

**Massenspektrometrische Identifikation  
neuer Interaktionspartner des IL-1/TLR  
Signaltransduktionsweges**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

genehmigte

**DISSERTATION**

von

**Tobias Benjamin Schuster**

aus Pforzheim

Dekan:

Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referentin:

Prof. Dr. Doris Wedlich

Co-Referent:

Prof. Dr. Michael Neumaier

Tag der mündlichen Prüfung:

18. April 2012



Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Institut für Klinische Chemie der Universitätsmedizin Mannheim, Medizinische Fakultät der Universität Heidelberg in der Zeit von Mai 2006 bis Juli 2010 durchgeführt.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Tobias Schuster, 06. März 2012

„Zum Forschen gehört Glück,  
zum Erfinden Geist,  
und beide können beides nicht entbehren.“

*Johann Wolfgang von Goethe*

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Tobias B. Schuster, Victor Costina, Peter Findeisen, Michael Neumaier, Parviz Ahmad-Nejad. 2011. Identification and functional characterization of 14-3-3 in TLR2 signaling. *Journal of Proteome Research*. 2011 Oct 7;10(10):4661-70.

---

## Abkürzungsverzeichnis

AP-1	<i>Activator protein-1</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IFN	Interferon
IKK	I $\kappa$ B Kinase
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucin-rich-repeat</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response protein 88</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
Oligo dT	Oligonukleotid-Primer

## Abkürzungsverzeichnis

Pam <sub>3</sub> CysSK <sub>4</sub>	synthetisches Lipopeptid
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
Poly (I:C)	<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PKC	Proteinkinase
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
AS	<i>antisense</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR
S	<i>sense</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ssRNA	Einzelstrang-RNA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TEMED	(N,N,N',N')-Tetraethylethylendiamin
TIRAP	<i>TIR domain-containing adapter protein</i>
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adapter molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter inducing interferon-β</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN-20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat

Nicht angegebene Abkürzungen für physikalische Größen und deren Einheiten entsprechen dem SI-System.

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>ii</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>2</b>
1.1 Das Immunsystem .....	2
1.2 Das angeborene Immunsystem .....	2
1.3 Das adaptive Immunsystem.....	4
1.4 Pathogen Recognition Receptors (PRR) .....	6
1.5 Toll-like Rezeptoren .....	7
1.6 Struktur der TLR.....	8
1.7 TLR2, TLR1, TLR6.....	9
1.8 TLR4.....	10
1.9 TLR9.....	11
1.10 Weitere TLR.....	12
1.11 TLR-Signaltransduktionswege .....	15
1.12 MyD88-abhängiger Signaltransduktionsweg.....	16
1.13 MyD88-unabhängiger / TRIF-abhängiger Signaltransduktionsweg.....	18
1.14 PI3K-Akt Signaltransduktionsweg .....	18
1.15 Negative Regulation des TLR-Signaltransduktionsweges .....	19
1.16 TLR-bedingte Krankheiten.....	19
1.17 Massenspektrometrie zur Identifikation von Proteinen.....	20
1.17.1 Grundlagen der Massenspektrometrie.....	22
1.17.2 MALDI-TOF.....	23
1.17.3 ESI-Elektrospray Ionisation.....	25
1.17.4 Orbitrap-Massenspektrometer.....	26
1.17.5 Identifikation von Peptiden und Proteinen.....	27
1.17.6 Tandem-Massenspektrometrie .....	28
<b>2 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>30</b>
<b>3 Materialien.....</b>	<b>32</b>
3.1 Geräte.....	32
3.2 Glaswaren.....	34
3.3 Verbrauchsmaterialien .....	34
3.4 Bakterienstämme.....	35
3.5 Antikörper.....	35
3.6 Chemikalien.....	36
3.7 TLR-Liganden.....	38
3.8 Enzyme .....	38

3.9	Kits.....	39
3.10	Oligonukleotide.....	39
3.10.1	PCR-Klonierungen.....	39
3.10.2	Mutagenese.....	40
3.10.3	Sequenzierungsprimer.....	40
3.11	Vektoren.....	41
3.12	Längenstandards.....	42
3.13	Lösungen.....	42
3.14	Zellkultur.....	44
3.15	Zelllinien.....	44
<b>4</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>45</b>
4.1	Molekularbiologische Methoden.....	45
4.1.1	Isolation von RNA.....	45
4.1.2	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	46
4.1.3	Reverse Transkription (RT) und cDNA-Synthese.....	46
4.1.4	Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente.....	46
4.1.5	DNA-Restriktionsanalyse.....	48
4.1.6	Analytische Flachbett-Gelelektrophorese.....	49
4.1.7	Präparative Flachbett-Gelelektrophorese.....	50
4.1.8	Dephosphorylierung linearer DNA am 5'-Ende.....	50
4.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	50
4.1.10	Topo-TA-Klonierung.....	51
4.1.11	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	51
4.1.12	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	52
4.1.13	Anzucht transformierter Bakterien.....	52
4.1.14	Isolation bakterieller Plasmid-DNA im Klein- und Mittelmaßstab.....	52
4.1.15	DNA-Sequenzanalyse.....	54
4.1.16	Klonierung.....	56
4.1.17	Gerichtete Mutagenese.....	56
4.2	Zellbiologische und biochemische Methoden.....	58
4.2.1	Kultivierung und Passagieren von humanen HEK293-Zellen.....	58
4.2.2	Kultivierung und Passagieren von murinen RAW264.7-Zellen.....	58
4.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	59
4.2.4	Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätstest.....	59
4.2.5	Transfektion eukaryotischer Zelllinien.....	59
4.2.6	Reportergen-Analyse in Zellkultur.....	61

## Inhaltsverzeichnis

4.2.7	Immunfluoreszenzfärbung von HEK293-Zellen .....	62
4.2.8	Konfokales Mikroskopie .....	62
4.2.9	Durchflusszytometrie .....	62
4.2.10	Multiplex-Bead-Assay zur Messung von Zytokinen .....	65
4.2.11	Proteinextraktion aus Gewebekulturzellen.....	66
4.2.12	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	66
4.2.13	Isolierung von Proteinkomplexen mittels Affinitätschromatographie. ....	67
4.2.14	Immunpräzipitation .....	69
4.2.15	Konzentrierung von Proteinlösungen.....	69
4.2.16	Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE.....	70
4.2.17	Western Blot .....	71
4.2.18	Strippen von Western Blot-Membranen .....	72
4.2.19	Coomassie-Färbung.....	72
4.2.20	In-Solution Trypsinverdau .....	76
4.2.21	ZipTip®-C18-Peptidaufreinigung.....	76
4.3	Massenspektrometrie.....	77
4.3.1	Messung mit MALDI-TOF-MS .....	77
4.3.2	Proteinidentifikation durch „ <i>Peptide Mass Fingerprinting</i> “ .....	78
4.3.3	Nano-ESI-MS/MS.....	78
4.3.4	Orbitrap.....	79
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>81</b>
5.1	Identifikation neuer Interaktionspartner von MyD88.....	81
5.1.1	MALDI-MS-Ergebnisse des MyD88-Signalkomplexes.....	83
5.1.2	ESI-MS-Ergebnisse des MyD88-Signalkomplexes .....	85
5.2	Identifikation neuer Interaktionspartner von TLR2 .....	86
5.2.1	Identifikation von TLR2-Interaktionspartner mit MALDI-TOF-MS..	87
5.2.2	Funktionelle Charakterisierung von TRAF3IP3.....	88
5.2.3	Identifikation von TLR2-Interaktionspartner mit ESI-MS.....	96
5.2.4	Funktionelle Charakterisierung von 14-3-3 .....	97
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>108</b>
6.1	Identifikation neuer Interaktionspartner von MyD88.....	109
6.2	Identifikation von Interaktionspartner von TLR2.....	110
6.2.1	Identifikation von TRAF3IP3 als Interaktionspartner des TLR2-Signaltransduktionsweges.....	111

6.3 Identifikation von 14-3-3 als Interaktionspartner der TLR-Signaltransduktionswege .....	113
<b>7 Zusammenfassung.....</b>	<b>124</b>
<b>8 Summary .....</b>	<b>125</b>
<b>9 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>126</b>
<b>10 Danksagung.....</b>	<b>146</b>
<b>Publikationen.....</b>	<b>148</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>150</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

**D**as Immunsystem schützt den Organismus vor Krankheitserregern, deren verursachten Gewebeschädigungen und andere schädliche Substanzen. Zum Schutz des Organismus vor Krankheiten muss das Immunsystem eine Infektion von Mikroorganismen wie Bakterien und Pilzen aber auch Viren, Parasiten und fehlerhafte eigene Zellen erkennen. Zu den Aufgaben des Immunsystems der Wirbeltiere gehören das Erkennen einer Infektion, als Reaktion darauf die Immunantwort, die Regulierung dieser Immunreaktion sowie das immunologische Gedächtnis. Die Immunabwehr wird dabei in zwei grundlegend verschiedene Mechanismen unterteilt, das angeborene und das adaptive Immunsystem. Beide Teile des Immunsystems sind über komplexe Mechanismen miteinander verbunden. Das adaptive Immunsystem wird aktiviert, wenn die natürlichen Abwehrmechanismen der angeborenen Immunantwort alleine dem Angreifer nicht gewachsen sind.

## 1.2 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene, oder innate Immunsystem ist evolutionär älter und in einfachen Organismen bis hin zu höheren Wirbeltieren zu finden. Es dient der ersten Abwehr und ist durch schnelle Effektor-Mechanismen zur Elimination von Infektionen charakterisiert. Reicht dieses System der Verteidigung nicht aus, wird die komplexe, anpassungsfähige, so genannte adaptive Immunabwehr, die sich in Wirbeltieren entwickelt hat, ausgelöst (Janeway & Medzhitov 2002). Hierbei werden Krankheitserreger gezielt durch antigenspezifische Effektorzellen bekämpft.

Als erster Bestandteil des angeborenen Immunsystems bilden die Epithelien der Haut und der Schleimhäute physikalische Barrieren und bieten Schutz vor invasiven Organismen.

Ein saurer pH-Wert im Magen und Verdauungsenzyme, Gallen- und Fettsäuren im oberen Intestinaltrakt schaffen chemische Hindernisse für Infektionen. In der Darmschleimhaut werden zudem antimikrobielle Substanzen wie z. B. Lysozyme und Defensine zum Schutz vor Mikroorganismen gebildet.

Eine Schlüsselrolle im angeborenen Immunsystem nehmen Makrophagen und Neutrophile Granulozyten, sogenannte Phagozyten, ein. Sie erkennen, phagozytieren, verdauen und beseitigen die meisten Krankheitserreger, wenn diese die Epithelbarrieren überwinden. Dabei erkennen sie Pathogene als körperfremde Zellen in erster Linie über verschiedene Keimbahn-codierte Oberflächenrezeptoren, sogenannte „*Pattern Recognition Receptors*“ (PRRs). Diese unterscheiden eigene Moleküle von pathogen-assoziierten molekularen Mustern (engl. *Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) von Krankheitserregern, konservierte Strukturen, die einem breiten Spektrum an Mikroorganismen gemeinsam sind. Bei den PAMPs handelt es sich z. B. um mikrobielle Zellmembranmoleküle wie Lipopolysaccharide (LPS), Flagellin, Lipoteichonsäure und Peptidoglykane, sowie bakterielle und virale Nukleinsäuren. Zusätzlich setzen Phagozyten nach Erkennen der Pathogene Zytokine und Chemokine frei, die weitere Effektorzellen anlocken und eine lokale Entzündung auslösen. Dabei wird unter anderem die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf Makrophagen und Dendritischen Zellen induziert, die diesen Antigen-präsentierenden Zellen ermöglicht, die adaptive Immunantwort zu aktivieren.

Die Freisetzung von Zytokinen durch immunkompetente Zellen löst auch die Akute-Phase-Reaktion aus (Cecilian et al. 2002). Dazu gehört z. B. die Erhöhung der Körpertemperatur durch eine Induktion der Expression von Prostaglandin E<sub>2</sub>. Eine wichtige Reaktion ist die Synthese von Akute-Phase-Proteinen wie das C-Reaktive Protein oder das Mannose-bindende Lektin. Sie binden an eine breite Reihe von Pathogenen, agieren dabei als Opsonine für Phagozyten und aktivieren das Komplementsystem. Das Komplementsystem, das aus vielen Plasma-Proteinen besteht, löst nach Aktivierung eine Kaskade von Reaktionen aus und attackiert die Zellmembran von Pathogenen, was zu deren Lyse führt (Frank & Fries 1991).

Von Viren infizierte Zellen sezernieren Interferone, die die virale Replikation inhibieren und NK-Zellen (natürliche Killerzellen) aktivieren (Kawai & Akira 2006). NK-Zellen gehören zu den Lymphozyten, besitzen aber keine Antigen-spezifische Rezeptoren und zählen zum angeboren Immunsystem. Sie zerstören Virus-infizierte Zellen durch Freisetzung von zytotoxischen Granula, die in den Zielzellen Apoptose induzieren und beeinflussen durch Sekretion von Interferon  $\gamma$  die anschließende klonale Expansion Antigen-spezifischer T-Zellen des adaptiven Immunsystems (Warren & Smyth 1999; Scharton & Scott 1993).

Die Vielzahl der Signalwege, die durch das angeborene Immunsystem beeinflusst werden, führen zu einer multifunktionalen Immunantwort, welche die Feinabstimmung des angeborenen und des adaptiven Immunsystems ermöglicht (Brown et al. 2011).

### **1.3 Das adaptive Immunsystem**

Das adaptive Immunsystem, oder auch erworbenes Immunsystem genannt, hat sich phylogenetisch in unseren Wirbeltier-Vorfahren entwickelt (Cooper & Alder 2006). Seine Merkmale sind Spezifität und Gedächtnis, diese Eigenschaften ermöglicht es, nahezu jedes potentielle Antigen zu erkennen und diese Fähigkeit teilweise ein Leben lang beizubehalten. Dieses immunologische Gedächtnis erhöht den Schutz vor einer Reinfektion und sorgt dafür, dass eine Impfung über Jahrzehnte hinweg aufrechterhalten werden kann.

Wesentliche Bestandteile des adaptiven Immunsystems sind die Lymphozyten. Sie tragen an ihrer Oberfläche Rezeptoren, Immunglobuline bei B-Lymphozyten und T-Zell-Rezeptoren bei T-Lymphozyten, die eine Vielzahl an möglichen Antigenstrukturen erkennen können und gezielt zelluläre Abwehrmechanismen und spezifische Antikörper bilden. Diese Vielfalt der Antigen-Rezeptoren beruht auf genetischer somatischer Rekombination der antigenerkennenden Abschnitte.

Man unterscheidet beim adaptiven Immunsystem die humorale Immunantwort, welche Antikörper produziert, und die zelluläre Immunantwort, die infizierte Zellen tötet. Bei der humoralen Immunantwort werden Antikörper durch B-Lymphozyten gebildet. Die Bindung eines Antigens mit passendem Epitop an einen membranständigen Immunglo-

bulin-Rezeptor eines B-Lymphozyten aktiviert die Zelle und regt sie zur Teilung an. In dieser klonalen Selektion differenzieren sich die meisten Zellen zu Plasmazellen, den Effektorzellen, die Antikörper sezernieren. Einige Zellen entwickeln sich zu B-Gedächtniszellen, die im Körper Jahrzehnte überdauern und bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen sofort aktiviert werden und weitere Effektorzellen hervorbringen. Sezernierte Antikörper haben mehrere Wirkungen. Zum einen neutralisieren sie Antigene: Durch Bindung an das Antigen blockieren sie seine toxische Wirkung oder verhindern das Eindringen von Bakterien und Viren in Zellen. Zum anderen werden Krankheitserreger und Fremdpartikel durch das Binden von Antikörpern an Antigenen auf deren Oberfläche „opsonisiert“, d.h. für Phagozyten zur Eliminierung durch Phagozytose kenntlich gemacht. Außerdem aktivieren Antikörper das Komplementsystem, ein System von Plasmaproteinen, die Entzündungsreaktionen auslösen, Phagozyten anlocken und z. B. Bakterien direkt durch Einfügen von Poren in deren Zellmembran zerstören.

Im Unterschied zur humoralen Immunantwort richtet sich die zelluläre Immunantwort gegen Antigene, die in Zellen des Wirtsorganismus auftreten. So können auch virusinfizierte oder mutierte Körperzellen erkannt und zerstört werden. Daran beteiligt sind T-Lymphozyten. Deren Aktivierung setzt voraus, dass bei einer virusinfizierten oder mutierten Zelle die fremden oder anomalen Proteinfragmente an der Oberfläche, assoziiert mit MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse I-Molekülen, präsentiert werden. Die zytotoxischen T-Zellen ( $T_C$ -Zellen) können die Antigenfragmente mithilfe ihrer T-Zell-Rezeptoren erkennen. Sie proliferieren und bilden Klone. Bei erneutem Erkennen des prozessierten Antigen-MHC-Klasse I-Protein-Komplexes mit dessen T-Zell-Rezeptors setzt die  $T_C$ -Zelle das Protein Perforin frei, das die Zielzelle in den programmierten Zelltod treibt. Die T-Helfer Zellen ( $T_H$ -Zellen) unterstützen, sowohl die zelluläre, als auch die humorale Immunantwort. Die Typ1-T-Helferzellen ( $T_H1$ ) aktivieren durch Ausschüttung von Zytokinen Makrophagen.  $T_H2$ -T-Helferzellen spielen bei der Erkennung von prozessierten Antigenen eine wichtige Rolle und aktivieren die Proliferation von B-Zellen durch ausgeschüttete Zytokine.

Eine wichtige Rolle für die Regulation der Immunantwort spielen regulatorische T-Zellen ( $T_{Reg}$ ) und damit auch für das Gleichgewicht zwischen Elimination von Krankheitserre-

gern und Krebszellen, sowie für die Unterdrückung der Autoimmunität gegen normales Gewebe (Geuking et al. 2011).

#### 1.4 Pathogen Recognition Receptors (PRR)

Die PRRs des angeborenen Immunsystems erkennen Pathogene über deren PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) und können sehr schnell auf eine große Anzahl unterschiedlichster Infektionserreger reagieren. Es werden funktionell drei Klassen von PRRs unterschieden: sezernierte, endozytierende und signaltransferierende PRRs (Janeway & Medzhitov 2002). Zu den sezernierten PRRs gehört z. B. das Mannose-bindende Lektin, das als Oponin wirkt, indem es an mikrobielle Zellwände bindet und diese damit für das Komplementsystem und Phagozyten markiert (Fraser et al. 1998). Die endozytierende PRRs sind membrangebundene Rezeptoren auf Phagozyten, die nach Erkennung bestimmter mikrobieller Moleküle die Aufnahme und Zerstörung der Pathogene initiieren. Zu dieser Gruppe gehören z. B. Scavenger-Rezeptoren oder C-Typ Lektin-Rezeptoren (Akira et al. 2006). Hierbei werden auch verschiedene Zytokine und Effektoren freigesetzt (Medzhitov & Janeway Jr 2000). Die dritte Klasse von PRRs ist durch die Fähigkeit charakterisiert, die Information der Pathogenerkennung ins Innere der Zelle weiterzuleiten und mit Hilfe von Signaltransduktionskaskaden die Expression verschiedener Gene der Immunantwort zu induzieren. Hierzu zählen die NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-like Rezeptoren und RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1 protein*)-ähnliche Proteine. NALP (*NACHT, LRR and PYD domains-containing protein*) ist eine Familie von NOD-like Rezeptoren die Peptidoglykane von Pathogenen erkennt. Daneben gehören auch die Toll-like Rezeptoren (TLR) zu dieser Gruppe (Medzhitov 2001). Sie nehmen eine Schlüsselrolle im angeborenen Immunsystem wahr. Die Erforschung der Signaltransduktionswege der TLR ist weiterhin ein wichtiger Schwerpunkt in der Untersuchung der Aktivierung der innate Immunantwort während einer Infektion (O'Neill 2006). Die Aufklärung dieser Signalwege ist Gegenstand dieser Arbeit.

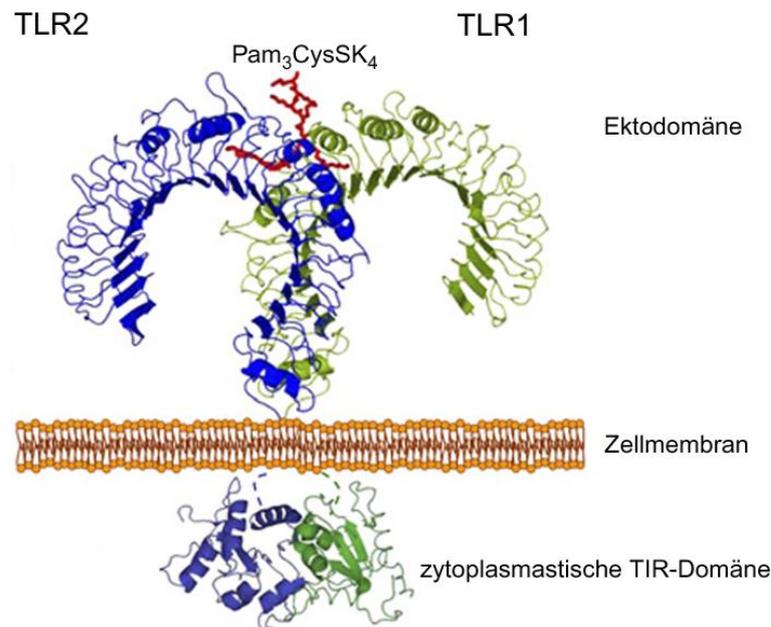
## 1.5 Toll-like Rezeptoren

Die Toll-like Rezeptoren (TLR) der Säugetiere gehören zu einem stammesgeschichtlich ursprünglichen System der Signalübertragung, welches nach der Entdeckung des Proteins Toll 1984 in *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde. Toll spielt eine essentielle Rolle in der Steuerung der dorso-ventralen Polarität in der Embryonalentwicklung (Anderson et al. 1985). Später wurde die Funktion des Toll-Rezeptors in adulten Fliegen im angeborenen Immunsystem erkannt, nachdem *Drosophila* mit Toll-Mutationen anfällig für Pilzinfektionen war (Lemaitre et al. 1996). Homologe zu Toll wurden dann auch in anderen Spezies von Pflanzen bis zu Säugetieren gefunden und Toll-like Rezeptoren (TLR) genannt. Der Signalweg von Toll scheint in vielen Spezies konserviert zu sein, so zeigt der Vergleich von *Drosophila* und Säugetieren-Signalweg der Toll-like Rezeptoren zahlreiche Homologien. In *Drosophila* führt die Stimulation von Toll zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der Rel-Familie wie z. B. *Dorsal-related immunity factor* (DIF) oder Dorsal, was wiederum, wie der humane homologe Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor-kappa B*), die Transkription von Genen zur Immunantwort induziert (LeMosy et al. 1999; Anderson 2000). Eine Pilzinfektion führt bei *Drosophila* zu einer Spaltung des extrazellulären Polypeptids Spätzle durch eine Serinprotease, das als endogener Ligand für den Toll-Rezeptor dient. Intrazellulär werden Signalproteine aktiviert wie der Adapter dMyD88 und die Kinasen Pelle und Cactus, was zur Induktion von antimikrobiellen Proteinen führt (Lemaitre et al. 1996; Royet et al. 2005).

Beim Menschen wurden bisher zehn und bei der Maus zwölf TLR gefunden. Jeder Toll-like Rezeptor erkennt unterschiedliche pathogene Molekülstrukturen. TLR1 bis TLR9 erkennen bei Mensch und Maus die gleichen PAMPs, TLR10 ist in der Maus aufgrund einer Retrovirusinsertion nicht funktionell, TLR11, TLR12 und TLR13 kommen nur noch in der Maus vor (Beutler 2004; Takeda et al. 2003). Die einzelnen TLR und ihre Liganden werden in den nächsten Kapiteln vorgestellt. Die TLR erkennen PAMPs an der Plasmamembran und verschiedene Zellkompartimente wie Endosomen, Lysosomen und Endolysosomen (Akira et al. 2006).

## 1.6 Struktur der TLR

Alle TLR gehören zu den Typ I Transmembranrezeptoren und sind charakterisiert durch eine glykosylierte extrazelluläre Domäne, eine transmembrane Region und eine evolutionär konservierte intrazelluläre Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne (Gay et al. 2006). Die hufeisenförmige extrazelluläre Domäne der Vertebraten besteht aus 16 bis 28 Leucin-reichen Regionen (LRRs) von je 24 bis 29 Aminosäuren lange Konsensussequenz, deren Kern das konservierte Motiv  $LxxLxLxxNxLxxLxx-xxF/LxxLxx$  und manchmal kurze Motive wie  $LxxLxLxxNxLxxLPx(x)LPxx$  enthält (Matsushima et al. 2007). In dem Motiv steht das x für jede beliebige Aminosäure, „L“ für die Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin oder Phenylalanin, „N“ für Asparagin, Threonin, Serin oder Cystein, „F“ für Phenylalanin und P für Prolin). Der Kern jeder LRR nimmt eine  $\beta$ -Faltblattstruktur ein und trägt zur konkaven Form der extrazellulären Domäne bei. Kristallstrukturanalysen von extrazellulären Domänen mehrerer TLR ergaben Erkenntnisse wie verschiedene PAMPs als Liganden für TLR dienen (Jin und Lee, 2008).



**Abbildung 1: Modell eines Liganden-induzierten Heterodimers von Toll-like Rezeptoren.**

Hier ist die Bindung von Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (rot) an TLR2 (blau) und TLR1 (grün) dargestellt (Jin et al. 2007). Die hufeisenförmige Ektodomäne besteht aus Leucin-reichen Regionen (LRRs), sie erkennt Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs), die zyttoplasmatische Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne ist für die Weitergabe des Signals an Adapterproteine verantwortlich.

Bei der Detektion der Liganden bilden einige TLR Homo-oder Heterodimere. Zum Beispiel sind Heterodimere von TLR1/TLR2 durch eine Acyl-Gruppe des Liganden Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> verbunden, der sich in die hydrophoben Strukturen der LRR 9-12 einfügt (siehe Abbildung 1) (Jin et al. 2007). Der Ligand für TLR3, doppelsträngige RNA, wird dagegen an zwei positiv geladene Oberflächenstrukturen gebunden (Liu et al. 2008). Die TIR-Domäne weist deutliche Homologien mit dem Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R) auf und ist für die Weitergabe der Signale innerhalb der Zelle über die Interaktion mit einer komplexen Signaltransduktionskaskade verantwortlich (O'Neill & Greene 1998).

