der unprozessierten Proteine im Lysat zeigte vergleichbare Mengen an proCaspase. Die im STAT3 Knockout erhöhte Expression von IL-1 β ist auf die Abwesenheit der antiinflammatorischen Wirkung von IL-10 zurückzuführen. Gleiche Effekte hatte die LPS Stimulation für kurze Zeitperioden und nachfolgende gezielte Aktivierung des NALP3 Inflammasoms durch Zugabe von extrazellulärem ATP. Erst die zusätzliche Induktion des Inflammasoms führte zu frühen Zeitpunkten zur Ausschleusung von immunologisch aktivem IL-1 β . Wie erwartet enthielten die Überstände STAT3 defizienter Zellen, im Vergleich zur wt-Kontrolle deutlich erhöhte Mengen an prozessiertem Zytokin. Analog dazu verhielt sich die Aktivierung von Caspase-1. Die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration zur Blockade der Inflammasomaktivierung unterband die Initiierung von Caspase-1, sowohl im Wildtyp als auch im Knockout, beeinflusste jedoch die LPS vermittelte Aufregulation von intrazellulärem proIL-1 β nicht (Abbildung 34).

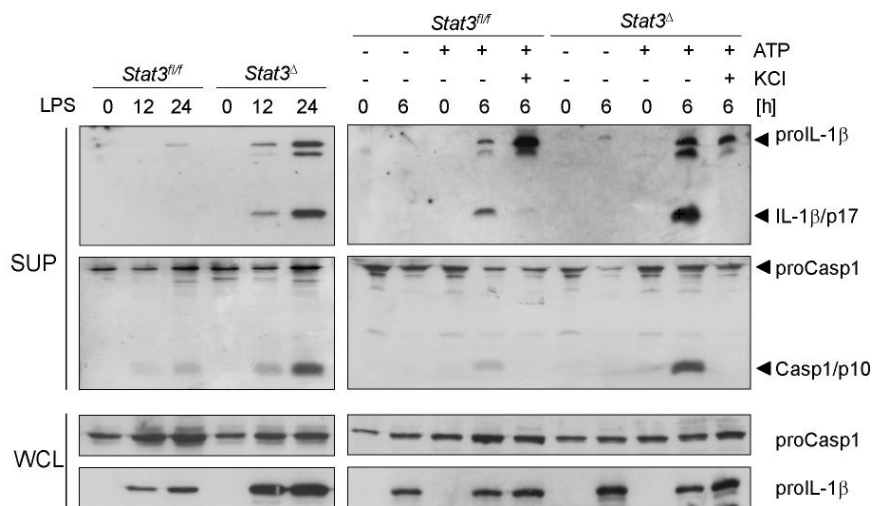


Abbildung 34: STAT3 defiziente BMDM aktivieren auf Stimulation mit LPS verstärkt Caspase-1. BMDM wurden für die angegebenen Zeiten mit TLR4 Agonist stimuliert. Falls angezeigt erfolgte die Zugabe von ATP (5 mM) für die letzten 30 min der Stimulation. KCl (100 mM) wurde zeitgleich mit ATP appliziert. Die Detektion der aktiven, beziehungsweise prozessierten Proteine erfolgte mittels Immunoblot gefällter Zellüberstände, die unprozessierten Proteine wurden in Ganzzelllysaten nachgewiesen. (SUP, *supernatant*, Überstand; WCL, *whole cell lysate*, Ganzzelllysat; proIL-1 β , ungespaltenes IL-1 β , p35; IL-1 β /p17, aktives IL-1 β ; proCasp1, ungespaltene Caspase-1; Casp1/p10, Caspase-1 Untereinheit p10)

3.4.5. Inhibitorvermittelte Verstärkung der IL-1 β Sekretion

Die durch die STAT3 Defizienz hervorgerufene Verstärkung der IL-1 β Sekretion simulierten wir durch die Inhibition der PAI-2 Aufregulation. Zu diesem Zweck wurden Knochenmarksmakrophagen von Wildtyp Mäusen bei unterschiedlichen Konzentrationen von MEK1- und mTOR Inhibitor inkubiert. Der Stimulation mit LPS für vier Stunden folgte die Gabe von ATP für 30 min. Die alleinige Inhibitorbehandlung führte bereits zur LPS abhängigen Freisetzung von IL-1 β . Die zusätzliche NALP3 abhängige Induktion von Caspase-1 zeigte sowohl bei PD98059 vermittelter Inhibition von MEK1, als auch für Rapamycin vermittelte Hemmung von mTOR zu einer dosisabhängigen Verstärkung der IL-1 β Freisetzung. Die Illustration von zytoplasmatischen IL-1 β zeigte die von der Inhibitorgabe weitestgehend unbeeinflusste Expression des Zytokins.

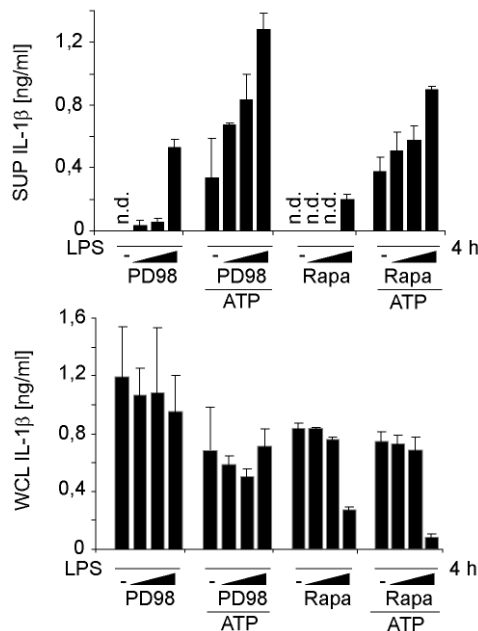


Abbildung 35: Erhöhung der IL-1 β -Freisetzung durch Inhibition von STAT3 Serin-Phosphorylierung. Wt BMDM wurden mit steigenden Konzentrationen Inhibitor (1, 10 und 100 nM) für 1 h (PD98, PD98050, MEK1 Inhibitor) oder 3 h (Rapa, Rapamycin, mTOR Inhibitor) vorinkubiert und mit LPS stimuliert. Die Zugabe von ATP (5mM) erfolgte 30 min vor Stimulationsende. Die Bestimmung der IL-1 β Konzentration erfolgte aus den Überständen und Lysaten. (SUP, *supernatant*, Überstand; WCL, *whole cell lysate*, Ganzzellysate n.d., not detected, nicht detektiert).

3.4.6. PAI-2 Aufregulation unabhängig von autokriner Tyrosin-Phosphorylierung

Wie bereits beschrieben führt die Aktivierung von TLRs zur Produktion und Sekretion von Zytokinen, die ihrerseits durch die Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren, Signaltransduktion initiieren. Eine Vielzahl zytokinvermittelter Signalprozesse erfolgt über die JAK abhängige Tyrosin-Phosphorylierung von STATs.

Um eine Beteiligung von Tyrosin-phosphoryliertem STAT3 an der Aufregulation von PAI-2 auszuschließen, wurde die TLR4 abhängige Aufregulation von PAI-2 in An- und Abwesenheit des pan-JAK Inhibitors Pyridon P6 untersucht. Inhibitorbehandelte Zellen zeigten keine Induktion

später STAT3 Tyrosin-Phosphorylierung. Die Aufregulation sowohl von PAI-2, als auch von proIL-1 β war jedoch unbeeinflusst (Abbildung 36A).

Neuere Publikationen beschrieben eine Beteiligung von mTOR an der Produktion von IL-10 und die IL-10 vermittelte Suppression der Aufregulation des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12 (Ohtani et al., 2008). STAT3 stellt einen essentiellen Bestandteil der IL-10 abhängigen Signalweiterleitung dar. Um Nebeneffekte von im STAT3 Knockout fehlerhafter IL-10 Signaltransduktion auszuschließen wurden Makrophagen von Wildtyp und IL-10 Rezeptor defizienten Mäusen hinsichtlich der LPS induzierten Aufregulation von PAI-2 verglichen. Während STAT3 Tyrosin-Phosphorylierung lediglich im Wildtyp detektierbar war, zeigten die Lysate der Knockoutmakrophagen intakte und unveränderte Aufregulation von PAI-2. Die Expression von proIL-1 β war in IL-10 defizienten Makrophagen deutlich erhöht (Abbildung 36 B).

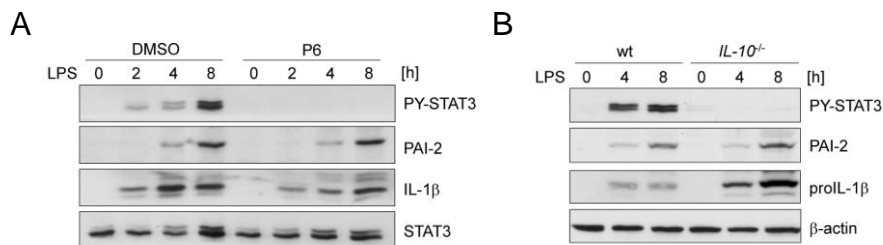


Abbildung 36: TLR induzierte PAI-2 Expression ist unabhängig von autokrin induziertem STAT3 Phospho-Y705. (A) und (B) BMDM der angegebenen Genotypen wurden (A) für 1h mit Inhibitor vorinkubiert, TLR4 spezifisch stimuliert und die Lysate mittels Immunoblot analysiert. (DMSO, Dimethyl Sulfoxid, Lösungsmittel; P6, Pyridone P6 (1 μ M), pan-JAK Inhibitor)

3.4.7. IL-1 β Sekretion ist unbeeinflusst von retroviraler STAT3-S727A Transduktion

Das STAT3 Molekül verfügt über zwei bekannte Phosphorylierungsstellen, Tyrosin 705 und Serin 727. Um die unmittelbar durch TLR Stimulation vermittelte Serin-Phosphorylierung in einen Kontext mit der durch PAI-2 beeinflussten IL-1 β Sekretion zu bringen, wurden STAT3 defiziente Knochenmarksmakrophagen retroviral mit Serin-mutiertem STAT3 transduziert, um spezifisch die STAT3 Phospho-Tyrosin abhängigen Signalkaskaden „wieder“ herzustellen. Die Analyse von LPS stimulierten mit Leervektor und S727A transduzierten STAT3 ^{Δ mye} Makrophagen zeigte im Vergleich zu Wildtyp Zellen eine deutlich erhöhte Freisetzung von IL-1 β . Die Rekonstitution mit Wildtyp STAT3 hingegen führte zur Reduktion der IL-1 β Ausschüttung auf ein den Wildtyp-Makrophagen vergleichbares Niveau (Abbildung 37). Die transfizierten Konstrukte wurden im Immunoblot auf erfolgreiche Expression und entsprechendes Phosphorylierungsverhalten getestet. Alle Zellen zeigten unveränderte TLR Signaltransduktion wie anhand der LPS induzierten Phosphorylierung von p38 illustriert ist (Abbildung 37 B).

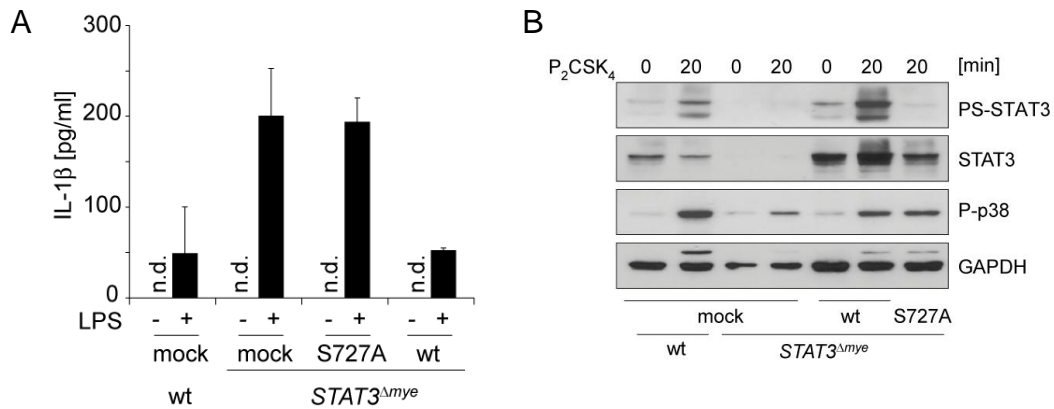


Abbildung 37: LPS induzierte IL-1 β Sekretion ist abhängig von STAT3 Serin-Phosphorylierung. STAT3 defiziente BMDM wurden retroviral mit den angegebenen Expressionsplasmiden transduziert und nach Differenzierung (A) für 24 h mit LPS (1 μ g/ml) stimuliert. Die Überstände wurden mittels ELISA analysiert. (B) Immunoblot von P₂CSK₄ (1 μ g/ml) stimulierten retroviral transduzierten BMDM. (S727A, S 727 substituiert durch A)

3.4.8. Überexpression von PAI-2 reduziert die Sekretion von IL-1 β in STAT3 defizienten Makrophagen

Die Relevanz von PAI-2 bei der Kontrolle LPS induzierter IL-1 β zeigte sich durch retrovirale Transduktion eines für murines PAI-2 codierenden Expressionsvektors in STAT3 defiziente Knochenmarksmakrophagen. Nach Langzeitstimulation mit LPS erfolgte die Messung des in den Überstand sekretierten IL-1 β . Die Überexpression von PAI-2 führte ebenso wie die Rekonstitution mit STAT3 zur signifikanten Reduktion der IL-1 β Freisetzung im Vergleich zu Leervektor-transfuzierten Zellen des Knockouts (Abbildung 38).

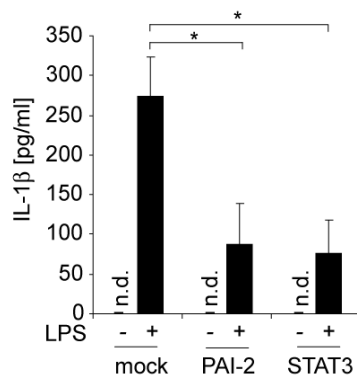


Abbildung 38: PAI-2 Expression hemmt LPS abhängige IL-1 β Freisetzung in STAT3 defizienten Zellen. Retroviral transduzierte STAT3 defiziente BMDM wurden für 24 h mit LPS (1 μ g/ml) stimuliert, die Menge an freigesetztem IL-1 β mittels ELISA bestimmt.

3.4.9. Zytoplasmatische PRRs induzieren keine STAT3 Serin-Phosphorylierung

Inwieweit weitere Mustererkennungsrezeptoren, neben TLRs, auf ihre Aktivierung hin ebenfalls ebenfalls die Serin-Phosphorylierung von STAT3 induzieren wurde durch die spezifische Stimulation von RLRs und NODs untersucht. Die zytoplasmatisch lokalisierten RLRs erkennen sowohl intrazelluläre virale RNA als auch das synthetische doppelsträngige RNA Analogon poly(I:C) und initiieren spezifische, in die Induktion von Typ-I Interferonen mündende Signalgebung. Ursprünglich als Ligand für TLR3 beschrieben aktivierten große Mengen an poly(I:C) Zellen auch in Abwesenheit des zentralen Adaptermoleküls TRIF. Grund hierfür ist die Diffusion des Agonisten in die Zelle und die dort erfolgende Erkennung über RLRs.

Um eine zeitnahe zytoplasmatisch vermittelte Rezeptoranwort zu generieren, wurden Zellen synchron mit poly(I:C) und niedrigen Konzentrationen ATP behandelt. Der zugrunde liegenden Rationale zufolge würde ATP an den P2X7 Rezeptor binden und so die Bildung von Pannexin Kanälen innerhalb der Zellmembran ermöglichen. Diese Kanäle sollten die Aufnahme des eigentlichen Liganden in das Zytoplasma der Zelle begünstigen. Durch die alleinige Gabe von ATP wurde keine der untersuchten Signalkomponenten aktiviert (Abbildung 39). Die zusätzliche Stimulation von Wildtyp Makrophagen mit poly(I:C) führte sowohl zur schnellen Serin-Phosphorylierung von STAT3, als auch zur Aktivierung von ERK1/2 und p70/S6K. Die Aktivierung des NF- κ B Signalweges wurde durch die Degradation des Inhibitors I κ B α illustriert. TRIF defiziente Zellen wiesen auf die parallele Behandlung mit ATP und poly(I:C) eine intakte, jedoch leicht verminderte Aktivierung von ERK1/2 sowie Degradation von I κ B α auf. Die im TRIF Knockout alleinig durch RLRs vermittelte Signalgebung resultierte jedoch nicht in der Serin-Phosphorylierung von STAT3. Interessanterweise weist gleichwohl die Detektierbarkeit von phosphorylierter p70/S6K auf die durch zytoplasmatische RLRs vermittelte Induktion der mTOR Signalkaskade hin.

Eine weitere Gruppe zytoplasmatischer Mustererkennungsrezeptoren stellen die NLRs dar. Aus dieser großen Familie ist bisher erst für zwei Vertreter die PAMP vermittelte Aktivierung von Signalgebung gezeigt: NOD1 und NOD2. Lediglich für NOD2 ist ein natürlicher Ligand beschrieben: MDP. Die Stimulation von Knochenmarksmakrophagen mit MDP resultierte in der Phosphorylierung von MAPK, jedoch nicht in der Serin-Phosphorylierung von STAT3, wie die vergleichende Stimulation mit LPS zeigt (Abbildung 39B).

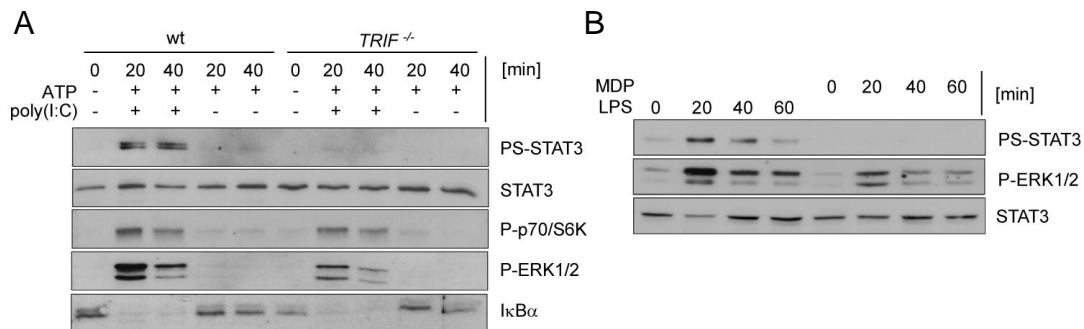


Abbildung 39: Stimulation zytoplasmatischer PRRs führt nicht zur Induktion von STAT3 S727 Phosphorylierung. BMDM verschiedener Genotypen (Wildtyp, falls nicht anders angegeben) wurden (A) mit ATP allein (250 µM) oder zusammen mit poly(I:C) (100ng/ml), beziehungsweise (B) mit LPS (1 µg/ml) oder MDP (10 µg/ml) stimuliert, lysiert und die Phosphorylierungszustände bestimmter Proteine mittels Immunoblot erfasst. (P, phosphoryliert; S, Serin S727; IκBα, Inhibitor von NF-κB, MDP, Muramyl Dipetid; (*) appliziert; (-), nicht appliziert).

3.5. Charakterisierung der PAI-2 abhängigen Regulation von Caspase-1

3.5.1. PAI-2 defiziente Makrophagen zeigen erhöhte IL-1β und IL-1α Sekretion

Wie die vorherigen Befunde illustrieren, wirkt die Überexpression von PAI-2 regulierend auf die Aktivierung von Caspase-1 und die LPS vermittelte Sekretion von IL-1β. Wenngleich die Wirkung als antiapoptotisches Protein beschrieben ist und ebenfalls seine Rolle in der Unterdrückung der Sekretion von IL-1β gezeigt wurde, beruhen diese Befunde auf Überexpressionsstudien und Untersuchungen an der PAI-2 defizienten Zelllinie THP-1.

Eine Charakterisierung PAI-2 defizienter muriner Knochenmarksmakrophagen war bisher nicht erfolgt. Zur Untersuchung der Übertragbarkeit unserer Befunde aus den STAT3 Knockout Versuchen analysierten wir PAI-2 defiziente Makrophagen hinsichtlich ihrer Caspase-1 Aktivität. PAI-2 defiziente Knochenmarksmakrophagen sekretierten, im Vergleich zu Wildtypzellen sowohl zeit-, als auch dosisabhängig auf Stimulation mit LPS verstärkt IL-1β und IL-1α. Sowohl direkt als auch indirekt erfolgt die Sekretion beider Zytokine Caspase-1 abhängig. Während IL-1β als direktes Substrat der Caspase-1 abhängigen Prozessierung unterliegt, erfolgt die Ausschleusung von IL-1α aus der Zelle durch Interaktion mit der aktiven p20 Untereinheit über einen alternativen, Caspase-1 abhängigen, Sekretionsweg (Keller et al., 2008).

Die Freisetzung des Caspase-1 unabhängigen Zytokins IL-6 erfolgte PAI-2 unabhängig. Im Gegensatz zu IL-1β und IL-1α war in Bezug auf IL-6 das Maximum der Freisetzung bereits nach 8 Stunden erreicht (Abbildung 40).