### 1.7 TLR2, TLR1, TLR6

Als Liganden für TLR2 wurden Lipoproteine und Lipopeptide von verschiedenen Organismen identifiziert (Aliprantis et al. 1999; Brightbill et al. 1999; Takeuchi et al. 2000). Lipoproteine kommen in zahlreichen Lebewesen und Viren vor, unter anderem auch in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien und Mykoplasmen. Außerdem erkennt TLR2 eine große Anzahl unterschiedlicher Zellwandbestandteile verschiedener Pathogene wie Peptidoglykane Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien (Schwandner et al. 1999; Takeuchi et al. 1999), Lipoteichonsäure Gram-positiver Bakterien (Schröder et al. 2003), Zymosan von Hefepilzen (Underhill et al. 1999), das Glycolipid Lipoarabinomannan (LAM) von Mycobakterien (Means et al. 1999), OspA (*outer surface protein A*) von *Borrelia burgdorferi* (Bas et al. 2010) und Porin von *Haemophilus influenzae* (Galdiero et al. 2004). Während enterobakterielle Lipopolysaccharide (LPS) von TLR4 erkannt werden, aktiviert LPS von *Leptospira interrogans* (Werts et al. 2001), *Porphyromonas gingivalis* (Hirschfeld et al. 2001), *Rhizobium* Arten und *Legionella pneumophila* (Girard et al. 2003) ebenso den TLR2-Signaltransduktionsweg wie LPS von *Bacteroides fragilis*, *Chlamydia trachomatis* und *Pseudomonas aeruginosa* (Erridge et al. 2004). TLR2 erkennt von eukaryotischen Parasiten z. B. den Glycosylphosphatidylinositol-Anker von *Trypanosoma cruzi* (Campos et al. 2001), Lyso-Phosphatidylserin von *Schistosoma mansoni* (van der Kleij et al. 2002) und Lipophosphoglykan von *Leishmania major* (Kavoosi et al. 2010). Endogene Agonisten von TLR2 sind z. B. Hitzeschockproteine HSP70, HSP60 oder Gp96 (Vabulas, Ahmad-Nejad, et al. 2002; Vabulas et al. 2001; Vabulas, Braedel, et al. 2002).

TLR2 ist zusätzlich an der Abwehr von Viren beteiligt. Der Zytomegalievirus (CMV) aktiviert die Immunantwort über TLR2 zusammen mit CD14 (Compton et al. 2003). Hämagglutinin des Masern-Virus wird von TLR2 erkannt (Bieback et al. 2002). TLR2 ist außerdem für die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen als Antwort auf Herpes-simplex-Virus (Aravalli et al. 2005) und Varizella-Zoster-Virus (Wang, Kurt-Jones, et al. 2005) erforderlich. Die Liganden von TLR2 und den anderen TLR sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Diese große Bandbreite an verschiedenen PAMPs, die von TLR2 erkannt werden, lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass TLR2 Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 bildet. Dabei erkennt TLR1/2 triacetylierte Lipoproteine (Takeuchi et al. 2002) wie auch den synthetischen Ligand Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>, wohingegen es zur Immunantwort auf diacetylierte Lipoproteine und Peptidoglycane von Mycoplasmen die Dimerisierung von TLR2 und TLR6 erfordert (Takeuchi et al. 2002). Neben TLR2 wurden in dieser Arbeit auch die Signaltransduktionswege von TLR4 und TLR9 untersucht.

### 1.8 TLR4

Auf der Suche nach humanen homologen Genen zu Toll von *Drosophila* wurde TLR4 als erster Toll-like Rezeptor identifiziert und ist daher besonders gut charakterisiert (Medzhitov et al. 1997). Bei LPS-resistenten Mausstämmen C3H/HeJ und C57BL/10ScCr wurde eine Mutation im TLR4-Gen gefunden (Poltorak et al. 1998). Nach Transfektion von Zellen mit TLR4 konnten diese durch LPS stimuliert werden und TLR damit als Rezeptor für bakterielles LPS nachgewiesen werden (Chow et al. 1999).

Lipopolysaccharide (LPS, Endotoxin) sind Bestandteile der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. LPS wird von TLR4, im Komplex mit dem LPS-Bindeprotein (LBP), CD14 und MD-2 erkannt. Dabei assoziiert LPS mit LBP, das es an den Rezeptor CD14 überträgt (Schumann et al. 1990; Wright et al. 1990). Dieser überträgt es wiederum an MD-2 im Komplex mit TLR4 und führt zu einer Homo-Dimerisierung von TLR4 und der Initiierung der Signaltransduktion (Raetz et al. 2006; Viriyakosol et al. 2006).

Als weitere TLR4-Liganden wurden endogene Moleküle wie HMGB1 (*high mobility group box 1 protein*), 60 kDa Hitzeschock-Protein (HSP60), HSP70, Hyaluronsäure-Oligosaccharide, Fibrinogen oder andere von Pathogenen stammende Liganden wie Pneumolysin von *Streptococcus pneumoniae* und HSP60 von *Chlamydia pneumoniae* identifiziert (Gay & Gangloff 2007).

TLR4 ist der einzige TLR, der alle vier bekannten TLR-Adapterproteine, TIRAP (*toll-interleukin-1 receptor domain containing adapter protein*), MyD88 (*Myeloid differentiation primary response protein 88*), TRIF (*TIR-domain-containing adapter inducing interferon- $\beta$* ) und TRAM (*TRIF-related adapter molecule*) zur Signaltransduktion verwendet. Die Aktivierung von TLR4 führt zur Bindung von zwei verschiedenen Adapterproteinpaaren, TIRAP/MyD88 und TRIF/TRAM, wobei TIRAP und TRIF hier als Bindemolekül für MyD88 und TRAM fungieren. Hierbei werden unterschiedliche Signalwege aktiviert, die sich in ihrem induzierten Expressionsprofil an Genen unterscheiden (O'Neill & Bowie 2007). Die Signalwege werden im Kapitel 1.12 bis 1.14 genauer beschrieben. Nach der Bindung von TIRAP und MyD88 und dem Auslösen der initialen Aktivierung von NF- $\kappa$ B und MAP (*mitogen-activated protein*) Kinasen wird TLR4 endozytiert und zu Endosomen transportiert (Kagan & Medzhitov 2006a; Rowe et al. 2006). Dort bildet er ein Signalkomplex mit TRIF und TRAM um den TRIF-abhängigen Signalweg zu initiieren, was zu einer Aktivierung von IRF3 (*Interferon regulatory factor*) und der späteren Phase der NF- $\kappa$ B-Aktivierung führt (Kagan et al. 2008; Tanimura et al. 2008). Die Aktivierung beider Signalwege ist dabei für die Induktion inflammatorische Zytokine durch TLR4 notwendig (Kawai & Akira 2010).

### 1.9 TLR9

TLR9 erkennt unmethylierte bakterielle und virale Oligodesoxynukleotide, die ein sogenannte CpG-Sequenzmotiv enthalten (Hemmi et al. 2000; Ahmad-Nejad et al. 2002). Der TLR9-abhängige Signaltransduktionsweg wird z. B. von Herpes-simplex-Virus (HSV-2) aktiviert (Lund et al. 2003). TLR9 wird im Endoplasmatischen Retikulum exprimiert und im Endosom zum reifen Protein gespalten, wo es dann CpG-DNA binden und die Signal-

transduktion über den Adapter MyD88 initiieren kann (Ahmad-Nejad et al. 2002; Ewald et al. 2008). Eine Aktivierung von TLR9 führt zur Produktion von Zytokinen wie Typ I Interferone und Interleukin-12. In Dendritischen Zellen wurde beobachtet, dass CpG-DNA zwei verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert, den NF- $\kappa$ B und den PI3K/Akt-Signalweg (Park et al. 2002). Neben bakterieller und viraler DNA kann auch DNA von dem Malaria-Erreger *Plasmodium* den TLR9 Signaltransduktionsweg aktivieren (Parroche et al. 2007; Wu et al. 2010).

### 1.10 Weitere TLR

Die restlichen TLR wurden in dieser Arbeit nicht näher untersucht und werden daher nur kurz beschrieben:

TLR3 ist in der Membran von sauren Endosomen lokalisiert und erkennt in dessen Lumen virale doppelsträngige RNA (dsRNA) (Alexopoulou et al. 2001). Er dient damit als wichtiger Detektor viraler Infektionen und Auslöser der antiviralen Immunantwort. Die Interaktion mit dsRNA führt zur Rekrutierung der TIR-Adapters TRIF, das im Zytoplasma die Signaltransduktionskaskade initiiert und downstream die Transkriptionsfaktoren IRF3, IRF7 und NF- $\kappa$ B aktiviert. Als synthetisches Analogon für dsRNA wird häufig Poly(I:C) (besteht aus Polyriboinosinsäure u. Polyribocytidylsäure) als TLR3-Ligand verwendet um virale Infektionen zu imitieren. Poly(I:C) zeigt Potential als Adjuvans für Impfstoffe (Trumfheller et al. 2008).

TLR5 erkennt Flagellin von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (Hayashi et al. 2001). Flagellin ist als Protein des Mobilitätsmotor von bakteriellen Flagellen stark konserviert und eignet sich daher gut als PAMP (Samatey et al. 2001). TLR5 bildet Homo-Dimere, es wurde aber auch schon gezeigt, dass ein heteromerer Komplex mit TLR4 möglich ist (Mizel et al. 2003). Der molekulare Mechanismus von TLR5 ist dem anderer TLR relativ ähnlich, eine Ligation mit Flagellin führt zur Homo- oder Heterodimerisierung von TLR5 was den MyD88/IRAKs/TRAF6/NF- $\kappa$ B- und MAPK-Signaltransduktionsweg aktiviert über 500 Gene transkriptionell reguliert (Buchholz & Bauer 2010). Eine verbreiteter TLR5-Stopcodon-Polymorphismus verhindert die Immun-

antwort auf Flagellin und wird assoziiert mit einer Anfälligkeit für die Legionärskrankheit (Hawn et al. 2003).

Aufgrund von Sequenzhomologien bilden TLR7, TLR8 zusammen mit TLR9 eine Unterfamilie innerhalb der TLR. Bekannte Liganden für TLR7, welche die Immunantwort induzieren sind z. B. Imidazoquinoline wie Imiquimod and Resiquimod (R848), synthetische Produkte mit potenten anti-viralen und anti-tumoralen Eigenschaften, die strukturell den Nukleinsäuren sehr ähnlich sind (Hemmi et al. 2002). Als natürliche Liganden für humane TLR8 und murine TLR7 wurde einzelsträngige Guanin und Uracil reiche RNA, wie z. B. von HIV-1, identifiziert (Heil et al. 2004). TLR7 und TLR8 spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von viralen Infektionen durch die Produktion von Typ I Interferone. Bei einer Infektion nehmen Phagozyten und Dendritische Zellen von Viren infizierte apoptotische Zellen auf und virale Partikel werden anschließend in Phagosomen von endosomalen Proteasen zerlegt und die virale RNAs freigelegt. Hier können diese RNAs an die TLR binden und Signaltransduktion auslösen (Diebold et al. 2004). Über den Adapter MyD88 werden die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B oder IRF-7 aktiviert (Hemmi et al. 2002; Lee et al. 2006). Die Erkennung der Liganden erfolgt in lysosomale Kompartimente und erfordert die Ansäuerung dieser Kompartimente. Auch wenn TLR7 und TLR8 strukturell und funktionell sehr verwandt sind wurde gezeigt, dass ihr Vorkommen in bestimmten Zellen und ihr Profil der Zytokininduktion sich unterscheiden (Gorden et al. 2005).

TLR10 assoziiert mit sich selbst, bildet auch Heterodimere mit TLR1 und TLR2 und spielt eine zentrale Rolle in der Induktion von Typ I Interferonen in plasmazytoiden Dendritischen Zellen (PDCs) (Hasan et al. 2005). Bisher konnten noch keine spezifischen Liganden für TLR10 identifiziert werden, allerdings ergab ein Protein-Liganden-Bindungs-Ansatz von Govindaraj et al. die künstlichen Moleküle PamCysPamSK<sub>4</sub> und Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> als mögliche Agonisten (Govindaraj et al. 2010). TLR10 scheint mit TLR2 in der Erkennung von PAMPs zu kooperieren, sich aber in der Funktion der Signalübertragung von der TLR2-Unterfamilie zu unterscheiden (Guan et al. 2010).

Tabelle 1: Überblick über die Mitglieder der humanen TLR-Familie und ihre Liganden.

TLR	Ligand	Quelle
<b>TLR1/TLR2</b>	Triacylierte Lipopeptide	Bakterien und Mycobakterien
<b>TLR2</b>	Lipoproteine/Lipopeptide	Bakterien
	Peptidoglycan	Gram-positive Bakterien
	Lipoteichonsäure	Gram-positive Bakterien
	Lipoarabinomannan	Mycobakterien
	Glycoinositolphospholipide	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	Glycolipide	<i>Treponema maltophilum</i>
	Porine	<i>Neisseria</i>
	Zymosan	Pilze
	Atypisches LPS	<i>Leptospira interrogans, Porphyromonas gingivalis, Legionella, Bordetella</i>
	HSP60	Endogener Ligand
	Hyaluronan	Endogener Ligand
	Virale Proteine	Herpes Simplex Virus-1 (HSV), HSV-2, Humanes Cytomegalie-Virus
<b>TLR3</b>	dsRNA Synthetische Polyinosin/ Polycytosin (Poly(I:C))	Viren
	dsRNA während viraler Replikation von ssRNA-Viren	Semliki-Forest-Virus (SFV), West-Nil-Virus (WNV)
<b>TLR4</b>	Lipopolysaccharid	Gram-negative Bakterien
	Taxol	Aus der Pazifischen Eibe ( <i>Taxus brevifolia</i> )
	Mannan	<i>Candida albicans</i>
	Glycoinositolphospholipide	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	Virales Fusionsprotein	Respiratorische Synzytial-Virus (RSV)
	HSP60	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
	HSP60 + HSP70	Endogener Ligand
	Fibrinogen	Endogener Ligand
	Fibronectin Extradomäne A	Endogener Ligand
	Surfactant Protein-A	Endogener Ligand

	Hyaluronan	Endogener Ligand
	Heparansulfat	Endogener Ligand
<b>TLR5</b>	Flagellin	Bakterien
<b>TLR6/TLR2</b>	Diacylierte Lipopeptide	Bakterien (Mycoplasmen)
<b>TLR7 und TLR8</b>	ssRNA	Viren (Influenzavirus, vesikuläres Stomatitis Virus (VSV))
	Imidazoquinoline	Synthetische, antivirale Komponente
	Loxoribine	Guanosin-Nukleotid-Analoga
	Guanosin-oder Uridin/ Guanosin-reiche ssRNA	Virus oder endogener Ligand
<b>TLR9</b>	Unmethylierte bakterielle CpG-DNA	Bakterien
	Hämозoin von Plasmodien	Apicomplexa
	Unmethylierte virale CpG-DNA	HSV-1, HSV-2; HCMV

### 1.11 TLR-Signaltransduktionswege

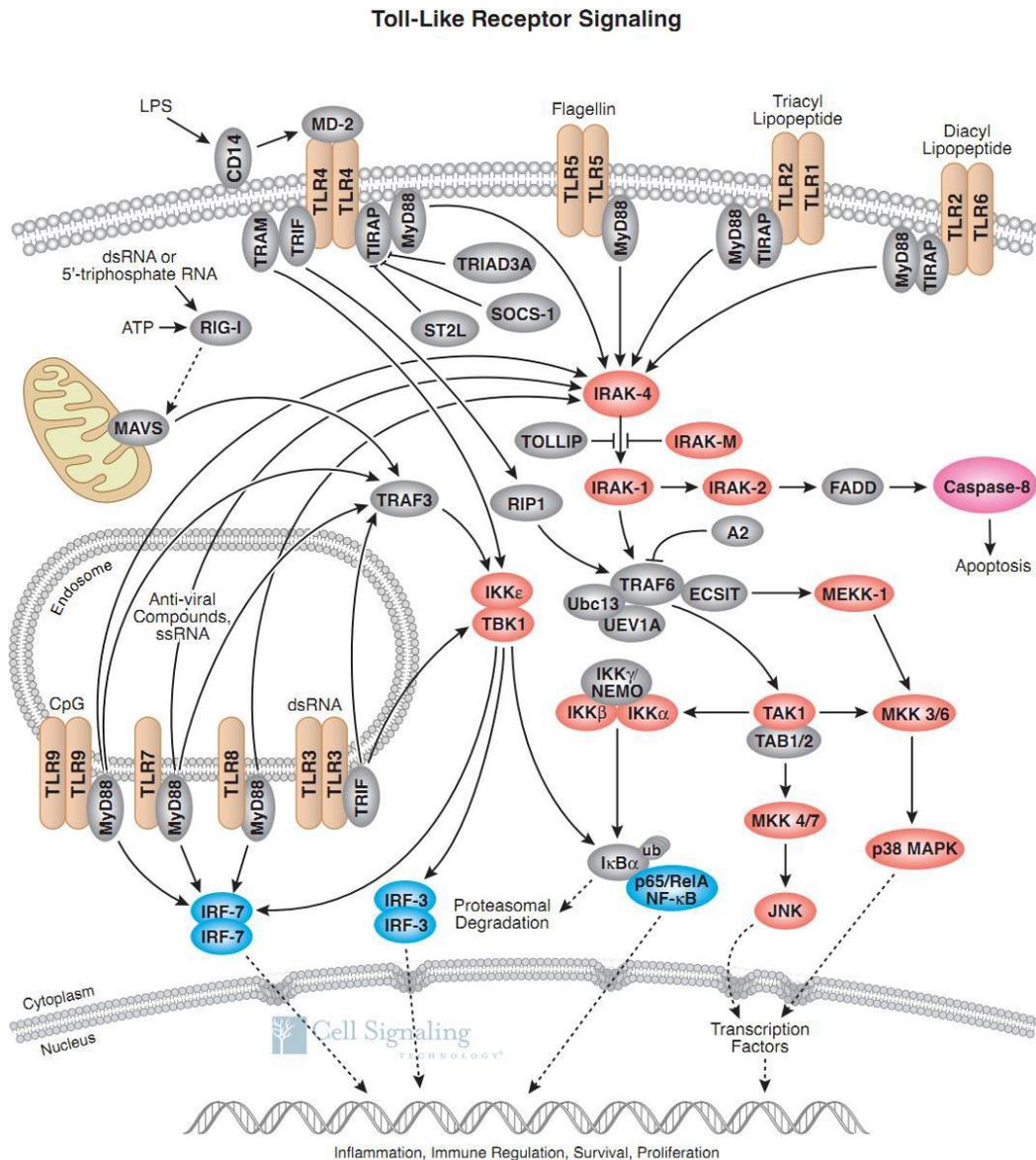
Die verschiedenen TLR induzieren nach Bindung der jeweiligen Molekülstruktur eine Signaltransduktionskaskade, die zur Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren führt. Es werden Zytokine wie z. B. Interleukin (IL)-6, IL-8, IL-12 und Tumornekrosefaktor (TNF) $\alpha$  sowie Chemokine wie IP-10 (CXCL-10), RANTES (CCL5) sezerniert und kostimulatorische Moleküle wie z. B. MHC-Moleküle, CD80 und CD86 hochreguliert (Banchereau & Steinman 1998). Allerdings führen z. B. die Aktivierung von TLR3 und TLR4 zu einer höheren Expression von Typ I Interferonen und inflammatorischen Zytokinen, wohingegen TLR2 und TLR5 hauptsächlich die Sekretion von inflammatorische Zytokine erhöhen. Diese Unterschiede lassen sich durch die verschiedene TIR-Domäne enthaltene Adapterproteine erklären, die zu verschiedenen TLR rekrutiert werden und unterschiedliche Signaltransduktionswege aktivieren. Dazu zählen MyD88, TIRAP, TRIF und TRAM. Der erste identifizierte Adapter war MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) und wird von allen TLR außer TLR3 verwendet. Seine Rekrutierung führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und IRF7, sowie der Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs), um die Expression inflammatorischer Zytokine und Typ I Interferone zu induzieren. Seine TIR-Domäne interagiert direkt mit

der TIR-Domäne des TLR oder mit dem zwischengeschalteten Adapterprotein TIRAP bei TLR2 und TLR4. Der Adapter TRIF wird von TLR3 und TLR4 rekrutiert, um alternative Signalwege auszulösen und die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, IRF3 und IRF7 zu aktivieren. TLR4 benötigt TRAM, welches TRIF rekrutiert. Es gibt noch ein fünftes TIR-Domäne enthaltene Adapterprotein, das Protein SARM (*Sterile-alpha and Armadillo motif-containing protein*), von dem gezeigt wurde, dass es TRIF inhibiert (Carty et al. 2006). Man kann die TLR-Signaltransduktionswege also grob in einen MyD88-abhängigen Signalweg und einen TRIF-abhängigen Signalweg einteilen. TLR4 ist hierbei der einzige Rezeptor, der alle zwei Adapterproteinpaare, TIRAP/MyD88 und TRIF/TRAM rekrutiert und beide Wege verwendet (O'Neill & Bowie 2007). Die verschiedenen Signaltransduktionswege der TLR sind vereinfacht in Abbildung 2 dargestellt. Die Fähigkeit der TLR verschiedene Adaptermoleküle zu nutzen, mit anderen regulatorischen Signalwegen zu kommunizieren und eine Fülle an Kinasen, die in einer Vielzahl von Signalkaskaden involviert sind, zu aktivieren bzw. zu unterdrücken, ist ein wichtiger Faktor, die Art und Weise einer Immunantwort zu prägen (Brown et al. 2011).

### 1.12 MyD88-abhängiger Signaltransduktionsweg

Nach der Aktivierung der TLR durch die entsprechenden PAMPs rekrutiert MyD88 die IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinasen IRAK4, IRAK1, IRAK2 und IRAKM. Die Kinase IRAKM reguliert dabei den TLR-Signaltransduktionskaskade negativ, indem sie die Dissoziation von IRAK1 und IRAK4 von MyD88 und die Bildung des IRAK-TRAF6-Komplexes verhindert (Kobayashi et al. 2002). Die Aktivierung der IRAKs führt zu Interaktion mit TRAF6, einer E3-Ligase die die Polyubiquitinierung von IRAK1 zusammen mit den Ubiquitin konjugierenden Enzymen Ubc13 und Uev1A katalysiert. Dabei wird die MAP3 Kinase TAK1 (*Transforming growth factor- $\beta$ -activated-kinase 1*) aktiviert, die zum einen NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modulator*) bindet, ein essentieller regulatorischer Bestandteil des IKK (I $\kappa$ B Kinase)-Komplexes, erforderlich für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. TAK1 phosphoryliert dabei IKK $\beta$ , das wiederum NF- $\kappa$ B durch die Phosphorylierung von I $\kappa$ B-Proteinen und deren folgenden Abbau aktiviert (Bhoj &

Chen 2009). TAK1 aktiviert zum anderen die MAPKs Erk1, Erk2, p38 und JNK durch Phosphorylierung, was zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (*activator protein 1*) (*c-fos/c-jun*) führt (Kawai & Akira 2010). TLR7/8 und TLR9 aktivieren über MyD88 direkt IRF7 und indizieren damit Typ I Interferone. Ein weiterer IRF-Transkriptionsfaktor, IRF5 wird durch MyD88 aktiviert und ist an der Transkription inflammatorischer Zytokine beteiligt (Colonna 2007).



**Abbildung 2: TLR-Signaltransduktionswege**

(● Toll-like Rezeptor, ● Signalprotein, ● Transkriptionsfaktor, ● Kinase, ● Caspase).

(Nach Cell Signaling Technology Inc. Beverly, USA 2010, online im Internet: URL: <http://www.cellsignal.com/pathways/nk-kappab-signaling.jsp>).

### 1.13 MyD88-unabhängiger / TRIF-abhängiger Signaltransduktionsweg

Im Jahr 2003 wurde bei Trif-defizienten Mäusen gezeigt, dass TRIF essentiell für den TLR3- und TLR4-Signaltransduktionsweg ist (Yamamoto et al. 2003). TRIF bindet wie bei den einzelnen TLR schon beschrieben TRAF3 direkt, wobei TRIF über das Adapterprotein TRAM mit TLR4 verbunden wird (Sheedy & O'Neill 2007). Die Rekrutierung des TIR-Adapters TRIF führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und NF- $\kappa$ B. Unter TLR4-Stimulation wird auch der TRIF-abhängige MAP Kinasen-Signalweg aktiviert (Kagan et al. 2008; Tanimura et al. 2008). IRF3 aktiviert die Transkription von Interferon alpha und beta und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Immunantwort des angeborenen Immunsystems auf virale Infektionen (Collins et al. 2004).

Unter Stimulation von TLR3 und -4 bindet TRIF einen Signalkomplex, der die nicht kanonischen IKKs TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) und IKK $\epsilon$  enthält und die Phosphorylierung von IRF3 katalysiert und dessen Translokation in den Kern induziert (Häcker & Karin 2006). Die TRIF-abhängige Aktivierung von TBK1-IKK $\epsilon$  benötigt TRAF3, ein weiteres Mitglied der TRAF-Familie (Häcker et al. 2006; Oganessian et al. 2006).

TRIF rekrutiert aber auch TRAF6 und aktiviert TAK1, was zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt. Ebenso bindet TRIF den Adapter RIP1 (*Receptor-interacting protein 1*). Nach Polyubiquitinierung durch Pellino-1, eine E3 Ubiquitin Ligase, wird der Adapter TRADD (*Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*) gebunden. Insgesamt bildet TRIF ein Multiproteinsignalkomplex mit TRAF6, TRADD, Pellino-1 und RIP1 zur Aktivierung von TAK1, was wiederum NF- $\kappa$ B und die MAPKs aktiviert (Cusson-Hermance et al. 2005).

### 1.14 PI3K-Akt Signaltransduktionsweg

Stimulation von TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 und TLR9 kann auch über den Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Akt-Signaltransduktionsweg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B führen (Hazeki et al. 2007). PI3K assoziiert je nach TLR mit unterschiedlichen TIR-Adaptoren, was zur Aktivierung der Serin/Threonin Kinase Akt führt. Diese phosphoryliert I $\kappa$ B und aktiviert dadurch NF- $\kappa$ B.

### 1.15 Negative Regulation des TLR-Signaltransduktionsweges

Eine negative Regulation der TLR-induzierten Immunantwort ist wichtig um Entzündung und schädliche Reaktionen zu unterdrücken (Wang et al. 2009). Fehlerhafte Regulierung von TLR kann zu verschiedenen Krankheiten führen. (Siehe Kapitel 1.16). Bisher wurden viele Regulatoren identifiziert die am TLR-Signaltransduktionsweg eingreifen. Zum einen gibt es Splicevarianten von Adaptoren wie z. B. TAG, eine Splicevariante von TRAM, das den MyD88-abhängigen Signalweg von TLR4 negativ reguliert (Palsson-McDermott et al., 2009). Eine trunkierte Form von MyD88, MyD88s genannt, unfähig IRAK4 zu binden, vermindert die Aktivierung von LPS-induzierter NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Janssens et al. 2003). Der TIR-Adapter SARM, wie oben genannt, reguliert den TRIF-abhängige Signalweg negativ (Carty et al., 2006). IRAK-M verhindert die Dissoziation des IRAK-1-IRAK-4-Komplexes von MyD88 und damit die Bildung des IRAK-TRAF6-Komplexes (Kobayashi et al. 2002). Auf ähnliche Weise wirkt das membrangebundene und eine TIR-Domäne enthaltene Protein SIGIRR (*single immunoglobulin IL-1R-related molecule*) (Wald et al. 2003). Das Protein SOCS-1 (*suppressor of cytokine signaling*) inhibiert das TLR-induzierte Typ I IFN-Signaling auf der einen Seite und reguliert die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch den durch Ubiquitinierung verursachten Abbau von TIRAP (Baetz et al. 2004; Mansell et al. 2006). Ein weiteres Membranprotein, SHPS-1 (*SH2-domain bearing protein tyrosine phosphatase (SHP) substrate-1*), soll in Makrophagen die TLR3- und TLR4-abhängige Zytokinproduktion über die Hemmung von NF- $\kappa$ B negativ regulieren (Miyake et al. 2008). Weiter bekannt sind posttranskriptionelle Regulation durch microRNA, post-translationale Regulation durch Ubiquitinierung (Coll & O'Neill 2010).

### 1.16 TLR-bedingte Krankheiten

Gerät das Gleichgewicht der TLR-induzierten Immunantwort außer Kontrolle, kann dies zu Autoimmunerkrankungen und autoinflammatorischen Erkrankungen beitragen. Aber auch der Septische Schock bei einer Sepsis wird von einer überschießenden Sekretion inflammatorische Zytokine als Antwort von TLR4 auf LPS bei einer unkontrollierten systemischen bakteriellen Infektion ausgelöst. Eine Reihe von Studien weisen auf eine

Rolle von TLR bei Autoimmunerkrankungen wie systemischer Lupus erythematoses (SLE), Arteriosklerose, Asthma, chronischer Darmentzündungen, Typ 1 Diabetes, Multiple Sklerose und rheumatoide Arthritis (Drexler & Foxwell 2010).

Genpolymorphismen in TLR können für unzureichende Aktivität der TLR verantwortlich sein und das Risiko erhöhen an einer Infektion zu erkranken. Mittlerweise wurden viele bekannte Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) in TLR und deren pathophysiologische Bedeutung bei bestimmten infektiösen, inflammatorischen und chronisch entzündlichen Krankheiten untersucht. So wird z. B. der SNP D299G in TLR4 mit den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn als auch Colitis Ulcerosa in Verbindung gebracht (Franchimont et al. 2004). Ebenso scheint der SNP R753Q im TLR2-Gen für ein erhöhtes Risiko an der Entstehung eines septischen Schocks im Verlauf einer Staphylokokken-Infektion verantwortlich (Lorenz et al. 2000). Eine Stopp-Mutante im TLR5-Gen wird, wie oben schon erwähnt, mit einer erhöhten Anfälligkeit an der Legionärskrankheit zu erkranken assoziiert (Hawn et al. 2003). Menschen die einen R753Q SNP im TLR2-Gen besitzen sind anfälliger gegenüber die von *Mycobacterium tuberculosis* verursachte Tuberkulose und tuberkulöser Meningitis (Ogus et al. 2004; Thuong et al. 2007).

Dies stellt nur eine Auswahl an Erkrankungen dar, an denen TLR beteiligt sind. Ein genaues Verständnis von der Beteiligung von TLR an Krankheiten beim Menschen ermöglicht die Entwicklung immuntherapeutischer Behandlungsansätze für solche Krankheiten.

### 1.17 Massenspektrometrie zur Identifikation von Proteinen

Die Aufklärung molekularer Interaktionen von Proteinen, die die Basis des regulatorischen Netzwerkes der Zelle darstellen, ist eine der großen Aufgaben der Molekularbiologie und Proteomics in der postgenomischen Ära. Die an Signaltransduktion beteiligten Protein-Protein-Wechselwirkungen bzw. Signalproteinkomplexe können mit unterschiedlichen Methoden untersucht und identifiziert werden. Beim Yeast Two-Hybrid System werden mögliche Interaktionspartner im Screening-Verfahren eher empirisch ermittelt. Um die während einer Signaltransduktion entstehenden Proteinkomplexe zu

isolieren, werden häufig Immunpräzipitationen für massenspektrometrische Analysen verwendet (Steen et al. 2002; Zhang et al. 2003). Eine effiziente Methode ist die Affinitätsaufreinigung mit Hilfe eines markierten Proteins mit einem sogenannten Tag, meist ein kurzes Peptid (Brizzard 2008). Mit der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (*Tandem affinity purification* (TAP)) kann man in mehreren Schritten Proteinkomplexe sogenannter „Bait-Proteine“ isolieren und damit Kontaminationen mit unspezifisch gebundenen Proteine reduzieren (Gavin et al. 2002). In dieser Arbeit wurden Proteinkomplexe über die Tags Flag und Strep isoliert. Diese Epitop sind sehr klein und mindern die Wahrscheinlichkeit die Funktion des markierten Proteins zu beeinflussen. Mit dem Flag-Tag (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und der One-Strep-Tag-Technologie (IBA Bio TAGnology, Göppingen) kann der Proteinkomplex in nur einem einzigen Reinigungsschritt aufgereinigt werden. Hierbei lässt sich der Verlust von Interaktionspartnern mit schwacher transienter Bindung im Vergleich zur Tandem-Affinitäts-Aufreinigung mit den vielen Waschschritten reduzieren. In Abbildung 8 ist die Durchführung einer Strep-Tag-Aufreinigung dargestellt. Ein Nachteil aller affinitätschromatographischen Aufreinigungen ist auch die Tatsache, dass die Zellen gentechnisch veränderte Proteine exprimieren müssen, die mit den endogenen Proteinen konkurrieren. Die Aufreinigung und Identifikation von Komponenten transient gebildeter Proteinkomplexe, wie z. B. Immunsignalkomplexe, bleibt eine große Herausforderung.

Zur Identifikation der assoziierten Proteine in solchen Ansätzen eignet sich besonders die Massenspektrometrie, weil man mit diese Methode aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit und Geschwindigkeit viele Proteine auf einmal, genau und quantitativ analysieren kann (Romijn et al. 2003; Monti et al. 2007). Bis heute hat man aufgrund ihrer geringen Abundanz und ihrer transienten Natur noch wenig Erfolg damit gehabt, Protein-Protein-Wechselwirkungen mittels proteomischen Analysen in Immunzellen zu identifizieren. Wang et al. haben in einem Ansatz mit Hilfe der Tandem-Affinitäts-Chromatographie und der Massenspektrometrie Interaktionspartner des TLR-Adapters MyD88 unter LPS-Stimulation identifiziert (Wang, Gu, et al. 2005). Wenige Proteine des TLR-Signalschaltungsweges wie z. B. TRAF3, TANK, RIP1 wurden bisher mittels Massenspektrometrie identifiziert (Brennan & Jefferies 2009). Der Toll-like Rezeptor 5 ist von Ivison

et al. als Fusionsprotein mit einem Flag-Tag präzipitiert worden, die anschließende massenspektrometrische Analyse bezog sich allerdings auf den Nachweis von Signalrelevanten Phosphorylierungsstellen der TIR-Domäne (Iverson et al. 2007). In einer anderen Studie wurde in LPS-aktivierten RAW264.7-Zellen auf der Suche nach Tyrosinphosphorylierten Proteinen mittels Massenspektrometrie CsK (*C-terminal Src kinase*) identifiziert, ein möglicher Regulator des TLR-4-Signalweges (Aki et al. 2005).

Die Identifikation neuer Protein-Protein-Wechselwirkungen der TLR-Signaltransduktionswege könnte helfen, deren Regulationsmechanismen besser zu verstehen. Diese Regulatorproteine könnten Zielstrukturen sein, um das angeborene Immunsystem pharmakologisch zu manipulieren und Erkrankungen des Immunsystems zu therapieren (O'Neill 2006). Aufgrund des großen Potentials der Massenspektrometrie, geringe Mengen an Proteinen zu identifizieren, in Verbindung mit Methoden der Isolierung von aktivierten Signalproteinkomplexen, sollen damit neue Proteine des TLR-Signaltransduktionsweges gefunden und funktionell charakterisiert werden. In den folgenden Abschnitten werden die Grundlagen der Massenspektrometrie beschrieben.

### 1.17.1 Grundlagen der Massenspektrometrie

Für das Feld der Proteomforschung wurde die Massenspektrometrie in den letzten Jahrzehnten zur unerlässlichen Methode, um komplexe Proteinproben zu analysieren und Protein-Protein-Interaktionen zu identifizieren (Sardiu & Washburn 2011). Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren, das die Massen von Atomen oder Molekülen misst. Mit deren Molekulargewicht lassen sich unter anderem Proteine und Peptide bestimmen und damit identifizieren, quantifizieren und charakterisieren.

Ein Massenspektrometer misst ionisierte Analyten in der Gasphase. Er besteht aus einer Ionenquelle, einem Analysator der die ionisierten Analyten nach dem Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) sortiert und einem Detektor, der die Anzahl der Ionen zu jedem  $m/z$ -Wert aufzeichnet. Entscheidend für die Untersuchung von Proteinen war in den 1980er Jahren die Entdeckung und Entwicklung der zwei schonenden Ionisierungstechniken: die Matrix-unterstützte Laser-Desorption und -Ionisation (MALDI, *matrix-*

*assisted laser desorption/ionisation*) und Elektrospray-Ionisierung (ESI). Die Kombination mit verschiedenen Massenanalysatoren, wie dem TOF (*Time of Flight*), dem Quadrupol oder der Ionenfalle ermöglicht die Charakterisierung von Proteinen bis in den subfemtomolaren Bereich (Kristensen et al. 2000).

Das massenspektrometrische Messen besteht aus drei Schritten:

1. Ionisierung des Analyten und Beschleunigung der Moleküle mit Hilfe einer Ionenquelle in einem elektrischen Feld.
2. Auftrennung der generierten Ionen in einem Analysator oder Massenselektor nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ).
3. Erfassung der aufgetrennten Ionen durch einen Detektor und Darstellung eines Massenspektrums Intensität gegen das Masse-zu-Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ).

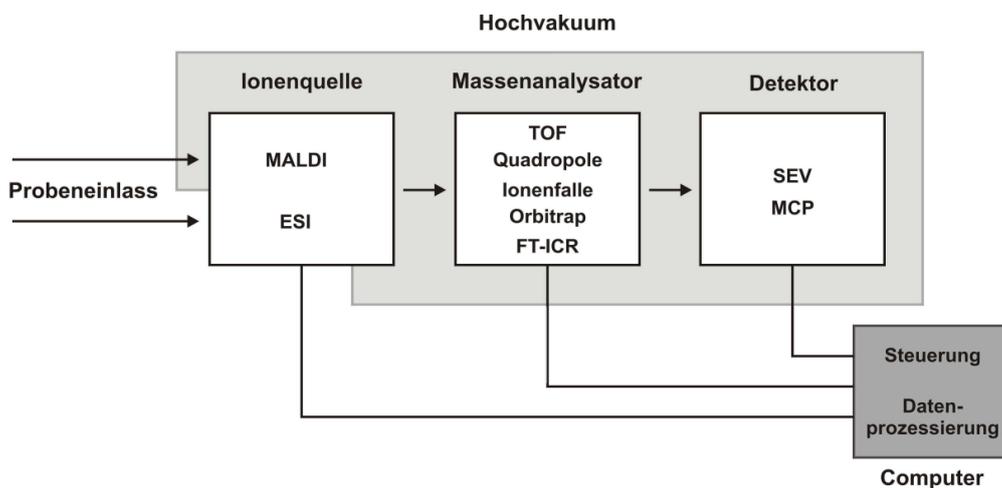


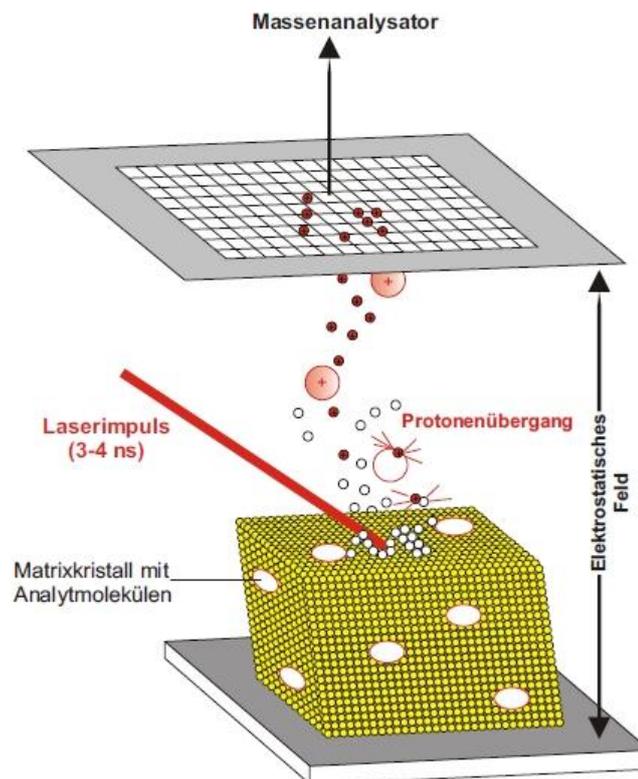
Abbildung 3: Darstellung der Komponenten eines Massenspektrometers mit den verschiedenen Möglichkeiten der Ionenquelle, des Massenanalysator und dem Detektor, sowie die computergestützte Auswertung der Messdaten (Baltruschat 2009).

### 1.17.2 MALDI-TOF

Die Matrix-unterstützte Laser-Desorption und -Ionisation (MALDI, *matrix-assisted laser desorption/ionisation*) wird bevorzugt mit einem Flugzeit-Massenspektrometer (*Time-of-flight*) gekoppelt. Die MALDI-Methode beruht auf der Kokristallisation des Analyten mit einer Matrix (Karas & Hillenkamp 1988). Bei dieser „dried-droplet“ Präparation wird der in Lösungsmittel gelöste Analyt in die Matrix in einem 1.000 bis 10.000-fachen molaren

## 1. Einleitung

Überschuss während der Bildung der Kristalle eingebaut. Im Hochvakuum werden die Kristalle z. B. mit einem intensiven, kurzen Laserimpuls bestrahlt. Die Matrix absorbiert die Energie, setzt gasförmige Matrix- und Analytmoleküle frei und führt zur Ionisierung (Abbildung 4). Die durch Einwirkung des Laserstrahls entstandenen Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt. Die Ionen werden nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) aufgetrennt (Abbildung 5).

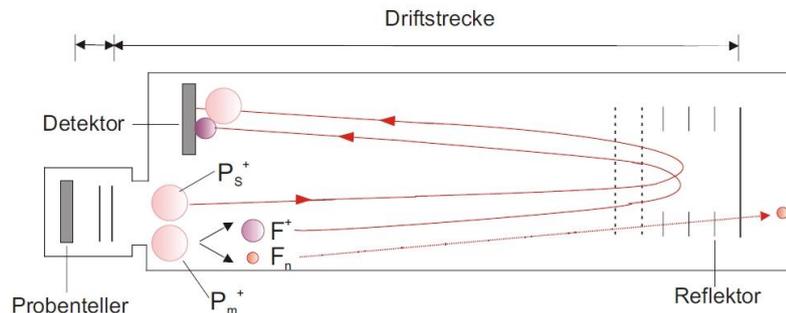


**Abbildung 4: Grafische Darstellung des Prinzips der MALDI.**

Ein Laser ionisiert in Matrixkristallen eingebetteten Analytmoleküle, die im elektrischen Feld beschleunigt und im Massenanalysator nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) aufgetrennt werden. (Abbildung aus Lottspeich et al. 2006).

In einem sogenannten Reflektor-Flugrohr werden geladene Fragmente getrennt von intakten Molekülionen detektiert. Wegen der fehlenden Ladung werden neutrale Fragmente durch den Reflektor nicht abgelenkt und deshalb vom Detektor nicht registriert. In dem Flugzeit-Massenspektrometer werden am Detektor die Masse der Ionen aus ihrer Flugzeit berechnet.

## Reflektor- Flugrohr



**Abbildung 5: Grafische Darstellung des Prinzips der MALDI-TOF.**

Ein Laser ionisiert in Matrix eingebetteten Analyten auf dem Probenenteller, die im elektrischen Feld beschleunigt und nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) aufgetrennt werden. Im Reflektor-Flugrohr werden geladene Fragmente ( $F^+$ ) getrennt vom intakten Molekülonen ( $P_s^+$ ) detektiert. Wegen der fehlenden Ladung werden neutrale Fragmente ( $F_n$ ) durch den Reflektor nicht abgelenkt und deshalb vom Detektor nicht registriert. In dem Flugzeit-Massenspektrometer werden am Detektor die Massen der Ionen aus ihrer Flugzeit berechnet. (Abbildung aus Lottspeich et al. 2006).

### 1.17.3 ESI-Elektrospray Ionisation

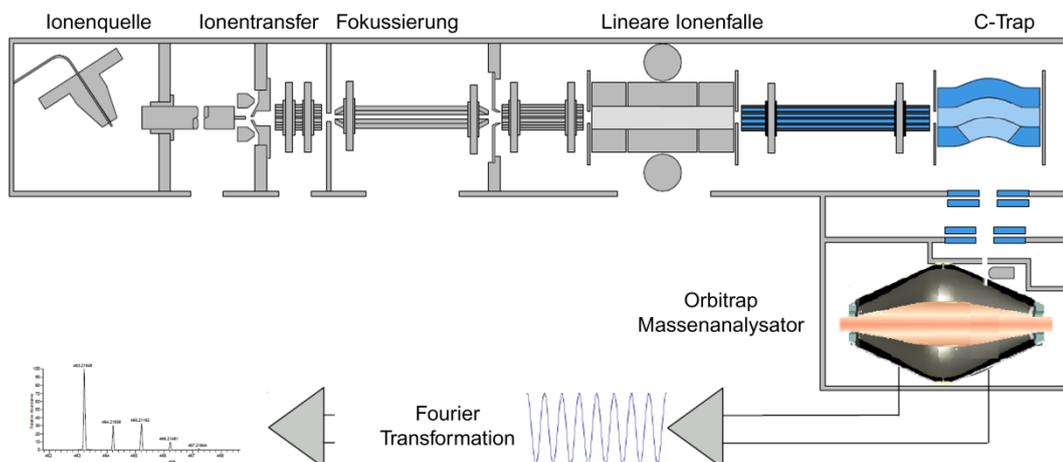
Bei der Elektrospray-Ionisation (Fenn et al. 1989) wird eine Analytlösung durch eine Metallkapillare geleitet, an deren Spitze eine Spannung anliegt. Mit Hilfe eines elektrostatischen Feldes zwischen Kapillare und Gegenelektrode wird ein feines Aerosol aus sehr vielen kleinen geladenen Tröpfchen erzeugt, das aus der Kapillare austritt und in das Vakuum des Massenspektrometers gelangt. Bei der ESI-Methode kommt es zur Bildung mehrfach geladener Ionen der allgemeinen Formel  $[M+nH]^{n+}$ , wobei M für die Masse des Analyten steht und n die Anzahl der Ladung angibt.

Ein Nachteil der ESI- gegenüber der MALDI-Methode ist die Empfindlichkeit gegenüber niedermolekularer Verunreinigung, die den Sprühfluss verhindern und zur Ionensuppression im Spektrum führen. Ein großer Vorteil der ESI-Methode ist die Möglichkeit der einfachen direkten Kopplung mit chromatographischen Trennsystemen wie HPLC oder nanoLC. Mit einer Nano-ESI-Kapillare kann dank der niedrigeren Flussrate die Probe höher konzentriert werden und doch weniger Probenmaterial verbraucht werden. Als Massenanalytoren werden bei der ESI-Technik meist Ionenfallen und Quadrupole eingesetzt.

### 1.17.4 Orbitrap-Massenspektrometer

Der Orbitrap Massenanalysator wird meist mit einer linearen Ionenfalle kombiniert, er zeichnet sich durch eine extrem hohe Massengenauigkeit ( $\leq 1$  ppm bei interner Kalibrierung,  $\leq 3$  ppm bei externer Kalibrierung) und einer hohen Auflösung aus (Olsen et al. 2005). Der in dieser Arbeit verwendete LTQ-Orbitrap XL von Thermo Scientific (Abbildung 6) besteht aus einer linearen Ionenfalle (LTQ) in der die Ionen gespeichert werden, die über eine C-Trap komprimiert und in die Orbitrap transferiert werden. Dort rotieren die Ionen im elektrischen Feld um die spindelförmige zentrale Elektrode, oszillieren axial und induzieren dabei einen Strom. Die Messmethode basiert auf der Messung von Frequenzen. Durch die Frequenz, mit der die Ionen sich entlang der Elektrodenachse bewegen, errechnet sich das  $m/z$  Verhältnis mittels einer Fourier Transformation (Hu et al. 2005).

Die hohe Auflösung, Massengenauigkeit und die verschiedenen Analysemethoden ermöglichen den vielfältigen Einsatz des Gerätes, sowohl für die Identifikation und Charakterisierung von Analyten aus hochkomplexen Gemischen, als auch deren Quantifizierung.



**Abbildung 6: Schematischer Aufbau der LTQ Orbitrap XL.** Die Peptide werden in der Ionenquelle ionisiert, in der linearen Ionenfalle (LTQ XL) in einem Ionenstrahl fokussiert und axial in C-förmig geformte Falle injiziert, bevor die Ionen in die Orbitrap in Form eines kurzen Pulses überführt werden. Sie oszillieren axial um die spindelförmige zentrale Elektrode. Die axiale Schwingung der Ionen wird detektiert und die Signale werden amplifiziert und durch Fourier Transformation in ein Frequenzspektrum umgewandelt. (Abbildung nach Thermo Scientific 2006, online im Internet: URL: [http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File\\_31081.pdf](http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_31081.pdf)).

## 1.17.5 Identifikation von Peptiden und Proteinen

### 1.17.5.1 Peptide Mass Fingerprinting

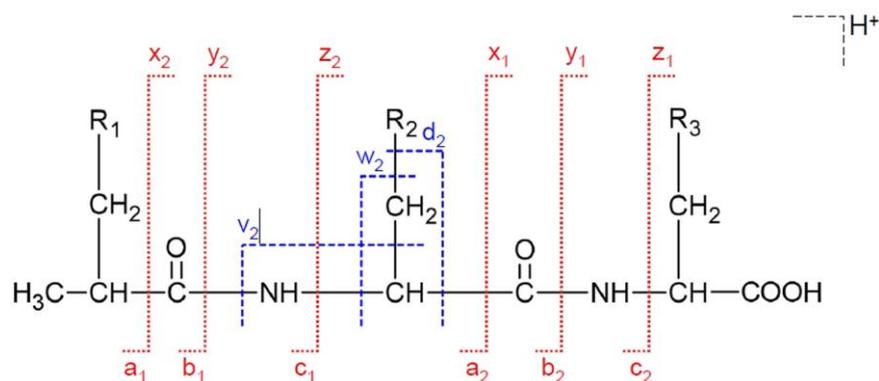
Beim *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) werden Proteine meist tryptisch in kleinere Peptide gespalten und massenspektrometrisch gemessen. Diese Massenspektren sind für jedes Protein oder Peptid einzigartig. Das Spektrum mit den Massen der Peptide wird in eine Peakliste überführt und zur Identifikation an eine Datenbanksuchmaschine gesendet. Diese greift auf Proteinsequenzdatenbanken zu und errechnet unter Berücksichtigung der Parameter wie verwendete Protease oder Taxonomie, maximale Zahl übersprungener Spaltstellen (engl. *missed cleavages*) etc. die theoretisch entstehenden Peptide des virtuellen Verdauens aller Proteine. Dabei wird die experimentell erhaltene Peakliste mit den errechneten verglichen. Die Ergebnisse werden statistisch ausgewertet und Übereinstimmungen als Resultate ausgegeben. In Verbindung mit der Massenspektrometrie wurde das *Peptide Mass Fingerprinting* zum ersten Mal im Jahre 1989 vorgestellt (Henzel et al. 1989). Je nach Massengenauigkeit können Proteine bereits anhand weniger Peptidmassen signifikant identifiziert werden. Allerdings wird bei einer komplexeren Probe mit mehreren Proteinen der Abgleich erheblich erschwert und eine Identifikation eventuell unmöglich. An Grenzen stößt das Verfahren auch, wenn die gesuchte Proteinsequenz nicht komplett in der Datenbank vorliegt. Dies trifft auf einen Großteil der humanen Proteine zu, da deren kodierender Bereich im Genom zwar sequenziert, aber auf viele kleine Exons verteilt ist, deren Lage und Grenzen oft nicht bekannt sind (Reese et al. 2000).

### 1.17.5.2 Fragmentierungsexperimente mittels Massenspektrometrie

In der Proteinanalytik lassen sich mit Hilfe von Fragmentierungsexperimente Informationen über die Struktur der Moleküle gewinnen. Aus Fragmentspektren lassen sich die Sequenzen von Peptiden rekonstruieren und so die entsprechenden Proteine identifizieren. Die bei der Ionisierung der Peptide entstandenen Fragmentierung treten überwiegend an den Peptiden entlang der Peptidkette auf (Abbildung 7). Fragmente der N-terminalen Serie werden mit a, b und c, die der C-terminalen Serie hingegen mit x, y und z bezeich-

## 1. Einleitung

net. Ein zusätzlicher Index gibt die Zahl der im jeweiligen Fragment-Ion enthaltenen Aminosäurereste an. Bei bestimmten Fragmentierungsarten, insbesondere bei Nutzung höherer Kollisionsenergien, können zudem Fragmente der Seitenketten der Aminosäuren entstehen. Diese mit d, v und w bezeichneten Fragment-Ionen können wichtige Informationen zur Interpretation der Spektren beitragen und zum Beispiel die Unterscheidung zwischen Leucin und Isoleucin ermöglichen.



**Abbildung 7: Schema der Bildung von Fragment-Ionen bei Peptiden** am Beispiel eines protonierten Tripeptids. Bei a-, b-, c-Fragmentionen verbleibt die Ladung des Peptids am N-terminalen Fragment. Bei x-, y-, und z-Ionen liegt die Ladung des Peptids nach der Fragmentierung C-terminal vor. (Abbildung modifiziert nach Lottspeich & Zorbas 1998).