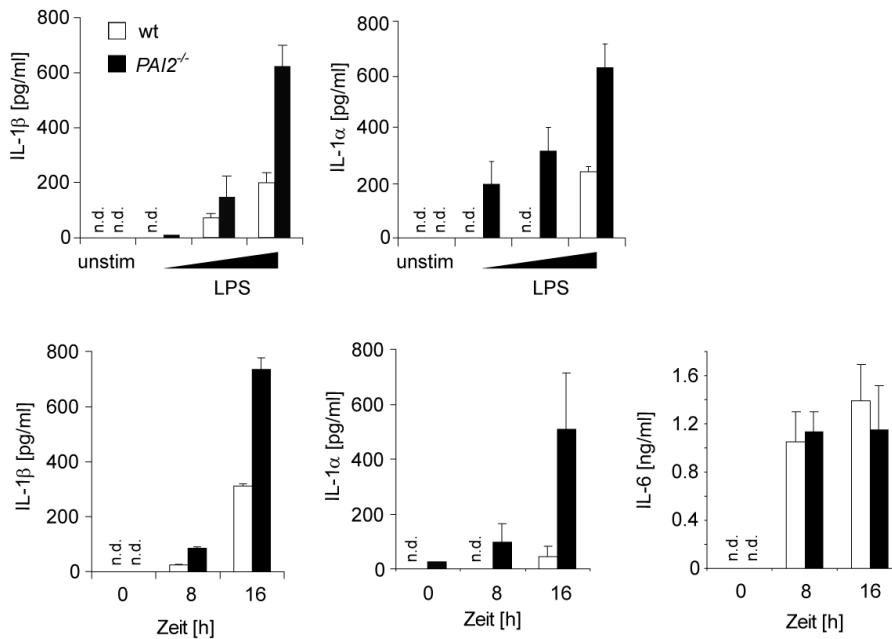


Abbildung 40: Verstärkte Freisetzung Caspase-1 abhängiger Zytokine aus PAI-2^{-/-} Knochenmarksmakrophagen. BMDM der angegebenen Genotypen wurden mit steigenden Mengen LPS (10, 100 und 1000 ng) für 24 h, oder mit konstanten Mengen (1000 ng) für unterschiedliche Zeiten stimuliert. Die Bestimmung der Zytokin-Konzentration erfolgte mittels ELISA (n.d., *not detected*, nicht detektiert)

3.5.2. PAI-2 Defizienz führt zu verstärkter Caspase-1 Aktivität

Zytoplasmatisch vorliegende Plasmid DNA wird durch AIM2 erkannt und induziert so die Bildung eines IL-1β prozessierenden Inflammasoms (Hornung et al., 2009). Inwieweit die TLR induzierte Aufregulation von PAI-2 regulierend auf die AIM2 vermittelte Aktivierung von Caspase-1 wirkt sollte der Vergleich von Wildtyp- und PAI-2 defizienten Makrophagen zeigen. Die Stimulation von Zellen mit dem TLR2 Agonisten P₂CSK₄ für unterschiedliche Zeitpunkte resultierte in der Aufregulation von PAI-2 in Wildtyp-Zellen. Den Einfluss des exprimierten Proteins auf die Aktivierbarkeit von Caspase-1 zeigte die durch die nachfolgende Transfektion endotoxinfreier Plasmid DNA vermittelte Aktivierung des AIM2 Inflammasoms. In den Überständen von wt Makrophagen waren im Vergleich zu PAI-2 defizienten BMDM deutlich geringere Mengen an aktivem IL-1β bei vergleichbaren zytoplasmatischen Expressionniveaus von proIL-1β nachweisbar. Dementsprechend war die Caspase-1 in Abwesenheit von PAI-2 nach längerer TLR Stimulation deutlich verstärkt. Ohne TLR Vorstimulation zeigten Zellen beider Genotypen vergleichbare Aktivierungen von Caspase-1. Ebenfalls keine Unterschiede fanden sich bezüglich der Expressionsniveaus der proCaspase-1.

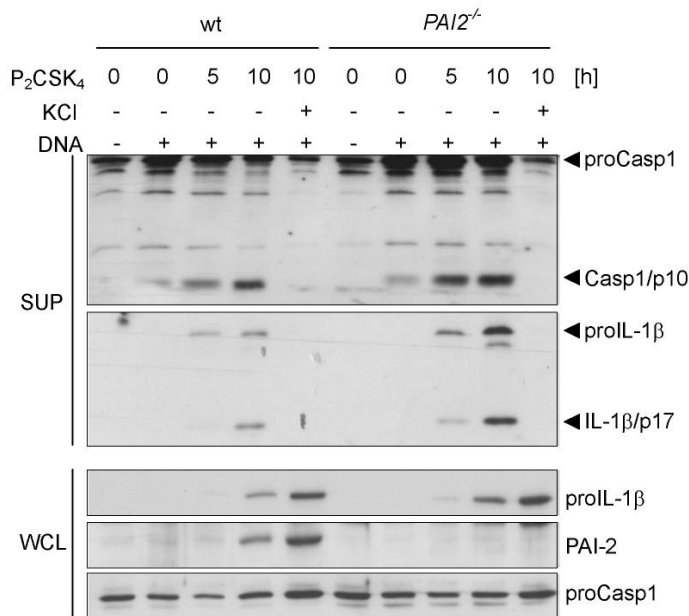


Abbildung 41: PAI-2 vermittelte Hemmung der AIM2 abhängigen Caspase-1 Aktivierung. BMDM der angegebenen Genotypen wurden für die angegebene mit TLR2 Ligand stimuliert. Falls angegeben erfolgte die Transfektion von 1 µg endotoxinfreier Plasmid-DNA 2 h vor Beendigung der Stimulation. Die Zugabe von KCl (100 mM) erfolgte zeitgleich mit der Transfektion von DNA. (SUP, supernatant, Überstand; WCL, whole cell lysate, Ganzzelllysate; proIL-1β, ungespaltenes IL-1β, p35.; IL-1β/p17, aktives IL-1β; proCasp1, ungespaltene Caspase-1; Casp1/p10, Caspase-1 Untereinheit p10)

3.5.3. Caspase-1 Abhängigkeit der IL-1β Sekretion in PAI-2 defizienten BMDM

Verschiedene Mechanismen sind für die Freisetzung von IL-1β verantwortlich. Neben Caspase-1 spaltet auch die zelltodassoziierte Caspase-8 IL-1β. Auch die Aufhebung der Zellintegrität durch apoptotische oder nekrotische Ereignisse kann zur Freisetzung von proIL-1β führen. Die auf LPS Stimulation verstärkte Freisetzung vom IL-1β in PAI-2 defizienten Zellen erfolgte jedoch abhängig von Caspase-1 wie die Verwendung des Caspase-1 spezifischen Inhibitors Ac-WEHD-CHO zeigt (Abbildung 42).

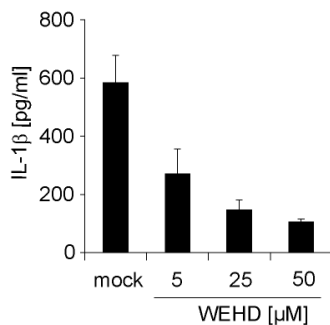


Abbildung 42: Caspase-1 vermittelt die PAI-2 abhängige Sekretion von IL-1β. PAI-2^{-/-} BMDM wurden mit 1 µg LPS für 24 h stimuliert. Die Zugabe von Caspase-1 spezifischem Inhibitor (WEHD) erfolgte in den angegebenen Mengen 1 h vor Stimulationsbeginn. Die Bestimmung der Zytokinkonzentration erfolgte mittels ELISA.

3.5.4. Erhöhter Serum IL-1β Spiegel in PAI2^{-/-} Mäusen nach LPS-Injektion

Wir validierten unsere *in vitro* erhobenen Befunde durch systemische Untersuchungen. PAI-2 defiziente Mäuse zeigten auf die intraperitoneale (i.p.) Injektion von Hochdosis LPS bereits nach 2 Stunden leicht erhöhtes IL-1β im Serum. Während Wildtyp Mäuse nur geringe Mengen an IL-

IL-1 β ins Serum abgaben, setzte der PAI-2 Knockout signifikant größere Mengen des proinflammatorischen Zytokins ins Serum frei. Die Gleichheit der Serum IL-6 Konzentrationen dokumentierte die Spezifität des PAI-2 Effektes (Abbildung 43).

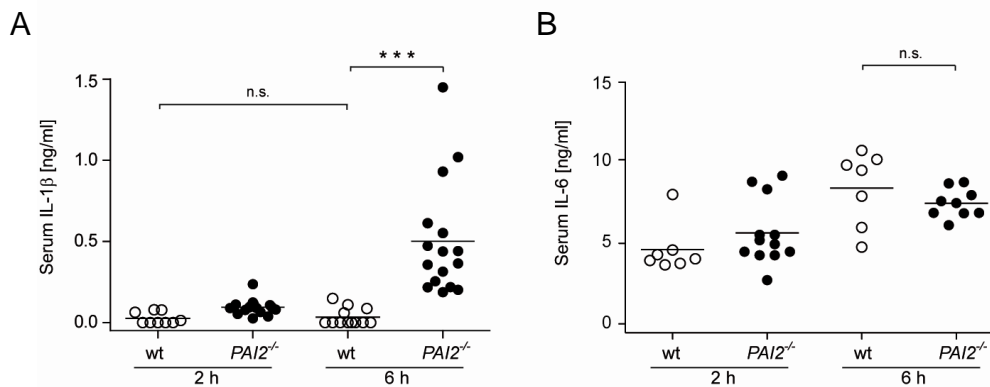


Abbildung 43: LPS induziertes Serum- IL-1 β aber nicht Serum-IL-6 PAI-2 abhängig reguliert. Mäuse der angegebenen Genotypen wurden intraperitoneal mit 40 mg/kg LPS (O111:B4) behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Serumproben genommen und mittels ELISA auf ihren (A) IL-1 β und (B) IL-6 Gehalt analysiert (n.s., nicht signifikant; ***, höchst signifikant, $p < 0,001$)

3.6. Der Mechanismus der PAI-2 vermittelten Inflammation-Inhibition

3.6.1. Selektive Interaktion von PAI-2 mit den NALPs 2 und 4

Wie zuvor beschrieben aktivierten PAI-2 defiziente Makrophagen verstärkt Caspase-1. Wir fragten nach dem Mechanismus der PAI-2 vermittelten Suppression der Caspase-1 Aktivität. Eine jüngere Publikation beschreibt die spezifische Unterdrückung des NALP1 Inflammasoms durch die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X_L (Bruey et al., 2007). Beide interagieren spezifisch mit NALP1 und unterdrücken so die Bindung des NLRs an das Adaptermolekül ASC. PAI-2 hat antiapoptotisches Potential und ähnelt strukturell Bcl-2. Konsequenterweise untersuchten wir PAI-2 auf seine potentielle Fähigkeit, wie Bcl-2 und Bcl-X_L, spezifisch an NALPs zu binden und so die Induktion des Inflammasoms zu unterbinden. Die Überexpression der NALPs 1-4 zusammen mit Flag-epitopmarkiertem PAI-2, sowie die nachfolgende Präzipitation zeigte, dass PAI-2 mit den NALPs 2 und 4, nicht jedoch, wie aufgrund der LPS Versuche vermutet, mit NALP3 interagiert (Abbildung 44).

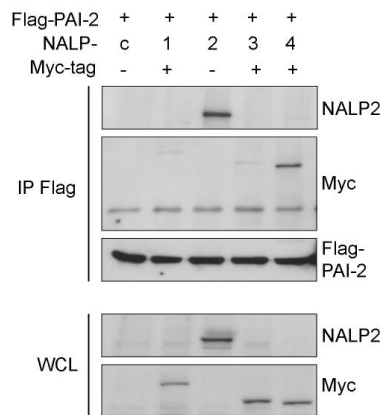


Abbildung 44: Selektive Interaktion von PAI-2 mit den NALPs 2 und 4. HEK 293 Zellen wurden transient mit den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert. Nach 60h erfolgte die Präzipitation des Flag-Epitop markiertem PAI-2 aus den Zelllysaten. Die Proteine wurden mittels Immunoblot nachgewiesen. Die Detektion von nicht-epitop-markiertem NALP2 erfolgte mittels spezifischem gegen NALP2 gerichteten polyklonalen Antiserum. (Myc-tag, Myc-Epitop markierte Proteine, c, *control*, Kontrolle; IP, Immuno-präzipitation; WCL, *whole cell lysate*, Ganzzelllysat; (-), nicht transfiziert; (+), transfiziert)

3.6.2. PAI-2 interagiert mit der ASC-Pyrin Domäne

Die Bildung eines NALP2 enthaltenden Inflammasoms ist beschrieben. Sein Ligand ist jedoch nicht bekannt. Die ATP vermittelte Inflammasom-Aktivierung auf LPS Vorbehandlung der Zellen ist abhängig von NALP3. Zudem zeigten unsere Versuche die Suppression eines weiteren Inflammasoms, namentlich des AIM2 Inflammasoms. Demnach interferiert PAI-2 mit der Funktion einer zentraleren, für alle bisher beschriebenen Inflammasome relevanten Komponente. Einen solchen Kandidaten stellt ASC, als Bindeglied zwischen NLR und Caspase-1, sowohl im NALP3-, als auch im AIM2 Inflammasom, dar. Mit der Ausnahme von NALP1 und IPAF sind alle Inflammasom-bildenden NALPs vollständig auf das Adaptermolekül ASC angewiesen. Diese Annahme bestätigte die Expression und Immunopräzipitation von PAI-2 zusammen mit ASC. Die Interaktion von PAI-2 und ASC wurde von der N-terminalen PYRIN- aber nicht von der C-terminalen CARD Domäne von ASC vermittelt (Abbildung 45).

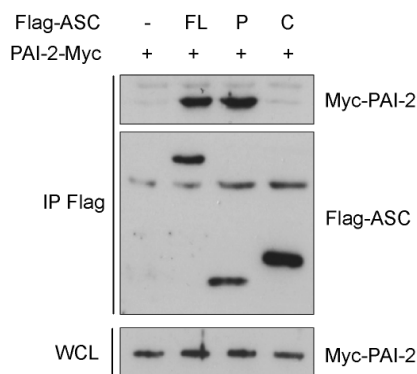


Abbildung 45: Interaktion von PAI-2 mit der Pyrimdomäne von ASC. Immunoblot von Immunopräzipitationen aus Lysaten von mit unterschiedlichen Plasmiden zur Expression von Deletionsmutanten von ASC (FL, full length, Volllängenprotein; P, Pyrin-Domäne; C, CARD-Domäne) transient transfizierten HEK 293 Zellen. (IP, Immunopräzipitation; WCL, *whole cell lysate*, Ganzzelllysat; (-), nicht transfiziert; (+), transfiziert)

3.6.3. ASC - PAI-2 Assoziation unterdrückt die Interaktion von NALP3 - ASC

Die Assemblierung des Inflammasoms erfolgt über homotypische Domänen-Interaktionen. Während NALPs über PYRIN-PYRIN Interaktionen an ASC binden, wird Caspase-1 über CARD-CARD Bindung rekrutiert. Inwieweit die Bindung von PAI-2 an die PYRIN-Domäne von ASC die Interaktion von NALP3 und ASC beeinflusst, wurde durch Co-Immunopräzipitation untersucht. Die Präzipitation von NALP3 mit ASC in Abwesenheit jedoch nicht in Anwesenheit von PAI-2 in HEK 293 Zellen zeigte die Konkurrenz von NALP3 und PAI-2 um die Bindung an ASC. (Abbildung 46).

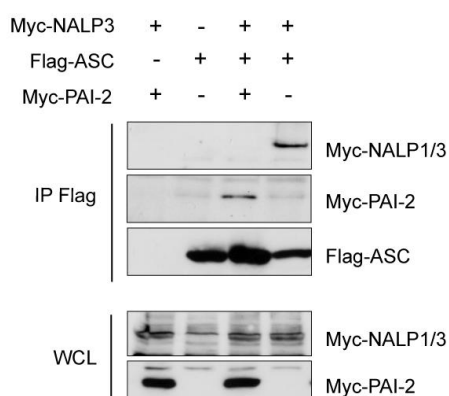


Abbildung 46: PAI-2 - ASC Interaktion unterdrückt die Assoziation von NALP3 und ASC. HEK 293 Zellen wurden transient mit Plasmiden zur Expression der angegebenen Expressionskonstrukte transfiziert und mittels Co-Immunopräzipitation auf Interaktion untersucht. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Immunoblot. (IP, Immunopräzipitation; WCL, *whole cell lysate*, Ganzzelllysat; (-), nicht transfiziert; (+), transfiziert)

Wir fragten, ob die Präsenz von PAI-2 die stimulationsbedingte Assoziation von NALP3 und ASC unterbinden könnte. Die klassische Aktivierung des Inflammasoms erfolgt auf die Stimulation mit einem TLR Liganden und die Zugabe von ATP. Die für Überexpressionsstudien verwendeten HEK 293 Zellen sind jedoch defizient für den ATP responsiven P2X7 Rezeptor. So wurde auf ein zellfreies Analysesystem zurückgegriffen. Lysate von THP-1 Zellen zeigten auf die Inkubation bei 30°C eine spontane Aggregation des Inflammasoms (Martinon et al., 2002). Wir übertrugen diesen Befund auf das Überexpressionsmodell in HEK 293 Zellen. Inflammasomkomponenten wurden deshalb separat exprimiert, die Zellen aufgeschlossen und die Extrakte kombiniert. Durch Inkubation bei 37°C und nachfolgender Co-Immunopräzipitation wurde die Assemblierung von ASC und NALP3 in An- und Abwesenheit von PAI-2 untersucht. Die Präzipitation von ASC zeigte die zeitabhängige Rekrutierung von NALP innerhalb von 3 Stunden (Abbildung 47). In Gegenwart von PAI-2 war keine Steigerung der Interaktion von ASC und NALP3 detektierbar.

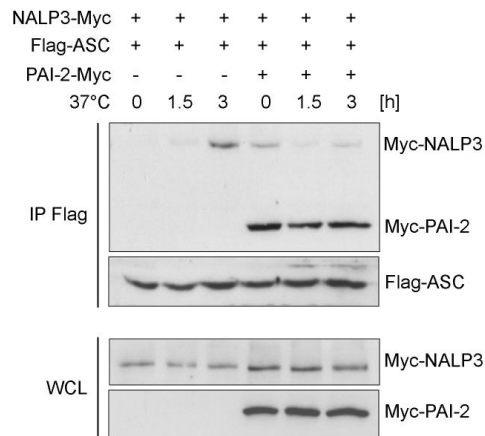


Abbildung 47: PAI-2 verhindert Assoziation von NALP3 und ASC. Lysate einzeln exprimierter Konstrukte wurden wie aufgeführt vereint und für die angegebenen Zeiten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zielproteine präzipitiert und mittels Immunoblot auf Interaktion analysiert (IP, Immunopräzipitation, WCL, *whole cell lysate*, Ganzzelllysate)

3.6.4. Die Koexpression von PAI-2 inhibiert dosisabhängig die Assoziation von ASC und NALP3

Die Ergebnisse der Caspase-Aktivierungsexperimente (Abbildung 41) zeigten, dass PAI-2 die Inflammasom-Aktivierung nicht irreversibel blockiert. Untersuchungen im zellfreien System zeigten auf Titration von PAI-2 enthaltendem Zelllysate die Reduktion der Interaktion von NALP3 und ASC. Umgekehrt führte die Koexpression von NALP3 bei Konstanthaltung der Mengen von PAI-2 und ASC zur Reduktion der Bindung von PAI-2 an ASC zu konstanten Mengen von PAI-2 und ASC zur Reduktion der Bindung von PAI-2 an ASC (Abbildung 48).

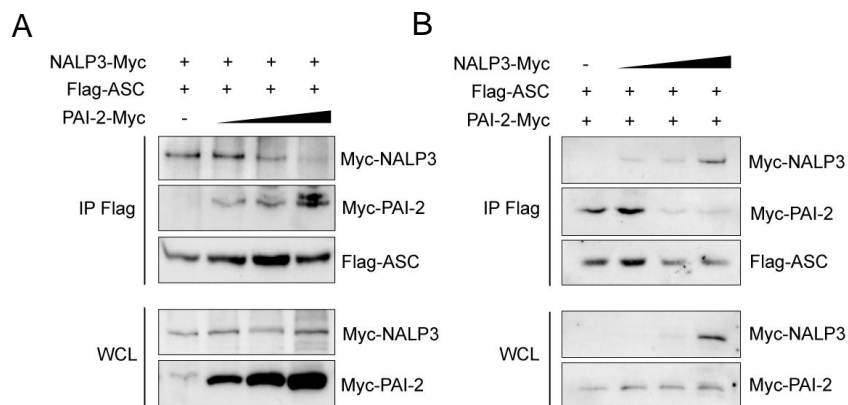


Abbildung 48: Kompetitive Interaktion von PAI-2 und NALP3 mit ASC. Analog zu Abbildung 41 wurden Lysate separat exprimierter Konstrukte wie angegeben vereint und vor der IP für 3 h bei 37°C inkubiert. Das Dreieck bezeichnet steigende Mengen des Expressionskonstruktes. Schwankungen im Gesamtvolumen wurden durch Lysispuffer angeglichen. Die Analyse der Zielproteine erfolgte mittels Immunoblot. (IP, Immunopräzipitation; WCL, *whole cell lysate*, Ganzzelllysate; (-), nicht transfiziert; (+), transfiziert)

3.6.5. Endogene Interaktion von PAI-2 und ASC

Die Überexpressionsstudien zeigten, erfolgt die PAI-2 abhängige Regulation der Caspase-1 Aktivität durch kompetitive Bindung des Serpins an ASC. PAI-2 inhibiert somit die Assoziation von NALP3 mit ASC als initiales Ereignis der Inflammasom-Aktivierung. Die durch Überexpression herbeigeführte der PAI-2 oder NALP3 Mengen könnte in Immunzellen durch eine verstärkte Aktivierung von NALP3 und/oder Expressionserhöhung beider Moleküle erreicht werden. Inwieweit die Interaktion von PAI-2 und ASC, sowie mögliche stimulative Effekte beeinflussend auf diese Interaktion wirken, wurde durch Präzipitation aus Makrophagen untersucht. Aufgrund der konstitutiven Expression von ASC auf hohem Niveau, sowie der über TLRs effektiv induzierbaren Aufregulation von PAI-2 verwendeten wir aus Knochenmark differenzierte Makrophagen. Die Präzipitation aus den Zellysaten vorstimulierter und teilweise mit ATP behandelter Zellen zeigte die konstitutive Interaktion von ASC und PAI-2 (Abbildung 49). Die Behandlung mit ATP für 30 Minuten führte zur deutlichen Reduktion der Assoziation der beiden Moleküle.