### 1.17.6 Tandem-Massenspektrometrie

Bei der Tandem-Massenspektrometrie ( $\text{MS}/\text{MS}$  oder  $\text{MS}^2$ ) werden bestimmte Molekülionen gezielt zur Fragmentierung angeregt. Die Massenanalyse erfolgt in zwei Stufen. Zunächst werden die Ionen eines zu untersuchenden Analyten nach Isolation im ersten Analysator in einer Kollisionszelle mit Gasteilchen eines Inertgases wie Stickstoff, Argon oder Helium zur Fragmentierung gebracht. Dieser Vorgang wird als stoßinduzierte Fragmentierung bzw. CID (engl. *collision-induced dissociation*) bezeichnet. Die dabei entstehenden leichteren Ionen werden anschließend in der zweiten Stufe massenspektrometrisch analysiert. Diese beiden Analysen können räumlich oder zeitlich getrennt stattfinden. Bei der räumlichen Tandem-MS (engl. *tandem-in-space*) befinden sich zwei Massenanalytoren in Serie, wie das beispielsweise bei Triple-Quadrupol-, qTOF- oder TOF-TOF-Geräten der Fall ist. Bei Instrumenten mit Quadrupol-Ionenfallen oder FT-ICR-

## 1. Einleitung

Analysatoren handelt es sich dagegen um zeitliche Tandem-Massenspektrometrie (engl. *tandem-in-time*), bei der die Analyse der Fragment-Ionen im gleichen Analysator durchgeführt wird. Bei diesen Instrumenten besteht die Möglichkeit, den gesamten Vorgang mehrmals zu wiederholen, so dass bereits erhaltene Fragmente isoliert und weiterfragmentiert werden können. Hierbei spricht man von Mehrfach-Massenspektrometrie oder  $MS_n$ , wobei  $n$  der Anzahl der Fragmentierungsschritte entspricht. Diese Möglichkeit ist besonders dann von Nutzen, wenn im ersten Fragmentierungsschritt nicht genügend aussagekräftige Fragmente entstehen.

Bei Tandem-MS-Experimenten an Peptiden mit ESI-Massenspektrometern treten Fragmentierungen an den Peptidbindungen auf, insbesondere zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Amidstickstoff, womit es primär zur Ausbildung von b- und  $\gamma$ -Ionen kommt (siehe Abbildung 7).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, in verschiedenen Ansätzen Protein-Protein-Interaktionen unter spezifischer Stimulation der Membranrezeptoren der „Toll-like“-Familie mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren.

Die Membranrezeptoren der Toll-like-Familie nehmen in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems eine zentrale Rolle ein und sind in der Lage, eine adaptive Immunantwort auszulösen. Jeder der zehn unterschiedlichen TLR erkennt spezifisch konservierte pathogene Molekülstrukturen und löst über verschiedene Adaptermoleküle komplexe Signaltransduktionskaskaden aus. Das Ergebnis des TLR-Engagements ist die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle und die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine. Die Regulation der Expression der großen Anzahl an Genen, abhängig von Dauer und Stärke des Signals, ist bis heute noch nicht hinreichend geklärt.

Um das Verständnis dieser vielschichtigen zellulären Mechanismen zu verbessern, sollen in dieser Arbeit neue Interaktionspartner des IL-1/TLR-Signaltransduktionsweges identifiziert und funktionell charakterisiert werden. Mit biochemischen und immunologischen Methoden sollen aktivierte Signalprotein-Komplexe von TLR2 und des wichtigen Adapters MyD88 mittels Immunpräzipitation und Affinitätschromatographie isoliert und gereinigt, im SDS-PAGE aufgetrennt und nach tryptischem Verdau neue Interaktionspartner mit Hilfe der Massenspektrometrie unterschiedlicher Verfahren und Geräte wie MALDI-TOF-MS, LC-ESI-MS und nanoLC-Orbitrap-MS identifiziert werden. Das große Potential der Massenspektrometrie hat in der Erforschung des TLR-Signalweges bisher noch kaum Anwendung gefunden und soll hier erfolgreich eingesetzt werden.

Die Ergebnisse der Massenspektrometrie sollen in komplementierenden Ansätzen validiert werden. Die neu identifizierten Interaktionspartner werden auf verschiedenen Ebenen in humanen und murinen Systemen umfassend funktionell charakterisiert. Auf transkriptioneller Ebene wird der Einfluss auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren in

## 2. Zielsetzung

Reportergenanalysen untersucht. Es kommen Methoden wie die Fluoreszenzmikroskopie und die Durchflusszytometrie zum Einsatz. Der Effekt auf die Expression von sekretorischen Zytokinen stimulierter Immunzellen wird in Multiplex-Immunoassay analysiert.

### 3 Materialien

#### 3.1 Geräte

Arbeitsgerät	Bezeichnung, Hersteller, Firmensitz
Analysenwaage	IsoCal, Sartorius AG, Göttingen
Autoklav	Vakulab S3000, Münchener Medizin Mechanik GmbH, München
Autoradiographie-Kassette	Cawo Photochemisches Werk GmbH, Schrobenehausen
DNA-Sequenzierer	ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Darmstadt
Durchflusszytometer	FACSCalibur™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Eismaschine	Icematic F80C, CastelMac, Castelfranco, Italien
Elektroporationsapparat	Gene Pulser Xcell™, Bio-Rad, München
ELISA-Reader DIAS	Dynatech Laboratories, Corston, UK
Entwicklermaschine	Curix 60, AGFA, München
Flüssigstickstoff-Lagertank	Apollo, MESSER Griessheim GmbH, Krefeld
Geldokumentationsapparat	MultiImage™ Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Gelelektrophoresekammern	Wide Mini-Sub <sup>R</sup> Cell GT, Bio-Rad, München GNA100, Amersham Pharmacia Biotech GE Healthcare, München Scie-Plas, Witec AG, Littau, Schweiz
Grobwaage	Kern 440-45, Kern & Sohn GmbH, Balingen
HPLC	ProteomeLab™ PF 2D, Beckman Coulter, Krefeld UltiMate3000 RSLCnano, Dionex, Idstein
Heizblock	NeoBlock-Heizer Duo 2-2504, neoLab, Heidelberg Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	Memmert GmbH & Co.KG, Schabach
Inkubatoren	HERA Cell 240, Heraeus Instruments, Hanau

### 3. Material

	WTC Binder, Tuttlingen
Kühlwasserbad	RTE-101, Neslab Instruments Inc, Newington, NH, USA
Luminex 100	Multimetrix, Heidelberg
Luminometer	Victor <sup>3</sup> TM Wallac 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Massenspektrometer	Autoflex MALDI-TOF/TOF, Bruker Daltonics, Bremen ESI-MS HCT ultra, Bruker Daltonics, Bremen LTQ-Orbitrap XL hybrid, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	OLYMPUS IX70, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg Konfokales Mikroskop Leica TCS SP2, Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim
Mikrowellenherd	R-334, Sharp
Mini-Protean II (Protein-Minigele)	Bio-Rad, München
Nano-HPLC	UltiMate3000 RSLCnano HPLC system, Dionex
PCR-Thermocycler	Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg Mastercycler epS gradient, Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	InoLab pH Level, WTW, Weilheim
Photometer	GeneQuant pro, Amersham Pharmacia Biotech GE Healthcare, München NanoDrop ND1000 Spectrophotometer, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetten	Gilson International, Bad Camberg Multipette <sup>®</sup> Plus, Eppendorf, Hamburg
Pipetus / Pipetboy	Hirschmann-Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt
Rührer	MR3000, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Schüttelinkubator	INFORS AG, Bottmingen
Schüttler	Horizontalschüttler TPM-2, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Spannungsquelle	Electrophoresis Power Supply EPS 601, Amer-

### 3. Material

	sham Pharmacia Biosciences GE Healthcare, München
Sterilbank	HERA Safe, Heraeus Instruments, Hanau
Über-Kopf-Schüttler	Roto-Shake Genie, Scientific Industries, Inc. (oder Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe), New York, USA
Ultraschallgerät	Sonorex RK100, Bandelin electronic, Berlin
Vakuumabsaugvorrichtung für Filterplatten (Multibead-Assay)	MadaVacII No.178, Mada Medical Products, Inc., Carlstadt, NJ, USA
Vakuumzentrifuge	Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Vortex Mixer 7-2020, neoLab, Heidelberg
Western Blot-Kammer	Bio-Rad, München
Zentrifugen	Biofuge pico, Heraeus Instruments, Hanau Biofuge fresco, Heraeus Instruments, Hanau Megafuge 1.9 R, Heraeus Instruments, Hanau Multifuge 3SR, Heraeus Instruments, Hanau Rotanta TRC, Hettich, Tuttlingen

### 3.2 Glaswaren

Verwendete Glaswaren wurden von der Firma Schott, Mainz, bezogen.

### 3.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Blotting Papier	A. Hartenstein
Nitrozellulose-Transfer-Membran	Whatman
Polyvinylidenfluorid-Transfermembran	Millipore, Schwalbach
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Multiwell Schalen (6, 12, 24 und 96 Kavitäten)	BD Falcon, Heidelberg
Parafilm	3 M, Neuss
Pipettenspitzen	Star Lab, PeqLab
Reaktionsgefäße (0,5 – 2,0 mL)	Eppendorf
8er PCR-Strips	Biozym

### 3. Material

Skalpell zum Einmalgebrauch	Braun Aesculap AG
Spitzen verschiedener Volumina	Becton Dickinson
CellStar TC-Plate 6well, 12well, 24well, steril, einzeln verpackt	Greiner Bio-One, Essen
Multiwell 12well, Flachbodenplatten	BD Falcon, Heidelberg
CellStar Gewebekulturschalen, steril, 145/20mm	Greiner Bio-One, Essen
Gewebekulturschalen, Polystyren, Nonpyrogenic, steril, 100x20mm	BD Falcon, Heidelberg
OptiPlate-96, weiss, opak	Perkin Elmer, Rodgau- Jügesheim
50 ml Polypropylenröhrchen, konisch	BD Falcon, Heidelberg
15 ml High Clarity Polypropylenröhrchen, konisch	BD Falcon, Heidelberg
14 ml Polypropylen Rundbodenröhrchen	BD Falcon, Heidelberg
Gewebekulturflasche, 250 ml, Canted Neck, 0.2µm Vented Blue Plug Seal Cap	BD Falcon, Heidelberg

#### 3.4 Bakterienstämme

E.coli Stamm DH5α (Invitrogen, Karlsruhe)

Genotyp: fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1  
endA1 thi-1 hsdR17

#### 3.5 Antikörper

Primärantikörper

- Anti-FLAG M2 Antikörper (Maus) Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Anti-HA High Affinity (Ratte) Roche, Mannheim
- Anti-Phospho Erk1/Erk2 (p44/42  
MAP Kinase) (Thr202/Tyr204) Cell Signaling Technology, Beverly,  
Massachusetts, USA
- Anti-Erk1/Erk2 (p44/42 MAP Kinase) Cell Signaling Technology, Beverly,  
Massachusetts
- Anti-Phospho p38 MAP Kinase) Cell Signaling Technology, Beverly,  
(Thr180/ Tyr182) Massachusetts, USA

### 3. Material

- Anti-p38 MAP Kinase (Kaninchen) Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA
- Anti-Phospho SAPK/JNK (Thr183/ Tyr185) (Kaninchen) Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA
- Anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  (Kaninchen) Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA
- Anti-Phospho p38 MAP Kinase (Thr180/ Tyr182) Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA
- Anti-GFP (Maus) Roche, Mannheim

#### Sekundärantikörper

- Anti-Maus-Peroxidase (Ziege) Jackson Immuno Research, Dianova, Hamburg
- Anti-Maus-Peroxidase (Kaninchen) Invitrogen, Karlsruhe
- Anti-Kaninchen-Peroxidase (Esel) Jackson Immuno Research, Dianova, Hamburg
- Anti-Ratte, FITC-konjugiert (Ziege) Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, USA
- Anti-Maus-Alexa Fluor 488 Jackson Immuno Research, Dianova, Hamburg
- Anti-Kaninchen, Phycoerythrin - konjugiert Jackson Immuno Research, Dianova, Hamburg

### 3.6 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid Dihydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 3. Material

Dimethylsulfoxid (DMSO) Hybri-max	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
DL-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol absolut	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd 37 % Solution (Formalin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hoechst Farbstoff 33342	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Immersionsöl	Leica GmbH, Bensheim
Isopropanol	Fluka, Seelze
Kaliumchlorid	Fluka, Neu-Ulm
Kanamycin B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magermilchpulver	Fluka, Seelze
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Manganchlorid-Tetrahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid-Plättchen	Merck, Darmstadt
Natronlauge 1 N	Merck, Darmstadt
Nonidet P40 Substitute	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyoxyethylensorbitanmonolaureat (Tween20)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS Pellets	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris Pufferan <sup>®</sup>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)- amonomethanhydrochlorid	Merck, Darmstadt

### 3. Material

Trypanblau-Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
X-Gal	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

#### 3.7 TLR-Liganden

Rezeptor	Ligand	Quelle
TLR2	Pam <sub>3</sub> CysSK <sub>4</sub>	EMC Microcollections, Tübingen
TLR3	Poly(I:C)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
TLR4	<i>E. coli</i> Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
TLR5	<i>E. coli</i> Flagellin	Inotek Pharmaceuticals
TLR7 und TLR8	Imidazoquinolin-Analog Resiquimod R-848	InvivoGen, Toulouse
TLR9	CpG-DNA	TIB MOLBIOL, Berlin
IL-1R	IL-1	PepproTech, London
TNF-R	TNF- $\alpha$	PepproTech, London

#### 3.8 Enzyme

- REDTaq® DNA-Polymerase Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- PfuTurbo® DNA-Polymerase Stratagene, Amsterdam, Niederlande
- Herculase® Hotstart-DNA Polymerase Stratagene, Amsterdam, Niederlande
- Alkalische Phosphatase MBI Fermentas, St. Leon-Rot
- Klenow-Fragment MBI Fermentas, St. Leon-Rot
- T4 DNA-Ligase Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Trypsin Promega, Mannheim

Alle Restriktionsenzyme wurden wenn nicht anders angegeben von MBI Fermentas, St. Leon-Rot bezogen.

### 3.9 Kits

Kits	Hersteller, Firmensitz
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
DyeEx™ 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden
DNA Ligation Kit Ver. 2.1	BioWhittaker Europe, Taufkirchen
NucleoBond® PC 500 EF Endotoxin-freie Plasmid DNA	Macherey-Nagel, Düren
One-Strep-Kit	IBA Bio TAGnology, Göppingen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
QuikChange® site-directed mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Amersham ECL Plus Western Blot Detection System	GE Healthcare, München
Procarta Cytokine/Chemokine Assay	Multimetrix, Progen, Heidelberg

### 3.10 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

#### 3.10.1 PCR-Klonierungen

MyDH-ST-S105-EI	5'-AAAAGAATTCGATGGCTGCAGGAGGTCCCGGC-3'
MyDH-ST-AS105-Kpn	5'-TTTTGGTACCGATCAGGGCAGGGACAAGGC-3'
TRAF3IP3-NotI-S	5'-AAAAGCGGCCGCATGATCAGCCCAGACCCC-3'
TRAF3IP3-XbaI-S	5'-TTTTTCTAGATCAGATCATCAGGTTGTCTTT-3'
TRAF3IP3-N-XbaI-S	5'-TTTTTCTAGACTACAGTAGTACTTTTTTC-3'
TRAF3IP3-C-NotI-S	5'-AAAAGCGGCCGCATGTGGAGATGGAAGACCAGAAAAAC-3'

### 3. Material

TRAF3IP3-NotI-S	5'-AAAAGCGGCCGCATGATCAGCCCAGACCCC-3'
TRAF3IP3-XbaI-S	5'-TTTTTCTAGATCAGATCATCAGGTTGTCTTT-3'
m14-3-3theta-NotI-S	5'-AAAAGCGGCCGCATGGAGGAGACCGAGCTGATCC-3'
m14-3-3theta-XbaI-AS	5'-AAAATCTAGATTAGTTTTTCGGCCCCCTCTGCTGC-3'
R18-5-3-S	5'-TTTTGAATTCATGCCACACTGCGTACCACGAGACCTA TCATGGCTAGACCTAGAAGCAAACATGTGCCTATGATCTAGAA AAA-3'
R18-3-5-AS	5'-TTTTTCTAGATCATAGGCACATGTTTGCTTCTAGGTCT AGCCATGATAGGTCTCGTGGTACGCAGTGTGGCATGAA TTCAAAA-3'
R18-XbaI-AS	5'-AAAATCTAGATCATAGGCACATGTTTGCTTCTAG-3'
MEKK3-EcoR-I	5'-TTTGAATTCAATGGACGAACAGGAG-3'
MEKK3-Xba-I-AS	5'-AAAATCTAGATCAGTACATGAGCTGTGC-3'

#### 3.10.2 Mutagenese

m14-3-3R5660A-S	5'-GGGGGCCGCGCGTCCGCCTGGGCGGTCATCTCGAGC-3'
m14-3-3R5660A-AS	5'-GCTCGAGATGACCGCCCAGGCGGACGCGCGGCCCCC-3'

#### 3.10.3 Sequenzierungsprimer

pEXPR-IBA105fw	5'-GAGAACCCACTGCTTACTGGC-3'
pEXPR-IBA105rev	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
BGH reverse primer	5'-CCTCGACTGTGCCTTCTA-3'
T7 primer	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
m14-3-3t-AS1	5'-GTCACGGCTTTCATGCAGGTG-3'
m14-3-3t-S1	5'-GCTTAGAGACAACCTAACATTATGGAC-3'
m14-3-3t-S2	5'-GGCCACCTGCATGAAAGCCGTGACG-3'
m14-3-3t-AS1	5'-GTCACGGCTTTCATGCAGGTG-3'
m14-3-3t-S1	5'-GCTTAGAGACAACCTAATTATGGAC-3'

### 3. Material

h14-3-3-t-S1	5'-CTAACACTTTGGACATCA-3'
h14-3-3-t-AS1	5'-GGCCATGTCGTCGTAGC-3'
SeqHA-S1	5'-TACCCATACGATGTTCTG-3'
SeqHA-AS1	5'-AGCGTAATCTGGAACGTCATA-3'
pCMV14 S	5'-ACGGTGGGAGGTCTATATAAGC-3'
pCMV14 AS	5'-TATTAGGACAAGGCTGGTGGGCAC-3'
pTRAF3IP3-S2	5'-CCTCCACAGGACACTCCCATCAAG-3'
pTRAF3IP3-S3	5'-CAGCTATGAGCAGAAGGCCAAGG-3'
pTRAF3IP3-S4	5'-GGCCAAGATTGAATGCCTGCAAG-3'
EGFP	5'-CATGGTCCCTGCTGGAGTTCGTG-3'
EGFP	5'-GTGTAAACATCTCCGGGGTGAAC-3'
Aktin	5'-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3'
Aktin	5'-CTGGTGCCTGGGCG-3'
mcT3JAM-S	5'-AAGGCGTCACTGCAGAAAGT-3'
mcT3JA-AS	5'-GATGACCAGGTTGCCTTTGT-3'

#### 3.11 Vektoren

Es wurden Vektoren für die Expression von funktionellen nativen, rekombinanten und Fusions-Proteinen, mit und ohne Tag, zur Klonierung oder als Leervektor in Transfektionen verwendet.

Vektor	Eigenschaften	Quelle
pEXPR-IBA105	SV40-ori, pUC-ori, SV40 pA, amp <sup>r</sup> , neo <sup>r</sup>	IBA GmbH
pcDNA3.1 (+)	CMV-Promotor, BGH pA, f1-ori, SV40-ori, pUC-ori, SV40 pA, neo <sup>r</sup> , amp <sup>r</sup> , P <sub>CMV</sub>	Invitrogen
p3XFLAG-CMV™-14	CMV-Promotor, 3xFlag, hGH pA, SV40-ori, pBR322-ori, f1-ori, neo <sup>r</sup> , amp <sup>r</sup> , SV40 pA	Sigma-Aldrich
p3XFLAG-CMV™-10	CMV-Promotor, 3xFlag, hGH pA, SV40-ori, pBR322-ori, f1-ori, neo <sup>r</sup> , amp <sup>r</sup> , SV40 pA	Sigma-Aldrich

### 3. Material

pCR <sup>2.1</sup> -TOPO <sup>*</sup>	P-lacZ $\alpha$ , f1-ori, pUC-ori, kana <sup>r</sup> , amp <sup>r</sup>	Invitrogen
pC-3xHA	CMV-Promotor, BGH pA, SV40-Promotor, SV40 pA, hygro <sup>r</sup> , amp <sup>r</sup> , 3xHA-Tag	Angelika Hausser
p6xNF- $\kappa$ B-Luzi	6xNF- $\kappa$ B kloniert in pGL3 (Promega), Firefly-Luziferase, für Dual-Luziferase Assay, ELAM Promotor, Vektor von Promega	IKC, Mannheim
pGL3-3xAP1	3xAP-1 kloniert in pGL3 (Promega), Firefly-Luziferase, f1-ori, SV40-ori, amp <sup>r</sup>	IKC, Mannheim
pGL4.74(hRLuc/TK)	hRluc, HSV-TK Promotor, SV40 late pA, amp <sup>r</sup> ; Renilla-Luziferase für Dual-Luziferase Assay	Promega
pEGFP-C1	CMV-Promotor, BGH pA, SV40 pA, f1-ori, SV40-ori, neo <sup>r</sup> , amp <sup>r</sup> , EGFP ( <i>enhanced green fluorescence protein</i> )	BD Clontech
pRK5	Leervektor mit CMV-Promotor/Enhancer	BD PharMingen

#### 3.12 Längenstandards

- GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus MBI Fermentas, St. Leon-Rot
- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus MBI Fermentas, St. Leon-Rot
- PageRuler™ Prestained Protein Ladder MBI Fermentas, St. Leon-Rot
- PageRuler™ Unstained Protein Ladder MBI Fermentas, St. Leon-Rot

#### 3.13 Lösungen

##### Mikrobiologie

- Ampicillin-Stammlösung (1000x): 100 mg Ampicillin pro ml aqua bidest. bei -20 °C lagern
- Kanamycin-Stammlösung (1000x): 50 mg Kanamycin pro ml aqua bidest. bei -20 °C lagern
- LB-Medium (Luria Bartani Medium): 10 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,5.

### 3. Material

- LBamp/kan-Agar Platten: LB-Agar in 1 l aqua bidest lösen und autoklavieren. Nach dem Abkühlen auf 55 °C 1 ml Ampicillin- bzw. Kanamycin-Stammlösung zugeben und 25 ml in Petrischalen gießen. Die erkalteten Platten werden kopfüber bei 4 °C gelagert.
- Transformationspuffer: 10 mM Pipes, 15 mM CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 250 mM KCl in aqua bidest., pH 6,8

#### Zellbiologie

- SDS Sample-Puffer: 62,5 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 10 % Glycerin, 50 mM DTT, 0,01 % Bromphenolblau, pH 6,8
- IP-Lyse-Puffer: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 % NP-40, pH 8,0
- NP-40 Zellysepuffer: 50 mM Tris-HCl, 150 mM Na-Cl, 1% NP-40, pH 8.0
- SDS-Probenpuffer: 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 % w/v SDS, 10 % Glycerin, 50 mM DTT, 0.01 % w/v Bromphenolblau
- IBA-Lysepuffer: 50 mM Tris-HCl, 7.5 % Glycerin, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5
- Western Blot-Blocking-Puffer: 1 x TBS, 0.1 % Tween-20, 5 % Milchpulver
- 1x SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris base, 3,5 mM SDS, 192 mM Glycin
- Protein-Transferpuffer: 25 mM Tris base, 150 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol, pH 8.3
- TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 8.0
- TBE-Puffer: 89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA
- TAE-Puffer: Tris-Acetat 40 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4
- 2x HBS-Puffer: 0,8 g NaCl, 0,02g Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat, 0,037 g KCl, 0,5 g HEPES, 0,1 g Dextrose, pH 7,3
- IBA-Lysepuffer: 50 mM Tris-HCl, 7.5 % Glycerin, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5

### 3. Material

- IBA-Waschpuffer: 100 mM Tris/HCl, 150 mM BaCl, 1 mM EDTA, pH8
- IBA-Biotin-Elutionspuffer: 100 mM Tris/HCl, 150 mM BaCl, 1 mM EDTA, 2 mM Biotin, pH8
- Reduktionslösung: 10 mM DTT (Dithiothreitol) in 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>
- Alkylierungslösung: 50 mM Jodacetamid in 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>
- Trypsinlösung: 12,5 ng/μl Trypsin bzw. 25 ng/μl Trypsin in 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

#### 3.14 Zellkultur

Produkt	Hersteller, Firmensitz
DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium) High Glucose 4,5 g/ml	PAA, Pasching, Österreich
RPMI 1640 mit L-Glutamine	PAA, Pasching, Österreich
VLE-RPMI	Biochrom AG, Berlin
Dulbecco's PBS ohne Ca & Mg	PAA, Pasching, Österreich
Fetal Bovine Serum	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin 100x	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, Österreich
G418 (Geneticin)	PAA, Pasching, Österreich

#### 3.15 Zelllinien

HEK293, humane embryonale Fibroblastenzelllinie (ATCC CRL-1573)

RAW264.7, murine Monozyten/Makrophagenzelllinie aus BALB/c Mäusen (ATCC TIB-71)

## 4 Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Isolation von RNA

Zur Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen werden  $10^6$  bis  $10^7$  Zellen in 1 ml Trizol, einer Lösung aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat, die die Zellen lysiert und die Proteine denaturiert, aufgenommen und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden 0,2 ml Chloroform dazu pipettiert, 15 sec kräftig geschüttelt und 2 bis 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch 15 minütiges Zentrifugieren bei  $12.000 \times g$  bei  $4^\circ\text{C}$  wird die Mischung in eine untere Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine obere wässrige farblose Phase getrennt. Die wässrige, die RNA enthaltende Phase, wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit  $500\mu\text{l}$  Isopropanol vermischt und nach einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur für weitere 10 min bei  $12.000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Die dabei als Pellet sichtbare gefällte RNA wird durch Zugabe von 1 ml 75 % Ethanol, kräftigem Schütteln und 5 minütiger Zentrifugation bei  $7.500 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  gewaschen. Das RNA-Pellet wird für 5 bis 10 min an der Luft getrocknet und in 15 – 20  $\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser aufgenommen und für 10 min bei  $55^\circ\text{C}$  auf dem Heizblock gelöst. Die Konzentration und Reinheit der RNA wird photometrisch bestimmt und die RNA bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

- Zellen in 1ml Trizol aufnehmen, 5 min RT
- 0,2 ml Chloroform dazugeben, 15 sec schütteln, 2-15 min RT
- zentrifugieren bei  $12.000 \times g$  für 15 min,
- obere wässrige Phase in neues Gefäß überführen
- $500 \mu\text{l}$  Isopropanol dazugeben, mischen, 10 min RT
- zentrifugieren bei  $12.000 \times g$  für 15 min,  $4^\circ\text{C}$
- Pellet Waschen mit 1 ml 75 %, schütteln
- zentrifugieren bei  $7.500 \times g$  für 5 min,  $4^\circ\text{C}$

- Pellet 5-10 min trocknen
- in 10-15 µl RNase freies Wasser aufnehmen und bei -80 °C lagern

### 4.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration der Nukleinsäurelösungen wird photometrisch über die optische Dichte (OD) bei ihrem spezifischen Absorptionsmaximums bei  $\lambda = 260$  nm gemessen. Mögliche Proteinkontaminationen werden zuverlässig mit dem Quotienten  $A_{\lambda 260}$  zu  $\lambda 280$  abgeschätzt. Bei sauberen Nukleinsäurelösungen sollte dieser Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Berechnung der DNA- bzw. RNA-Konzentration folgte auf der Annahme, dass eine OD<sub>260</sub> von 1.0 einer doppelsträngigen DNA Konzentration von etwa 50 µg/ml bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger RNA entspricht.