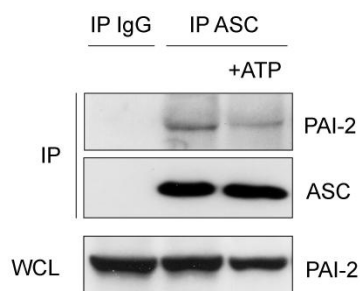


Abbildung 49: Interaktion von endogenem ASC und PAI-2 in Makrophagen. Co-Immunopräzipitation endogener Proteine aus für 12 h mit LPS (1 µg/ml) vorstimulierten und falls angegeben für die letzten 30 min vor Zellyse mit ATP (5mM) behandelten BMDM. Nach Stimulationsende wurden die Zellen in PBS gewaschen, mit Crosslinker DTBP für 1h inkubiert und folgend lysiert. Die Präzipitation der Proteine erfolgte unter Verwendung spezifischer gegen das Zielprotein gerichteter Antikörper. Als Kontrolle wurde ein unspezifischer Kontroll-Antikörper gleicher Spezies verwendet.

3.6.6. PAI-2 hemmt die Sekretion von ASC und NALP3 abhängig freigesetztem IL-1β im Überexpressionsmodell

PAI-2 defiziente Makrophagen zeigten die verstärkte Aktivierung von Caspase-1. Inwieweit nun die PAI-2 vermittelte Hemmung der Caspase-1 Aktivität auf der direkten Beeinflussung dieses Enzyms, oder aber auf der Regulation eines seine Aktivierung beeinflussenden Mechanismus beruht, war nicht bekannt. Potentiell denkbar wäre die direkte Hemmung der Cystein-Protease Caspase-1 durch den Serin-Protease-Inhibitor PAI-2. Versuche mit in HEK 293 Zellen überexprimierten Proteinen sollten Anhaltspunkte für das mechanistische Wirken von PAI-2 auf die Inflammasom abhängige Prozessierung und Freisetzung von IL-1β liefern.

Die Überexpression von Caspase-1 führt zur Autoaktivierung des Enzyms. Überexpression von Caspase-1 zusammen mit proIL-1β führte zur konstitutiven Prozessierung und Sekretion von IL-1β. Die zusätzliche Expression von ASC und NALP3 führte zur Verstärkung der Caspase-1

abhängigen Freisetzung von IL-1 β . Koexpression von PAI-2 reduzierte die durch Anwesenheit von ASC und NALP3 erhöhte Sekretion von IL-1 β . Die alleinig durch Caspase-1 Expression vermittelte IL-1 β Freisetzung zeigte sich unbeeinflusst durch parallele PAI-2 Transfektion. Die Expression von TRIF induziert Caspase-8 abhängig die Prozessierung von IL-1 β (Maelfait et al., 2008). Doch hatte die Expression von PAI-2 keinen Einfluss auf die Caspase-8 vermittelte Sekretion von IL-1 β (Abbildung 50).

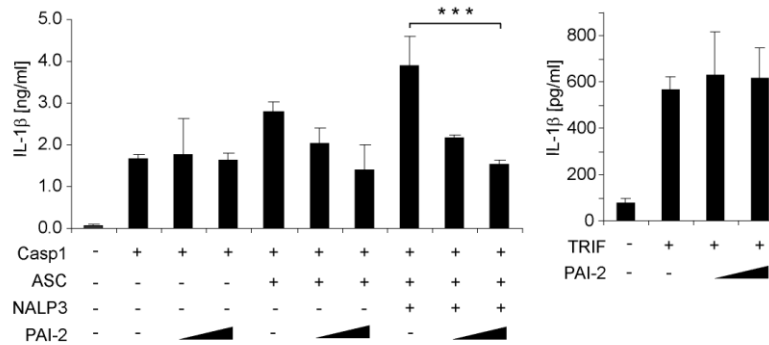


Abbildung 50: PAI-2 Expression hemmt ASC und NALP3 aber nicht Caspase-8 abhängige Sekretion von IL-1 β im Überexpressionsmodell. HEK 293 Zellen wurden mit IL-1 β Expressionsplasmid sowie den für die angegebenen Proteine codierenden Expressionsvektoren (Dreieck entspricht steigenden Mengen an PAI-2, 5 und 50 ng) transfiziert. 60 h nach Transfektion wurden die Überstände abgenommen und die Menge an freigesetztem IL-1 β mittels ELISA bestimmt ((-), nicht transfiziert; (+), transfiziert; ***, höchst signifikant, p < 0,001)

Analog zur Messung von freigesetztem IL-1 β aus den Überständen transfizierter Zellen, zeigte die Analyse von Zelllysaten, hinsichtlich der potentiell durch PAI-2 beeinflussten Prozessivität von Caspase-1, ebenfalls keinerlei Effekte des Serpins auf durch Überexpression aktivierte Caspase-1, wie die Detektion von aktivem IL-1 β zeigt (Abbildung 51).

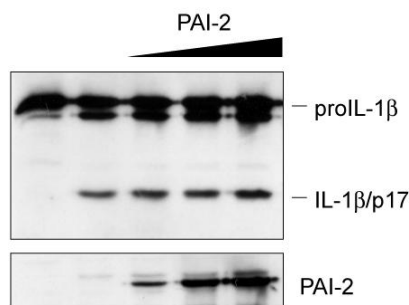


Abbildung 51: Keine direkte Beeinflussung von Caspase-1 Aktivität durch PAI-2. HEK 293 Zellen wurden mit IL-1 β sowie den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert (Dreieck bezeichnet steigende Konzentrationen von PAI-2(10, 50, 500 ng)). Die Detektion des prozessierten IL-1 β aus den Lysaten erfolgte mittels Immunoblot ((-), nicht transfiziert; (+), transfiziert)

4. Diskussion

4.1. Die Rolle von STAT3 in der TLR-vermittelten Signalkaskade

Signalmolekül-Rezeptor Interaktionen stellen das Starterereignis Rezeptor vermittelter Signalgebung dar. Nach aktuellem Kenntnisstand bilden dabei, in Bezug auf TLR, lediglich zwei TIR-enhaltende Adaptermoleküle, namentlich MyD88 und TRIF, die tragenden Säulen der durch Toll-like Rezeptor Stimulation initiierten Signalkaskaden (O'Neill und Bowie, 2003). Die durch die Stimulation der verschiedenen TLR-Rezeptoren induzierten Genexpressionsmuster sind jedoch sehr komplex und möglicherweise mit 2 Hauptmolekülen nicht vollständig erklärbar. Verantwortlich dafür ist, unter anderem, die durch die zentralen Adaptermoleküle vermittelte, selektive Rekrutierung weiterer Signalmoleküle. So führt die Aktivierung der endosomalen TLRs 7, 8 und 9, nicht aber die der oberflächenassoziierten TLRs 2 und 4, zur Rekrutierung und Bindung der IRFs (*interferon regulatory factors*) 1, 3, 5 und 7 an das Adaptermolekül MyD88 und folgend zur Expression von Typ-I Interferonen. Welcher Mechanismus letztendlich für diese Spezifität, unter Nutzung eines gemeinsamen Adaptermoleküls, verantwortlich ist, bleibt zu klären. Diskutiert wird eine Lokalisationsabhängigkeit der Rekrutierung spezifischer Signalgebungsmoleküle (Kagan et al., 2007).

So soll die Internalisierung von ligandaktiviertem TLR zur Rekrutierung des Signalmoleküls TRIF führen, während die Stimulation des zuvor noch an der Zelloberfläche assoziierten Rezeptors zur sofortigen Bindung von MyD88 führt. Inwieweit die für TLR4 gezeigten Befunde auch die selektive Rekrutierung der IRFs erklären könnten bleibt offen.

Eine weitere Möglichkeit der Induktion spezifischer Signalgebung könnte in der direkten Assoziation distinkter Signalmoleküle mit der TIR-Domäne einzelner Rezeptoren liegen. Trotz der allen TLRs gemeinen zytoplasmatischen TIR-Domäne, finden sich innerhalb dieser, als auch in den sie flankierenden Bereichen bisweilen deutliche strukturelle Unterschiede, die für die spezifischen Bindung bestimmter Adapter- oder Signalgebungsmoleküle verantwortlich sein können (Xu et al., 2000). Beispielhaft hierfür ist die auf TLR2 und 4 beschränkte Nutzung des TIR enthaltenden Verbrückungsmoleküls TIRAP, beziehungsweise das ausschließlich von TLR4 genutzte Adaptermolekül TRAM (Oshiumi et al., 2003).

Inwieweit andere, nicht TIR-Domänen haltige Moleküle durch direkte Bindung an die zytoplasmatischen Bereiche der Rezeptoren allgemein oder gar spezifische Signalübertragung induzieren könnten ist wenig bekannt. Lediglich für eine kleine Zahl konnte die direkte Assoziation mit dem Rezeptor, sowie weiterführende Einflussnahme auf die Signalgebung gezeigt werden. So

ist beispielsweise die ligandenabhängige Rekrutierung von PI3K an die zytoplasmatischen Domäne von TLR2 gezeigt (Arbibe et al., 2000). Kimura et al. beschreibt die Bindung von STAT5 an den aktivierten TLR4 und die daraus resultierende Beeinflussung der IL-6 Expression (Kimura et al., 2005).

4.1.1. Interaktion von STAT3 mit den intrazellulären Domänen von TLRs im Hefe-Zwei-Hybrid-System

Auf der Suche nach neuen, bisher unbekanntem mit der zytoplasmatischen Domäne des hTLR1 interagierenden Proteinen identifizierten wir mittels Hefe-Zwei-Hybrid Screen STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) als neuen TLRicd Bindungspartner. STAT3 ist ein essentieller Bestandteil der durch Zytokine und Wachstumsfaktoren induzierten Signalgebung. Die Bindung eines Zytokins an den korrespondierenden Zelloberflächenrezeptor und dessen darauffolgende Dimerisierung führt zur Aktivierung rezeptorassoziierter JAK (*janus kinases*) Tyrosin-Kinasen. Diese wiederum phosphorylieren spezifische Tyrosine innerhalb der zytoplasmatischen Bereiche des Rezeptors und ermöglichen so die Rekrutierung von STATs. Rezeptorgebundene STATs werden von JAKs aktiviert, dimerisieren und translozieren in den Zellkern, um dort, nach Bindung spezifischer Promotorsequenzen, Gentranskription zu induzieren. Das Ziel dieser Arbeit war die Verifizierung der mittels des Hefe-Zwei-Hybrid Screens gefundenen Interaktion zwischen der intrazellulären Domäne von hTLR1 und STAT3, sowie die die Aufklärung der Rolle dieses Transkriptionsfaktors in TLR vermittelter Signalübertragung.

Nach den in Abbildung 7 gezeigten Ergebnissen konnte die mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid cDNA Screens gefundene Interaktion zwischen STAT3 und hTLR1icd bestätigt werden. Des Weiteren erbrachten Hefe-Zwei-Hybrid gestützte Interaktionsanalysen Assoziationen von STAT3 mit den intrazellulären Domänen der TLRs 2, 4, 7, 8 und 10 (Abbildung 7). Keine Interaktion mit STAT3 zeigten hTLR3icd und hTLR9icd (Daten nicht gezeigt). Von einer Wertung dieses Ergebnisses wurde jedoch abgesehen, da beide Konstrukte trotz ordnungsgemäßer Expression bei Testung auf Assoziation mit ihren Prototyp-Interaktoren, MyD88 (TLR9) und TRIF (TLR3), kein Interaktionssignal zeigten. Ursächlich könnte hier eine durch Fehlfaltung des Proteins veränderte Tertiärstruktur und somit eine stark modifizierte bindungsinkompetente Oberfläche sein. Interessanterweise deuteten die Hefe-Zwei-Hybrid Befunde ebenfalls auf eine Interaktion des Adaptermoleküls MyD88 mit STAT3 hin (Abbildung 7). Sehr wahrscheinlich ist die Bindung von STAT3 an den zu den TIR-Domänen der Toll-like Rezeptoren homologen C-Terminus von MyD88 (Medzhitov et al., 1998).

Die Röntgenstrukturanalyse der cytoplasmatischen Domäne von TLR2 zeigt fünf sich wiederholende Abschnitte mit jeweils gleicher Organisation (Xu et al., 2000). Dabei ist je ein β -Faltblatt durch eine Schleifenregion mit einer folgenden α -Helix verbunden. Die sukzessive Deletion jeweils eines dieser fünf Module zeigte lediglich für das strukturell innenseitig liegende β^C - α^3 Fragment ein dem Wildtyp entsprechendes Bindungsverhalten mit STAT3 im Hefe-Zwei-Hybrid-System. Die Deletion jeweils eines der anderen Module (β^A - α^1 , β^B - α^2 , β^D - α^4 , β^E - α^5) führte nicht zur Unterbrechung der Interaktion (Abbildung 8). Verantwortlich hierfür könnte neben der Mutation der betreffenden Bindungsstelle die Relevanz der weiteren Bereiche bei der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der gesamten TIR-Domäne, beziehungsweise des interaktionsrelevanten Bereiches sein. So ist die in der BB-Schleife, dem Übergang zwischen dem β -Faltblatt und der α -Helix des zweiten Moduls (β^B - α^2), liegende Mutation Pro712His für eine Unterbrechung der TLR4 vermittelten MyD88 abhängigen Signalgebung in C3H/HEJ (LPS^d) Mäusen verantwortlich, was letztendlich zur Entdeckung von TLR4 als LPS Rezeptor führte. Diese spezielle BB-Schleife ragt aus der Oberfläche der TIR-Domäne von TLR2 heraus und bildet eine Interaktionsplattform für MyD88. Die Substitution des zur TLR4 Mutation homologen Prolins bei TLR2 zeigte bei Aufrechterhaltung der Gesamtstruktur keine Rekrutierung von MyD88. Mutationen in anderen Modulen zeigten sich ebenfalls als fatal für weitere Signalübertragung. So scheint das Glutamat an Position α^1 -13 für die Stabilisierung der BB-Schleife und somit für die Aufrechterhaltung der Adaptermolekülinteraktion zu sein (Xu et al., 2000; Schneider et al., 1991). Allgemein zeigen die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid Untersuchungen die Interaktion von STAT3 und der cytoplasmatischen TIR Domäne von TLR2 abhängig von einer strukturell intakten Bindungsoberfläche.

Welche Bereiche des STAT3 Proteins an der Interaktion mit der TIR-Domäne von TLR2 verantwortlich sein könnten, wurde durch gezielte Deletion der einzelnen, funktionell unterschiedlichen, Regionen des Transkriptionsfaktors analysiert. Sowohl ein um die α -helikalen „Coiled-Coil“ als auch ein um die C-terminale Transaktivierungsdomäne verkürztes STAT3 Proteinkonstrukt zeigten im Hefe-Zwei-Hybrid keine Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne von TLR2. Unverändert im Vergleich zum Wildtyp zeigen sich die um die Interaktions-, Binde-, beziehungsweise SH2 Domäne verkürzten Moleküle. Im Gegensatz zu der bei Zytokin-vermittelter Signalübertragung erfolgenden Interaktion der SH2 Domäne von STAT3 mit einem phosphorylierten Tyrosin des Rezeptors, scheint die Interaktion mit der TIR-Domäne des TLR2 SH2- unabhängig zu erfolgen. Inwieweit die STAT3 Transaktivierungsdomäne direkt an der Assoziation mit dem TLR beteiligt ist, oder aber der durch Phosphorylierung determinierte Aktivierungsstatus des Transkriptionsfaktors das Bindungsverhalten regulieren könnte, konnte durch Hefe-Zwei-Hybrid Analysen nicht adressiert werden.

4.1.2. Ligandeninduzierte Interaktion von TLR2, TLR3 und TLR4 mit STAT3

Der Transfer der nukleär via Hefe-Zwei-Hybrid erhobenen Befunde auf die zytoplasmatische Ebene zeigte im Überexpressionsmodell die ligandenabhängige und transiente Interaktion von STAT3 mit den TLRs 2, 3 und 4 (Abbildung 9). Die zu beobachtende Interaktion vollzog sich in einem kurzen Zeitfenster nach Stimulation des jeweiligen Rezeptors. Während bereits nach 7,5 Minuten die Assoziation der beiden Proteine nachweisbar war, dissoziierten beide Moleküle nach 15 Minuten wieder auseinander.

Ein vergleichbares Bild lieferte die Kopräzipitation endogener Proteine aus RAW 264.7 Makrophagen mit überexprimiertem MyD88 (Abbildung 23). Die schwache konstitutive Assoziation beider Moleküle im Überexpressionsmodell, sowie die auf Stimulation rasch erfolgende Rekrutierung von STAT3 an den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors lassen auf eine hochspezifische, aktivitätsregulierte Interaktion schließen. Klassische STAT3-Rezeptorbindung erfolgt durch Assoziation mit spezifischen, durch Janus Kinasen (JAK) phosphorylierten, Tyrosinen im zytoplasmatischen Teil von Zytokinrezeptoren (Greenlund et al., 1995). Denkbar wäre ein vergleichbarer Mechanismus bei der Assoziation des STAT-Moleküls mit den TLR-TIR Domänen. So wurde für TLR2 und -4 die stimulusabhängige Phosphorylierung spezifischer Tyrosin-Reste beschrieben (Arbibe et al., 2000; Medvedev et al., 2007). Diese bewegten sich in einem, zur hier von uns beschriebenen Interaktion von STAT3 mit TLRicd, analogen Zeitfenster. Für TLR4 wurde zudem die Interaktion mit JAK2 und folgend mit STAT5 gezeigt (Kimura et al., 2005). Inwieweit diese Kinase auch mit den intrazellulären Domänen weiterer TLRs assoziiert, bleibt zu klären.

Ebenso bleibt die Frage nach der Abhängigkeit der Rekrutierung von STAT3 von phosphorylierten Tyrosinen innerhalb der zytoplasmatischen TIR-Domänen offen. Die Substitution der bisherig in TLR vermittelte Signalgebung implizierten Tyrosin-Reste zeigte im Überexpressionsmodell keinen Einfluss auf die Interaktion von STAT3 und TLR2 (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin möglich ist die dem Modell für die Rekrutierung von MyD88 folgende Assoziation aufgrund von Rezeptordimerisierung. Die vorassembliert vorliegenden Rezeptormonomere dimerisieren auf Ligandenbindung, um die räumlich angenäherten TIR-Domänen nach Konformationsänderung eine neue Interaktionsfläche bilden zu lassen (Latz et al., 2007; Xu et al., 2000). Welche stimulationsvermittelte Modifikation am Rezeptor letztendlich zur Rekrutierung und Bindung von STAT3 führt, muss noch gezeigt werden.

4.1.3. STAT3 Interaktion mit dem Adaptermolekül MyD88

Wie aus den Hefe-Zwei-Hybrid Untersuchungen hervorging, interagierte STAT3 nicht ausschließlich mit den zytoplasmatischen Domänen der TLRs, sondern auch mit dem Adaptermolekül MyD88 (Abbildung 7). Um auszuschließen, dass die detektierte Assoziation zwischen aktiviertem TLR und STAT3 weniger auf einer direkten Interaktion der beiden Moleküle, vielmehr aber auf der Bindung von STAT3 an MyD88 beruht, letzteres somit als Brückenglied fungiert, wurde die stimulationsbedingte Assoziation von STAT3 an TLR in Abwesenheit von MyD88 untersucht. Die Co-Immunopräzipitation überexprimierter TLR2 und STAT3 aus transient transfizierten MyD88 defizienten MEF-Zellen unterschied sich nicht von jener in zu Wildtyp Zellen hinsichtlich der Rekrutierung von STAT3 an den aktivierten Rezeptor nach 7,5 Minuten Stimulation. Die Synchronität der Rezeptorbindung auch in Abwesenheit des Adaptermoleküls unterstützte unsere Interpretation der direkten Wechselwirkung zwischen STAT3 und der zytoplasmatischen Domäne der TLRs.

Unseren Ergebnissen der Hefe-Zwei-Hybrid Untersuchungen zufolge interagierte STAT3 mit dem Adapterprotein MyD88. Die Überexpression der beiden Proteine zeigte die konstitutive Bindung von STAT3 an MyD88 (Abbildung 11). Die Expression von MyD88 führt, hervorgerufen durch spontane Dimerisierung des Proteins zur Autoaktivierung stromabwärts gelegener Signalereignisse (Medzhitov et al., 1998). In ähnlicher Weise könnte in diesem Fall die artifizielle Expression des Adaptermoleküls einen Zustand eines TLR aktivierten Umfeldes und somit eine verbesserte Rekrutierungsatmosphäre für STAT3 geschaffen haben. Trotz der konstitutiven Bindung erfuhr die Interaktion zwischen STAT3 und MyD88 nach TLR spezifischer Stimulation für 20 Minuten eine substantielle Signalverstärkung. Auffallend ist die, im Vergleich zur Interaktion mit den TLRicds, zeitlich verzögerte Assoziation von MyD88 und STAT3. In Korrelation mit den vorausgegangenen Assoziationsexperimenten zwischen TLRicd und STAT3 ist ein Modell denkbar in welchem STAT3 an den aktivierten Rezeptor bindet und im weiteren Stimulationsverlauf auf das ebenfalls rekrutierte Adaptermolekül überspringt. Dieses möglicherweise aufgrund der verbesserten durch aktiviertes MyD88 gebotenen Interaktionsplattform.

Um diejenige Domäne von MyD88 zu identifizieren, die für die Assoziation mit dem Transkriptionsfaktor verantwortlich ist, wurden durch Deletion verkürzte MyD88-Moleküle verwendet. Überraschenderweise hob wechselseitige Deletion der beiden funktional zu unterscheidenden Bereiche des MyD88 Proteins die Interaktion von STAT3 nicht auf. Demnach ist sowohl die N-terminale Todesdomäne (*DD, death domain*), als auch die C-terminale TIR-Domäne in die Interaktion mit STAT3 involviert (Abbildung 11).

4.1.4. TLR Stimulation vermittelt STAT3 Serin-Phosphorylierung

Die Aktivierung von STAT3 erfolgt dem aktuellen Kenntnisstand zufolge einzig durch spezifische Phosphorylierung eines, in der C-terminalen Transaktivierungsdomäne gelegenen, Tyrosins (Y)705 (Becker et al., 1998, Chen et al., 1998). Eine zusätzliche Phosphorylierung eines Serins an Aminosäureposition 727 verstärkt lediglich die Aktivität von Phospho-Tyrosin STAT3.

Unseren Befunden zufolge führte die TLR2 spezifische Stimulation von murinen Knochenmarksmakrophagen „lediglich“ zur raschen Serin-Phosphorylierung von STAT3. Die für eine Aktivierung als relevant angesehene Tyrosin-Phosphorylierung war zu keinem Zeitpunkt detektierbar (Abbildung 12). Das Auftreten der STAT3 Serin-Phosphorylierung erfolgte zeitlich parallel zur Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 innerhalb von 10 min. Das mit fortschreitender Stimulationsdauer rückläufige Phosphorylierungssignal ist möglicherweise auf direkte Dephosphorylierung durch spezifische Phosphatasen zurückführbar. Dementsprechende Effekte hatte die Aktivierung von TLR4.

Die TLR-induzierte Zytokinexpression und Sekretion führt auch über autokrine Schleifen zur Beeinflussung primär zytokinvermittelter Signalgebung. So erfolgt die Aktivierung von STAT3 beispielsweise abhängig von TLR induziertem IL-10 etwa 2 Stunden nach TLR Stimulation (Benkhart et al., 2000). Die Blockade der *de novo* Proteinsynthese durch Verwendung des Translationshemmers Cycloheximid beeinflusste die TLR4 vermittelte Serin-Phosphorylierung von STAT3 nicht (Abbildung 13). Wie schon der frühe Zeitpunkt der Aktivierung vermuten ließ, erfolgte die TLR abhängige Aktivierung von STAT3 demzufolge unabhängig von sekundär vermittelten Signalen.

Auch die spezifische Stimulation der TLRs 3, 5, 7 und 9 induzierte Serin-Phosphorylierung von STAT3 in Abhängigkeit von den zentralen, durch den jeweiligen Rezeptor rekrutierten, Adaptermolekülen (Abbildung 14). Es war lediglich die TLR3 induzierte STAT3 Serin-Phosphorylierung - wie auch die Induktion von MAP-Kinasen-abhängig von TRIF (Yamamoto et al., 2003). Das von allen anderen TLR in ihre Signaltransduktion eingebundene MyD88 (Medzhitov et al., 1998; Kawai et al., 1999) war essentiell für die Aktivierung von MAP-Kinasen, aber auch für die Serin-Phosphorylierung von STAT3. Lediglich die über den TRIF abhängigen Weg signalgebenden TLR3 und TLR4 aktivierten STAT3 in MyD88 defizienten Zellen. Der über beide Adaptermoleküle, MyD88 und TRIF, signalisierende TLR4 zeigte in Makrophagen beider Einzelknockout-Genotypen lediglich leicht reduzierte STAT3 Serin-Phosphorylierung sowie MAP-Kinasen Aktivierung. In Abwesenheit beider Moleküle induzierte LPS weder STAT3 Serin-, noch MAP-Kinasen Phosphorylierung (Daten nicht gezeigt).

Eine frühere Studie von Huang et al., 2001 impliziert IRAK1 als potentielle Serin-Kinase von STAT3. Gezeigt wurde, neben der nukleären Interaktion von IRAK1 und STAT3, die LPS abhängige Induktion der STAT3 Serin727-Phosphorylierung, allerdings frühestens eine Stunde

nach Stimulation. Die von uns beobachtete TLR induzierte Serin-Phosphorylierung erfolgte unabhängig von dieser Serin/Threonin Kinase (Abbildung 14).

IRAK4 ist ein elementarer Bestandteil TLR vermittelter Signalgebung. Es zeigten sich IRAK4 defiziente Mäuse resistent gegenüber der Applikation lethaler Mengen LPS (Suzuki et al. 2002). Dementsprechend phosphorylierten IRAK4 defiziente Knochenmarksmakrophagen lediglich auf Stimulation mit LPS und auch lediglich schwach STAT3-Serin und MAP-Kinasen. Die Stimulation von TLR2, 3, 5, 7 und 9 führte weder zur Aktivierung der stromabwärts gelegenen MAP-Kinasen, noch zur Serin-Phosphorylierung von STAT3. Entgegen bestehender Veröffentlichungen bezüglich der Interferenz zwischen STAT3 Tyrosin-Phosphorylierung und Serin-Phosphorylierung (Chung et al., 1997) erfolgten in unserem Fall beide Ereignisse unabhängig voneinander, wie die sequentielle Induktion der Tyrosin-Phosphorylierung durch IFN- γ und die TLR abhängige Phosphorylierung des Serins727 zeigte (Abbildung 15).

4.1.5. mTOR ist die TLR getriebene STAT3 Serin-Kinase

Nach Ausschluss von IRAK1 als potentielle STAT3 Serin-Kinase in der TLR Signalkaskade und Gruppierung der potentiellen Kandidaten stromabwärts von IRAK4 suchten wir nach der für TLR induzierte STAT3 Serin-Phosphorylierung relevanten Kinase. Abhängig vom zellulären Kontext, sowie vom stimulativen Agens wird, Berichten zufolge, die Serin727-Phosphorylierung von STAT3 durch eine Vielzahl verschiedener Kinasen katalysiert. Neben PKC δ (Protein kinase C δ) (Jain et al., 1999) wurden p38 MAPK (Turkson et al., 1999), JNK (Lim and Cao, 1999) und MEK/ERK (Chung et al., 1997) als Serin-Kinasen von STAT3 beschrieben. Die spezifische Blockade von MEK1 und der nachfolgenden ERK1/2 Kinase resultierte in der Hemmung der TLR2 vermittelten STAT3 Serin-Phosphorylierung, jedoch auch in der Suppression der Phosphorylierung von p70/S6K, einem Zielmolekül der Serin/Threonin Kinase mTOR (Abbildung 16).

Als Effekt der Stimulation mit CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) wurde die mTOR abhängige Serin-Phosphorylierung von STAT3 beschrieben (Yokogami et al., 2000). Neuere Studien beschreiben die Beteiligung von mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) an TLR vermittelter Signalgebung (Cao et al., 2008; Schmitz et al., 2008; Weichhart et al., 2008). Die Regulation der mTOR Aktivierung erfolgt über einen Proteinkomplex bestehend aus TSC1 und TSC2 (*tuberous sclerosis complex*). Dieser an sich inhibitorisch auf die mTOR aktivierende GTPase Rheb wirkende Komplex integriert über multiple Phosphorylierungsstellen eine Vielzahl aktivierender und inhibierender Signale. Wir konnten zeigen, dass die Blockade von MEK1 und somit auch von ERK1/2 gleichsam zur Aktivierung des TSC-Komplexes und letztendlich zur Suppression der ligandeninduzierten mTOR Aktivität führt (Schmitz et al., 2008).

Die Blockade von mTOR durch den spezifischen Inhibitor Rapamycin resultierte in einer deutlichen Hemmung der TLR vermittelten STAT3 Serin-Phosphorylierung (Abbildung 17). Analog dazu resultierte die Blockade des mTOR über PI3Kinase und AKT aktivierenden Signalweges (Ohtani et al., 2008) in der Unterdrückung von Serin727-STAT3 Phosphorylierung. Die Aktivierung eines konstitutiv exprimierten und mit Tamoxifen aktivierbaren AKT führte zu einer vernachlässigbaren Phosphorylierung von STAT3 (Abbildung 18). Erst die Kombination aus AKT Induktion und TLR Stimulation verstärkte deutlich sowohl die STAT3 Serin-Phosphorylierung als auch die Aktivierung des mTOR Substrates p70/S6K. Demnach bedarf es der Integration mehrerer auf den TSC Komplex inhibitorisch wirkender Signale, um die Aktivierung von mTOR zu induzieren. Hierbei wäre sowohl eine kumulative Wirkung der einzelnen Signale als auch die Aktivität erst nach Induktion aller regulatorischen Phosphorylierungsstellen des TSC Komplexes denkbar.

Als eine weitere TSC1 phosphorylierende und somit den TSC Komplex negativ regulierende Kinase wurde die I κ B-Kinase β (IKK β) beschrieben (Lee et al., 2007). Sowohl die pharmakologische Blockade von IKK β als auch dessen genetische Depletion resultierten in verminderter TLR abhängiger STAT3 Phosphorylierung (Abbildung 19). Die in IKK β defizienten Knochenmarksmakrophagen nur unvollständige Hemmung der STAT3 Serin- und p70/S6K Phosphorylierung deuten mehr auf eine lediglich regulierende, weniger auf eine determinierende Wirkung von IKK β bei TLR vermittelter mTOR Aktivierung hin. Denkbar wäre auch die nur unvollständige Deletion des IKK β Gens im induzierten Knockout. So zeigten IKK β Inhibitor-behandelte Zellen deutlichere Effekte (Abbildung 19).

4.1.6. Die mTOR vermittelte Serin-Phosphorylierung von STAT3 induziert die Dissoziation von STAT3 aus dem MyD88 Komplex

Die Interaktion von mTOR mit dem Adaptermolekül MyD88 wurde kürzlich von uns beschrieben (Schmitz et al., 2008). Die zeitliche Synchronität der zuvor gezeigten Interaktion von STAT3 mit MyD88 (Abbildung 11) als auch die Induktion der STAT3 Serin-Phosphorylierung (Abbildung 12) ließen uns nach der unmittelbaren Abhängigkeit der Serin-Phosphorylierung von STAT3 und der Interaktion mit MyD88 fragen.

Die Interaktion von MyD88 und STAT3 zeigte sich unbeeinflusst von der Koexpression der durch mTOR induzierten p70/S6K (Abbildung 24). Die Präsenz von funktionalem mTOR hingegen führte zur Reduktion der Bindung von STAT3 an das Adaptermolekül. Die möglicherweise auf die kompetitive Blockade der STAT3 Bindungsstelle durch mTOR zurückzuführende Reduktion der Assoziation von STAT3 und MyD88 wurde durch Expression einer die Interaktion stabilisierenden weil Kinase-inaktiven Form von mTOR ausgeschlossen (Abbildung 21). Weder Kinase-aktive,

noch -inaktive p70/S6K beeinflussten die durch mTOR hervorgerufenen Effekte. Dieser Befund deutet auf die fehlende Beteiligung stromabwärts von mTOR gelegener Kinasen hin.

HEK 293 Zellen zeigten auf TLR Stimulation lediglich eine schwache Aktivierung von mTOR (Abbildung 20). Die Transfektion steigender Mengen von mTOR Expressionsplasmid resultierte in einer dosisabhängigen Zunahme der Serin-Phosphorylierung von STAT3. Inwieweit diese verstärkte Aktivierung von STAT3 das Interaktionsverhalten von STAT3 beeinflusst, zeigten Interaktionsstudien mit phosphorylierungsdefizienten STAT3 Konstrukten in An- und Abwesenheit von koexprimiertem mTOR. Die Interaktion der S727A Mutante von STAT3 war unbeeinflusst von der Expression von aktivem mTOR. Sowohl Wildtyp als auch die Y705F Mutante von STAT3 hingegen dissoziierten in Anwesenheit von aktivem mTOR vom Interaktionspartner MyD88. Die Koexpression von Kinase-inaktivem mTOR führte zu einer Verstärkung der Interaktion. Die Möglichkeit der sterischen Blockade der STAT3 Bindungsstelle an MyD88 konnte somit ausgeschlossen werden. Unsere Befunde stützend führte die Koexpression von TSC2 zur Umkehrung der mTOR vermittelten Dissoziation von MyD88 und STAT3 (Abbildung 22). Zusammenfassend deuten die erhaltenen Befunde auf die, durch mTOR induzierte, Serin-Phosphorylierung von STAT3 als Dissoziationssignal vom Interaktionspartner MyD88 hin.

4.1.7. mTOR interagiert mit dem MyD88 Signalkomplex

Dem von uns vorgeschlagenen Modell entsprechend, führt die Rekrutierung von mTOR an einen aus MyD88 und STAT3 bestehenden Komplex zur Aktivierung des mTOR Substrates STAT3, welches auf seine Serin-Phosphorylierung hin den Komplex verlässt. Neben der von uns beschriebenen Interaktion zwischen mTOR und MyD88 wurde eine Assoziation zwischen der Kinase und ihrem Substrat STAT3 gezeigt (Yokogai et al., 2000). Untermauert wird unser Modell von der in Abbildung 23 gezeigten TLR-Stimulus abhängigen Assoziation von mTOR und STAT3, zeitlich korrelierend mit der Interaktion von STAT3 und MyD88 (Abbildung 11). Die Präzipitation von epitopmarkiertem MyD88 aus TLR2 spezifisch stimulierten RAW264.7 Makrophagen zeigte sowohl die synchrone Kopräzipitation von mTOR als auch von STAT3 mit MyD88. Dies stützte unsere Vermutung eines Komplexes aus MyD88, STAT3 und mTOR.

4.1.8. TLR aktiviertes STAT3 akkumuliert im Zellkern

An seinem Tyrosin phosphoryliertes STAT3 bildet Homo- und Heterodimere und transloziert in den Zellkern (Reich und Liu, 2006). Als einziges Mitglied der Familie der STAT Transkriptionsfaktoren kann STAT3 auch ohne entsprechendes Aktivierungssignal zwischen Zytoplasma und Kernmilieu wechseln. Als zugrunde liegender Mechanismus wird die Existenz

einer unkonventionellen NLS (*nuclear localisation site*) und die daran erfolgende Assoziation mit Importin $\alpha 3$ beschrieben (Liu et al., 2005).

TLR Stimulation führte zur Akkumulation von STAT3 im Zellkern bereits nach 45 Minuten Stimulation, somit unabhängig von Tyrosin-Phosphorylierung (Abbildung 25). Die vergleichend durchgeführte, Tyrosin-Phosphorylierung induzierende, IL-6 Behandlung resultierte ebenfalls in einer verstärkten Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern.

Die TLR-Stimulus vermittelte nukleäre Akkumulation von STAT3 erfolgte abhängig von der Serin-Phosphorylierung von STAT3 was die Transfektion von RAW 264.7 Makrophagen mit der Gal4 DNA Bindedomäne fusionierten STAT3 Mutanten zeigt. Sowohl die Substitution der Serin-Phosphorylierungsstelle durch Alanin, als auch die pharmakologische Hemmung der Serin-Phosphorylierung von STAT3 führten zur deutlichen Reduktion der TLR2 vermittelten STAT3 Kerngängigkeit (Abbildung 26). Ein vergleichbares Bild hatte die Aktivierung von Zellen, die Fluoreszenzprotein gekoppeltes STAT3 exprimierten und deren isolierte Zellkerne untersucht wurden. Isolierte Zellkerne von LPS stimulierten RAW264.7 Makrophagen wiesen ein verstärktes Fluoreszenzsignal im Vergleich zu unstimulierten, beziehungsweise zu zusätzlich mit Inhibitor behandelten Zellen auf.

Welcher Mechanismus letztendlich zur verstärkten Präsenz von TLR aktiviertem STAT3 im Zellkern führt, bleibt offen. Denkbar wäre, analog zur Tyrosin-Phosphorylierung, die Bildung von Homo- beziehungsweise Heterodimeren mit anderen Mitgliedern der STAT Familie und die folgende aktive Translokation in den Zellkern (Reich und Liu, 2006). Auch Interaktionen von STAT3 mit anderen Transkriptionsfaktoren wie z.B. IRF1 und der NF- κ B Untereinheit p65 wurden beschrieben. Wenngleich die Bildung von transkriptionsaktivierenden Komplexen aus Serin-phosphoryliertem STAT und p65 nicht ausgeschlossen werden konnte, erfolgte die TLR induzierte Kerntranslokation von STAT3 unabhängig von p65 (Daten nicht gezeigt). Abweichend von der aktiven Translokation von STAT3 in den Zellkern wäre auch ein passiver Mechanismus denkbar, der weniger den Kernimport beschleunigt, jedoch durch Hemmung des Exports, möglicherweise durch Interaktion mit nukleären Proteinen, zur Akkumulation von STAT3 im Kern beiträgt. Für Serin-phosphoryliertes STAT1 ist die Interaktion mit DNA bindenden Molekülen wie CBP und p300 beschrieben (Varinou et al., 2003). Als einziges STAT Molekül über ein latentes Kernlokalisierungssignal verfügend würde Serin-phosphoryliertes STAT3, vergleichbar dem unphosphorylierten Molekül, demzufolge in den Zellkern transportiert und dort durch Bindung immobilisiert.

4.1.9. Die TLR induzierte PAI-2 Expression ist abhängig von STAT3-Ser727

Die durch Stimulation hervorgerufene nukleäre Translokation von STAT3 und die folgende Bindung spezifischer DNA-Bindungsmotive innerhalb der Promotoren distinkter Gene führt zur Initiation transkriptioneller Ereignisse (Reich und Liu, 2006).

Die aus vergleichenden Genexpressionsanalysen zwischen Wildtyp und STAT3 defizienten Makrophagen hervorgegangenen Befunde zeigten, dass die Stimulation mit dem TLR2 Agonist P₃CSK₄ zu lediglich schwacher Expression von PAI-2 (*Plasminogen Activator Inhibitors 2*) in STAT3 defizienten Zellen, bei gleichwohl starker Aufregulation der *PAI2* mRNA in Wildtyp-Zellen bereits nach 60 min (Abbildung 27). Eine vergleichbare Vitalität und Responsivität der untersuchten Zellen repräsentiert das identische Expressionsniveau der *TNF α* mRNA. Aus unseren Microarray-Daten und der RT-PCR ging hervor, dass STAT3 unmittelbar an der TLR abhängigen Aufregulation lediglich einer eng begrenzten Anzahl von Genen beteiligt war. Die Blockade des von uns für STAT3 Serin-Phosphorylierung als relevant postulierten MEK1-ERK1/2 Signalweges (Abbildung 16) führte, analog zum Phänotyp der STAT3 defizienten Knochenmarksmakrophagen, zur deutlich verminderten Transkription von *PAI2* (Abbildung 27). Die Gleichheit der beiden Befunde inhibitorbehandelter und defizienter Zellen und lässt auf die Beteiligung von Serin-phosphoryliertem STAT3 an TLR vermittelten Signaltransduktionsereignissen schließen.

Unterstützt wurde diese Hypothese durch die Präzipitation von DNA-STAT3 Komplexen aus TLR2 stimulierten RAW264.7 Makrophagen. Die spezifische Präzipitation von STAT3 Phosphorylierungsmutanten zeigte die von der Serin-Phosphorylierungsstelle abhängige Interaktion des STAT3 Proteins mit der Kernsequenz des *PAI2*-Promotors (Abbildung 29). Sowohl das Wildtyp- als auch das an Position 705 mutierte Protein assoziierte mit dem Promotor. Die Hemmung der TLR abhängigen STAT3 Serin-Phosphorylierung durch direkte (Rapamycin), oder indirekte Blockade (PD 98059) der mTOR-Aktivierung führte ebenso zur Aufhebung der durch TLR2 vermittelten *PAI2* Promotorbindung des STAT3 Proteins wie die Mutation des Serins an Aminosäureposition 727 (Abbildung 29). Die Blockade der, für die Interaktion der p65 Untereinheit des NF- κ B Transkriptionsfaktors mit dem *PAI2*-Promotor essentiellen, p38 MAPK (Park et al., 2005) wie auch die spezifische Hemmung der Janus Kinase 2 (JAK2) zeigte keinerlei Beeinträchtigung der Bindungsfähigkeit von TLR2 aktiviertem STAT3 an den *PAI2*-Promotor. Die genregulatorischen Eigenschaften der STAT gebundenen Promotorsequenz wurden durch Reporteranalysen belegt. Die Koexpression eines konstitutiv aktiven TLR4-Konstruktes führte zur mTOR abhängigen Aktivierung eines unter der Kontrolle der *PAI2*-Promotor Kernsequenz befindlichen Reportergens (Abbildung 30). Die sukzessive Titration steigender Mengen der inhibierend mit dem mTOR Signalweg interferierenden Proteine TSC2 und Kinase inaktivem mTOR resultierten in der konzentrationsabhängigen Reduktion der Reporteraktivität. Die Expression von Wildtyp-STAT3 führte zur Verstärkung der *PAI2*-Promotor abhängigen

Reportergentranskription in TLR2 spezifisch stimulierten RAW264.7 Makrophagen (Abbildung 30). Die Transfektion der S727A-Mutante von STAT3 zeigte keinerlei verstärkende Effekte. Die Untersuchungen im Reportermodell lassen auf die von der Serin-Phosphorylierung von STAT3 abhängige Aktivierung der untersuchten *PAI2*-Promotorsequenz schließen und stützen somit die durch ChIP-Experimente erhobenen Befunde (Abbildung 29).

PAI-2 gilt als eines der in Monozyten und Makrophagen auf TLR Aktivierung hin am Stärksten aufregulierten Proteine (Kruithof et al., 1995; Medcalf et al., 2005). Seine Induktion ist für Stimulation mit LPS, aber auch mit TNF α oder PMA gezeigt. Die Stimulation von Knochenmarksmakrophagen mit Agonisten für TLR2, 3 und 4 resultierte in der Aufregulation von monomerem PAI-2 nach 8 h Stimulation. Die Stimulation des zytoplasmatisch lokalisierten NOD2-Rezeptors mit MDP (*muramyl dipeptid*) führte zwar zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2, nicht jedoch zur Induktion der PAI-2-Expression, beziehungsweise wie zuvor gezeigt zur Serin-Phosphorylierung von STAT3 (Abbildung 28).