### 4.1.3 Reverse Transkription (RT) und cDNA-Synthese

Isolierte Gesamt-RNA wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre (cDNA) umgeschrieben. Diese dient dann in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) als Matrize für Vervielfältigung bestimmter Gene für gerichtete Klonierungen. Die nach Angaben des Herstellers verwendete Reverse Transkriptase Superscript II der Firma Invitrogen (Karlsruhe) ist eine RNA abhängige DNA Polymerase. Als Primer für die cDNA-Synthese werden in einem 20 µl Reaktionsansatz 0,5 µg Oligo (dT) (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Als Positivkontrolle der cDNA-Synthese dient eine PCR auf das Housekeeping-Gen GAPDH.

### 4.1.4 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) ist eine Methode zur in vitro-Amplifikation von DNA-Abschnitten. Sie beruht auf der Eigenschaft der DNA-Polymerase, anhand einer DNA-Matrize einen neuen komplementären DNA-Doppelstrang zu synthetisieren. Die Reaktion setzt sich aus den drei Schritten Denaturierung der DNA, Primer-Hybridisierung und Polymerisation zusammen, durch die eine DNA-Matrize in mehreren Zyklen exponentiell vervielfältigt wird. Als Startermoleküle

dienen synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer), die sequenzspezifisch mit der Matrizen-DNA hybridisieren. An den freien 3'-OH-Primer-Enden dieser kurzen doppelsträngigen Abschnitte kann die DNA-Polymerase ansetzen und mit der Synthese komplementärer DNA-Sequenzen beginnen. Durch Wahl eines gegenläufig orientierten Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den Primern amplifiziert werden. Ein Zyklus beginnt mit dem Aufschmelzen der DNA in Einzelstränge bei 95 °C. Die Hybridisierungstemperatur ist abhängig vom CG/AT-Verhältnis der Primer. Für eine Primer-Länge zwischen 18 und 24 Nukleotiden gilt als Faustregel für die Schmelztemperatur ( $T_m$ ):  $T_m = 4 \cdot (G+C) + 2 \cdot (A+T)$ .

Nach dem Binden der Primer an die DNA kann die DNA-Polymerase ansetzen und mit der Synthese des DNA-Moleküls beginnen. Die optimale Temperatur für die Polymerisation beträgt 72 °C, wobei die Dauer von der Länge des zu amplifizierenden Fragments abhängig ist. Nach der Verlängerung des Nukleotidstrangs an den Primern wird die nun erneut doppelsträngige DNA aufgeschmolzen, und der Zyklus beginnt von neuem. In der vorliegenden Arbeit werden neben der Taq-Polymerase, aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus*, die „proof-reading“ Polymerasen Pfu (aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus*) benutzt, welche Fehlpaarungen in der DNA erkennen und durch eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität diese falsch eingebauten Nukleotide ausschneiden und korrigieren. Um lange Sequenzen mit möglichst wenigen Fehlpaarungen zu erhalten, kommen daher hauptsächlich die Pfu Polymerasen zum Einsatz. Die Taq-Polymerase besitzt keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, hängt aber im Gegensatz zu den Proofreading-Polymerasen an die 3'-Enden der neu synthetisierten Produktstränge ein Adenosin an, so dass die PCR-Produkte effektiv in TA-Vektoren kloniert werden können.

In einem 50 µl PCR Ansatz werden 30-50 ng Plasmid-DNA, 50-100 ng genomische DNA oder 2 µl cDNA als Matrize eingesetzt. Er enthält zusätzlich 0,2 mM dNTP-Mix, je 0,2 µM sense- und antisense-Primer, 5 µl 10x Polymerase Puffers, 2,5 Units DNA-Polymerase und wird mit Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt.

Standard-PCR-Ansatz:

PCR-Reagenzien	Menge	Endkonzentration
10x Herculase Reaktionspuffer	5 $\mu$ l	1x
10 mM dNTP-Mix	1 $\mu$ l	0,2 mM
20 $\mu$ M sense-Primer	0,5 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
20 $\mu$ M antisense-Primer	0,5 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
PCR-H <sub>2</sub> O	40 $\mu$ l	
cDNA-Template	2 $\mu$ l	
DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l	2,5 U
Endvolumen	50 $\mu$ l	

Standard-PCR-Programm:

	Zeit	Temperatur	
Initiale Denaturierung	3 min	92 °C	
Denaturierung	1 min	92 °C	} 35 Zyklen
Annealing	1 min	55 – 60 °C	
Elongation	1 min/kb	68 °C	
Finale Elongation	10 min	68 °C	
	$\infty$	4 °C	

In dieser Arbeit kommt die PCR auf vielfältige Weise zur Anwendung, z. B. bei Klonierungen, Sequenzierungen, Mutagenesen, zur Kontrolle der cDNA-Synthese und zur Überprüfung der Genexpression auf mRNA-Ebene.

#### 4.1.5 DNA-Restriktionsanalyse

Bakterielle Restriktionsendonukleasen haben die biologische Funktion fremde DNA zu spalten und so z. B. infizierenden Viren abzuwehren. Jede Restriktionsendonuklease erkennt eine spezifische DNA-Basensequenz, meist Palindrome aus vier, sechs oder acht

Basenpaaren, und schneidet dort das Phosphatzuckerrückgrat. Dabei entstehen je nach Enzym glatte (engl. „blunt“) oder 5' bzw. 3' überhängende (engl. „sticky“) Enden.

Zur gerichteten Klonierung werden zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme eingesetzt, die jeweils Vektor und Insert so schneiden, dass überstehende Enden entstehen. Vektor- und Insert-DNA werden in einem Reaktionsvolumen von 30 – 50 µl nach Angaben der Hersteller in einem dem Enzym entsprechendem Puffer mit 1 U Restriktionsendonuklease für gewöhnlich eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Restriktionsansätze werden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten Fragmente ausgeschnitten und für die Klonierung aufgereinigt. Mit der Restriktionsanalyse lassen sich auch Plasmide nach einer Klonierung analysieren.

### 4.1.6 Analytische Flachbett-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente werden je nach Länge in einem 0,8 bis 2 %igen Agarosegel der Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Durch Aufkochen wird Agarose in TBE-Puffer gelöst und nach Abkühlen auf ca. 50 °C mit Ethidiumbromid der Konzentration 0,1-0,5 µg/ml versetzt. Die Suspension wird in eine vorbereitete Gelform gegossen. Nach Auspolymerisieren der Agarose werden die mit Ladepuffer versetzten DNA-Proben in die Geltaschen pipettiert und eine Gleichspannung von 100-150 V bis zur gewünschten Auftrennung angelegt. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern dabei Richtung Anode. Die Auswertung erfolgt unter UV-Licht, bei dem das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 312 \text{ nm}$  oder  $\lambda = 254 \text{ nm}$  fluoresziert. Auf diese Weise leuchten im Agarosegel die Stellen, an denen sich Nukleinsäuren befinden, hell auf. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur DNA-Konzentration sowie zur Länge der Nukleinsäure. Die Größenzuordnung der DNA-Banden erfolgt durch einen Laufstreckenvergleich mit einem parallel auf dem Gel aufgetrennten DNA-Größenstandard.

### 4.1.7 Präparative Flachbett-Gelelektrophorese

Das zu isolierende DNA-Fragment wird mit einem sauberen Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Das Extrahieren der Nukleinsäuren aus dem Gel geschieht mit dem GeneJET™ Gel-Extraktionskit der Firma MBI Fermentas nach Angaben des Herstellers. Das ausgeschnittene Gelstück wird dabei in ein 1,5 ml Zentrifugationsgefäß zusammen mit Binde-Puffer gegeben, wobei dem Gewicht des Gelstücks entsprechend zu 100 mg Agarosegel 100 µl Bindepuffer gegeben wird. Nach Lösen des Gelstücks bei 50-60 °C für 10 min wird Lösung in eine Zentrifugationssäule (GeneJET™ purification column) überführt und 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und noch einmal 100 µl Bindepuffer in die Zentrifugationssäule gegeben und für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und 700 µl Waschpuffer in die Zentrifugationssäule pipettiert. Nach einem einminütigen Zentrifugationsschritt wird die geleerte Zentrifugationssäule eine zusätzliche Minute zentrifugiert, um den restlichen Waschpuffer zu entfernen. Die Säule wird in ein 1,5 ml Zentrifugationsgefäß überführt und mit 50 µl Elutionspuffer für 1 min inkubiert und in einem letzten Zentrifugationsschritt für 1 min die Nukleinsäuren eluiert.

### 4.1.8 Dephosphorylierung linearer DNA am 5'-Ende

Vor einer Ligation werden mit Restriktionsenzymen geschnittene Vektor und Insert am 5'-Ende enzymatisch dephosphoryliert. Hierzu gibt man 1 U alkalischer Phosphatase (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, MBI Fermentas) zum Ansatz und inkubiert für 1 Stunde bei 37 °C.

### 4.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden Vektor und Insert mit Hilfe der Ligase aus dem DNA Ligation Kit Ver. 2.1 der Firma TaKaRa ligiert. In der Regel wird in einem Ansatz zehnmal so viel Insert wie Vektor verwendet. Es werden 6 µl Ligationsansatz mit 6 µl TaKaRa Solution I versetzt und 1 Stunde bei 16 °C inkubiert. Von dem Ligationsansatz werden 5 µl zur Transformation in chemisch kompetente *E. coli* DH5α verwendet.

#### 4.1.10 Topo-TA-Klonierung

Mit dem TOPO TA-System (Invitrogen) ist es möglich PCR-Produkte, die mittels Taq-Polymerase amplifiziert wurden, direkt in einen speziellen Vektor zu klonieren und auf positive Klone nach der Transformation in Bakterien zu screenen. Der dafür vorgesehene Vektor liegt in linearisierter Form mit 3'-Desoxythymidin-Überhängen vor. Die Taq-Polymerase besitzt eine terminale Transferaseaktivität, die an 3'-Enden der Amplifikate einzelne Deoxyadenosine anhängt. Diese Adenosine hybridisieren mit den 3'-Desoxythymidinen des Vektors. Eine kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase I bindet an die doppelsträngige DNA des PCR-Produktes oder mit Taq-Polymerase behandelte DNA und ermöglicht so eine spontane Ligation. Durch Transformation wurden Topo TA-klonierte Plasmide in kompetente E.coli-Zellen übertragen. Da der verwendete Vektor pCR2.1-TOPO das Gen für  $\beta$ -Lactamase enthält, können nur solche Bakterien auf Ampicillin-Agarplatten anwachsen, die das Plasmid aufgenommen haben. Da das Reporter-gen für  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*) die multiple Klonierungsstelle (MCS) enthält, konnte mittels der sogenannten Blau-Weiß-Selektion auf X-Gal enthaltenen Agarplatten vorselektioniert werden. Die Aufnahme eines intakten Plasmides führt zu einer Ampicillin-Resistenz der Zellen und zur Spaltung des farblosen Substrates X-Gal in das blaue Produkt. Der Einbau eines Inserts in die MCS zerstört das Leseraster des *LacZ* Gens. Die mit dem Insert transformierten Bakterienkolonien bleiben in Anwesenheit von X-Gal farblos.

#### 4.1.11 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Der Bakterienstamm E.coli DH5 $\alpha$  wurde auf einer Agarplatte mit LB-Medium ohne Antibiotikum ausgestrichen und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und damit eine 5 ml Vorkultur angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde 200 ml frisches LB-Medium mit der Übernachtskultur im Verhältnis 1/100 inokuliert und die Kultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,4 inkubiert. Nach Zentrifugation der Bakterien bei 3000 rpm unter 4 °C wurde der Überstand abgenommen und 67 ml eiskalter Transformationspuffer zu den Zellen gegeben und vorsichtig resuspendiert und 10 min bei 4 °C inkubiert. Die Bakterien wurden

wieder für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 16 ml eiskaltem Transformationspuffer aufgenommen. Nach vorsichtigem Suspendieren wurde 1,2 ml DMSO dazu gegeben und die Zellsuspension für 10 min auf Eis stehen gelassen. In 200 µl aliquotierten Teilen wurde die Bakteriensuspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### **4.1.12 Transformation chemisch kompetenter Bakterien**

Die Transformation wird genutzt um rekombinante DNA in Bakterien zu vervielfältigen. In dieser Arbeit verwendete chemisch kompetente *E. coli* DH5α nehmen dabei freie DNA, im Normalfall ein Plasmid, auf. Zu diesem Zweck werden 200 ng Plasmid-DNA, 6 µl Ligations- bzw. Mutageneseansatz auf 80 µl mit chemisch kompetenten DH5α sowie 20 µl 5x KCM-Lösung vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA erfolgt bei einem Hitzeschock bei 42 °C für 40 sec. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis werden die Bakterien mit 200 µl LB-Medium ohne Antibiotikazusatz für 60 min bei 37 °C geschüttelt. Davon werden 50 µl – 100 µl auf LB-Agarplatten ausplattiert. Je nach Antibiotikaresistenzgene enthaltende Plasmide werden LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum z. B. 50 µg/ml Kanamycin oder 100 µg/ml Ampicillin verwendet und damit erfolgreich transformierte Zellen selektiert. Die Agarplatten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag auf gewachsene Kolonien kontrolliert.

### **4.1.13 Anzucht transformierter Bakterien**

Bei der Transformation gewachsene Kolonien werden einige davon mit einer Pipettenspitze gepickt und damit LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum beimpft und bei 37 °C auf dem Schüttler wachsen gelassen.

### **4.1.14 Isolation bakterieller Plasmid-DNA im Klein- und Mittelmaßstab**

In Bakterien vervielfältigte Plasmid-DNA wird mit einer bestimmten Methode isoliert. Das verwendete GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) zur Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Es werden 5 ml Übernachtskultur mit *E. coli* DH5 $\alpha$  die das zu isolierende Plasmid enthalten bei 12.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 250  $\mu$ l Resuspensionslösung resuspendiert. Die Zellsuspension wird in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und nach Zugabe von 250  $\mu$ l Lyselösung gründlich gemischt. Dazu wird 350  $\mu$ l Neutralisationslösung pipettiert und sofort gemischt. Durch Zentrifugieren bei 12.000 rpm für 5 min werden die Zelltrümmer und chromosomale DNA pelletiert. Der Überstand wird in eine GeneJET™ Zentrifugationssäule überführt und für eine Minute bei 12.000 rpm zentrifugiert. Danach wird mit 500  $\mu$ l Waschlösung und erneutes Zentrifugieren gewaschen und der Durchlauf verworfen. Der Waschschrift wird mit 500  $\mu$ l Waschlösung wiederholt. Nach Verwerfen des Durchlaufs wird nochmals für eine Minute zentrifugiert um die restliche Waschlösung entfernt. Die Zentrifugationssäule wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß umgesetzt und 50 ml Elutionspuffer in die Mitte der Membran der Säule pipettiert um die Plasmid-DNA zu eluieren. Es wird 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und die DNA-Lösung in einem letzten zweiminütigen Zentrifugationsschritt gesammelt und die gereinigte Plasmid-DNA bei -20 °C gelagert.

Für die Isolierung von Plasmid-DNA für sensible Stimulationsversuche, z. B. in den Mausmakrophagen-Zelllinie RAW264.7, wurde ein Endotoxin-freies Extraktionskit für den größeren Maßstab verwendet (NucleoBond® PC 500 EF Endotoxin-freie Plasmid DNA, Macherey-Nagel, Düren). Die Durchführung nach Angaben des Herstellers verläuft prinzipiell genauso wie im kleinen Maßstab. Man geht von 140 ml Übernachtskultur aus, zentrifugiert diese in mehreren 50 ml Zentrifugenröhrchen, klärt das Zelllysate über bestimmtes Filterpapier und isoliert die Plasmid-DNA über entsprechende Säulen (NucleoBond® Column).

- 5 ml Übernachtskultur zentrifugieren bei 12 000 rpm für 5 min
- Pellet in 250  $\mu$ l Resuspensionslösung resuspendiert und in neues Zentrifugenröhrchen überführt
- Zugabe von 250  $\mu$ l Lyselösung, schütteln
- Zugabe von 350  $\mu$ l Neutralisierungslösung, sofort mischen
- zentrifugieren bei 12 000 rpm für 5 min

- Überstand in GeneJET™-Zentrifugenröhrchen überführen
- zentrifugieren bei 12.000 rpm für 1 min, Überstand verwerfen
- Zugabe von 500 µl Waschlösung
- zentrifugieren bei 12.000 rpm für 1 min
- Waschprozedur mit 500 µl Waschlösung wiederholen
- Überstand verwerfen und für eine weitere Minute bei 12.000 rpm zentrifugieren
- das GeneJET™-Zentrifugenröhrchen in ein neues 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführen
- Zugabe von 50 µl Elutionspuffer, 2min RT
- zentrifugieren bei 12.000 rpm für 2 min
- DNA bei -20 °C lagern.

### 4.1.15 DNA-Sequenzanalyse

Zur Kontrolle der Plasmide aus Klonierungen und Mutagenesen werden die entsprechenden DNA-Abschnitte mit Hilfe des ABI PRISM 310 Genetic Analyzers (Applied Biosystems) sequenziert. Dazu wird ein größerer Bereich der DNA, der das zu sequenzierende Teilstück umfasst, mittels einer PCR mit einem entsprechend dafür designten Primer linear amplifiziert.

Hierfür wird das BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycling Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems verwendet. Ein Ansatz von 10 µl enthält 2µl Ready Reaction Premix, 1 µl 5 x Puffer, ca. 200 ng Plasmid-DNA, 5 pM Sequenzierungsprimer und PCR-Grade Wasser. Im Thermocycler folgen einer initialen Denaturierung der DNA-Stränge bei 96 °C für 1 min 25 Zyklen von 10 sec bei 96 °C und 30 sec bei 56 °C und die Amplifikation endet mit einer Inkubation bei 60 °C für 4 min.

PCR-Ansatz:

<b>PCR-Komponenten</b>	<b>10 µl-Ansatz</b>
Ready Reaction Premix	2 µl
5 x Puffer	1 µl
10 pmol/µl Sequenzierungsprimer	0,5 µl

Aufgereinigtes PCR-Produkt / Plasmid-DNA	2-5 µl / 100-300 ng
PCR-H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

PCR-Programm für Sequenzierung:

	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>	
Initiale Denaturierung	1 min	96 °C	
Denaturierung	10 sec	96 °C	} 25 Zyklen
Annealing	1 min	55 – 65 °C	
Elongation	4 min	60 °C	
	∞	4 °C	

In der PCR werden die DNA-Stränge von den Bindungsstellen des Primers aus synthetisiert, bis Fluoreszenz-markierte Didesoxynukleotide eingebaut werden und die DNA-Synthese abbricht. Bei dieser Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Das Chromatogramm gibt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder.

Die Sequenz-PCR-Produkte werden mit Hilfe des CRYSTAL DYE Removal Kit (Biolab) zur Entfernung des Fluoreszenz-markierten Nukleotide aufgereinigt. Im Anschluss an den Reinigungsschritt werden 4 µl des gereinigten PCR-Ansatzes mit 16 µl denaturierendem HiDi™-Formamid versetzt und in einem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer analysiert. Die Auswertung erfolgt mit der Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems) sowie einer Internet-basierten BLAST-Analyse zum Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der NCBI-Datenbank.

Verwendete Lösungen und Reagenzien der Firma Applied Biosystems:

BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit

Hi-Di™ Formamide

POP-6™ Polymer

310 Genetic Analyzer Capillary, 47 cm

### 4.1.16 Klonierung

Das humane Gen MyD88 wurde aus humaner cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion mit den Restriktionsschnittstellen EcoRI und KpnI amplifiziert und in den Expressionsvektor pEXPR-IBA105 kloniert, wobei bei Expression des Gens ein Fusionsprotein mit einem Strep-tag am N-terminalen Ende entsteht. Das One-STrEP-tag ist ein Peptid mit der Aminosäuresequenz MASWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWWSHPQFEK.

In den Versuchen mit TLR2 wurde ein Plasmid verwendet indem das Gen für das humane TLR2 gerichtet in den Flag-Vektor p3XFLAG-CMV™-14 kloniert war.

Humanes und murines TRAF3IP3, voller Länge sowie die trunkierte Versionen wurden aus humaner bzw. muriner cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Humanes TRAF3IP3 wurde zuerst mit der TOPO-TA-Klonierung in einen pCR2.1-Vektor kloniert um es in die Expressionsvektoren pC-3xHA, pcDNA3.1 und p3XFLAG-CMV™-10 umzuklonieren. Murines Traf3ip3 wurde mit den Restriktionsschnittstellen NotI und XbaI amplifiziert und in die Expressionsvektoren pC-3xHA u. p3XFLAG-CMV™-10 kloniert.

Konstrukte von humanem 14-3-3 theta wurden freundlicherweise von Frau Dr. Angelika Hausser (Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart) bereitgestellt und in den Vektor pC-3xHA umkloniert. Murines 14-3-3 theta wurde aus RAW264.7-cDNA amplifiziert und in den Vektor pC-3xHA eingefügt.

Der Inhibitor von 14-3-3-Proteinen R18 ist ein Peptid aus 20 Aminosäuren (PHCVPRDLSWLDLEANMCLP) (B. Wang et al. 1999). Es wurde eine Matrize aus 83 Nukleotiden synthetisiert und für die Amplifizierung der für das Peptid R18 kodierende Nukleotidsequenz mit Restriktionsschnittstellen verwendet (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) und in den Expressionsvektor p3XFLAG-CMV™-10 kloniert.

### 4.1.17 Gerichtete Mutagenese

Mit Hilfe der QuikChange Site-Directed Mutagenese-Kits der Firma Stratagene werden Punktmutationen in Plasmide nach Angaben des Herstellers eingefügt. Die Primer für die

gewünschte Mutagenese werden individuell so designt, dass die Sequenz der neuen Aminosäure in der Mitte der 30-35 Basenpaare langen Oligonukleotide liegt und deren Schmelztemperatur über 78 °C liegt. Die Primer wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. In einer PCR wird das gesamte Plasmid in insgesamt 17 Zyklen mit der ausgetauschten Nukleinbase bzw. den ausgetauschten Nukleinbasen linear amplifiziert. Ein 25 µl-PCR-Ansatz enthält 1 x Reaktionspuffer, 125 ng der sense- und antisense-Mutageneseprimer, 2 mM dNTP-Mix, 25-50 ng Plasmid-DNA, 1,25 U PfuTurbo<sup>®</sup> DNA-Polymerase und PCR-Wasser. Ein Zyklus besteht aus 30 sec Denaturierung bei 95 °C, 30 sec Elongation bei 55 °C, 1 min/kb Annealing bei 68 °C und eine abschließende Inkubation bei 68 °C für 14 min. Anschließend wird in dem Reaktionsprodukt die parentale, methylierte Plasmid-DNA mit 2,5 U des Restriktionsenzym *DpnI* bei 37 °C für eine Stunde abgebaut. Nach dem Verdau werden 1 µl der amplifizierten, mutierten, einzelsträngigen, zirkulären DNA in *E.coli* DH5α transformiert und dort zur doppelsträngigen Plasmid-DNA vervollständigt. Transformierte Bakterien werden auf Agarplatten ausplattiert und Plasmide aus gepickten Kolonien isoliert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Mutagenese werden die mutagenisierten Plasmide auf Vorhandensein des gewünschten Aminosäureaustausches sequenziert.

Mutagenese-PCR-Ansatz:

<b>PCR-Reagenzien</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
10x Reaktionspuffer	5 µl	1x
10 mM dNTP-Mix	1 µl	0,2 mM
20 µM sense-Primer	1,25 µl	0,5 µM
20 µM antisense-Primer	1,25 µl	0,5 µM
PCR-H <sub>2</sub> O	x µl	
5-50 ng DNA-Template	x µl	
<i>PfuTurbo</i> DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl	2,5 U
Endvolumen	50 µl	

Mutagenese-PCR-Programm:

	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>	
Initiale Denaturierung	30 sec	92 °C	
Denaturierung	30 sec	92 °C	} 17 Zyklen
Annealing	1 min	55 °C	
Elongation	1 min/kb	68 °C	
finale Elongation	14 min	68 °C	
	2 min	4 °C	

- Zugabe von 1 µl DpnI, Inkubation bei 37 °C, 1 h.
- Transformation von 1 µl in chemisch kompetente *E.coli* DH5α

## 4.2 Zellbiologische und biochemische Methoden

### 4.2.1 Kultivierung und Passagieren von humanen HEK293-Zellen

Humane embryonale Nierenzellen der Linie HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) werden in DMEM (Dulbecco's MEM) mit 4,5 g/l D-Glucose, L-Glutamin, 100 U/ml (100 µg/ml) Penicillin/Streptomycin und 10 % hitzeinaktiviertes FBS bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Gewebekulturschalen kultiviert. Zur Passage der adhärenen Zelllinie werden die Zellen bei einer Konfluenz von 70-90 % mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit Trypsin/EDTA bei 37 °C für 5 min vom Schalenboden abgelöst. Die Zellen können so in einer geeigneten Verdünnung mit DMEM in neue Gewebekulturschalen ausgesät werden.