Die Abwesenheit von STAT3 Expression führte auf TLR2 Stimulation hin ebenso zu verminderter Aufregulation zytoplasmatischen PAI-2s, wie die pharmakologische Hemmung der für STAT3 Serin-Phosphorylierung relevanten Signaltransduktionsereignisse (Abbildung 28). Demzufolge resultierte die Blockade der MEK1 abhängigen Aktivierung von ERK1/2 wie auch die Inhibition des TLR abhängig induzierten mTOR Signalweges über PI3K und AKT in einer stark verminderten Expression von PAI-2. Die Zellviabilität und Responsivität war unbeeinträchtigt, wassich in der Expressions der pro-Form des Zytokins IL-1 β ausdrückte. Zusammenfassend untermauern die Befunde der STAT3 defizienten Zellen, wie auch die Inhibition der für STAT3-Serin-Phosphorylierung relevanten Kinasen die Rolle des Serin-phosphorylierten Transkriptionsfaktors in TLR vermittelter Genexpression

4.1.10. Erhöhung der Caspase-1 Aktivität durch STAT3 Defizienz

PAI-2 wird als Mitglied der Ovalbumin Unterfamilie der Serin Protease Inhibitoren eingeordnet (Remold-O'Donnel., 1993). Neben seiner klassischen Funktion als sekretierter Inhibitor des Plasminogen Aktivators uPA (Plasminogen Aktivator Urokinase Typ), ist die Rolle des vorwiegend zytoplasmatisch vorliegenden Proteins weitestgehend unbekannt. So ist aufgrund seiner strukturellen Homologien zu Bcl-2 seine Rolle als antiapoptotisches Protein impliziert, die dezidierten Mechanismen sind jedoch ungeklärt (Park et al., 2005). Greten et al., 2007 zeigten dass die Überexpression von PAI-2 die Apoptoseeigung IKK β defizienter Makrophagen reduziert. Wie vorausgehende Studien belegten, führte IKK β Defizienz zur Hemmung der PAI-2 Expression (Park et al., 2005). Greten korrelierte die verstärkte Apoptoseinduktion in IKK β defiziente Zellen mit der ebenfalls auf LPS Stimulation zu verzeichnenden Aktivierung der Caspase-1.

Wir fragten, ob die verminderte PAI-2 Expression in STAT3 defizienten Zellen in ähnlicher Weise zur LPS vermittelten Aktivierung der Caspase-1 führt. Als zytoplasmatische Cystein-Protease wird es durch die Bildung eines intrazellulären Signalkomplexes, dem Inflammasom, induziert. Aktivierte Caspase-1 prozessiert die zytoplasmatisch vorliegenden und durch TLR Stimulation induzierten Pro-Formen der Zytokine IL-1 β , IL-18 und IL-33. Die durch Spaltung gereiften Zytokine werden aus der Zelle geschleust.

Die Stimulation von STAT3 defizienten Knochenmarksmakrophagen mit TLR4 Agonist resultierte in der im Vergleich zu Wildtyp-Zellen deutlich verstärkten Sekretion von IL-1 β nach 16 h Stimulation (Abbildung 31). Die Sekretion des Zytokins IL-1 α war gleichfalls erhöht. Es zählt zwar nicht zu den Caspase-1 Substraten, jedoch ist sowohl seine Interaktion mit Caspase-1, als auch die von dessen Aktivität abhängige Sekretion gezeigt (Keller et al., 2008). Die erhöhte Freisetzung der beiden genannten Zytokine ließ auf die in STAT3 defiziente Zellen verstärkte Aktivität der Caspase-1 schließen. Ein möglicher Beitrag zur Freisetzung unprozessierter Zytokine z.B. die strukturelle Desintegration der Zellen durch nekrotische Ereignisse, konnten durch Messung der sich im Zellüberstand befindlichen Lactat Dehydrogenase (LDH) ausgeschlossen werden. Die Überstände von Wildtyp und Knockout Zellen enthielten vergleichbare Mengen von LDH (Abbildung 31).

Die Kurzzeitstimulation mit TLR Liganden führt nicht zur Induktion des Inflammasoms. Erst die zusätzliche Behandlung der Zellen mit hohen Mengen von ATP resultiert in der NALP3 abhängigen Induktion der Caspase-1 (Kanneganti et al., 2005). Postuliert wird die durch Bildung ATP-abhängiger Pannexin Kanäle vermittelte Diffusion der betreffenden Liganden in die Zelle, sowie deren direkte zytoplasmatische Erkennung durch NALPs, beziehungsweise Inflammasom-assoziierte Mustererkennungsrezeptoren. Der ursprünglichen Annahme entgegenstehend scheint die Aktivierung des Inflammasoms jedoch nicht unabhängig von der Stimulation eines TLRs zu erfolgen. Vielmehr deuten unsere Befunde auf einen Synergismus aus Aktivierung eines TLRs und der Aktivierung des entsprechenden Inflammasoms hin. Die Bildung des durch Erkennung zytoplasmatischer DNA aktivierten AIM2 Inflammasoms und die daraus resultierende Aktivierung der Caspase-1 wurden jüngst beschrieben (Hornung et al., 2009).

Den allgemeinen Inflammasom-Aktivierungs-Modellen entsprechend, zeigte die vergleichende Analyse von Wildtyp und STAT3 defizienten Makrophagen nach Vorstimulation mit LPS für 3 oder 6 h und Induktion des AIM2-, beziehungsweise des NALP3 Inflammasoms die Verstärkung der Freisetzung von IL-1 β im Knockout (Abbildung 32). Die erst mit längerer LPS Vorstimulation auftretenden deutlichen Unterschiede lassen sich durch die fortgeschrittene Expression von PAI-2 und damit die verstärkte Suppression der Caspase-1 Aktivität in wt-Zellen erklären.

Die spezifische Blockade von Caspase-1 führte zur Hemmung der LPS induzierten Freisetzung von IL-1 β sowohl in Wildtyp, als auch in STAT3 defizienten Zellen (Abbildung 33). Die durch

Verwendung des pan-Caspase Inhibitors zVAD weiter reduzierte Sekretion des Zytokins lässt eventuell auf die Beteiligung weiterer Proteasen bei der durch LPS vermittelten Prozessierung und Sekretion schließen. Denkbar wäre eine Beteiligung der TRIF abhängig induzierten Caspase-8 (Maelfait et al., 2008). Inwieweit diese tatsächlich an der LPS vermittelten verstärkten IL-1 β Freisetzung im STAT3 Knockout beteiligt ist, bleibt zu klären. Die Blockade allgemeiner Serin-Protease Aktivität führte ebenfalls zur deutlichen Reduktion des freigesetzten IL-1 β . Möglicherweise ist die antiapoptotische Wirkung des verwendeten Inhibitors verantwortlich für die Hemmung der IL-1 β Sekretion. So wäre analog zu den von Greten angebotenen Erklärungen die Induktion der STAT3 abhängigen Caspase-1 über pro-apoptotische Prozesse denkbar. Aufgrund seines breiten Wirkspektrums ist jedoch bei der Interpretation von Effekten dieses Inhibitors kritische Reflexion geboten. Die Hemmung des für die Aktivierung des NALP1 und NALP3 Inflammasoms essentiellen Ausstroms von Kalium Ionen (Pétrilli et al., 2007) resultierte in der völligen Unterdrückung LPS induzierter IL-1 β Sekretion.

Pelegrin beschreibt die Caspase-1 unabhängige Freisetzung des unprozessierten IL-1 β aus RAW264.7 Makrophagen, sowie folgend dessen Spaltung durch extrazelluläre Proteasen (Pelegrin et al., 2008). Die Blockade dieses atypischen Sekretionswegs durch Glycin zeigte keine Auswirkung auf die, durch LPS induzierte IL-1 β Ausschüttung aus Knochenmarksmakrophagen (Abbildung 33) und lässt somit auf die ausschließliche Präsenz Caspase-1 prozessierten Form von IL-1 β im Überstand schließen. Bestätigt wurde dies durch die direkte Detektion der p17 Untereinheit von IL-1 β mittels Immunoblot (Abbildung 34). Konform zu den ELISA Befunden führte eine Langzeitstimulation von STAT3 defizienten Knochenmarksmakrophagen mit LPS zur deutlich verstärkten Sekretion von aktivem IL-1 β . Korrelierend mit der Freisetzung des prozessierten Zytokins enthielten Überstände von STAT3 defizienten Zellen im Vergleich zu Wildtyp Makrophagen deutlich erhöhte Mengen der aktiven Caspase-1 Untereinheit p10. Die vergleichende Analyse der untersuchten Genotypen zeigte keine Unterschiede hinsichtlich der Expressionsniveaus der zytoplasmatisch vorliegenden proCaspase-1. Die für STAT3^Δ Makrophagen erhöhte Expression der Pro-Form des Zytokins IL-1 β ist auf die Blockade autokrin vermittelter Signalwege zurückzuführen. So stellt STAT3 die Kernkomponente der, durch das immunsuppressiv wirkende Zytokin IL-10 induzierten, Signalkaskade dar (Lang et al., 2002). Unsere Vermutung bestätigend, wiesen TLR stimulierte IL-10^{-/-} Knochenmarksmakrophagen im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich verstärkte Expression von proIL-1 β auf (Abbildung 36). Auch die ATP abhängige Aktivierung des NALP3 Inflammasoms nach Vorstimulation der Makrophagen mit LPS zeigte, wie schon die Befunde aus den ELISA Experimenten, sowohl die verstärkte Sekretion von bioaktivem IL-1 β als auch der Caspase-1 Untereinheit p10 aus STAT3 defizienten Knochenmarksmakrophagen. Die Aktivierung erfolgte abhängig von dem für Inflammasom aktivierung als essentiell beschriebenen Kalium Ausstrom (Extrazelluläres Kalium

hemmt Freisetzung). Die Expression der zytoplasmatischen Pro-Formen beider Moleküle fand in Zellen beider Genotypen auf einem vergleichbaren Niveau statt (Abbildung 34). Ebenso wie STAT3 Defizienz resultierte die Applikation der die STAT3 Serin-Phosphorylierung inhibierenden und somit die Expression von PAI-2 suprimierenden Substanzen PD98059 und Rapamycin in einer gesteigerten, ATP vermittelbaren Freisetzung von IL-1 β . Die zytoplasmatischen Expressionsniveaus des untersuchten Proteins waren weitestgehend unbeeinflusst von der Inhibitorgabe (Abbildung 35).

Zusammenfassend zeigen unsere Befunde die in STAT3 defizienten Knochenmarksmakrophagen verstärkte Aktivierbarkeit inflammasomabhängiger Caspase-1. Die erhöhte Aktivität zeigte sich sowohl infolge der NALP3, beziehungsweise der AIM2 abhängigen Inflammasomaktivierung LPS geprimter Zellen, als auch als Resultat der Langzeitstimulation mit TLR4 Ligand *per se*. Für die Stimulation mit LPS beobachteten wir für STAT3 $^{\Delta}$ und PAI2 $^{-/-}$ wie Greten für IKK β defiziente Makrophagen verstärkte Freisetzung von IL-1 β (Greten et al., 2007). Inwiefern die von ihm für IKK β defiziente Makrophagen beschriebene und von uns ebenfalls für STAT3 $^{\Delta}$ Makrophagen beobachtete Apoptoseneigung (nicht gezeigt) zur Aktivierung des Inflammasoms führt, oder diese eventuell erst durch Caspase-1 vermittelt wird, bleibt zu klären. Hierzu sind weiterführende, die Apoptoseinduktion betreffende Untersuchungen erforderlich. Inwieweit dieser Punkt durch die Applikation spezifischer Caspase Inhibitoren adressierbar ist, bleibt auf Grund der eingeschränkten Selektivität der zur Verfügung stehenden inhibitorischen Substanzen fraglich. Denkbar wäre die gezielte Hemmung der Caspase-1 Aktivität, gefolgt von der analytischen Betrachtung der Apoptoserate in STAT3 defizienten Makrophagen.

4.1.11. Die TLR abhängige Aufregulation von PAI-2 erfolgt unabhängig von der STAT3 Tyrosin-Phosphorylierung

Eine Reihe jüngerer Studien beschreibt die mTOR abhängige Transkription des Gens des Zytokins IL-10 (Ohtani et al., 2008, Weichhardt et al., 2008, Schmitz et al., 2008). Als antiinflammatorisches Zytokin greift IL-10 regulierend in die durch TLR Stimulation initiierte Genexpression ein (Lang et al., 2002). Dementsprechend wurde im Kontext TLR abhängiger mTOR Aktivierung die IL-10 vermittelte Reduktion der IL-12 Expression gezeigt (Ohtani et al., 2008).

Die von der autokrin vermittelten Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3 unabhängige Aufregulation von PAI-2 zeigte die Applikation des pan-Jak Inhibitors Pyridon P6 (Abbildung 36). Die spezifische Hemmung der JAK (Janus Kinasen) -Aktivität führte zur Hemmung der LPS abhängigen STAT3 Tyrosin-Phosphorylierung beginnend zwei Stunden nach Stimulation. Die unmittelbar durch TLRs induzierte Serin-Phosphorylierung von STAT3 zeigte sich unbeeinflusst

von der Inhibitorbehandlung (Daten nicht gezeigt). Ebenso unverändert verhielt sich die Aufregulation von PAI2 und proIL-1 β (Abbildung 36).

Die vergleichende Stimulation von Wildtyp und IL-10 defizienten Knochenmarksmakrophagen mit TLR4 Ligand resultierte in der synchronen und somit IL-10 unabhängigen Expression von PAI-2. Gemäß der immunsuppressiven Wirkung von IL-10 zeigte der Knockout deutlich erhöhte Expression von proIL-1 β . Interessanterweise führte bereits die alleinige Abwesenheit von IL-10 zur Unterdrückung jeglicher, durch TLR Stimulation vermittelter, autokrin induzierter, STAT3 Tyrosin- Phosphorylierung. Das ebenfalls auf TLR Stimulation sekretierte und STAT3 Aktivierung induzierende IL-6 scheint in diesem Modell keinerlei Einfluss auf die Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3 auszuüben. Die durch IL-10 Defizienz zu verzeichnende Blockade der STAT3 Tyrosin-Phosphorylierung bei gleichzeitig unverändertem PAI-2 Signal steht im Einklang mit den zuvor beschriebenen Befunden der Abhängigkeit der PAI-2 Expression von STAT3 Serin-Phosphorylierung, nicht jedoch von der Phosphorylierung des Tyrosins.

4.1.12. Die Punktmutation von STAT3 S727A resultiert in erhöhter Freisetzung von IL-1 β

Zwei regulierende Phosphorylierungen sind für STAT3 beschrieben: die allgemein als Aktivierungssignal geltende Phosphorylierung des Tyrosins 705, sowie die Phosphorylierung des Serins 727.

Unsere Ergebnisse zeigen die Beteiligung von Serin phosphoryliertem STAT3 an der TLR induzierten Aufregulation von PAI-2. Jedoch beruhen die bisher in dieser Arbeit aufgezeigten Korrelationen zwischen STAT3 Aktivitäten und einer neuen Funktion von PAI-2 auf der Untersuchung STAT3 defizienter Zellen, also einem System in welchem auch die allgemein als essentiell beschriebene Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3 nicht stattfindet. Zur Darstellung der Bedeutung der TLR vermittelten STAT3 Serin-Phosphorylierung wurden STAT3 defiziente Makrophagen durch retrovirale Transduktion mit Serin-mutiertem STAT3 rekonstituiert und folgend hinsichtlich ihrer IL-1 β Sekretion untersucht. Lediglich die Transfektion des Wildtyp STAT3 Konstruktes führte zur Reduktion der Freisetzung von IL-1 β auf ein demjenigen in Wildtyp Makrophagen entsprechendes Niveau, nicht jedoch die Expression der Serin-Mutante S727A STAT3 (Abbildung 37). Die Expression und Funktionalität der Konstrukte, sowie die Vitalität der Zellen wurde mittels Immunoblot verifiziert (Abbildung 37). Unsere diesbezüglichen Befunde untermauern die von uns postulierte Bedeutung der TLR vermittelten STAT3 Serin-Phosphorylierung für die Regulation von Caspase-1 und konsequenterweise die Kontrolle der Prozessierung und Sekretion von IL-1 β .

4.1.13. Die Überexpression von PAI-2 revertiert den IL-1 β Phänotyp STAT3 defizienter Zellen

Die von uns aufgezeigte vermehrte IL-1 β Prozessierung und Sekretion STAT3 defizienter Makrophagen gleicht dem für IKK β Makrophagen beschriebenen Phänotyp (Greten et al., 2007). Inwieweit die verminderte Expression des über mTOR und STAT3 induzierten PAI-2 für die verstärkte Caspase-1 Aktivität verantwortlich ist, zeigte die Überexpression von PAI-2 in STAT3 defizienten Knochenmarksmakrophagen. Die Transfektion von PAI-2 Expressionsvektor führte ebenso wie die Rekonstitution mit Wildtyp STAT3 zu einer signifikanten Reduktion der LPS induzierten IL-1 β Freisetzung (Abbildung 38). Wie PAI-2 mechanistisch auf die Aktivierung von Caspase-1 und letztendlich die Freisetzung von IL-1 β wirkt bleibt zu klären. Denkbar wäre seine Funktion als antiapoptotisches Protein und somit die Unterdrückung der durch Apoptose induzierten Caspase-1 (Park et al., 2005; Greten et al., 2007), aber auch eine direkte Einflussnahme als Serin-Protease-Inhibitor auf Inflammasom-regulierende Prozesse. Unser Modell der PAI-2 vermittelten Regulation der Caspase-1 Aktivität wird unter 4.3. illustriert.

4.1.14. Zytoplasmatische PRRs induzieren nicht die Serin-Phosphorylierung von STAT3

Die Stimulation von TLRs führte, über die Aktivierung von mTOR, zur schnellen und transienten Serin-Phosphorylierung von STAT3 (Abbildung 38). Inwieweit andere PRRs ebenfalls in der Lage sind, STAT3 Serin-Phosphorylierung zu induzieren, untersuchten wir durch spezifische Stimulationen von RIG-I und MDA5, beziehungsweise von NOD2.

Die Stimulation der zytoplasmatisch lokalisierten RLRs (*RIG-I like Rezeptors*) RIG-I und MDA5 mit dem dsRNA Analogon poly(I:C) resultierte sowohl in der Aktivierung von ERK1/2, als auch von NF- κ B, nicht jedoch in der Serin-Phosphorylierung von STAT3 (Abbildung 38). Die Phosphorylierung von p70/S6K deutete interessanterweise auf die RLR abhängige Aktivierung von mTOR hin. Im Gegensatz zur TLR getriebenen, durch mTOR vollzogenen STAT3 Serin-Phosphorylierung, führte die RLR induzierte Aktivierung von mTOR nicht zur Aktivierung von STAT3-S727. Als Erklärung denkbar ist die Kopplung der mTOR vermittelten STAT3 Serin-Phosphorylierung an membrangebundene Signalkomplexe oder aber die Notwendigkeit eines bindungsstabilisierenden Adapterproteins wie MyD88 im Fall der TLR (siehe 3.1.). Analog zur RLR Stimulation resultierte die MDP abhängige Aktivierung von NOD2 in der Induktion der MAP-Kinasen ERK1/2, nicht jedoch in der Serin-Phosphorylierung von STAT3. Zusammenfassend waren die zytoplasmatischen Mustererkennungsrezeptoren nicht in der Lage, STAT3 Serin-Phosphorylierung zu induzieren. Inwiefern diese auf TLRs beschränkt, oder aber über weitere membrangebundene PRRs wie Dectin-1 vermittelt werden kann, bleibt zu klären.

4.2. Die Rolle von PAI-2 bei der Suppression von Caspase-1 Aktivierung

4.2.1. PAI-2 Defizienz korreliert mit verstärkter IL-1 β Sekretion

Die bisher für intrazelluläres PAI-2 postulierten Funktionen beschränken sich weitgehend sowohl auf Überexpressionsexperimente, als auch auf die Verwendung der PAI-2 defizienten humanen Monozytenzelllinie THP-1 (Yu et al., 2001). So führte die Expression von funktionellem PAI-2 in THP-1 Zellen zu verminderter Zellproliferation, reduzierter DNA Synthese und phänotypischen Veränderungen aufgrund PMA induzierter Zelldifferenzierung (Yu et al., 2001). Untersuchungen von *PAI2*^{-/-} Mäusen zeigten bisher keine signifikanten Phänotypen hinsichtlich Fertilität, Wachstum oder Infektionsabwehr (Dougherty et al., 1999).

Die von uns durchgeführte Stimulation von PAI-2 defizienten Knochenmarksmakrophagen resultierte in der sowohl konzentrations- als auch zeitabhängigen, im Vergleich zu Wildtyp Zellen deutlich verstärkten, Freisetzung des durch Caspase-1 prozessierten und sekretierten IL-1 β , sowie des durch Caspase-1 sekretierten IL-1 α (Keller, et al., 2008) (Abbildung 40). Die vergleichende Analyse der Caspase-1 unabhängigen IL-6 Sekretion zeigte keine Unterschiede zwischen *PAI2*^{-/-} und Wildtyp Makrophagen. Gemäß der sich abzeichnenden Rolle in der Freisetzung spezifischer Zytokine und analog zu unseren Befunden für LPS stimulierte STAT3 defiziente Zellen (Abbildung 31) erfolgte die LPS induzierte Sekretion von IL-1 β abhängig von Caspase-1 (Abbildung 42). Welcher Mechanismus der Aktivierung der Caspase-1 zugrunde liegt, bleibt zu klären. Denkbar wäre die Diffusion des Liganden LPS in die Zelle und die direkte Aktivierung des für LPS Erkennung beschriebenen NALP3 Inflammasoms (Kanneganti et al., 2005) oder die durch Apoptose vermittelte Aktivierung der Caspase-1 (Greten et al., 2007). Neuere Studien beschreiben weiterhin die durch LPS induzierte, TRIF abhängige Aktivierung von Caspase-1 über ROS (*reactive oxygen species*) (Saitoh et al., 2008).

Die Vorstimulation sowohl von Wildtyp als auch von PAI-2 defizienten Knochenmarksmakrophagen mit TLR2 Ligand, sowie die nachfolgende Aktivierung des AIM2 abhängigen Inflammasoms resultierte in der Aktivierung von Caspase-1. Dabei zeigten *PAI2*^{-/-} Makrophagen mit fortschreitender Stimulationsdauer eine im Vergleich zu Wildtypzellen deutlich verstärkte Aktivierung von Caspase-1, als auch eine deutlich erhöhte Sekretion von prozessierten IL-1 β (Abbildung 41). Die Koinzidenz von aus im Wildtyp induzierter PAI-2 Expression und der im Vergleich zu PAI-2 Defizienz verminderten Detektion aktiver Caspase-1 unterstützten die von

uns postulierte Funktion von PAI-2 als regulatorisches Element der IL-1 β Prozessierungsmaschinerie.

Analog zu unseren *in vitro* Befunden waren in *PAI2*^{-/-} Mäusen auf intraperitoneale Applikation von LPS hin im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen die IL-1 β Serumkonzentrationen deutlich erhöht (Abbildung 43). Die IL-6 Werte zeigten sich dagegen unbeeinflusst von *PAI2*^{-/-} Defizienz.