### 4.2.2 Kultivierung und Passagieren von murinen RAW264.7-Zellen

Die murine Monozyten/Makrophagenzelllinie RAW264.7 sind aus BALB/c Mäusen stammende mit Abelson-Leukämievirus transformierte Zellen. Sie werden in VLE-RPMI 1640 (Very Low Endotoxin) Flüssigmedium mit 2,0 g/l NaHCO<sub>3</sub>, ohne l-Glutamin, mit 100 U/ml (100 µg/ml) Penicillin/Streptomycin und 10 % hitzeinaktiviertem FBS bei 37 °C

und 5 % CO<sub>2</sub> in Gewebekulturschalen kultiviert. Die Zellen werden durch Abspülen mit der Pipette vom Boden der Gewebekulturschale gelöst und im Verhältnis 1:5 in eine neue Schale ausgesät.

### **4.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zur Langzeitlagerung werden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen werden dabei mit einem Dimethylsulfoxid (DMSO) haltigen Einfriermedium eingefroren, das die Ausbildung von schädlichen Eiskristallen verhindert. In einem Kryoröhrchen werden  $1 \times 10^7$  Zellen in 1ml 10 % DMSO in FBS eingefroren.

Zum Auftauen der gefrorenen Zellen werden sie kurz im 37 °C Wasserbad aufgetaut und mit Zellkulturmedium für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand mit DMSO abgesaugt und die Zellen in entsprechendem Zellkulturmedium in Gewebekulturschalen oder -flaschen ausgesät.

### **4.2.4 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätstest**

Die Zellzahl einer Zellsuspension wird mittels einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Eine Verdünnung der Zellen mit einer Trypanblau-Lösung erlaubt dabei blau gefärbte tote Zellen von lebenden ungefärbten Zellen zu unterscheiden.

### **4.2.5 Transfektion eukaryotischer Zelllinien**

Als Transfektion wird in der Zellbiologie das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Dabei unterscheidet man zwischen der transienten Transfektion, dem zeitweiligen Einbringen der DNA in Form eines Plasmids in die Zelle und dem dauerhaften Einbau in das Genom, der stabilen Transfektion.

#### **4.2.5.1 Transiente Transfektion humaner HEK293-Zellen mit Calciumphosphat**

Bei der Calciumphosphat-Präzipitation wird in einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat die zu übertragende DNA an ausfallendem Calciumphosphat gebun-

den und von den Zellen durch Endocytose aufgenommen. Für Reporterassays z. B. werden  $3,5 \times 10^5$  HEK293-Zellen in einer 6 well-Platte ausgesät. In einem Transfektionsansatz werden 2,5 µg Plasmid-DNA mit 2 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung und 2x HBS-Lösung eingesetzt und auf die Zellen pipettiert. Als Positivkontrolle zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wird ein GFP-Plasmid in einem separaten Well transfiziert.

### 4.2.5.2 Transiente Transfektion muriner RAW264.7-Zellen mit Turbofect

Murine RAW264.7-Zellen wurden mittels TurboFect™ in vitro Transfektionsreagenz der Firma MBI Fermentas verwendet. Hierbei gelangen die Nukleinsäuren mit Hilfe von Lipidvesikeln, die mit der Zellmembran fusionieren, in die Zelle. Im 6 well-Maßstab werden 24 Stunden vor der Transfektion  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well ausgesät. In einem Ansatz werden 4 µg Plasmid-DNA in 400 µl Serum freies RPMI verdünnt, 4 µl TurboFect™ dazu gegeben und durch Pipettieren gemischt. Nach Inkubation von 15-20 min bei Raumtemperatur wird das Transfektionsreagenz/DNA-Gemisch tröpfchenweise in das Well gegeben.

### 4.2.5.3 Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen

Für eine dauerhafte Expression gewünschter Gene in Zellen muss das Plasmid in das Genom eingebaut werden, damit die fremde DNA nicht durch Abbauprozesse abgebaut wird. Zur dauerhaften Integration des Plasmids in die Wirts-DNA wird ein Vektor mit einem Antibiotikaresistenzgen eingesetzt, um die transfizierten Zellen mit einem Antibiotikum selektieren zu können. Nach der Transfektion werden HEK-Zellen durch Inkubation mit 1 mg/ml und RAW264.7 mit 0,5 mg/ml des Antibiotikums Geneticin (G418) einem Selektionsdruck ausgesetzt. Das Aminoglykosid G418 bindet irreversibel an die 80S Ribosomenuntereinheit und blockiert die Proteinsynthese der Zellen. Unter regelmäßiger Erneuerung des Selektionsmediums überleben nur transfizierte Zellen, die das Plasmid stabil in ihre DNA integriert haben.

Bei der Selektion transfizierter Zellen werden häufig Zellpopulationen erhalten, die das gewünschte Protein in unterschiedlicher Stärke exprimieren. Durch limitierende Verdünnung der Zellen werden monoklonale Zellpopulationen generiert. Dabei werden die

Zellen in 96-Loch-Kulturplatten mit Selektionsmedium so ausgesät, dass theoretisch pro Well 0,7 Zellen verteilt sind. Die einzelnen Zellpopulationen werden mittels Western Blot auf Expression des gewünschten Proteins kontrolliert und die Population mit der gewünschten Expressionsrate weiter verwendet.

#### 4.2.6 Reporter-Gen-Analyse in Zellkultur

In einem Reporter-Gen-Assay kann die Aktivität von bestimmten Promotoren in Zellen bestimmt werden. Das Dual-Glo™ Luciferase-Assay Kit der Firma Promega macht sich das Luciferin-Luciferase-System zunutze und wird verwendet, um die Aktivität von z. B. NF-κB zu untersuchen. In dem Plasmid ist der induzierbare Promotor NF-κB vor das Reporter-Gen der Firefly-Luciferase (aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*) geschaltet. Die Aktivität des unter der Kontrolle des Promotors stehenden Reporter-Gens wird quantitativ gemessen. Das gebildete Enzym Luciferase reagiert mit dem im Gluo Glo™ Luciferase Reagent enthaltenen Luciferin, ATP und  $Mg^{2+}$  zu Licht.

Transient transfizierte eukaryotische Zellen werden nach Stimulation mit PBS gewaschen und mit 100 µl 1 x passivem Lysepuffer resuspendiert, wovon 50 µl Lysat pro Well in eine 96 well-Platte pipettiert werden. Zur Messung der Firefly-Luciferaseaktivität pipettiert man 75 µl Dual-Glo™ Luciferase Reagenz in jedes Well, inkubiert die Platte 15 min im Dunkeln und misst danach das erste Mal im Luminometer (0,5 sec Intervall, dreimalige Wiederholung der Messung). Die Renilla-Aktivität (pGL4.7[hRLuc/TK]) erhält man durch Zugabe von 75 µl Dual-Glo™ Stop&Glo Reagenz, welches das Firefly-Luciferase-signal stoppt und die Katalyse der Renilla-Luciferase anschaltet. Nach 15 minütiger Inkubation im Dunkeln wird die zweite Lumineszenz-Messung gestartet.

Zur Berechnung der Reporter-Genaktivität wird der gemessene Wert der Firefly-Luciferase mit dem Wert der Renilla-Luciferase normalisiert. Aus dem Mittelwert der Messungen wird der Quotient aus stimuliertem zu nicht stimuliertem Wert gebildet. Das Ergebnis ist die vielfache Induktion, die sog. „fold induction“.

### 4.2.7 Immunfluoreszenzfärbung von HEK293-Zellen

Transient transfizierte HEK293-Zellen mit Flag-getagtem TRAF3IP3 wurde mit Anti-Flag-Antikörper und anschließendem Fluoreszenzfarbstoffgekoppeltem Anti-Maus Antikörper gefärbt. Als Kontrolle dienen transient transfizierte Zellen mit Leervektor und nicht transfizierte Zellen. Zur Lokalisation des Zellkerns wurde parallel mit dem DNA-Farbstoff Hoechst-33342 gefärbt. Die Zellen werden 48 Stunden nach der Transfektion für 3 min mit PBS gewaschen und für 15 min mit 2 %igem Formalin fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS für 3 min werden die Zellen mit 700 ng M2-Anti-Flag Antikörper in 200 µl Permeabilitätspuffer für 15 min inkubiert und wieder für 3 min mit PBS gewaschen. Zur Detektion gebundener Antikörper wird mit Alexa Fluor 488 gekoppeltem Anti-Maus Antikörper in der Konzentration 1:500 für 15 min inkubiert und anschließend wieder zweimal mit PBS für 3 min gewaschen. Die gefärbten Zellen werden im Fluoreszenzmikroskop OLYMPUS IX70 ausgewertet oder mit dem Konfokalmikroskop Leica TCS SP2 untersucht.

### 4.2.8 Konfokale Mikroskopie

Aufnahmen transfizierter, fixierter und fluoreszenzmarkierte Zellen wurden mit dem Laser-Konfokalmikroskop Leica TCS SP2 (Leica Microsystems) erstellt. Mit diesem Lichtmikroskop werden optisch mikroskopische Schnitte in dreidimensionalen Strukturen wie z. B. Zellen erzeugt und mit der entsprechenden Software zu einer hochauflösenden räumlichen Darstellung zusammengefügt. Es wurden HEK293-Zellen auf die Expression von TRAF3IP3 hin untersucht. Die Zellen wurden mit Flag-getagtem TRAF3IP3 transient transfiziert und nach einer Immunfluoreszenz-Färbung mit Alexa Fluor 488 das Protein angefärbt. Mit einem Serien-Scan werden dreidimensionale Bilder angefertigt.

### 4.2.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, oder auch FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Analyse, erlaubt sowohl die qualitative Analyse einer heterogenen Zellsuspension, als auch die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen.

Grundlage dieses Verfahrens ist die Bildung einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung, die es ermöglicht, die Zellen einzeln durch einen Laserstrahl zu führen. Die Passage einer Zelle durch den Laserstrahl führt zur Streuung des Lichts sowie zur Aktivierung von Fluoreszenzerscheinungen (bei entsprechender Markierung der Zellen). Das in einem kleinen Winkel abgelenkte Licht wird als Vorwärtsstreuung (FSC, *forward scatter*) bezeichnet und ist abhängig von der Zellgröße, während das orthogonal gestreute Licht entsprechend Seitwärtsstreuung (SSC, *side scatter*) genannt wird und proportional zur Granularität der Zelle ist. Durch den Einsatz von fluoreszierenden, intrazellulären Farbstoffen oder Fluoreszenz-markierten Antikörpern lassen sich markierte Zellen innerhalb einer Zellsuspension verfolgen und genauer untersuchen.

Zur Untersuchung des Einflusses von TRAF3IP3 auf die Phosphorylierung von JNK unter TLR-Stimulation wurde eine Zweifachfärbung der intrazellulären Antigene für die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Die transient mit TRAF3IP3 transfizierten RAW264.7-Zellen wurden nach TLR-Stimulation mit PBS gewaschen, mit 3,7 % Formaldehyd fixiert und mit Saponin (PBS, 0,2 % BSA, 0,2 % Saponin) für 20 min bei 4 °C zur Permeabilisierung der Zellmembran inkubiert. Danach werden die gewaschenen Zellen für 10 min mit Ziegen- und Esel-Serum die unspezifischen Bindungsstellen der Antikörper abgesättigt. Für die intrazelluläre Färbung werden die Antikörper Anti-HA (aus Ratte) und Anti-Phospho-JNK (aus Kaninchen) in der Konzentration 1:50 in Permeabilisierungspuffer (PBS, 0,2 % BSA, 0,2 % Saponin) zu den Zellen gegeben und 30 min inkubiert. Nach Waschen mit PBS wird mit den Zweitantikörpern FITC-Anti-Ratte (1:250) und Phycoerythrin-Anti-Kaninchen (1:100) für 30 min inkubiert. Der Antikörper Phycoerythrin -Anti-Kaninchen wurde allerdings vorher für drei Minuten mit 1 µg/ml Maus-IgG inkubiert um dessen unspezifischen Bindungen zu mindern. Nach Zentrifugation der Zellen wurden die Zellen in FACS-Puffer (PBS, 2 % FCS, 0,1 % NaN<sub>3</sub>) resuspendiert und im Durchflusszytometer FACSCalibur®(BD-Bioscience) und der Software CellQuest Pro™ (BD-Bioscience) analysiert. Durch den Einsatz von mehreren Fluorochromen werden einfach markierte Kontrollen einbezogen, um die überlappenden Emissionsspektren zu kompensieren.

- transient transfizierte RAW264.7-Zellen nach TLR-Stimulation mit PBS waschen

- zentrifugieren bei 1300 rpm für 5 min
- je  $1 \times 10^6$  Zellen in Rundboden-Polystyrolröhrchen (FACS-Röhrchen) überführen
- Zellen mit 3,7 % Formaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur (RT) fixieren
- Zellen mit PBS, 0,5 % BSA waschen
- zentrifugieren bei 1300 rpm für 5 min
- Inkubation der Zellen mit Saponin (PBS, 0,2 % BSA, 0,2 % Saponin) für 20 min bei 4 °C zur Permeabilisierung der Zellmembran
- Zellen mit PBS, 0,5 % BSA waschen
- Zugabe von Ziegen- und Esel-Serum, für 10 min inkubieren
- zentrifugieren bei 1300 rpm für 5 min
- Zellpellet in 400 µl der beiden Antikörper Anti-HA (Ratte) (1:50) und Anti-Phospho-JNK (Kaninchen) (1:50) in 400 µl Permeabilisierungspuffer (PBS, 0,2 % BSA, 0,2 % Saponin) für 30 min bei RT inkubieren
- zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS, 0,5 % BSA
- Hinzugabe von Esel und Ziegen-Serum, für 10 min inkubieren
- Zweitantikörper PE-Anti-Kaninchen (aus Esel) und FITC-Anti-Ratte (aus Ziege) in 100 µl PBS, 0,5 % BSA dazugeben und 30 min bei RT inkubieren
- zweimal mit PBS, 0,5 % BSA waschen, zentrifugieren bei 1300 rpm für 5 min
- Pellet in 200 µl FACS-Puffer (PBS, 2 % FCS, 0,1 %  $\text{NaN}_3$ ) resuspendieren und im Durchflusszytometer FACSCalibur®(BD-Bioscience) messen.

### 4.2.9.1 Zelltod

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie und Annexin-V-Markierung wurde der TLR-induzierte Zelltod von RAW264.7-Zellen gemessen. Im frühen Stadium der Apoptose, dem programmierten Zelltod, finden verschiedene Veränderungen der Zellmembran statt. Phosphatidylserin (PS) wird dabei von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite der Membran transloziert. Annexin-V ist ein Phosphatidylserin-bindendes Protein. Durch Markierung mit Fluoreszenz gelabelten Annexin-V kann man apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachweisen. Die Membran nekrotischer Zellen wird

durchlässig und Annexin-V kann eindringen und an Phosphatidylserin an der Membrinnenseite binden. Auf eine Unterscheidung nekrotischer Zellen durch Anfärben mit einem DNA-Farbstoff wie z.B. Propidiumjodid wurde verzichtet. Annexin-V-Alexa 568 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) wird mit einem 488 nm-Laser analysiert.

Zur Darstellung des TLR-induzierten Zelltods in RAW264.7-Zellen wird mit den TLR-Liganden für TLR2, TLR3, TLR4, TLR7/8 und TLR9 unterschiedlicher Dauer inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Um den Einfluss von 14-3-3 auf die TLR-induzierten Zelltod zu untersuchen wurden RAW264.7-Zellen mit GFP zusammen mit 14-3-3 theta bzw. DN-14-3-3 oder dem Inhibitor R18 transient transfiziert. Nach Stimulation der TLR mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> oder LPS für 16 Stunden werden die Zellen mit Annexin-V-Alexa 568 nach Angaben des Herstellers gefärbt. Zuvor werden die Zellen mit der Pipette von der Zellkulturplatte gespült und mit PBS gewaschen. Die Zellen werden für 10 min bei Raumtemperatur mit 100 µl Annexin-V-Alexa 568 in Puffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,6) inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Zellen werden die Zellen in 300 µl Puffer resuspendiert. Im Durchflusszytometer werden GFP-positive Zellen auf apoptotische und nekrotische Zellen analysiert.

### **4.2.10 Multiplex-Bead-Assay zur Messung von Zytokinen**

Die Messung der Zytokine im Zellkulturüberstand erfolgte mittels dem Procarta<sup>®</sup> Cytokine Assay Kit (Panomics, Vignate-Mailand, Italien), einem Multiplex-Immunoassay, basierend auf der xMAP<sup>®</sup> Technologie (Luminex Corporation). Diese Technologie erlaubt die Bestimmung von bis 100 unterschiedlichen Parametern in einer Probe. Dabei werden uniforme, sphärische Polystyrol-Partikel, sogenannte Beads verwendet, die an der Oberfläche die Zytokin-spezifischen Antikörper tragen und im Immunoassay als Festphase dienen. Sie sind durch verschiedene Fluoreszenzfarbtöne und -konzentrationen unterscheidbar. Die in der Probe enthaltenen Analyten (z. B. Zytokine, Antikörper, PCR-Produkte) binden an die entsprechenden Beads. Hinzugegebene Detektionsantikörper binden an den Analyten, welche anschließend von Phycoerythrin-markiertem Streptavidin gebunden werden. Diese Bindungen werden im Luminex 100 (Multimetrix) je nach

Bead klassifiziert und die Zytokine quantifiziert. Die Beads fließen hierbei durch eine Messküvette und die Fluoreszenzfarbstoffe werden mit einem Laser angeregt. Mittels einer Standardkurve wird die Zytokinkonzentration in den Proben berechnet. Zur Messung der Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$ , Interleukin (IL)-6, IP-10 (CXCL-10) und RANTES (CCL5) im Überstand TLR-stimulierter RAW264.7 wurde das Mouse Cytokine Plex Kit (Panomics) verwendet. Im Überstand TLR-stimulierter HEK293-Zellen wurde IL-8 mit Hilfe des Human Cytokine Assay (Panomics) gemessen. Die Durchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers.

### 4.2.11 Proteinextraktion aus Gewebekulturzellen

Es wurden unterschiedliche Lysepuffer zur Extraktion von Proteinen aus den Gewebekulturzellen verwendet. Für Immunpräzipitationen von Proteinkomplexen mit schwachen Protein-Protein-Bindungen wird ein NP-40-Lysepuffer verwendet. Die Zellen werden von den Zellkulturplatten gelöst, gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wird mit dem NP-40-Lysepuffer resuspendiert und bei 4 °C für 20 min inkubiert und das Zelldebris abzentrifugiert. Für die Isolierung von Proteinkomplexen mit dem Strep-Tag-System wird ein eigener Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, 7,5 % Glycerin, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) nach Angaben des Herstellers (IBA) verwendet. Die Lyse von Zellen für Western Blots erfolgt mit einem SDS-Probenpuffer der direkt auf die mit PBS gewaschenen Zellen mit 100  $\mu$ l auf die 6-well-Platte bzw. 500  $\mu$ l auf eine 10 cm Zellkulturplatte gegeben wird. Für Proteinextraktionen für Reportergenanalysen wird ein Lysepuffer aus dem Dual-Glo™ Luziferase-Assay Kit der Firma Promega verwendet.

### 4.2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinen in Lösungen wird mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) bestimmt. Dabei reagieren zweiwertige Kupferionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) quantitativ mit Protein zu einwertigen Kupferionen ( $\text{Cu}^{1+}$ ). Diese geben mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch ausgewertet werden kann. Zur Messung werden die Proben je nach 1:20 oder

1:50 verdünnt und jeweils 25 µl von Standard und Proben in eine 96-Lochplatte überführt. Es folgte eine Zugabe von 200 µl Reagenz pro Well. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wird die Absorption bei 570 nm in einem ELISA-Reader (Dynatech Laboratories) gemessen. Den Proteingehalt bestimmt man anhand der Standard-Eichgerade über die Absorption.

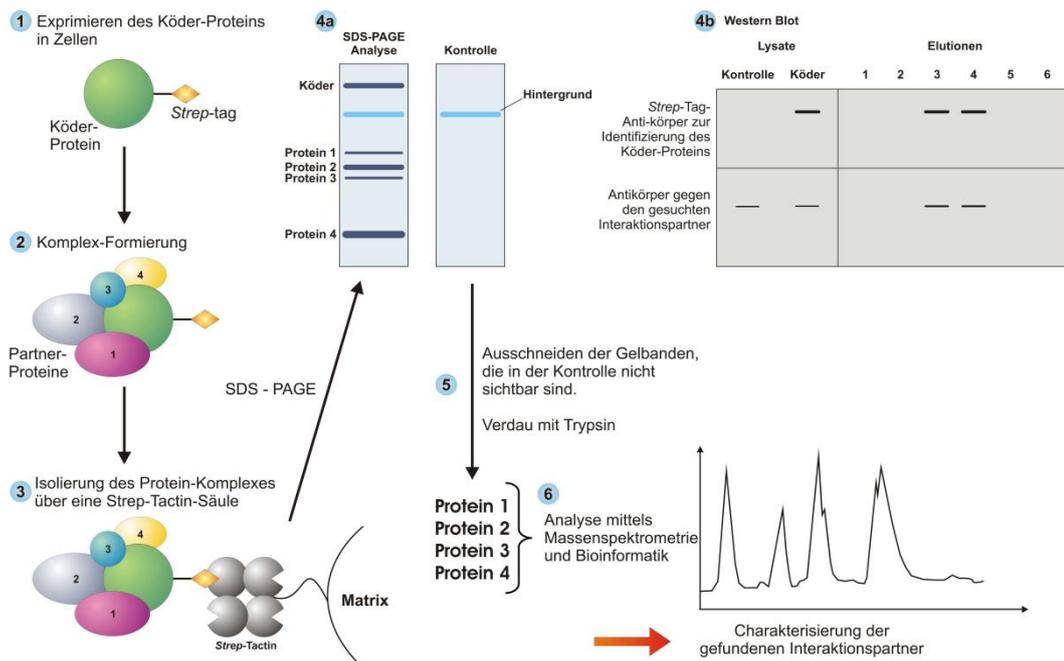
### 4.2.13 Isolierung von Proteinkomplexen mittels Affinitätschromatographie

Aus der Komplexität des Zell-Proteoms wird ersichtlich, dass man mindestens einen hoch spezifischen Reinigungsschritt braucht, um Moleküle anzureichern, die nur in geringer Kopienzahl in der Zelle vorkommen. Diese Anreicherung und Reinigung von Proteinkomplexen kann mit Hilfe einer Reihe von biochemischen Methoden erreicht werden. Breite Anwendung zur Komplexisolierung finden affinitätschromatographische Methoden. Sie sind in den meisten Fällen hochselektiv und erlauben eine robuste Reinigung. Außerdem sind diese Methoden gut reproduzierbar und einfach in der Anwendung. Eine Methode mit der man Proteinkomplexe in einem Schritt aus dem Zellysate isoliert ist das Strep-Tag-System (Junttila et al. 2005) der Firma IBA (Göttingen).

Das Strep-tag wird durch Klonierung mit einem rekombinanten Protein fusioniert. In dieser Arbeit wurde das humane Gen von MyD88 in den Vektor pEXPR-IBA105 kloniert, in HEK293-Zellen transfiziert und stabile Zellen generiert. Das Protein MyD88 erhält durch den Vektor einen N-terminalen Strep-Tag, mit dem nach Stimulation der Proteinkomplex von MyD88 über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie-Säulen (IBA GmbH, Göttingen) aus dem Zellysate isoliert und aufgereinigt werden kann. Die Zellen werden nach Stimulation mit NP-40 Lysepuffer lysiert, und nach Abtrennen der Zelltrümmer durch Zentrifugation wird das Lysat auf äquilibrierte Strep-Tactin-Säulen beladen. Das Fusionsprotein bindet mit seinem Strep-tag an das immobilisierte Strep-Tactin der Säule. Die Säulen werden fünfmal mit dem Bettvolumen der Säule mit physiologischem Waschpuffer gewaschen, um alle anderen Proteine zu entfernen. In acht Schritten wird mit dem halben Bettvolumen der Säulen mit Biotin-Elutionspuffer der Proteinkomplex vorsichtig

eluiert. Das Fusionsprotein in den einzelnen Fraktionen wird mittels Western Blot mit Anti-Strep-Antikörpern nachgewiesen.

Das Strep-Tag-System, bestehend aus Strep-Tag und Strep-Tactin hat sich besonders in der funktionellen Isolierung und Analyse von Proteinkomplexen in der Proteomforschung bewährt (Schmidt & Skerra 2007). In Abbildung 8 ist die Isolierung und Identifikation von Proteinkomplexen dargestellt.



**Abbildung 8: Überblick über die Identifikation von Interaktionspartnern mit der Strep-Tag-Methode.** Isolierung des Proteinkomplexes über das Strep-Tag an Strep-Tactin-Säulen, Auftrennung im SDS-PAGE, tryptischer Verdau der Proteine und Identifikation über die Massenspektrometrie (modifiziert nach IBA GmbH, 2010).

Aufreinigung der Strep-Fusionsproteine:

- Strep-Tactin-Säule (1 ml Säulenvolumen) mit 2 ml Waschpuffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8) äquilibrieren
- Strep-Tactin-Säule mit Zellysat beladen
- fünfmal Waschen mit 1 ml Waschpuffer
- Elution in acht Schritten mit 500 µl Elutionspuffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 2 mM Biotin, pH 8)
- Fraktionen, die das Strep-Fusionsprotein enthalten, werden im Western Blot mit Strep-Tag-Antikörpern identifiziert

#### 4.2.14 Immunpräzipitation

Eine Immunpräzipitation ist eine molekularbiologische Methode zur Aufreinigung und Isolierung von Proteinen oder Peptiden aus einer Lösung. Ein an ein festes Substrat gekoppelter Antikörper bindet dabei über seine Affinität das spezifische Antigen in der Lösung. Man kann mit dieser Methode auch das Protein mitsamt seinen Interaktionspartnern aus dem Proteingemisch präzipitieren und somit Protein-Protein-Wechselwirkungen nachweisen. Zur Präzipitation von Flag-Tag-Fusionsproteinen wird an Protein G-Sepharose (GE Healthcare) gekoppelte M2 Anti-Flag-Antikörper (Sigma-Aldrich) verwendet. Für 1 ml Zellysat werden 200 µl Protein G-Sepharose dreimal mit dem NP-40-Lysepuffer durch einminütiges Zentrifugieren bei 10.000 rpm gewaschen um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Die so äquilibrierte Sepharose wird für eine Stunde bei 4 °C unter Rotation mit dem Zellysat inkubiert um das Lysat vorzureinigen. Das Gemisch wird zentrifugiert und der Überstand des Zellysats mit 100 µl neuer äquilibrierter Sepharose zusammen mit 10 µg M2 Anti-Flag-Antikörper über Nacht unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Der an die Sepharose gebundene Proteinkomplex um das Flag-Fusionsprotein wird dreimal mit 1 ml Lysepuffer gewaschen um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Der Proteinkomplex wird durch Inkubation für fünf Minuten mit SDS-Probenpuffer (6,25 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 50 % Glycerin, 2 mM EDTA, Bromphenolblau) bei 95 °C inkubiert um die Antikörper-Flag-Fusionsprotein-Bindungen zu lösen. Nach Zentrifugation für eine Minute bei 10.000 rpm kann der Überstand für eine Auftrennung im SDS-PAGE verwendet werden. Das präzipitierte Protein kann mittels Western Blot und nachfolgende Immundetektion nachgewiesen werden. Die ko-präzipitierten Proteine des Proteinkomplexes aus dem SDS-PAGE werden mittels Massenspektrometrie identifiziert.