Eine auf Überaktivierung basierende Dysregulation des Immunsystems kann zu sepsisartiger Symptomatik und letztendlich zum Tod des Wirtes führen (Cohen et al, 2002). Verantwortlich dafür ist die exzessive Ausschüttung verschiedenster Entzündungsmediatoren, unter anderem IL-1 β (Dinarello, 2009). Im Gegensatz zu den ursprünglich publizierten Befunden (Dougherty et al., 1999) zeigten *PAI2*^{-/-} Mäuse in unseren Händen eine deutlich erhöhte Suszeptibilität gegenüber LPS-induziertem septischem Schock (Daten nicht gezeigt). Bereits 36 Stunden nach LPS Applikation lag die Mortalität von *PAI2*^{-/-} Mäusen bei 100%. Inwieweit dieser Effekt alleinig auf der massiven Freisetzung von IL-1 β beruht, muss noch geklärt werden. Erste vorläufige Befunde mit IL-1R (Rezeptor) Antagonist Anakinra behandelte *PAI2*^{-/-} Mäuse zeigten deren erhöhte Resistenz gegenüber dem, anderenfalls letalen LPS Schock (Daten nicht gezeigt). Analog zu den *PAI2*^{-/-} Mäusen und somit unserer Vermutung der mTOR abhängigen Regulation von PAI2 entsprechend zeigten sich Rapamycin behandelte Mäuse in signifikantem Maß suszeptibler gegenüber Endotoxin-vermitteltem Schock (Schmitz et al., 2008).

Die Diskrepanz zwischen der von Dougherty et al. beschriebenen, unveränderten Endotoxinresponsivität *PAI2* defizienter Mäuse und unseren Befunden ist prinzipiell auf verschiedene Faktoren zurückzuführen. Zum Einen unterschied sich die Menge des injizierten Endotoxins um das vierfache. So orientierte sich die von uns applizierte Dosis an beschriebenen Mengen (Schmitz et al. 2008) als auch an der Überlebensfähigkeit der Wildtyp-Tiere. Die von Dougherty verwendeten Mengen hätten aus unserer Sicht lediglich bei einer massiven Überaktivierung des Immunsystems, wie beispielsweise bei Defizienz der als immunsupprimierend beschriebenen Moleküle STAT3 und IL-10, zu akutem Schock geführt. Des Weiteren zeigt die vergleichende Analyse unterschiedlicher Mausstämme charakteristische Unterschiede hinsichtlich der Responsivität auf verschiedenste immunologisch relevante Stimuli. So erfolgten die Versuche prinzipiell mit Mäusen desselben genetischen Hintergrundes, jedoch erfolgten die ersten Versuche noch relativ früh nach Rückkreuzung aus dem für die Einführung des Knockouts verwendeten SV129 Mausstamms. Erst die von uns verwendeten Mäuse befanden sich nach 13 facher Rückkreuzung auf einem reinen C57/BL6 Hintergrund.

Weiterhin denkbar wäre auch die durch Haltung unter unterschiedlichen Keimbelastungen hervorgerufene unterschiedliche immunologische Prägung der Mäuse der LPS exponierten Mäuse.

4.2.2. PAI-2 Bindung an ASC blockiert die Bildung des Inflammasoms

Wie aus unseren Befunden hervorgeht und wie von Greten et al. postuliert führt die Abwesenheit von PAI-2 zu verstärkter Aktivierung von Caspase-1. Welcher Mechanismus dieser PAI-2 vermittelten Caspase-1 Hemmung zugrunde liegt ist bisher unbekannt. Diskutiert wird die Hemmung der Caspase-1 induzierenden Apoptoseneigung (Greten et al., 2007). Denkbar wäre jedoch auch die, auf die Funktion als Proteaseinhibitor zurückführbare, direkte Blockade der Cystein-Protease Caspase-1.

Für das antiapoptotische und zu PAI-2 homologe Bcl-2 ist die Interaktion mit NALP1 und die daraus resultierende Regulation der NALP1 abhängig induzierten Caspase-1 gezeigt (Bruey et al., 2007). Interaktionsstudien zeigten die Assoziation von PAI-2 mit NALP2 und NALP4, nicht jedoch mit NALP1 und NALP3 (Abbildung 44). Sowohl für NALP2, als auch für NALP4 ist die Bildung eines Inflammasoms bestehend aus ASC und Caspase-1 beschrieben, induzierende Agonisten jedoch nicht bekannt (Martinon et al., 2009). Unsere Versuche zeigen sowohl die PAI-2 abhängige Suppression der ATP vermittelten Aktivierung des NALP3 Inflammasoms, als auch die durch zytoplasmatische DNA hervorgerufene Aktivierung von AIM2 (Kanneganti et al., 2005; Hornung et al., 2009; Dostert et al., 2008). Inwieweit die Langzeitstimulation mit LPS ebenfalls zur Aktivierung des NALP3 Inflammasoms führt, ist noch offen.

Ein essentieller Bindungspartner der oben angesprochenen bekannten Inflammasom-Komplexbildner, NALP3 und AIM2, ist das bidirektionale Adaptermolekül ASC. Als zentrales Element nahezu aller bekannten Inflammasome, mit Einschränkungen für IPAF und NALP1 (Martinon et al., 2009) vermittelt ASC die Assoziation von NALP und der Effektorprotease Caspase-1 (Martinon et al., 2002; Agostini et al., 2004). PAI-2 interagiert mit dem Adapterprotein ASC (Abbildung 45). Zusätzlich führte die Transfektion erhöhter Mengen PAI-2 zur verminderten Rekrutierung von NALP3 an ASC (Abbildung 46). Die Inkubation von Zelllysaten resultiert in der spontanen Assoziation des Inflammasoms (Martinon et al., 2002, Bruey et al., 2007). Die Interaktion von PAI-2 mit ASC unterdrückte eine inkubationsbedingten Aggregation der Inflammasomkomponenten NALP3 und ASC (Abbildung 47). Wie Expressionsplasmid-Titrations von PAI-2, beziehungsweise von NALP3 zeigten, scheint der inhibitorische Effekt von PAI2 dabei auf der kompetitiven Interaktion mit dem Adaptermolekül ASC zu beruhen, (Abbildung 48). Dem von uns erstellten Modell zufolge führt die Assoziation von PAI-2 mit der Pyrin-Domäne von ASC (Abbildung 45) zur verminderten Rekrutierung der Inflammasomkomponente NALP3 (Martinon et al., 2002) und damit zur verzögerten Aggregation des Inflammasoms. Die CARD-CARD Interaktion zwischen ASC und Caspase-1 zeigte sich hingegen unbeeinflusst von PAI-2 Überexpression (Daten nicht gezeigt). Analog dazu zeigte die Überexpression von PAI2 in IL-1 β und Caspase-1 transfizierten HEK 293 Zellen lediglich bei zusätzlicher Expression der weiteren Inflammasombestandteile ASC und NALP3 inhibitorische Wirkung auf die Caspase-1 vermittelte

IL-1 β Sekretion (Abbildung 50). Die *per se* zu verzeichnende und auf Autoaktivierung der überexprimierten Caspase-1 beruhende Freisetzung und Prozessierung von IL-1 β erfuhr hingegen keinerlei Veränderung infolge von PAI-2 Expression (Abbildung 51). Dieser Befund schloss die Möglichkeit der direkten Inhibierung der Cystein-Protease Caspase-1 durch den Protease-Inhibitor PAI-2 aus. Die kürzlich beschriebene, TRIF abhängige und durch Caspase-8 vermittelte IL-1 β Aktivierung und Freisetzung (Maelfait et al., 2008) zeigte sich ebenfalls unbeeinflusst von der Expression von PAI-2 (Abbildung 50). Der von uns beobachtete inhibitorische Effekt von PAI-2 scheint somit weitestgehend exklusiv für ASC abhängige Induktionen von Caspase-1 zu sein.

Zahlreiche unterschiedliche Faktoren wurden für die Aktivierung des NALP3 abhängigen Inflammasoms beschrieben. Aufgrund der Vielzahl der veröffentlichten, aktivierenden Substanzen erscheint die Existenz mehrerer unabhängiger Induktionsmechanismen möglich. Vermutet wird die allen Liganden gemeinsame Induktion einiger weniger zentraler Aktivierungsmechanismen, die zur Aggregation der Inflammasomkomponenten führen. So wurde in jüngerer Zeit die durch lysosomale Destabilisierung induzierte Freisetzung der aktiven Protease Cathepsin B als ein essentieller Bestandteil NALP3 abhängiger Inflammasomaktivierung beschrieben (Hornung et al., 2008; Halle et al., 2008). Inwieweit das Protein selbst als Ligand für NALP3 wirkt, oder aber durch proteolytische Aktivität zur Induktion des Inflammasom führt, ist bisher nicht beschrieben. Denkbar wäre auch eine direkte und PAI-2 vermittelte Hemmung der für NALP3 Inflammasomaktivierung potentiell relevanten Protease. Kontrastierend dazu und unser Modell der sterischen Blockade des Adaptermoleküls stützend, steht die ebenfalls durch PAI-2 Expression beeinträchtigte Aktivierung des proteaseunabhängig aktivierten AIM2 Inflammasoms.

4.3. Der TLR-vermittelte mTOR-STAT3-PAI-2 Signalweg als Kontrollmechanismus von Caspase-1 Aktivierung

Die in dieser Arbeit beschriebenen Befunde zeigen die Abhängigkeit der Aktivierung zytoplasmatischer Inflammasomaktivierung von TLR vermittelter Genexpression. Entgegen bisheriger Studien, die eine komplette Entkopplung von ligandeninduzierter Inflammasomaktivierung und TLR Stimulation beschreiben (Kanneganti et al., 2007), zeigen die hier vorliegenden Daten die Aktivierung des Inflammasoms ohne Applikation weiterer, für Caspase-1 Aktivierung beschriebener, Substanzen. Die LPS induzierte Aktivierung des Inflammasoms erfolgte abhängig vom Expressionsniveau des Serin-Protease Inhibitors PAI-2. Die Regulation der PAI-2 Expression erfolgte über einen neuen, erstmals von uns beschriebenen, TLR induzierten, mTOR-STAT3 Signalweg.

Die hier vorliegenden Daten beschreiben die schnelle, stimulationsabhängige Rekrutierung des Transkriptionsfaktors STAT3 an die zytoplasmatische TIR-Domäne von TLRs. Das direkt mit dem Rezeptors assoziierte Molekül wechselt mit fortlaufender Stimulationszeit an das ebenfalls rekrutierte Adapterprotein MyD88. In einem von uns zuvor beschriebenen Komplex aus MyD88 und der Serin-Threonin Kinase mTOR (Schmitz et al., 2008) wird STAT3, mTOR abhängig, am Serin727 phosphoryliert und dissoziiert vom Adaptermolekül. Die TLR abhängige Aktivierung von mTOR erfolgte dabei sowohl abhängig vom zentralen PI3K-AKT Signalweg als auch unter stringenter Kontrolle der TSC regulierenden Kinasen ERK1/2 und IKK β . Serin-phosphoryliertes STAT3 akkumulierte im Zellkern und zeigt spezifische Bindung an den PAI-2 Promotor.

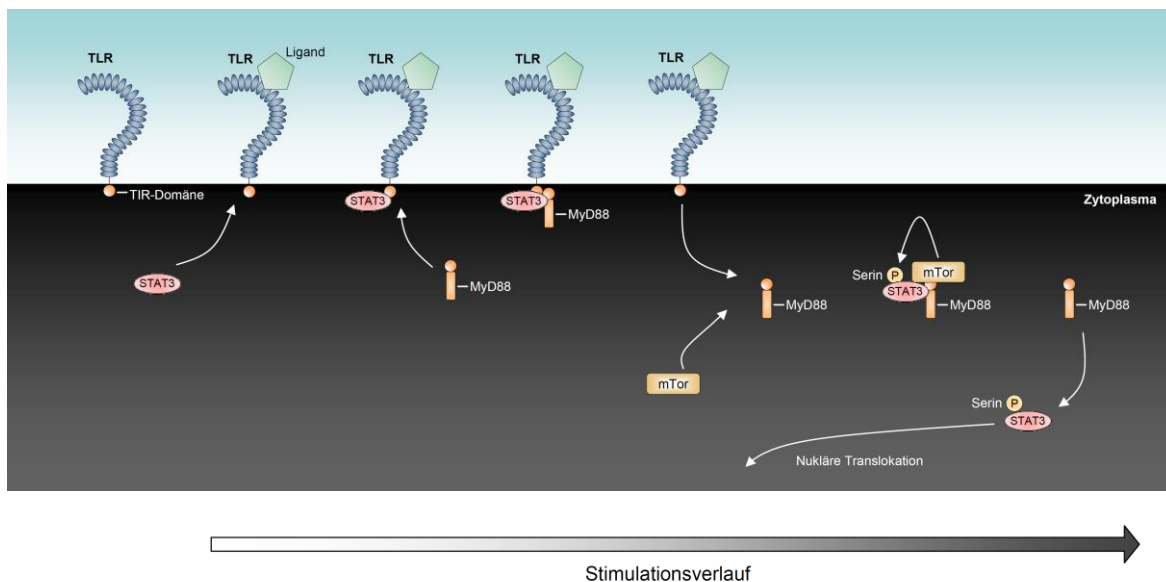


Abbildung 52: Modell der frühen Interaktionsereignisse von STAT3 mit TLR und MyD88. In chronologischer Folge führt die Aktivierung von TLR zur Rekrutierung von STAT3 an die TIR Domäne des Rezeptors. Die ebenfalls erfolgende Assoziation und Aktivierung von MyD88 am zytoplasmatischen Teil des Rezeptors führt zur Bindung von STAT3 an MyD88. Der Komplex aus STAT3 und MyD88 löst sich vom Rezeptor und assoziiert mit mTOR. mTOR induzierte STAT3 Serin-Phosphorylierung führt zur Dissoziation des STAT3 von MyD88 und zur Translokation in den Zellkern (mTOR, mammalian Target of Rapamycin; MyD88, myeloid differentiation primary-response gene 88; TSC, tuberous sclerosis complex; STAT3, signal transducer and activator of transcription; TIR, Toll/IL-1 receptor).

Sowohl die pharmakologische als auch die genetische Blockade der STAT3 Aktivierung, beziehungsweise der Expression des Moleküls selbst, zeigten die STAT3 abhängige, über TLR Stimulation vermittelte Expression von PAI-2. PAI-2 defiziente, beziehungsweise in dessen Expression supprimierte Zellen weisen verstärkte Caspase-1 Aktivität sowohl auf ATP vermittelte Induktion des NALP3 Inflammasoms als auch auf spezifische Stimulation des DNA-abhängigen AIM2 Inflammasoms auf. Die alleinige Stimulation mit TLR4 Ligand LPS führte zur verstärkten Aktivität der Caspase-1. Interaktionsstudien mit Inflammasomkomponenten zeigten die spezifische Interaktion von PAI-2 mit dem Adaptermolekül ASC. Die Anwesenheit von PAI-2 führte zur verzögerten Assoziation von aktiviertem NALP3 mit ASC und damit in der verminderten

Aktivierung der Caspase-1. Die Reversibilität der Bindung zwischen PAI-2 und ASC lässt mehr auf einen regulatorischen als auf einen komplett inhibitorischen Effekt auf Inflammasomaktivierung schließen.

Offen bleibt der Mechanismus der durch Langzeitstimulation mit LPS vermittelten Aktivierung des Inflammasoms. Denkbar wäre sowohl die jüngst postulierte Diffusion des Liganden in die Zelle, sowie die über das Signalmolekül TRIF erfolgende Produktion von ROS. In jedem Fall scheint die Expression von PAI-2 zu einer Erhöhung des für Inflammasomaktivierung erforderlichen Mindestschwellenwertes an induzierendem Signal zu führen. Meng et al (im Druck) beschreibt einen vergleichbaren Mechanismus für die bei Patienten mit Muckle-Well Syndrom auftretenden Punktmutation R260W in NALP3. Makrophagen mit eben dieser Punktmutation zeigten, im Gegensatz zu Wildtypzellen, Inflammasomaktivierung auf die alleinige Applikation von Toll-Liganden. Auch hier wurde die Diffusion des Liganden in die Zelle diskutiert. Mäuse des betreffenden Genotyps entwickelten infolge der erhöhte Sekretion von IL-1 β und der daraus resultierenden Th17 dominierten Entzündungsreaktion verstärkt Autoimmunkrankheiten.

Im Gegensatz zu dieser nur bei Patienten mit genetischer Prädisposition auftretenden Erscheinung der verstärkten Sekretion von IL-1 β , zeigen unsere Befunde die durch Applikation klinisch relevanter Inhibitoren hervorgerufene erhöhte Responsivität zytoplasmatischer, Caspase-1 abhängiger IL-1 β Prozessierung. Wie bereits von Schmitz et al., postuliert und in dieser Arbeit mechanistisch erklärt, führte die Inhibierung des als proinflammatorisch beschriebenen mTOR Signalosoms, bei erwartungsgemäßer Suppression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α zur verstärkten Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β (Schmitz et al., 2008). Vergleichbare Ergebnisse wurden für die Inhibition des NF- κ B Komplexes beschrieben (Greten et al., 2007).

In der bisherigen Medizin findet der mTOR Inhibitor Rapamycin vorwiegend aufgrund seiner immunsuppressiven Wirkung Verwendung. Die Rapamycin induzierte Hemmung der T-Zell Proliferation führt zu verminderter Organabstoßung nach Transplantationsoperationen. Aufgrund seiner antiproliferativen Effekte auf bestimmte Zellen wird zudem seine Verwendung in der Antitumortherapie diskutiert. Die in dieser Arbeit dargelegten Befunde erweitern das immunsuppressive Wirkspektrum von Rapamycin um einen kritischen Effekt: der erhöhten Suszeptibilität Inflammasom-abhängiger Caspase-1 Aktivierung. Pathogenexposition gegenüber Patienten mit Rapamycin supprimiertem Immunsystem könnte somit zur verstärkten Anfälligkeit gegenüber IL-1 β getriebener Sepsis führen. Auch könnte der Langzeitgebrauch der Inhibitoren der mTOR und NF- κ B Komplexe zur erhöhten Empfindlichkeit gegenüber IL-1 β vermittelter inflammatorischer Krankheitsbilder wie der chronischen rheumatoiden Arthritis beitragen.

Inwieweit natürlich auftretende Punktmutationen in PAI-2 oder anderen Komponenten der in dieser Arbeit beschriebenen Signalwege an bereits bestehenden chronischen, IL-1 β vermittelten Krankheitsbildern beteiligt sind, werden zukünftige Studien zeigen.

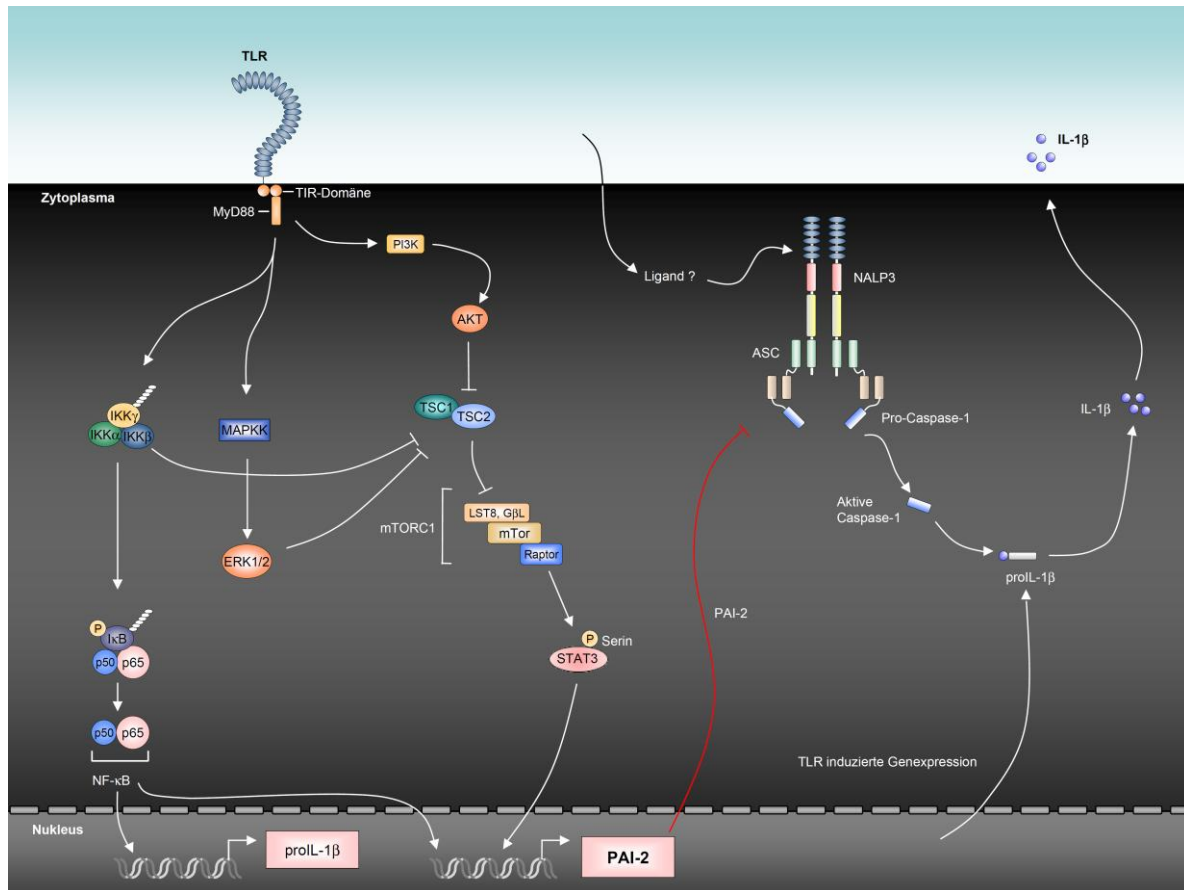


Abbildung 53: Schematische Übersicht der Rolle von Serin-phosphoryliertem STAT3 in TLR-vermittelter Signalübertragung. Die Aktivierung von TLR führt zur mTOR-abhängigen STAT3-Serin-Phosphorylierung. Die Regulation der mTOR-Aktivierung kontrollierenden TSC1/TSC2-Komplexes erfolgt in Abhängigkeit von den Aktivitäten von IKK β und ERK1/2. Serinphosphoryliertes STAT3 induziert die Transkription von PAI-2. Zytoplasmatisch vorliegendes PAI-2 inhibiert die Bildung des ASC-abhängigen NALP3-Inflammasoms und somit die Aktivierung von Caspase-1 und die daraus resultierende Prozessierung und Freisetzung von IL-1 β (ASC, *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*; AKT, *protein kinase B*; G β L, *mammalian LST8/G-protein β -subunit like protein*; mLST8/G β L, *mammalian LST8/G-protein β -subunit like protein*; mTOR, *mammalian Target of Rapamycin*; PI3K, *phosphatidylinositol-3-kinase*; Raptor, *regulatory associated protein of mTOR*; IKK β , *I κ B-Kinase β* ; MyD88, *myeloid differentiation primary-response gene 88*; TSC, *tuberous sclerosis complex*; PAI-2, *plasminogen activator inhibitor 2*; STAT3, *signal transducer and activator of transcription*; TIR, *Toll/IL-1 receptor*).