#### 4.2.15 Konzentrierung von Proteinlösungen

Bei der Isolierung von Proteinkomplexen wurden die das Strep-Fusionsprotein enthaltenden Elutionsfraktionen gepoolt für eine Beladung einer SDS-PAGE entsprechend eingengt. Die Proteinlösung wird in Vivaspin 2-Konzentrationsfilter (Vivascience Ltd., 30.000 MW cutoff) bei 12.000 rpm für 15 min zentrifugiert, bis die Lösung auf 50 µl aufkon-

zentriert ist. Unter Druck wird durch eine Größenausschluss-Ultrafiltrationsmembran filtriert und die Proteine dadurch eingengt.

### 4.2.16 Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Trennverfahren bei dem Proteine unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen entsprechende ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Als Trennmedium dient bei dieser Elektrophorese ein Gel aus Polyacrylamid. Dieses besitzt nach der Zugabe von N,N-Methylenbisacrylamid eine dreidimensionale Vernetzung. Die Größe der dabei entstehenden Poren hängt vom Mengenverhältnis zwischen Polyacrylamid und Bisacrylamid ab. Als Katalysator und Stabilisator der Radikale wird TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylen-diamin) als Radikalbildner Ammoniumperoxodisulfat eingesetzt. Die Proteinlösung wird mit Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 5 °C aufgeköcht um die Proteine zu denaturieren.  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert vorhandene Disulfidbrücken. Das negativ geladene ionische Detergenz SDS (*sodium dodecyl sulfate*) lagert sich an die Polypeptidketten und überdeckt deren Eigenladungen, sodass die Geschwindigkeit der im Gel wandernden Proteine hauptsächlich vom Molekulargewicht bestimmt wird. Das Gel ist von Elektrolyten des TRIS-Glycin-Puffersystems umgeben. Bei Anlegen einer Spannung von 120-160 V werden die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. In einer diskontinuierlichen SDS-PAGE wandern die Proteine zuerst in ein Sammelgel, indem sie aufkonzentriert werden und anschließend in ein Trenngel, indem die eigentliche Auftrennung erfolgt. Durch diese Vortrennung und Aufkonzentrierung kann eine scharfe Protein-Bande erzeugt werden. Die Proteine werden solange aufgetrennt bis die Probenpufferbande das andere Ende des Gels erreicht hat. Als Größenstandard dient ein gefärbter Proteinmarker der Firma Fermentas (PageRuler™ *Prestained Protein Ladder*). Das Polyacrylamidgel kann dann für die Proteinanalyse durch Western Blot oder Coomassie- oder Silberfärbungen weiter verwendet werden.

Zur Auftrennung von Proteinkomplexen wurden Gradientengele (NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris Gel, Invitrogen) verwendet, um eine bessere Auftrennung der Proteine in ei-

nem breiten Größenspektrum zu erreichen. Hierbei wird ein ungefärbter Proteinstandard verwendet (PageRuler™ *Unstained Protein Ladder*).

#### 4.2.17 Western Blot

Mit Hilfe der Western Blot-Methode lassen sich über eine Immundetektion gewünschte Proteine visualisieren. In einer SDS-PAGE aufgetrennte Proteine werden nach dem Nassblotverfahren auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schuell) oder Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen. Das Gel wird hierfür mit der Membran zwischen Whatman-Filterpapieren gelegt und in einen Einsatz geklemmt und in die Blotkammer mit Transferpuffer gestellt. Senkrecht zum Polyacrylamid-Gel wird ein Feld von 60 V für 60 min angelegt. Unter gekühlten Bedingungen wandern die Proteine vom Gel auf die Membran und bleiben dort aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine bleibt dabei erhalten. Die PVDF-Membran wird für 10 sec in 100 % Methanol getränkt und anschließend auf einem Filterpapier 15 min lang getrocknet. Die Nitrocellulose-Membran wird mit TBS- oder PBS-Puffer gewaschen. Je nach Antikörper wird mit 3-5 % Magermilchpulver (Fluka) oder 3 % BSA in TBS-Puffer für 30-60 min bei Raumtemperatur die unspezifischen Bindungsstellen geblockt und mit Puffer gewaschen. Danach wird die Membran mit dem primären Antikörper in Blocking-Puffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Es folgen je nach Antikörper unterschiedlich lange mehrere Waschstschritte mit TBS-T- oder PBS-T-Puffer (0,1 % Tween 20). Anschließend folgt die Inkubation mit dem entsprechenden zweiten Peroxidase-gekoppelten Antikörper (1:10.000 in TBS- oder PBS-Puffer verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach der Antikörperbindung wird dreimal für 5 min mit TBS-T- oder PBS-T-Puffer gewaschen. Zum Nachweis der bestimmten Proteine wird die Membran für 5 min mit Substrat des ECL Plus Western Blotting Detection Pack (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers inkubiert. Die dabei entstehende Chemilumineszenz wird durch Auflegen eines Röntgenfilms (Hyperfilm™ MP, Amersham Pharmacia Biotech) detektiert und mit einer Entwicklermaschine sichtbar gemacht.

#### **4.2.18 Strippen von Western Blot-Membranen**

Das Strippen von Western Blot-Membranen dient dazu, bereits gebundene Antikörper zu entfernen und ermöglicht so die Detektion mit einem anderen Primärantikörper. Zur Entfernung von gebundenen Antikörpern wurde die Membran für 20 Minuten in 0,1 M Glycin-Lösung (pH 2,9) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen konnte die Membran neu geblockt und eine erneute Immundetektion durchgeführt werden.

#### **4.2.19 Coomassie-Färbung**

In SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennte Proteine wurden entweder über Coomassie- oder durch Silberfärbung nachgewiesen. In der Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine werden nach einer 15-minütigen Fixierung (10 % Essigsäure, 40 % Ethanol, 50 % Wasser) über Nacht in Coomassie-Färbelösung inkubiert (0,1 % Coomassie G-250 in Fixierlösung). Anschließend werden die Gele in Fixier-Lösung entfärbt.

##### **4.2.19.1 Silberfärbung**

Für die Färbung von aufgetrennten Proteinkomplexen für die folgende Proteom-Analyse wurde das für die Massenspektrometrie kompatible SilverQuest™ Silver Staining Kit der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Silberfärbung stellt eine sehr empfindliche Methode zur Detektion von Proteinen dar. Die Sensitivität liegt im Vergleich zur Coomassie-Färbung viel höher.

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-Gelelektrophorese wird das Gel mit Wasser gespült und 1 Stunde mit Fixierlösung (40 % Ethanol, 10 % Essigsäure) inkubiert. Danach folgt ein Waschschriff mit 30 % Ethanol für 10 Minuten. Das gewaschene Gel wird für 10 Minuten in Sensibilisierungslösung inkubiert. Nach einem weiteren 10 minütigen Waschschriff mit 30 % Ethanol wird für 10 min mit Wasser gewaschen. Anschließend wird das Gel 15 min lang mit Färbelösung inkubiert. Nach dem Färben wird für 20-60 sec mit Wasser gewaschen. Zum Entwickeln wird das Gel 4-8 Minuten in Entwicklerlösung inkubiert, solange bis die Banden erscheinen. Wenn die gewünschte Bandenintensität

erreicht ist, wird sofort Stopperlösung dazugegeben und 10 Minuten leicht geschüttelt. Abschließend wird das Gel nochmal für 10 Minuten mit Wasser gewaschen und das Gel ausgewertet und für eventuelle massenspektrometrische Analysen weiter verwendet.

- Gel mit Reinstwasser spülen
- Gel mit 100 ml Fixierlösung für 20 min fixieren
- Gel mit 30 % Ethanol für 10 min waschen
- Ethanol abgießen und 100 ml Sensibilisierungslösung zum gewaschenen Gel hinzugeben und 10 min inkubieren
- Gel mit 100 ml 30 % Ethanol für 10 min waschen
- Gel mit 100 ml Reinstwasser für 10 min waschen
- Gel in 100 ml Färbelösung für 15 min inkubieren
- Gel mit Reinstwasser für 20-60 sec waschen
- Gel mit 100 ml Entwicklungslösung für 4-8 min inkubieren bis die gewünschte Bandenintensität erreicht ist
- zum Gel 10 ml Stopperlösung dazugeben und für 10 min auf dem Schüttler sanft bewegen
- Gel mit 100 ml Reinstwasser für 10 min waschen

### 4.2.19.2 In-Gel Trypsinverdau

Gefärbte Proteine werden zur Probenvorbereitung für massenspektrometrische Analysen entfärbt, reduziert und alkyliert und tryptisch verdaut. Coomassie und Silber-gefärbte Proteinbanden werden mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen gegeben.

Mit Coomassie gefärbte Proteinbanden werden mit einer Entfärbelösung (50 % Methanol, 0,1 % Essigsäure) für 10 min entfärbt. Bei Silberfärbung wird nach Anleitung des Silver-Quest™ Silver Staining Kit (Invitrogen) entfärbt. Hierbei wird zu jeder Probe 50 µl Entfär-

belösung A und Entfärbelösung B gegeben, gründlich geschüttelt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird der Überstand entfernt und 200 µl Reinstwasser dazu pipettiert, geschüttelt und 10 min inkubiert. Dieser Waschschrift wird mindestens zweimal wiederholt, bis mit dem tryptischen Verdau fortgefahren werden kann.

Nach dem Entfärben der Gelstückchen wird eine Reduktion und Alkylierung der Cysteine der Proteine angeschlossen. Die Disulfidbrücken der Proteine werden dabei zerstört und damit eine optimale Proteinfaltung erreicht. Es wird zuerst mit 100 µl Acetonitril dehydriert, bis die Gelstückchen komplett weiß sind. Danach wird zweimal mit Waschlösung (25 mM Ammoniumhydrogencarbonat) gewaschen, das Gelstückchen wieder mit 100 µl Acetonitril dehydriert und die Flüssigkeit abgezogen. Zur Reduktion wird zur Probe 50 µl Reduktionslösung (10 mM DTT (Dithiothreitol) in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung) gegeben und für 1 Stunde bei 56 °C inkubiert. Der Überstand wird verworfen und mit 50 µl Alkylierungsreagenz (50 mM Jodacetamid in Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung) für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Alkylierung wird zweimal für 5 min mit 50 µl Waschlösung gewaschen und der Überstand jeweils verworfen. Anschließend wird mit 100 µl Acetonitril dehydriert bis die Gelstückchen komplett weiß sind und danach zum Trocknen für 10 min in die Vakuumzentrifuge gestellt. Vor der tryptischen Spaltung der Proteine werden die Gelstückchen durch Zugabe von Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung rehydriert bis sie wieder farblos sind. Der Überstand wird verworfen und 20 µl Trypsinlösung dazu gegeben. Bei Proben aus der Silberfärbung wird 12,5 ng/µl Trypsin bzw. 25 ng/µl Trypsin bei Coomassiefärbung in Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung verwendet. Bei einer Inkubation bei 37 °C über Nacht spaltet die Serinprotease Trypsin die Proteine spezifisch am Carboxy-Ende der Aminosäuren Arginin und Lysin.

- Dehydrierung mit 100 µl Acetonitril dehydrieren bis Gelstück komplett weiß
- Waschen mit 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat
- Dehydrierung mit 100 µl Acetonitril dehydrieren bis Gelstück komplett weiß
- Flüssigkeit abziehen und Reduktion mit 50 µl Reduktionslösung für 1 h bei 56 °C

- Überstand verwerfen und mit 50 µl Alkylierungsreagenz für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- zweimal für 5 min mit 50 µl Waschlösung waschen
- Überstand verwerfen und mit 100 µl Acetonitril dehydrieren bis die Gelstückchen komplett weiß
- Trocknen für 10 min in der Vakuumzentrifuge
- Gelstücke durch Zugabe von Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung rehydrieren bis sie wieder farblos sind
- Überstand verwerfen und 20 µl Trypsinlösung dazugeben und bei 37 °C über Nacht inkubieren

Nach dem tryptische Verdau werden die Peptide aus der Gelmatrix in mehreren Schritten extrahiert. Dazu werden die Gelstückchen in Extraktionslösung für 10-15 min im Ultraschallbad inkubiert, zentrifugiert und der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Im ersten Extraktionsschritt wird in 1 % Ameisensäure inkubiert, dann folgt die Inkubation in 5 % Ameisensäure in 50 % Acetonitril und im letzten Schritt mit 5 % Ameisensäure inkubiert. Abschließend wird mit Acetonitril dehydriert und der zentrifugierte Überstand mit den anderen gesammelten Überständen in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingedampft.

- Ansatz zentrifugieren und Überstand in neues Gefäß überführen
- Zugabe von 1 % Ameisensäure und Inkubation für 10-15 min im Ultraschallbad
- Überstand abzentrifugieren und überführen und sammeln
- Zugabe von 5 % Ameisensäure in 50 % Acetonitril und Inkubation für 10-15 min im Ultraschallbad
- Überstand abzentrifugieren und überführen und sammeln
- Zugabe von 5 % Ameisensäure und Inkubation für 10-15 min im Ultraschallbad
- Überstand abzentrifugieren und überführen und sammeln

- Dehydrierung mit 100 µl Acetonitril
- Überstand abzentrifugieren und überführen und sammeln
- gesammelte Überstände bis zur Trockne in der Vakuumzentrifuge rotieren.

### 4.2.20 In-Solution Trypsinverdau

Proteine, die nicht im SDS-PAGE aufgetrennt wurden, werden für die Analyse im LTQ-Orbitrap in Lösung (In-Solution) mit Trypsin für die massenspektrometrische Analyse verdaut. Bei 50 µl Proteinlösung wird diese in 500 µl 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung aufgenommen und geschüttelt. Darauf wird zur Reduktion mit 50 µl 20 mM DTT in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung für 30 min bei 60 °C im Thermoblock inkubiert. Zur Alkylierung der Proteine wird nach Zugabe von 50 µl 50 mM Jodacetamid in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung geschüttelt und für 30 min bei 60 °C im Thermoblock inkubiert. Die tryptische Spaltung der Proteine erfolgt über Nacht bei 37 °C durch Zugabe von 10 µg Trypsin. Die Peptidlösungen werden in Röhrchen aufkonzentriert.

- 50 µl Proteinlösung mit 500 µl 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung aufnehmen und schütteln
- Reduktion durch Zugabe von 50 µl 20 mM DTT in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung für 30 min bei 60 °C im Thermoblock inkubieren
- Alkylierung der Proteine durch Zugabe von 50 µl 50 mM Jodacetamid in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung, schütteln und für 30 min bei 60 °C im Thermoblock inkubieren
- Zugabe von 10 µg Trypsin und tryptische Spaltung der Proteine über Nacht bei 37 °C

### 4.2.21 ZipTip®-C18-Peptidaufreinigung

Die Peptidlösung aus tryptisch verdauten Proteinen wird mit Hilfe der ZipTip®-C18 Pipetenspitzen (Millipore) entsalzt, aufkonzentriert und gereinigt. Die ZipTip®-integrierte C18-Säule wurde entsprechend der Herstellervorschrift verwendet. Die getrockneten Pep-

tidgemische wurden in 20 µl 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) gelöst. Zum Äquilibrieren wurden die ZipTips dreimal mit 10 µl Acetonitril durch Auf- und Abpipettieren und anschließend mit dreimal 10 µl 0,1 % TFA gewaschen. Die C18-Säulen wurden mit den Peptiden durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren von 10 µl der Probe beladen. Danach wird zweimal mit 10 µl 0,1 % TFA gewaschen und die Peptide zweimal mit 10 µl Elutionslösung eluiert. Für anschließende MALDI-TOF-Analysen wurde als Elutionslösung 70 % Acetonitril in 0,1 % TFA verwendet, für ESI-Messungen wurde mit 5 µl 80 % Acetonitril in 0,2 % Ameisensäure eluiert.

- Äquilibrieren der ZipTips durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren mit 10 µl Acetonitril
- dreimal mit 10 µl 0,1 % TFA waschen
- Beladen der ZipTips durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren von 10 µl der Probe
- ZipTips zweimal mit 10 µl 0,1 % TFA waschen
- Peptide zweimal mit 10 µl Elutionslösung eluieren

### 4.3 Massenspektrometrie

#### 4.3.1 Messung mit MALDI-TOF-MS

Zur massenspektrometrischen Analyse der Peptide wurde ein MALDI-TOF-Gerät Autoflex II von Bruker Daltonics verwendet. Vor dem Messen werden zur Probenvorbereitung das Probeneluat aus der ZipTip-C18-Peptidaufreinigung im Verhältnis 1+9 mit einer Matrixlösung aus  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure (HCCA) in 50 % ACN und 0,1 % TFA gemischt und direkt auf den als Probenhalter dienenden Stahlträger (MTP 384 target ground steel, Bruker Daltonics, Bremen) (MALDI-Target) gespottet und luftgetrocknet. Der Stahlträger mit den in Matrix kristallisierten Peptiden wird in die Quellregion des Geräts eingelegt. Über die MALDI-TOF-Steuerungssoftware FlexControl (Version 2.4, Bruker Daltonics, Bremen) können die einzelnen Peptid-Matrix-Proben unter dem Laser

mit einer Kamera positioniert werden, um den Kristallisationszustand der einzelnen Proben und die genaue Laserposition über dem Probenträger überwachen zu können. Vor der Messung der Proben wird das Gerät mit einem Peptid-Kalibrations-Standard kalibriert. Dieser Standard enthält ein Gemisch verschiedener Peptide bekannter Massen, nach deren Messung die erhaltenen Summenspektren von der Steuerungssoftware gegen die bekannten Peptidmassen abgeglichen und das Gerät auf diese Weise kalibriert wird. Im Reflektor Modus werden die Proteine durch *Peptide Mass Fingerprinting* analysiert. Die MS-Spektren werden im Bereich von 1-3.5 kDa durch Aufsummieren von 350 Laserschüsse an verschiedenen Positionen des Spots generiert. Zur Darstellung der resultierenden Summenspektren wird die Intensität der einzelnen Peptide auf der Ordinate gegen die Masse pro Ladung auf der Abszisse in einem Diagramm angezeigt (siehe Abbildung 9). Die ionisierten Peptide besitzen aufgrund ihrer Protonierung alle eine Ladung von +1, so dass sich aus dem  $m/z$ -Verhältnis direkt die Masse der Peptide ergibt. Aus dem Spektrum dieser molekularen Massen der Peptide lassen sich Listen erstellen, mit deren Hilfe die Proteine mittels *Peptide Mass Fingerprinting* identifiziert werden können.

### 4.3.2 Proteinidentifikation durch „*Peptide Mass Fingerprinting*“

Die Spektren der MALDI-TOF-Messungen werden mit der Software Flexanalysis (Bruker Daltonics) erstellt und mit der Software BioTools™ (Bruker Daltonics) analysiert. Mit Hilfe des *Peptide Mass Fingerprinting* des Programms Mascot 2.1 (Matrix Science, Boston, MA) und der Suche in der SwissProt-Datenbank unter der Taxonomie *Homo sapiens* analysiert und die entsprechenden Proteine identifiziert (Bienvenut et al. 2002).

### 4.3.3 Nano-ESI-MS/MS

Zur Identifikation tryptisch verdauter Proteine mittels Nano-Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie (Nano-ESI-MS/MS) wurde eine UltiMate® 1 nano-HPLC-Anlage (Dionex) gekoppelt an ein Bruker HCT ultra Massenspektrometer (Bruker Daltonics). Alle verwendeten Lösungsmittel besaßen HPLC-Qualität. Das Probevolumen von 5 µl wurde auf eine PepMap100 Vorsäule C18 5 µm, 100Å (300 µm × 5 mm, Dionex) inji-

ziert und über eine PepMap100 C18 RP nano-Säule (3  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$   $\times$  15 cm, Dionex) getrennt. Es wurde ein 30-minütiger Elutionsgradient von 5 % auf 62 % ACN mit 0,1 % Ameisensäure mit einer Flussrate von 250 nl/min verwendet.

Die ESI-MS/MS Datenakquisition erfolgte mittels der Software EsquireControl 6.1 (Bruker Daltonics) im Positiv-Ionen-Modus mit dem nanoESI online source Modus. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte mit dem 'Standard enhanced Scan' im Bereich  $m/z = 200 - 3000$ . Ein Massenspektrum ergab sich aus fünf gemittelten Scans. Die angelegte Spannung des Nanosprays betrug bei allen Experimenten  $\approx 1,5$  kV. Als Trocknungsgas wurde Stickstoff mit einer Trocknungstemperatur von 150  $^{\circ}\text{C}$  verwendet. Als Kollisionsgas für die MS<sup>2</sup>-Experimente (Modus: AutoMS(n)) wurde Helium verwendet. Dabei wurden die zwei intensivsten Ionen mit einer Fragmentierungszeit von 0,15 min fragmentiert. Die Auswertung der Rohdaten und die Extraktion der Masselisten für die Datenbanksuche geschah mit der DataAnalysis Software Version 3.4 (Bruker Daltonics). Die MS/MS-Daten wurden über die Suchmasken MASCOT mit der Proteindatenbank Swissprot abgeglichen und nach der Software signifikante Ergebnisse zur Identifikation verwendet.

#### 4.3.4 Orbitrap

Für die massenspektrometrische Messung am LTQ-Orbitrap XL Hybrid-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) werden die tryptisch verdauten Proben in 5 % Ameisensäure versetzt und in spezielle Röhrchen überführt. Zur Auftrennung der Peptide wurde ein UltiMate3000 RSLCnano HPLC-System (Dionex, Idstein) eingesetzt. Über den Probennehmer wurden 5  $\mu\text{l}$  des Peptidgemisches in die Proben-schleife injiziert und mit einer Flussrate von 300 nl/min und einem Gradienten von 2–60 % B in 90 Minuten in einer 75  $\mu\text{m}$  ID C18-Säule (Dionex, Idstein) chromatographisch aufgetrennt. Puffer A war destilliertes Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Puffer B bestand aus 80 % Acetonitril mit 0.08 % Ameisensäure. Die Kopplung der Nano-HPLC an die LTQ-Orbitrap verlief über eine TriVersa Nanomate-ESI-Quelle (Advion Biosciences, Norwich, UK), eine Chip-basierte Elektrospray-Ionisierung. Die Analyse der positiv geladenen Peptidionen erfolgte im Parallelmodus, was gleichzeitig die akkurate Messung der

m/z-verhältnisse der Peptidionen in der Orbitrap und die Detektion der MS/MS-Spektren mit hoher Sensitivität in der linearen Ionenfalle (LTQ) ermöglichte.

Die Auswertung erfolgte mit der Software Bioworks des Herstellers. Die MS/MS-Spektren wurden mit Hilfe von Mascot 2.1 (Matrix Science, Boston, MA) und der Suche in der SwissProt-Datenbank unter der Taxonomie *Homo sapiens* analysiert. Die Suchparameter erlaubten eine übersehene Schnittstelle, Trypsin als Schnittenzym, Carbamidomethylierung der Cysteinreste, als variable Modifikation Methionin-Oxidierung, mit einer Peptidtoleranz von 10-20 ppm und einer MS/MS-Toleranz von 0.6 Da. Als valide Ergebnisse wurden nur Peptide erachtet, die anhand der MASCOT-Wahrscheinlichkeitsanalyse signifikant identifiziert wurden. Der Mascot-Algorithmus errechnet einen „Ion Score“ mit  $-10 \cdot \log(P)$ , wobei P die Wahrscheinlichkeit ist, dass der Treffer zufällig ist. Ein Grenzwert für eine signifikante Identifikation ist immer auch von den Suchparametern abhängig ([http://www.matrixscience.com/help/scoring\\_help.html](http://www.matrixscience.com/help/scoring_help.html); (Fenyö & Beavis 2003)).

## 5 Ergebnisse

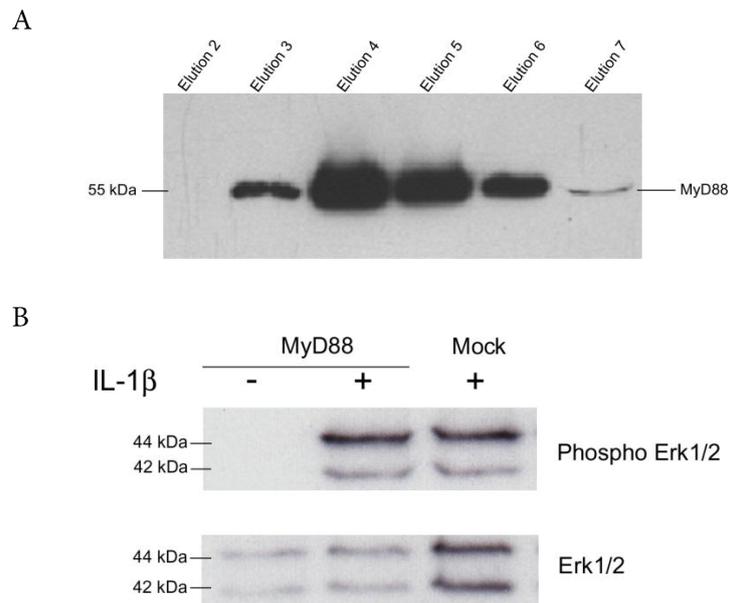
### 5.1 Identifikation neuer Interaktionspartner von MyD88

Die Isolierung von Proteinkomplexen mittels Strep-Tactin-Säulen und die Identifikation der Interaktionspartner via Massenspektrometrie wurden vorab mit einer von der Firma IBA GmbH angebotenen Kontrolle getestet. HEK293-Zellen wurden mit einem Kontrollplasmid transfiziert, das für das Protein PR65 alpha kodiert, eine Untereinheit der Phosphatase 2A (PP2A), das C-terminal mit dem Strep-Tag fusioniert ist. Die Zellen wurden lysiert, der Proteinkomplex mit einer Strep-Tactin-Säule isoliert und PR65 im Western Blot mit einem HRP-konjugierten Antikörper gegen das Strep-Tag nachgewiesen. Nach Auftrennung des Eluats im SDS-PAGE und tryptischen Verdau der gefärbten Banden konnten folgende Proteine des PR56-Komplexes identifiziert werden, PR56; Serin/Threonin Protein Phosphatase 2A, 55 kDa regulatory subunit B, PP2A; *Alpha Isoform of regulatory subunit A*, PP2A; *Protein Phosphatase type 2A catalytic subunit* (siehe (Junttila et al. 2005)). Dieser Vorversuch hat gezeigt, dass die Komponenten von Proteinkomplexen mit dieser Methode identifiziert werden können. Das PR65-Plasmid wurde bei den nächsten Ansätzen als Kontrolle eingesetzt.