Zusammenfassung

Toll-like Rezeptoren vermitteln die zelluläre Erkennung von Pathogen assoziierten molekularen Mustern. Die Übertragung der Signale im Zellinneren erfolgt, ausgehend von den zentralen Adaptermolekülen MyD88 und TRIF, durch verschiedene Signalmoleküle und führt letztendlich, über die Aktivierung distinkter Transkriptionsfaktoren, zur Transkription und Expression verschiedener immunregulatorischer Moleküle und Effektoren, unter ihnen das proinflammatorische Zytokin IL-1 β . Die Prozessierung und Aktivierung des als pro-Form exprimierten und zytoplasmatisch lokalisierten IL-1 β erfolgt unabhängig von TLR Stimulation durch die NLR abhängige Aktivierung der Cystein-Protase Caspase-1.

Die in dieser Arbeit dargelegten Befunde beschreiben die Rolle von STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) als Interaktor von TLRs, sowie des Adaptermoleküls MyD88 und somit neuer integraler Bestandteil TLR vermittelter Signalgebung. Die TLR induzierte Aktivierung von mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) führte zur Phosphorylierung von STAT3 am Serin 727 und resultierte in der Dissoziation von STAT3 aus dem Komplex mit MyD88. Serin phosphoryliertes STAT3 translozierte in den Zellkern und induzierte durch direkte Promotorbindung die Transkription von PAI2 (*plasminogen activator inhibitor 2*). Das exprimierte PAI2 interagiert mit ASC und führte so zur Hemmung der Ausbildung des NALP3 und AIM2 abhängigen Inflammasoms und somit zur verminderten Freisetzung von bioaktiven IL-1 β .

Zusammenfassend erklären die hier aufgeführten Daten, wie TLR aktiviertes mTOR über STAT3 vermittelte PAI2 Expression die Induktion von Caspase-1 und somit die Prozessierung und Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β reguliert.

Summary

Toll-like receptors mediate cellular recognition of pathogen-associated molecular patterns. Starting from the central adapter molecules MyD88 and TRIF, cytoplasmic signal transduction events are mediated by various signaling molecules leading to induction of distinct transcription factors, resulting in the transcription and expression of diverse immunoregulatory molecules and effectors - including the proinflammatory cytokine IL-1 β . Processing and activation of cytoplasmic immature IL-1 β is mediated by the NLR activated cystein-protease caspase-1, independently of TLR signaling.

The results presented in this thesis describe a new role for STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) as an integral component of TLR mediated signal transduction. STAT3 interacted with the cytoplasmic TIR domain of TLRs as well as with the adapter molecule MyD88. TLR induced activation of mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) led to STAT3 serin 727 phosphorylation and resulted in dissociation of STAT3 from its complex with MyD88. Upon serin phosphorylation, STAT3 translocated into the nucleus and induced, upon promoter binding, transcription of PAI-2 (*plasminogen activator inhibitor 2*).

PAI-2 protein interacted with ASC and thus inhibited the formation of NALP3 and AIM2 dependent inflammasomes, thus dampening the release of bioactive IL-1 β .

Conclusively the data shown explain how TLR activated mTOR, via STAT3 induced gene expression, regulates the induction of caspase-1 and thus processing and secretion of the proinflammatory cytokine IL-1 β .

Literaturverzeichnis

- Adachi, O. et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* **9**, 143-50 (1998).
- Agostini, L. et al. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* **20**, 319-25 (2004).
- Ahmad-Nejad, P. et al. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* **32**, 1958-68 (2002).
- Akira, S. et al. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* **77**, 63-71 (1994).
- Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**, 675-80 (2001).
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-8 (2001).
- Aliprantis, A. O. et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* **285**, 736-9 (1999).
- Anderson, K. V., Bokla, L. & Nusslein-Volhard, C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* **42**, 791-8 (1985).
- Andrejeva, J. et al. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17264-9 (2004).
- Arbibe, L. et al. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat Immunol* **1**, 533-40 (2000).
- Arcasoy, S. M., Latoche, J. D., Gondor, M., Pitt, B. R. & Pilewski, J. M. Polycations increase the efficiency of adenovirus-mediated gene transfer to epithelial and endothelial cells in vitro. *Gene Ther* **4**, 32-8 (1997).
- Barton, G. M., Kagan, J. C. & Medzhitov, R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* **7**, 49-56 (2006).
- Becker, S., Corthals, G. L., Aebersold, R., Groner, B. & Muller, C. W. Expression of a tyrosine phosphorylated, DNA binding Stat3beta dimer in bacteria. *FEBS Lett* **441**, 141-7 (1998).
- Bell, J. K. et al. The molecular structure of the TLR3 extracellular domain. *J Endotoxin Res* **12**, 375-8 (2006).
- Bell, J. K. et al. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* **24**, 528-33 (2003).
- Belvin, M. P. & Anderson, K. V. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 393-416 (1996).
- Benkhart, E. M., Siedlar, M., Wedel, A., Werner, T. & Ziegler-Heitbrock, H. W. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol* **165**, 1612-7 (2000).
- Beutler, B. Toll-like receptors and their place in immunology. Where does the immune response to infection begin? *Nat Rev Immunol* **4**, 498 (2004).

- Beutler, B. & Rietschel, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* **3**, 169-76 (2003).
- Boone, D. L. et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* **5**, 1052-60 (2004).
- Bowie, A. & O'Neill, L. A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* **67**, 508-14 (2000).
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J. & Jove, R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**, 2474-88 (2000).
- Brent, R. & Ptashne, M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* **43**, 729-36 (1985).
- Brint, E. K. et al. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* **5**, 373-9 (2004).
- Brown, E. J. Complement receptors and phagocytosis. *Curr Opin Immunol* **3**, 76-82 (1991).
- Bruey, J. M. et al. Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell* **129**, 45-56 (2007).
- Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Equils, O. & Ardit, M. Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J Immunol* **167**, 987-94 (2001).
- Burckstummer, T. et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* **10**, 266-72 (2009).
- Burns, K. et al. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol* **2**, 346-51 (2000).
- Burns, K. et al. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med* **197**, 263-8 (2003).
- Caldenhoven, E. et al. STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem* **271**, 13221-7 (1996).
- Campos, M. A. et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* **167**, 416-23 (2001).
- Cao, W. et al. Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. *Nat Immunol* **9**, 1157-64 (2008).
- Carty, M. et al. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* **7**, 1074-81 (2006).
- Cassel, S. L. et al. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9035-40 (2008).
- Ceresa, B. P., Horvath, C. M. & Pessin, J. E. Signal transducer and activator of transcription-3 serine phosphorylation by insulin is mediated by a Ras/Raf/MEK-dependent pathway. *Endocrinology* **138**, 4131-7 (1997).
- Chatterjee-Kishore, M., van den Akker, F. & Stark, G. R. Association of STATs with relatives and friends. *Trends Cell Biol* **10**, 106-11 (2000).

- Chen, X. et al. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* **93**, 827-39 (1998).
- Chiu, M. I., Katz, H. & Berlin, V. RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12574-8 (1994).
- Choe, J., Kelker, M. S. & Wilson, I. A. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* **309**, 581-5 (2005).
- Christensen, S. R. et al. Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *J Exp Med* **202**, 321-31 (2005).
- Chuang, T. H. & Ulevitch, R. J. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nat Immunol* **5**, 495-502 (2004).
- Chung, J., Uchida, E., Grammer, T. C. & Blenis, J. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* **17**, 6508-16 (1997).
- Coban, C. et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* **201**, 19-25 (2005).
- Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* **420**, 885-91 (2002).
- Conti, C., Mastromarino, P. & Orsi, N. Role of membrane phospholipids and glycolipids in cell-to-cell fusion by VSV. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **14**, 303-13 (1991).
- Couillault, C. et al. TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat Immunol* **5**, 488-94 (2004).
- Covert, M. W., Leung, T. H., Gaston, J. E. & Baltimore, D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science* **309**, 1854-7 (2005).
- Cruz, C. M. et al. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* **282**, 2871-9 (2007).
- Cui, S. et al. The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Mol Cell* **29**, 169-79 (2008).
- Cusson-Hermance, N., Khurana, S., Lee, T. H., Fitzgerald, K. A. & Kelliher, M. A. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- κ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem* **280**, 36560-6 (2005).
- Danial, N. N. & Rothman, P. JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene* **19**, 2523-31 (2000).
- Decker, T. & Kovarik, P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* **19**, 2628-37 (2000).
- Deng, L. et al. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**, 351-61 (2000).
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-31 (2004).
- Diehl, G. E. et al. TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity* **21**, 877-89 (2004).
- Dinarello, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* **27**, 519-50 (2009).

- Dostert, C. et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* **320**, 674-7 (2008).
- Dougherty, K. M. et al. The plasminogen activator inhibitor-2 gene is not required for normal murine development or survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 686-91 (1999).
- Doyle, S. E. et al. Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J Exp Med* **199**, 81-90 (2004).
- Doyle, S. L., Jefferies, C. A. & O'Neill, L. A. Bruton's tyrosine kinase is involved in p65-mediated transactivation and phosphorylation of p65 on serine 536 during NFkappaB activation by lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **280**, 23496-501 (2005).
- Dunne, A., Ejdeback, M., Ludidi, P. L., O'Neill, L. A. & Gay, N. J. Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J Biol Chem* **278**, 41443-51 (2003).
- Ehlers, M., Fukuyama, H., McGaha, T. L., Aderem, A. & Ravetch, J. V. TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE. *J Exp Med* **203**, 553-61 (2006).
- Eisenbarth, S. C. et al. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* **196**, 1645-51 (2002).
- Ezekowitz, R. A., Sastry, K., Bailly, P. & Warner, A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* **172**, 1785-94 (1990).
- Faustin, B. et al. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* **25**, 713-24 (2007).
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J. W., Datta, P., Wu, J. & Alnemri, E. S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* **458**, 509-13 (2009).
- Fields, S. & Song, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-6 (1989).
- Fitzgerald, K. A. et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* **4**, 491-6 (2003).
- Fitzgerald, K. A. et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**, 78-83 (2001).
- Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C. & Golenbock, D. T. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes Infect* **6**, 1361-7 (2004).
- Franchi, L. et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol* **7**, 576-82 (2006).
- Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C. & Toker, A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **275**, 665-8 (1997).
- Gao, B. & Tsan, M. F. Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor alpha from murine macrophages. *J Biol Chem* **278**, 22523-9 (2003).
- Gao, B. & Tsan, M. F. Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J Biol Chem* **278**, 174-9 (2003).
- Garlanda, C. et al. Intestinal inflammation in mice deficient in Tir8, an inhibitory member of the IL-1 receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3522-6 (2004).

- Gay, N. J. & Gangloff, M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem* **76**, 141-65 (2007).
- Gay, N. J. & Keith, F. J. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* **351**, 355-6 (1991).
- Gelman, A. E. et al. The adaptor molecule MyD88 activates PI-3 kinase signaling in CD4+ T cells and enables CpG oligodeoxynucleotide-mediated costimulation. *Immunity* **25**, 783-93 (2006).
- Girardin, S. E. et al. Identification of the critical residues involved in peptidoglycan detection by Nod1. *J Biol Chem* **280**, 38648-56 (2005).
- Girardin, S. E. et al. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* **2**, 736-42 (2001).
- Gray, P. et al. MyD88 adapter-like (Mal) is phosphorylated by Bruton's tyrosine kinase during TLR2 and TLR4 signal transduction. *J Biol Chem* **281**, 10489-95 (2006).
- Greenlund, A. C. et al. Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity* **2**, 677-87 (1995).
- Greten, F. R. et al. NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell* **130**, 918-31 (2007).
- Gurcel, L., Abrami, L., Girardin, S., Tschopp, J. & van der Goot, F. G. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* **126**, 1135-45 (2006).
- Hacker, H. et al. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* **439**, 204-7 (2006).
- Halle, A. et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* **9**, 857-65 (2008).
- Han, K. J. et al. Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappaB activation and apoptosis pathways. *J Biol Chem* **279**, 15652-61 (2004).
- Hardy, M. P. & O'Neill, L. A. The murine IRAK2 gene encodes four alternatively spliced isoforms, two of which are inhibitory. *J Biol Chem* **279**, 27699-708 (2004).
- Hasegawa, M. et al. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *Embo J* **27**, 373-83 (2008).
- Hashimoto, C., Hudson, K. L. & Anderson, K. V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**, 269-79 (1988).
- Hayashi, F. et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-103 (2001).
- Hazeki, K., Nigorikawa, K. & Hazeki, O. Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity. *Biol Pharm Bull* **30**, 1617-23 (2007).
- Heil, F. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-9 (2004).
- Hemmi, H. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-5 (2000).
- Hemmi, H. et al. The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med* **199**, 1641-50 (2004).

- Hirschfeld, M. et al. Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J Immunol* **163**, 2382-6 (1999).
- Hitotsumatsu, O. et al. The ubiquitin-editing enzyme A20 restricts nucleotide-binding oligomerization domain containing 2-triggered signals. *Immunity* **28**, 381-90 (2008).
- Hochrein, H. et al. Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11416-21 (2004).
- Hoebe, K. et al. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* **424**, 743-8 (2003).
- Hoebe, K. et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* **433**, 523-7 (2005).
- Hoebe, K. et al. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat Immunol* **4**, 1223-9 (2003).
- Honda, K. et al. Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10872-7 (2003).
- Honda, K., Takaoka, A. & Taniguchi, T. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* **25**, 349-60 (2006).
- Honda, K. et al. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15416-21 (2004).
- Honda, K. et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772-7 (2005).
- Hornig, T., Barton, G. M., Flavell, R. A. & Medzhitov, R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* **420**, 329-33 (2002).
- Hornig, T., Barton, G. M. & Medzhitov, R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* **2**, 835-41 (2001).
- Hornung, V. et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* **458**, 514-8 (2009).
- Hornung, V. et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* **9**, 847-56 (2008).
- Hornung, V. et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994-7 (2006).
- Horvath, C. M. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci* **25**, 496-502 (2000).
- Hoshino, K., Kaisho, T., Iwabe, T., Takeuchi, O. & Akira, S. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol* **14**, 1225-31 (2002).
- Hultmark, D. Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* **199**, 144-6 (1994).
- Inohara, N. et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* **278**, 5509-12 (2003).
- Ishii, K. J. et al. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* **7**, 40-8 (2006).
- Iwaki, D. et al. The extracellular toll-like receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **277**, 24315-20 (2002).

- Iwami, K. I. et al. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J Immunol* **165**, 6682-6 (2000).
- Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**, 987-95 (2004).
- Jain, N., Zhang, T., Kee, W. H., Li, W. & Cao, X. Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner. *J Biol Chem* **274**, 24392-400 (1999).
- Janssens, S., Burns, K., Vercammen, E., Tschopp, J. & Beyaert, R. MyD88S, a splice variant of MyD88, differentially modulates NF-kappaB- and AP-1-dependent gene expression. *FEBS Lett* **548**, 103-7 (2003).
- Jefferies, C. A. et al. Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain-binding protein that participates in nuclear factor kappaB activation by Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* **278**, 26258-64 (2003).
- Jiang, Z., Mak, T. W., Sen, G. & Li, X. Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3533-8 (2004).
- Jin, M. S. et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* **130**, 1071-82 (2007).
- Jurk, M. et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* **3**, 499 (2002).
- Kagan, J. C. & Medzhitov, R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* **125**, 943-55 (2006).
- Kagan, J. C. et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* **9**, 361-8 (2008).
- Kaisho, T. & Akira, S. Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors. *Curr Mol Med* **3**, 373-85 (2003).
- Kang, D. C. et al. mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 637-42 (2002).
- Kanneganti, T. D. et al. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem* **281**, 36560-8 (2006).
- Kanneganti, T. D. et al. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* **26**, 433-43 (2007).
- Kanneganti, T. D. et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* **440**, 233-6 (2006).
- Karin, M. & Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **18**, 621-63 (2000).
- Kataoka, K., Muta, T., Yamazaki, S. & Takeshige, K. Activation of macrophages by linear (Iright-arrow3)-beta-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *J Biol Chem* **277**, 36825-31 (2002).
- Kato, H. et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**, 19-28 (2005).
- Kato, H. et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* **205**, 1601-10 (2008).

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**, 115-22 (1999).

Kawai, T. et al. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* **5**, 1061-8 (2004).

Kawai, T. et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6**, 981-8 (2005).

Keller, M., Ruegg, A., Werner, S. & Beer, H. D. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* **132**, 818-31 (2008).

Kim, S. et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* **457**, 102-6 (2009).

Kimura, A. et al. Suppressor of cytokine signaling-1 selectively inhibits LPS-induced IL-6 production by regulating JAK-STAT. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17089-94 (2005).

Kinjo, I. et al. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity* **17**, 583-91 (2002).

Kirschning, C. J., Wesche, H., Merrill Ayres, T. & Rothe, M. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* **188**, 2091-7 (1998).

Klippel, A., Kavanaugh, W. M., Pot, D. & Williams, L. T. A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol* **17**, 338-44 (1997).

Kobayashi, K. et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* **110**, 191-202 (2002).

Kobe, B. & Kajava, A. V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 725-32 (2001).

Kojima, H. et al. STAT3 regulates Nemo-like kinase by mediating its interaction with IL-6-stimulated TGFbeta-activated kinase 1 for STAT3 Ser-727 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4524-9 (2005).

Kolek, M. J. et al. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. *Am Heart J* **148**, 1034-40 (2004).

Kruithof, E. K., Baker, M. S. & Bunn, C. L. Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood* **86**, 4007-24 (1995).

Laird, M. H. et al. TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. *J Leukoc Biol* (2009).

Lang, R., Patel, D., Morris, J. J., Rutschman, R. L. & Murray, P. J. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol* **169**, 2253-63 (2002).

Latz, E. et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* **5**, 190-8 (2004).

Latz, E. et al. Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* **8**, 772-9 (2007).

Leadbetter, E. A. et al. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* **416**, 603-7 (2002).

- LeBouder, E. et al. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol* **171**, 6680-9 (2003).
- Lee, D. F. et al. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* **130**, 440-55 (2007).
- Leemans, J. C. et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest* **115**, 2894-903 (2005).
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-83 (1996).
- Levashina, E. A. et al. Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. *Science* **285**, 1917-9 (1999).
- Levy, D. E. & Darnell, J. E., Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 651-62 (2002).
- Li, M. et al. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol* **166**, 7128-35 (2001).
- Liberati, N. T. et al. Requirement for a conserved Toll/interleukin-1 resistance domain protein in the *Caenorhabditis elegans* immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6593-8 (2004).
- Lien, E. et al. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* **105**, 497-504 (2000).
- Lightfield, K. L. et al. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat Immunol* **9**, 1171-8 (2008).
- Liljeroos, M. et al. Bruton's tyrosine kinase together with PI 3-kinase are part of Toll-like receptor 2 multiprotein complex and mediate LTA induced Toll-like receptor 2 responses in macrophages. *Cell Signal* **19**, 625-33 (2007).
- Lim, C. P. & Cao, X. Serine phosphorylation and negative regulation of Stat3 by JNK. *J Biol Chem* **274**, 31055-61 (1999).
- Lin, H. Y., Shih, A., Davis, F. B. & Davis, P. J. Thyroid hormone promotes the phosphorylation of STAT3 and potentiates the action of epidermal growth factor in cultured cells. *Biochem J* **338** (Pt 2), 427-32 (1999).
- Liu, L., McBride, K. M. & Reich, N. C. STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin-alpha3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8150-5 (2005).
- Lord, K. A., Hoffman-Liebermann, B. & Liebermann, D. A. Complexity of the immediate early response of myeloid cells to terminal differentiation and growth arrest includes ICAM-1, Jun-B and histone variants. *Oncogene* **5**, 387-96 (1990).
- Lorne, E. et al. Participation of mTOR Complex 1 in TLR2 and TLR4 Induced Neutrophil Activation and Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2009).
- Lund, J. M. et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5598-603 (2004).
- Lutticken, C. et al. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* **263**, 89-92 (1994).
- Maelfait, J. et al. Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1beta maturation by caspase-8. *J Exp Med* **205**, 1967-73 (2008).

- Mambula, S. S., Sau, K., Henneke, P., Golenbock, D. T. & Levitz, S. M. Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* **277**, 39320-6 (2002).
- Mansell, A., Brint, E., Gould, J. A., O'Neill, L. A. & Hertzog, P. J. Mal interacts with tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 to mediate NF-kappaB activation by toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *J Biol Chem* **279**, 37227-30 (2004).
- Mansell, A. et al. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol* **7**, 148-55 (2006).
- Mao, X. & Chen, X. Crystallization and X-ray crystallographic analysis of human STAT1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **61**, 666-8 (2005).
- Mariathasan, S. ASC, Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: bona fide intracellular adapters of the caspase-1 inflammasome. *Microbes Infect* **9**, 664-71 (2007).
- Mariathasan, S. et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* **430**, 213-8 (2004).
- Mariathasan, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**, 228-32 (2006).
- Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* **10**, 417-26 (2002).
- Martinon, F., Mayor, A. & Tschopp, J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* **27**, 229-65 (2009).
- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. & Tschopp, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**, 237-41 (2006).
- Martinon, F. & Tschopp, J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* **117**, 561-74 (2004).
- Massari, P. et al. Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J Immunol* **168**, 1533-7 (2002).
- McCartney-Francis, N., Jin, W. & Wahl, S. M. Aberrant Toll receptor expression and endotoxin hypersensitivity in mice lacking a functional TGF-beta 1 signaling pathway. *J Immunol* **172**, 3814-21 (2004).
- McGettrick, A. F. et al. Trif-related adapter molecule is phosphorylated by PKC{epsilon} during Toll-like receptor 4 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9196-201 (2006).
- McGreal, E. P., Miller, J. L. & Gordon, S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr Opin Immunol* **17**, 18-24 (2005).
- Means, T. K. et al. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol* **163**, 6748-55 (1999).
- Means, T. K. et al. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **163**, 3920-7 (1999).
- Medcalf, R. L. & Stasinopoulos, S. J. The undecided serpin. The ins and outs of plasminogen activator inhibitor type 2. *Febs J* **272**, 4858-67 (2005).
- Medvedev, A. E. et al. Role of TLR4 tyrosine phosphorylation in signal transduction and endotoxin tolerance. *J Biol Chem* **282**, 16042-53 (2007).
- Medzhitov, R. & Janeway, C. A., Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**, 298-300 (2002).

- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-7 (1997).
- Medzhitov, R. et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* **2**, 253-8 (1998).
- Meylan, E. et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* **5**, 503-7 (2004).
- Meylan, E. et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167-72 (2005).
- Miao, E. A. et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol* **7**, 569-75 (2006).
- Michallet, M. C. et al. TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway. *Immunity* **28**, 651-61 (2008).
- Miggin, S. M. et al. NF-kappaB activation by the Toll-IL-1 receptor domain protein MyD88 adapter-like is regulated by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3372-7 (2007).
- Mink, M., Fogelgren, B., Olszewski, K., Maroy, P. & Csiszar, K. A novel human gene (SARM) at chromosome 17q11 encodes a protein with a SAM motif and structural similarity to Armadillo/beta-catenin that is conserved in mouse, *Drosophila*, and *Caenorhabditis elegans*. *Genomics* **74**, 234-44 (2001).
- Mohammad, M. K. et al. Dysregulated Toll-like receptor expression and signaling in bone marrow-derived macrophages at the onset of diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Int Immunol* **18**, 1101-13 (2006).
- Muzio, M., Natoli, G., Saccani, S., Levrero, M. & Mantovani, A. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med* **187**, 2097-101 (1998).
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P. & Dixit, V. M. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* **278**, 1612-5 (1997).
- Naiki, Y. et al. MyD88 is pivotal for the early inflammatory response and subsequent bacterial clearance and survival in a mouse model of *Chlamydia pneumoniae* pneumonia. *J Biol Chem* **280**, 29242-9 (2005).
- Nakagawa, R. et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* **17**, 677-87 (2002).
- Neculai, D. et al. Structure of the unphosphorylated STAT5a dimer. *J Biol Chem* **280**, 40782-7 (2005).
- Negishi, H. et al. Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15136-41 (2006).
- Oganesyan, G. et al. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* **439**, 208-11 (2006).
- Ogura, Y., Sutterwala, F. S. & Flavell, R. A. The inflammasome: first line of the immune response to cell
Okamura, Y. et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* **276**, 10229-33 (2001).
- O'Neill, L. A. The role of MyD88-like adapters in Toll-like receptor signal transduction. *Biochem Soc Trans* **31**, 643-7 (2003).
- O'Neill, L. A. & Greene, C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* **63**, 650-7 (1998).

- Opitz, B. et al. Toll-like receptor-2 mediates *Treponema glycolipid* and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem* **276**, 22041-7 (2001).
- Oshiro, N. et al. Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes Cells* **9**, 359-66 (2004).
- Oshiumi, H. et al. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* **278**, 49751-62 (2003).
- Ozinsky, A. et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13766-71 (2000).
- Park, J. H. et al. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol* **178**, 2380-6 (2007).
- Park, J. M. et al. Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis--CREB and NF-kappaB as key regulators. *Immunity* **23**, 319-29 (2005).
- Park, J. S. et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* **279**, 7370-7 (2004).
- Parroche, P. et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1919-24 (2007).
- Pasare, C. & Medzhitov, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* **6**, 1382-7 (2004).
- Peiser, L., Gough, P. J., Kodama, T. & Gordon, S. Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of *Escherichia coli*: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. *Infect Immun* **68**, 1953-63 (2000).
- Pelegrin, P., Barroso-Gutierrez, C. & Surprenant, A. P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *J Immunol* **180**, 7147-57 (2008).
- Pelegrin, P. & Surprenant, A. Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway. *J Biol Chem* **282**, 2386-94 (2007).
- Perera, P. Y. et al. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J Immunol* **166**, 574-81 (2001).
- Perry, A. K., Chow, E. K., Goodnough, J. B., Yeh, W. C. & Cheng, G. Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. *J Exp Med* **199**, 1651-8 (2004).
- Petrilli, V. et al. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* **14**, 1583-9 (2007).
- Pfeffer, L. M. et al. STAT3 as an adapter to couple phosphatidylinositol 3-kinase to the IFNAR1 chain of the type I interferon receptor. *Science* **276**, 1418-20 (1997).
- Poltorak, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-8 (1998).
- Qing, Y. & Stark, G. R. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *J Biol Chem* **279**, 41679-85 (2004).
- Qureshi, S. T., Gros, P. & Malo, D. Host resistance to infection: genetic control of lipopolysaccharide responsiveness by TOLL-like receptor genes. *Trends Genet* **15**, 291-4 (1999).

- Rajan, P., Panchision, D. M., Newell, L. F. & McKay, R. D. BMPs signal alternately through a SMAD or FRAP-STAT pathway to regulate fate choice in CNS stem cells. *J Cell Biol* **161**, 911-21 (2003).
- Redecke, V. et al. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* **172**, 2739-43 (2004).
- Reich, N. C. & Liu, L. Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* **6**, 602-12 (2006).
- Riedemann, N. C., Guo, R. F. & Ward, P. A. The enigma of sepsis. *J Clin Invest* **112**, 460-7 (2003).
- Rifkin, I. R., Leadbetter, E. A., Busconi, L., Viglianti, G. & Marshak-Rothstein, A. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol Rev* **204**, 27-42 (2005).
- Roberts, T. L. et al. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* **323**, 1057-60 (2009).
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. & Bazan, J. F. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 588-93 (1998).
- Rothenfusser, S. et al. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* **175**, 5260-8 (2005).
- Rowe, D. C. et al. The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6299-304 (2006).
- Ruckdeschel, K. et al. Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages. *J Immunol* **173**, 3320-8 (2004).
- Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P. & Snyder, S. H. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* **78**, 35-43 (1994).
- Saitoh, T. et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* **456**, 264-8 (2008).
- Sasai, M. et al. Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J Immunol* **174**, 27-30 (2005).
- Sato, S. et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* **171**, 4304-10 (2003).
- Schmitz, F. et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells. *Eur J Immunol* **38**, 2981-92 (2008).
- Schmitz, F. et al. Interferon-regulatory-factor 1 controls Toll-like receptor 9-mediated IFN-beta production in myeloid dendritic cells. *Eur J Immunol* **37**, 315-27 (2007).
- Schnare, M. et al. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* **2**, 947-50 (2001).
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. & Kirschning, C. J. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* **274**, 17406-9 (1999).
- Shibuya, H. et al. TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* **272**, 1179-82 (1996).
- Shishido, T. et al. Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* **108**, 2905-10 (2003).

- Shoham, S., Huang, C., Chen, J. M., Golenbock, D. T. & Levitz, S. M. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol* **166**, 4620-6 (2001).
- Sizemore, N., Leung, S. & Stark, G. R. 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**, 4798-805 (1999).
- Smiley, S. T., King, J. A. & Hancock, W. W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* **167**, 2887-94 (2001).
- Smith, K. D. et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* **4**, 1247-53 (2003).
- Sobek, V. et al. Direct Toll-like receptor 2 mediated co-stimulation of T cells in the mouse system as a basis for chronic inflammatory joint disease. *Arthritis Res Ther* **6**, R433-46 (2004).
- Spiller, S. et al. Cellular recognition of trimyristoylated peptide or enterobacterial lipopolysaccharide via both TLR2 and TLR4. *J Biol Chem* **282**, 13190-8 (2007).
- Stockinger, S. et al. IFN regulatory factor 3-dependent induction of type I IFNs by intracellular bacteria is mediated by a TLR- and Nod2-independent mechanism. *J Immunol* **173**, 7416-25 (2004).
- Strober, W., Murray, P. J., Kitani, A. & Watanabe, T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* **6**, 9-20 (2006).
- Sun, D. & Ding, A. MyD88-mediated stabilization of interferon-gamma-induced cytokine and chemokine mRNA. *Nat Immunol* **7**, 375-81 (2006).
- Sun, L., Deng, L., Ea, C. K., Xia, Z. P. & Chen, Z. J. The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell* **14**, 289-301 (2004).
- Sutterwala, F. S. et al. Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J Exp Med* **204**, 3235-45 (2007).
- Sutterwala, F. S., Ogura, Y., Zamboni, D. S., Roy, C. R. & Flavell, R. A. NALP3: a key player in caspase-1 activation. *J Endotoxin Res* **12**, 251-6 (2006).
- Suzuki, N., Suzuki, S. & Yeh, W. C. IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity. *Trends Immunol* **23**, 503-6 (2002).
- Takaesu, G. et al. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* **5**, 649-58 (2000).
- Takahashi, K. et al. Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J Immunol* **176**, 4520-4 (2006).
- Takahashi, K. et al. Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell* **29**, 428-40 (2008).
- Takaoka, A. et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* **448**, 501-5 (2007).
- Takaoka, A. et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* **434**, 243-9 (2005).
- Takeuchi, O., Hoshino, K. & Akira, S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* **165**, 5392-6 (2000).

- Takeuchi, O. et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* **13**, 933-40 (2001).
- Takeuchi, O. et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* **169**, 10-4 (2002).
- Taylor, K. R. et al. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem* **279**, 17079-84 (2004).
- Termeer, C. et al. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* **195**, 99-111 (2002).
- Tian, J. et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* **8**, 487-96 (2007).
- Turkson, J. et al. Requirement for Ras/Rac1-mediated p38 and c-Jun N-terminal kinase signaling in Stat3 transcriptional activity induced by the Src oncoprotein. *Mol Cell Biol* **19**, 7519-28 (1999).
- Uematsu, S. et al. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction. *J Exp Med* **201**, 915-23 (2005).
- Underhill, D. M. et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* **401**, 811-5 (1999).
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Smith, K. D. & Aderem, A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14459-63 (1999).
- Vabulas, R. M. et al. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem* **277**, 20847-53 (2002).
- Vabulas, R. M., Wagner, H. & Schild, H. Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* **270**, 169-84 (2002).
- Varinou, L. et al. Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN- γ -dependent innate immunity. *Immunity* **19**, 793-802 (2003).
- Venkataraman, T. et al. Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J Immunol* **178**, 6444-55 (2007).
- Wald, D. et al. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* **4**, 920-7 (2003).
- Wang, C. et al. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346-51 (2001).
- Wang, H., Kavanaugh, M. P., North, R. A. & Kabat, D. Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* **352**, 729-31 (1991).
- Weichhart, T. et al. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity* **29**, 565-77 (2008).
- Weinstein, S. L. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR mediate lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in macrophages via interferon-beta. *J Leukoc Biol* **67**, 405-14 (2000).
- Wen, Z. & Darnell, J. E., Jr. Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res* **25**, 2062-7 (1997).
- Werts, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* **2**, 346-52 (2001).

- Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S. & Cao, Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* **7**, 837-47 (1997).
- Wetzler, L. M. The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity. *Vaccine* **21** Suppl 2, S55-60 (2003).
- Wierenga, A. T., Vogelzang, I., Eggen, B. J. & Vellenga, E. Erythropoietin-induced serine 727 phosphorylation of STAT3 in erythroid cells is mediated by a MEK-, ERK-, and MSK1-dependent pathway. *Exp Hematol* **31**, 398-405 (2003).
- Williams, D. L. et al. Modulation of the phosphoinositide 3-kinase pathway alters innate resistance to polymicrobial sepsis. *J Immunol* **172**, 449-56 (2004).
- Wong, M. & Fish, E. N. RANTES and MIP-1 α activate stats in T cells. *J Biol Chem* **273**, 309-14 (1998).
- Wyllie, D. H. et al. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol* **165**, 7125-32 (2000).
- Xu, Y. et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **408**, 111-5 (2000).
- Yamaguchi, K. et al. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF- β signal transduction. *Science* **270**, 2008-11 (1995).
- Yamamoto, M. et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640-3 (2003).
- Yamamoto, M. et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* **4**, 1144-50 (2003b).
- Yamamoto, M. et al. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- β promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* **169**, 6668-72 (2002).
- Yang, R. B. et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* **395**, 284-8 (1998).
- Yarovinsky, F. et al. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* **308**, 1626-9 (2005).
- Ye, Z. & Ting, J. P. NLR, the nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing gene family. *Curr Opin Immunol* **20**, 3-9 (2008).
- Yokogami, K., Wakisaka, S., Avruch, J. & Reeves, S. A. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol* **10**, 47-50 (2000).
- Yoneyama, M. et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**, 730-7 (2004).
- Yu, P. et al. Toll-like receptor 9-independent aggravation of glomerulonephritis in a novel model of SLE. *Int Immunol* **18**, 1211-9 (2006).
- Yuan, Z. L., Guan, Y. J., Chatterjee, D. & Chin, Y. E. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* **307**, 269-73 (2005).
- Zhang, D. et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* **303**, 1522-6 (2004).
- Zhang, G. & Ghosh, S. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem* **277**, 7059-65 (2002).

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. PhD Hermann Wagner für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen, für sein Interesse und Engagement rund um dieses Thema, sowie die Ermutigung, in der Zukunft der Forschung treu zu bleiben.

Mein Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Alfons Gierl, der sich bereit erklärt hat, die Betreuung meiner Arbeit seitens des Wissenschaftszentrums Weihenstephan zu übernehmen.

Besonderer Dank gilt meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Prof. Dr. Carsten Kirschning, für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit bei ihm zu schreiben. Ich danke ihm für seine Unterstützung und die sehr gute Betreuung während dieser Zeit, für den Freiraum, den er mir bei der Durchführung meiner Arbeit gewährte, sowie für die Gewissheit jederzeit ein offenes Ohr für eigene Vorschläge, aber auch Problemstellungen zu haben.

Dr. Frank Schmitz möchte ich für die inspirierenden Diskussionen, die zahlreichen Ratschläge und die persönliche Freundschaft danken.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe danke ich für das gute und persönliche Arbeitsklima und den Spaß bei der Arbeit. Namentlich erwähnt seien Ruth Ferstl, Sylvia Fichte, Stephan Spiller, Anna Sigmund, Claudia Wurzenberger, Björn Schröder, Guanxun Meng und Alina Grabiec. Weiterhin danke ich den letzten Münchner Vertretern der AG Bauer, Thomas Müller, Svetlana Hamm und Doris Hangel für die griabige Zeit.

Ich danke meinem langjährigen Freund und Spezl Michael Bramberger, der mir zu jeder Zeit ein treuer und verlässlicher Wegbegleiter abseits des Forscheralltags war und ist.

Ein liebes Dankeschön gilt Ruth Ferstl, die sich als Kollegin für die RNA und *in vivo* Experimente dieses Themas verantwortlich zeigt und als Freundin mein Leben bereichert.

Meiner Schwester und ihrem Mann danke ich für die herzliche Unterstützung und den immerwährenden Rat in allen Lebenslagen.

Ein besonderer Dank gebührt meinem kleinen Neffen Eric und meiner kleinen Nichte Annika die mir durch ihre kindliche Unbefangenheit die Augen für die wichtigen Dinge im Leben öffnen.

Vor allem danke ich meinen Eltern, die mir dieses Studium erst ermöglicht haben. Ich danke ihnen für ihre Unterstützung, ihren Zuspruch, aber auch für die Geduld, die sie in stressigen Zeiten mir gegenüber übten. Danke für alles!

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2005 bis Mai 2009 unter der Betreuung von Prof. Dr. Carsten J. Kirschning am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München angefertigt.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Weder vor noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

München, im Mai 2009

Stefan Dreher

CURRICULUM VITAE

Stefan Dreher
Dipl. -Biol. (univ.)

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 19. April, 1980
Geburtsort: Starnberg
Familienstand: Ledig
Nationalität: Deutsch

AUSBILDUNG

- seit 07/2005 **Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene**
Technische Universität München
Institutsdirektor: Prof. Dr. Dirk Busch
Doktorarbeit (Dr. rer. nat.) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Carsten Kirschning.
Titel der Arbeit:
„Die Rolle von STAT3 in der TLR vermittelten Signalkaskade“
- 10/2000 - 06/2005 **Technische Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan**
Studium der Biologie
Fachrichtungen: Biochemie, Immunologie und Genetik
Abschluss: Dipl.-Biol. (univ.) (Gesamtnote: 1,3)
Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TUM, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Carsten Kirschning
Titel der Arbeit:
„Charakterisierung von durch Toll-like Rezeptor (TLR) 2 vermittelten intrazellulären Signalen“
- 07/1999 - 04/2000 **Deutsche Luftwaffe**
Wehrdienst
 - Grundausbildung bei der 12. Kompanie, 3 LAR, Germersheim
 - Verwendung als Flugbetriebsspezialist bei der 1. Staffel Lufttransportgeschwader 61, Penzing
- 09/1990 - 07/1999 **Christoph-Probst Gymnasium Gilching**
Allgemeine Hochschulreife (Gesamtnote: 1,4)

PRAKTIKA

04/2003 - 06/2003

Institut für EntwicklungsgenetikArbeitsgruppe für Molekulare Augenentwicklung von Prof. Dr. Graw
Helmholzzentrum, Neuherberg

Praktikum der Genetik

- Identifikation und Charakterisierung von Kataraktmutanten ENU-mutierter Mäuse

08/2003 - 10/2003

Lehrstuhl der Biotechnologie

Technische Universität München, Garching

Praktikum der Biochemie

- Analyse der *small heat shock* Proteine sHsp 26 und sHsp 42

SPEZIELLE KENNTNISSE

Molekularbiologische und biochemische Arbeitsmethoden:

DNA-Subklonierung, PCR, Mutagenese-PCR, Proteinisierung, SDS-PAGE, Immunoblot Analyse, Co-Immunopräzipitation, Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC), Konfokale Mikroskopie, Planung und Durchführung von Luciferase-gestützten Reporter-Gen-Assays, Hefe-Zwei-Hybrid-Screening, Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

Zellkultur:

Allgemeine Zellkulturmethoden, Transiente und stabile Transfektion von Zelllinien, Retrovirale Transduktion von murinen Knochenmarksmakrophagen, Generierung primärer aus murinem Knochenmark differenzierter Makrophagen und Dendritischer Zellen

Immunologie:

ELISA, Durchflusszytometrie (FACS), Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

SPRACHEN

Deutsch (Muttersprache), Englisch (fließend in gesprochener und geschriebener Form), Französisch (Schulwissen)

EDV-KENNTNISSE

MS Office, Adobe Illustrator, Adobe Photoshop, FlowJo

PUBLIKATIONEN

Dreher S, Ferstl R, Schmitz F, Rothe M, Mages J, Spiller S, Dechow T, Reed JC, Greten F, Förster I, Lang R, Wagner H und Kirschning CJ.

A TLR/STAT3/PAI-2 pathway involving STAT3-S727 phosphorylation through mTOR controls ASC dependent inflammasome activation.

Publikation in Arbeit.

Böldicke T*, **Dreher S** *, Maaß B, Fichte S, Chade J, Köster M, Noack A, Lindenmaier W, Wagner H, Kirschning CJ. * contributed equally.

Transduced anti-TLR2 intrabody inhibits macrophage surface TLR2 expression and TLR2-driven cell activation.

Publikation in Arbeit.

Schmitz F, Heit A, **Dreher S**, Tittel K, Mages J, Haas T, Krug A, Janssen KP, Kirschning CJ und Wagner H.

Mammalian target of rapamycin (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells.

Eur. J. Immunol. 2008. 38: 2981-2992

Spiller S, Elson G, Ferstl R, **Dreher S**, Mueller T, Freudenberg M, Daubeuf B, Wagner H, Kirschning CJ.
TLR4-induced IFN- γ production increases TLR2 sensitivity and drives Gram-negative sepsis in mice.

J Exp Med. 2008 Aug 4;205(8):1747-54. Epub 2008 Jul 21.

Ferstl R, Spiller S, Fichte S, **Dreher S** and Kirschning CJ.

Experimental models of acute infection and Toll-like receptor driven Septic Shock in “Toll-like receptors”

(McCoy, C.E and O’Neill, L.A.J., ed., 2008) Humana, Totowa, NJ.

Spiller S, **Dreher S**, Meng G, Grabiec A, Thomas W, Hartung T, Pfeffer K, Hochrein H, Brade H, Bessler W, Wagner H, Kirschning CJ.

Cellular recognition of trimyristoylated peptide or enterobacterial lipopolysaccharide via both TLR2 and TLR4.

J Biol Chem. 2007 May 4;282(18):13190-8. Epub 2007 Mar 12.

PRÄSENTATIONEN

09/2008 Vortrag bei dem *Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies*, Wien, Österreich
‘STAT3 serine 727 phosphorylation upon activated TLR binding promotes via MyD88/TRIF safekeeping of IL-1beta’

03/2007 Vortrag bei dem jährlichen Treffen der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Arbeitsgruppe Infektionsbiologie, Burg Rothenfels, Deutschland
‘Stat3 - TLR2 interaction and rapid STAT3 Serine phosphorylation upon TLR specific challenge’

WEITERE INTERESSEN

Photografie, Luftfahrt, Archäologie, Reisen

München, den 15. Mai 2009