Um die Interaktionspartner von MyD88 zu identifizieren, wurde die kodierende Sequenz von humanem MyD88 in den Vektor pEXPR-IBA105 kloniert, der Vektor in HEK293-Zellen transfiziert und anschließend stabile Zellen generiert. Das Protein MyD88 erhält durch den Vektor einen N-terminalen Strep-Tag, mit dem nach Stimulation der Proteinkomplex von MyD88 über Strep-Tactin-Affintätschromatographie-Säulen (IBA GmbH) aus dem Zellysate isoliert und aufgereinigt werden kann. In zwei Ansätzen mit jeweils  $1 \times 10^9$  HEK293-Zellen, die das Fusionsprotein MyD88-Strep stabil exprimieren, wurde für 40 min mit 100 ng/mL IL-1 $\beta$  stimuliert bzw. als Kontrolle nicht stimuliert. Da HEK293-Zellen außer TLR5 keine TLR exprimieren, wurde mit dem inflammatorischen Zytokin IL-1 $\beta$  stimuliert, das kongruent zu den TLR nach Rekrutierung von MyD88 eine gleiche Signaltransduktionskaskade auslöst (Bowie & O'Neill 2000). Die geernteten Zellen wur-

## 5. Ergebnisse

den lysiert und durch Zentrifugation die Zelltrümmer abgetrennt und das Lysat auf äquilibriumierte Strep-Tactin-Säulen beladen. Die Säule wurde dreimal gewaschen und in 8 Schritten mit Biotin Puffer eluiert. Im Western Blot wurden Lysat, Säulendurchlauf, Wasch- und Elutionsschritte mit einem Anti-Strep-Antikörper kontrolliert (Abbildung 9A).



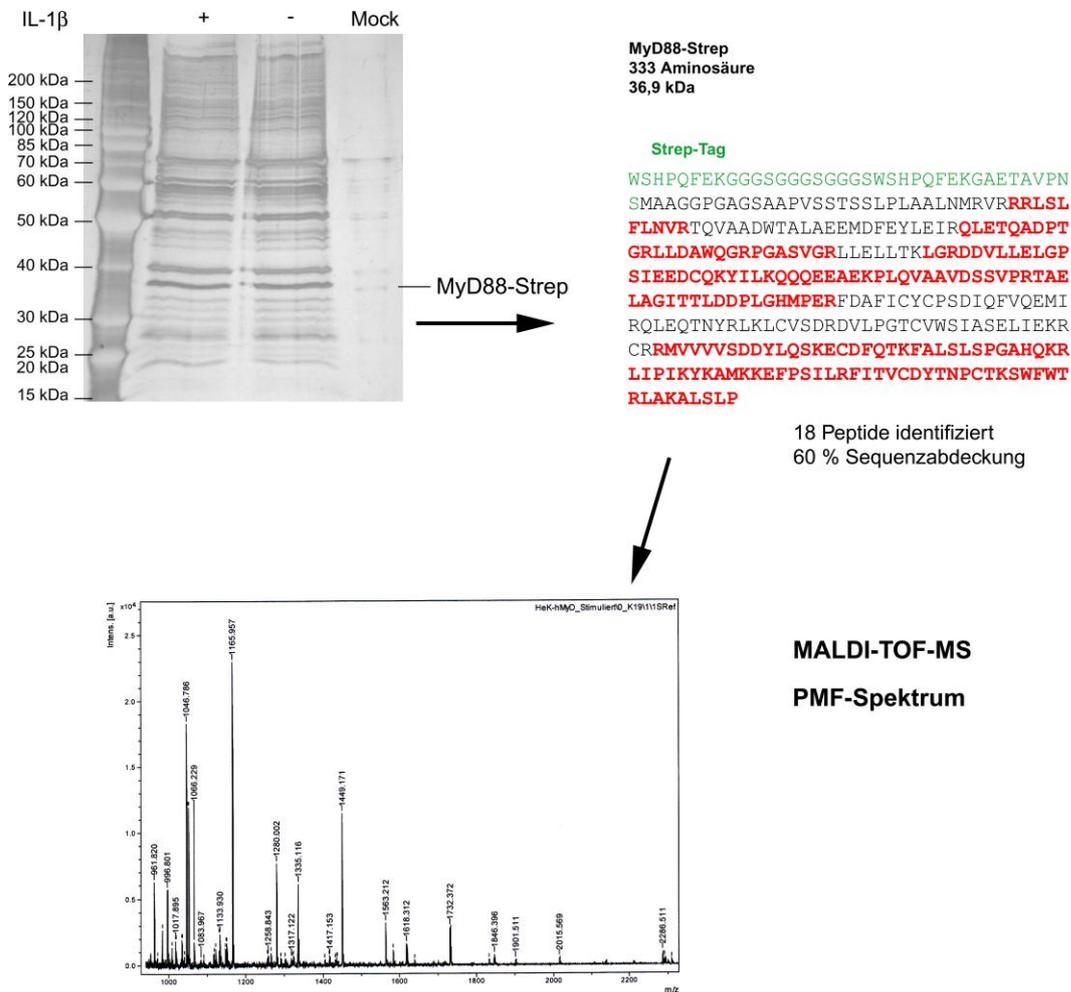
**Abbildung 9: Western Blot mit Strep (A) und Phospho-Erk1/2 (B) Antikörper.**

(A). Nachweis von MyD88 mittels Western Blot in den Elutionsfraktionen des isolierten Protein-komplexes des Fusionsproteins MyD88-Strep aus HEK293-Zellen unter Stimulation mit IL-1 $\beta$  mit Anti-Strep Antikörper. (B). Phospho-Erk1/2-Western Blot der HEK293-Lysate mit Antikörper gegen Phospho Erk1/2 und Erk1/2.

Eine Stimulation mit IL-1 $\beta$  rekrutiert über den IL-1-Rezeptor den Adapter MyD88 und führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und verschiedener MAP Kinasen wie z. B. Erk1/2. Die Aktivierung des IL-1/TLR-Signaltransduktionsweges durch IL-1 $\beta$  wurde über die Phosphorylierung der MAP-Kinase Erk1/2 mittels Western Blot überprüft (Abbildung 9B). Die im Western Blot mit dem Anti-Strep-Antikörper positiven Fraktionen wurden gepoolt und auf 100  $\mu$ l eingengt. Die isolierten Proteinkomplexe der stimulierten, unstimulierten sowie Negativkontrolle ohne transfizierten Zellen (Mock) wurden auf einem 4-12% Bis-Tris-Gel aufgetrennt, über Nacht das Gel fixiert und mit einer Massenspektrometrie-kompatiblen Silberfärbung gefärbt. Die einzelnen ausgeschnittenen Banden wurden In-Gel tryptisch verdaut und die extrahierten Peptide nach einer C-18-

## 5. Ergebnisse

Aufreinigung mit MALDI-TOF-MS gemessen. In Abbildung 10 ist die Durchführung von der Auftrennung der isolierten Proteine im SDS-PAGE und die Identifikation eines Proteins mittels PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*) schematisch dargestellt.



**Abbildung 10: Proteinidentifikation mittels MALDI-TOF-MS.**

Die Proteine des MyD88-Proteinkomplexes wurden im SDS-PAGE aufgetrennt, die einzelnen Banden ausgeschnitten und In-Gel mit Trypsin verdaut. Identifikation der Proteine anhand des *Peptide Mass Fingerprints* (PMF). Suchparameter: Datenbank: Swissprot, Organismus: *Homo sapiens*, unveränderliche Modifikationen: Carbamidomethylierung, variable Modifikation: Methioninoxidierung. Erlaubt war eine überlesene Schnittstelle. Die Massentoleranz lag bei 50 ppm.

### 5.1.1 MALDI-MS-Ergebnisse des MyD88-Signalkomplexes

In diesem Ansatz wurden verschiedene Proteine des isolierten Signalkomplexes von MyD88 identifiziert (Tabelle 2). Übereinstimmend mit der Analyse des MyD88-Komplexes von Wang et al. wurden folgende Proteine nachgewiesen (Wang, Gu, et al.

2005). Gefunden wurden z. B. Chaperone (HSPs), mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Acetyl-CoA-Carboxylase, Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Synthase und Phosphoglycerat-Dehydrogenase Proteine des Energiestoffwechsels und Biosynthese, Proteine des Zytoskeletts wie Keratin und Tubulin, Proteine des Zellzyklus wie Untereinheiten des 26S-Proteasoms sowie Proteine der Proteinsynthese.

**Tabelle 2: Liste der identifizierten Proteine des Proteinkomplexes von MyD88 nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  mittels MALDI-TOF-MS.**

Symbol <sup>*</sup>	Protein	Masse (kDa)	MASCOT score	sequenzierte Peptide
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene 88	33,2	366	12
HSP71	Heat shock 70 kDa protein 1	70	223	7
G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36	273	18
Q59FY4	Acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	114,6	216	7
B7ZAT2	Chaperonin containing TCP1, subunit 2	52,7	198	52
Q9UMY2	3-phosphoglycerate dehydrogenase	43	161	4
K2C5	Keratin type II	62	73	5
PRS4	26S proteasome regulatory chain 4	49,2	67	3
ENOA	Phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase	47,2	457	1
HMCS1	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	57,3	47	2
TBB5	Tubulin, beta	49,7	296	2
Q2F838	Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	9,6	173	11
IFA2	Eukaryotic initiation factor \$AII	46,4	64	4
D6RF62	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	37,1	100	5

\* UniProtKB/Swiss-Prot-Bezeichnung

Bekannt wichtige Proteine des TLR-Signalweges wurden im Proteinkomplex von MyD88 an dieser Stelle nicht gefunden.

### 5.1.2 ESI-MS-Ergebnisse des MyD88-Signalkomplexes

In diesem Ansatz wurden die Proben der tryptisch verdauten Proteine des MyD88-Signalkomplexes mittels Nano-Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie (Nano-ESI-MS/MS) gemessen. Wie mit der MALDI-TOF-MS wurden auch hier Proteine wie T-complex Proteine und Hitzeschockproteine identifiziert, die die Proteinfaltung unterstützen (Tabelle 3). Ebenso wurden Proteine des Zytoskeletts und des Zellzyklus gefunden. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen von Wang et al. überein, in deren Arbeit ebenfalls in einem proteomischen Ansatz als Bindungspartner von MyD88 in LPS-stimulierten Makrophagen Proteine wie Tubulin und Hitzeschock-Proteine identifiziert haben (Wang, Gu, et al. 2005). Die Funktion des identifizierten Proteins Ataxin-2-like Protein ist nach bisherigem Wissensstand noch unbekannt. Das Protein 14-3-3 epsilon wurde im Zusammenhang von MyD88 bisher noch nicht beschrieben. Dessen Isoform 14-3-3 theta wurde in einem anderen Ansatz im Proteinkomplex um TLR2 identifiziert (Kapitel 5.2.3) und funktionell im TLR-Signalweg charakterisiert (Kapitel 5.2.4).

**Tabelle 3: Liste der identifizierten Proteine des Signalkomplexes von MyD88 nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  mittels Nano-LC-ESI-MS.**

Symbol* Protein	Masse (kDa)	MASCOT score	Sequenzierte Peptide
MYD88 Myeloid differentiation primary response gene 88	33,2	183	6(3)
1433E 14-3-3 epsilon	29,3	59	2(2)
DDX6 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	54,8	124	3(3)
ATX2L Ataxin-2-like protein	113,6	124	10(9)
TBB5 Tubulin beta	49,7	363	9(8)
TBA1B Tubulin alpha 1B	50,2	356	9(8)
TBA1A Tubulin alpha-1A	50,8	385	9(8)
TCPQ T-complex protein 1 subunit theta	60,2	121	3(2)
TCPB T-complex protein 1 subunit beta	57,5	78	1(1)

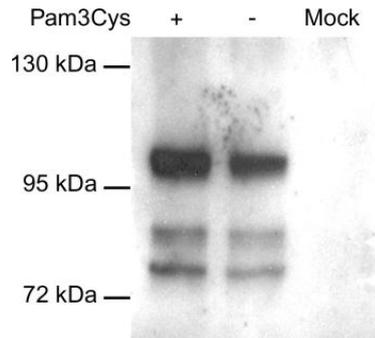
## 5. Ergebnisse

TCPD	T-complex protein 1 subunit delta	58,4	80	1(1)
TCPH	T-complex protein 1 subunit eta	59,8	60	2(1)
HSP71	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	70,0	1473	15(13)
HS71L	Heat shock 70 kDa protein 1-like	70,4	717	8(7)
HSP76	Heat shock 70 kDa protein 6	71,4	560	6(5)
HS90A	Heat shock HSP protein-alpha	85,0	105	3(3)
SF3A3	Splicing factor 3A subunit 3	59,2	76	3(1)
EF1G	Elongation factor 1-gamma	50,4	102	2(2)

\* UniProtKB/Swiss-Prot-Bezeichnung, # Anzahl gesamt, in Klammern Anzahl über Signifikanzschwelle

### 5.2 Identifikation neuer Interaktionspartner von TLR2

Zur Identifikation unbekannter Proteine des TLR2-Signaltransduktionskomplexes wurden HEK293-Zellen transient mit Flag-getagtem TLR2 transfiziert und nach Stimulation mit dessen Liganden Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> den Signalkomplex um das Fusionsprotein mittels Anti-Flag-Antikörper gekoppelten Sepharose-Beads präzipitiert. Der isolierte TLR2-Proteinkomplex mit interagierenden Proteinen wurde im SDS-PAGE aufgetrennt, die sichtbaren Banden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mit MALDI-TOF-MS bzw. der Nano-LC-ESI-MS gemessen. Die Expression und Isolation von TLR2 mit der Immunpräzipitation wurde mit Western Blot mit Anti-Flag-Antikörpern überprüft (Abbildung 11) und dessen Funktionalität in einem NF-κB-Luziferase-Reportergen-Assay getestet und mit ungetagtem TLR2 verglichen. Das Auftreten von mehreren Western Blot-Banden wird am ehesten durch Glykosylierungs-Varianten von TLR2 erklärt (Grabiec et al. 2004; Merx et al. 2007).



**Abbildung 11: Expressionskontrolle von TLR2 mittels Western Blot.**

Western Blot nach Immunpräzipitation mit Anti-Flag-Antikörper aus transient transfizierten HEK293-Zellen, stimuliert mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> bzw. unstimuliert sowie untransfizierte Zellen zur Kontrolle (Mock). Im Western Blot wurde M2-Anti-Flag-Antikörper verwendet.

### 5.2.1 Identifikation von TLR2-Interaktionspartner mit MALDI-TOF-MS

Im Ansatz zur Identifikation der Interaktionspartner von TLR2 mittels Immunpräzipitation des Proteinkomplexes und anschließender MALDI-TOF-MS wurden verschiedene bekannte Proteine des TLR-Signaltransduktionsweges wie der TLR2-Adapter TIRAP (Yamamoto et al. 2002), die Kinasen IRAK2 und IRAK4 (Lin et al. 2010), sowie der Transkriptionsfaktor IRF7 (Honda et al. 2005) gefunden. Unter Stimulation rekrutiert Zellrezeptor TLR2 die Adapter TIRAP und MyD88 an die Zellmembran, die wiederum die Kinasen IRAK4 und IRAK2 binden (Lin et al. 2010). In enolysosomalen Kompartimenten rekrutiert TLR2 zusätzlich IRF7 an MyD88 im Komplex mit IRAK4 und TRAF6 (Dietrich et al. 2010; Honda et al. 2004). Die in diesem Ansatz gefundenen Proteine sind in Tabelle 4 aufgelistet. Das *Ski-like* Protein reguliert den TGF (*transforming growth factor*)-beta-Signalweg und ist nicht bekannt im TLR-Signaling eine Rolle zu spielen (Stroschein et al. 1999). Von TGF-beta weiß man, dass es TLR2 induzierte Aktivierung von NF-κB hemmt (Naiki et al. 2005). Das *Ski-like* Protein wurde in dieser Arbeit im Zusammenhang mit dem TLR-Signalweg allerdings nicht weiter untersucht. Nach heutigem Stand gibt es keine direkte Verbindung von *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4* (MAP3K4) zum TLR-Signaling. Der Interleukin-18 receptor 1 (IL-18R1) gehört zur Interleukin-1 Rezeptor-Familie, besitzt daher auch eine intrazelluläre TIR-Domäne. Da IL-18R1 auch über MyD88 und IRAKs die Signalkaskade zur Aktivierung von NF-κB nutzt (Martin &

Wesche 2002), könnte der Rezeptor indirekt an den Signalkomplex von TLR2 gebunden haben. Eine Interaktion der beiden Rezeptoren über deren TIR-Domäne ist bisher nicht bekannt.

Das neu identifizierte Protein TRAF3IP3 schien besonders interessant weiter analysiert zu werden, da es mit TRAF3 interagiert, einem wichtigen Bestandteil des TLR-Signaling (Dadgostar et al. 2003; Häcker et al. 2006). TRAF3IP3 könnte den TLR-Signalweg über TRAF3 regulieren. Im nächsten Kapitel wird TRAF3IP3 funktionell charakterisiert um die Rolle im TLR-Signaltransduktionsweg aufzuklären.

**Tabelle 4: Liste der identifizierten Proteine des Proteinkomplexes von TLR2 mittels MALDI-TOF-MS.**

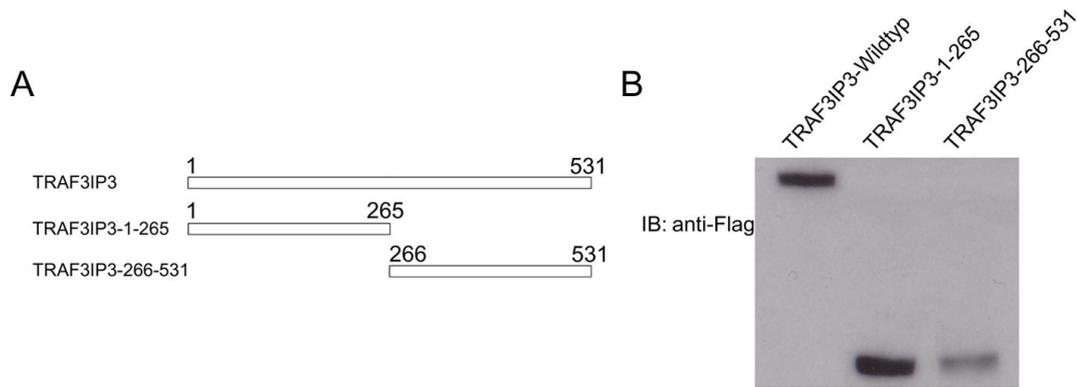
Symbol*	Protein	Masse (kDa)	MASCOT score	Sequenzierte Peptide
Vimentin	Vimentin	53,7	283	9
HSP71	heat shock protein 70	70	40	1
T3JAM	TRAF3IP3 protein	63,6	54	9
TIRAP	MyD88 adapter-like protein	23,9	54	6
IKKB	Inhibitor of nuclear factor kappa-B subunit beta	86,6	29	16
M3K4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	181,7	68	25
IRF7	Interferon regulatory factor 7	54,3	19	4
IRAK4	Interleukin-1 receptor-associated kinase 4	51,5	35	8
IL18R	Interleukin-18 receptor 1	62,3	26	7
IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase 2	69,4	30	6
SKIL	Ski-like protein	77	62	34

\* UniProtKB/Swiss-Prot-Bezeichnung

### 5.2.2 Funktionelle Charakterisierung von TRAF3IP3

Als neuer Interaktionspartner der TLR2-Signaltransduktionskaskade wurde TRAF3IP3 identifiziert. Das Protein TRAF3IP3 (TRAF3-interacting protein 3) wurde zuerst unter

dem Namen T3JAM (*TRAF3-interacting Jun N-terminal kinase-activating modulator*) beschrieben (Dadgostar et al. 2003). Es interagiert mit TRAF3 und aktiviert in synergistischer Weise JNK (*c-Jun N-terminale Kinase*), aber nicht NF- $\kappa$ B. Im Jahr 2006 wurde TRAF3 als neuer Bestandteil des TLR-Signaltransduktionsweges beschrieben (Häcker et al. 2006). Aus der Entdeckung von TRAF3IP3 im Signalproteinkomplex von TLR2 ergaben sich Fragen nach dessen Rolle im TLR-Signaltransduktionsweg. Ziel war es, für diese Fragestellung das neue Protein TRAF3IP3 im TLR-Signaling funktionell zu charakterisieren. Da TRAF3 sowohl im TRIF- als auch im MyD88-abhängigen Signalweg eine Rolle spielt, lag die Vermutung nahe, dass dessen Interaktionspartner TRAF3IP3 regulatorisch einen Einfluss auf beide Signalwege ausübt. Um diese Effekte zu überprüfen wurde zum einen die Lokalisation dieses Proteins unter TLR-Stimulation beobachtet und zum anderen der Einfluss von TRAF3IP3 auf die Phosphorylierung der TLR-abhängigen MAP-Kinase JNK untersucht. Anschließend wurde am Ende der Signaltransduktionskaskade die Rolle von TRAF3IP3 auf die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 analysiert. Für die Experimente wurde das humane Gen, das für TRAF3IP3 kodiert, in einen Expressionsvektoren kloniert, durch Sequenzierung die Orientierung überprüft und die Expression des Fusionsproteins mit einem 3xFlag-Tag nachgewiesen (Abbildung 12A). Das humane Gen TRAF3IP3 befindet sich auf Chromosom 1q32.3-q41 und besteht aus 17 Exons, in der Maus ist das Gen auf Chromosom 1 lokalisiert und besteht aus 14 Exons. Das humane Gen kodiert für ein Protein mit 531 Aminosäuren. Humanes und murines TRAF3IP3 sind DNA-Ebene zu 82 % identisch und ihre Aminosäuren stimmen zu 66 % überein, wobei die Ähnlichkeit der Aminosäuren bei 73 % liegt. Die N-terminalen Hälfte von TRAF3IP3 enthält eine Coiled-Coil-Bindungsdomäne, die mit der Isoleucin-Zipper-Domäne von TRAF3 interagiert (Dadgostar et al. 2003). Auf der Basis von Dadgostar et al. 2003 wurden trunkierte Versionen von TRAF3IP3 so gewählt, um die Wechselwirkung mit TRAF3 zu beeinflussen und somit auch den Einfluss auf den TLR-Signalweg beobachten zu können. Die N-terminal trunkierte Mutante enthält die Aminosäuren 1-265 und die C-terminale Mutante die Aminosäuren 266-531, dargestellt in Abbildung 12B.



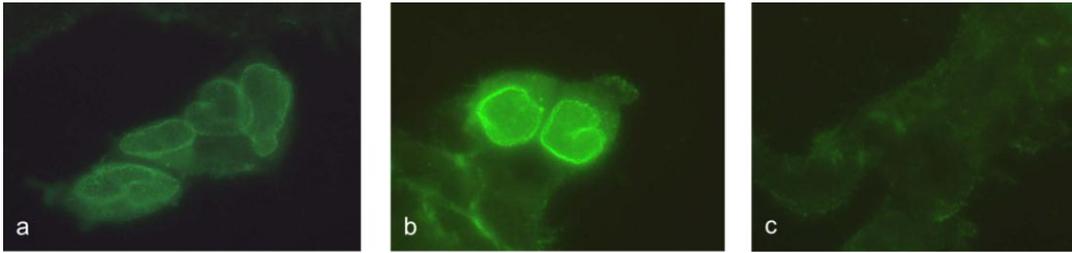
**Abbildung 12: Darstellung und Expression von TRAF3IP3**

(A). Modell von TRAF3IP3 und dessen truncierten Varianten. Der Wildtyp besteht aus 631 Aminosäuren (AS), die truncierten Varianten aus den AS 1 bis 265 bzw. AS 266 bis 531. (B). Expressionskontrolle von TRAFIP3 und den truncierten Versionen TRAF3IP3-1-265 und TRAF3IP3-266-531 in HEK 293-Zellen mittels Western Blot mit Anti-Flag-Antikörper.

### 5.2.2.1 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz sollte die Lokalisation von TRAF3IP3 in HEK293-Zellen unter TLR-Stimulation geklärt werden. Dafür wurden mit Flag-getagtem TRAF3IP3 transient transfizierte HEK293-Zellen mit Anti-Flag und anschließendem Fluoreszenzfarbstoffgekoppeltem Anti-Maus Antikörper gefärbt. Als Kontrolle dienen transient transfizierte Zellen mit Leervektor und nicht transfizierte Zellen. Zur Lokalisation des Zellkerns wurde parallel mit dem DNA-Farbstoff Hoechst-33342 gefärbt (hier nicht dargestellt). Die gefärbten Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop OLYMPUS IX70 ausgewertet oder mit dem Konfokalmikroskop Leica TCS SP2 analysiert.

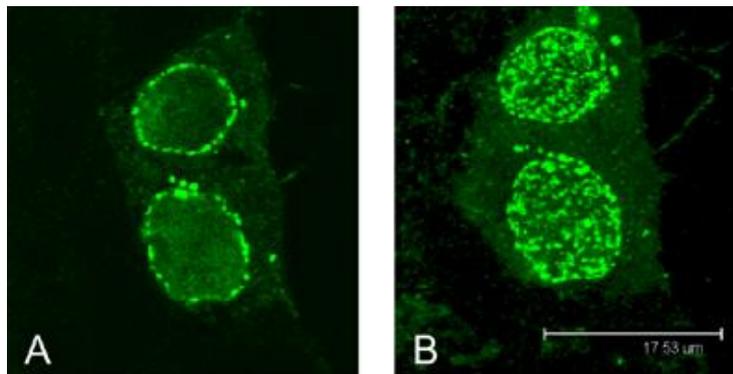
Die Immunfluoreszenzfärbung überexpressioniertem TRAF3IP3 zeigt eine starke Fluoreszenz an der Kernmembran. Zusätzlich kann eine feine, homogene Verteilung im Zytoplasma festgestellt werden (Abbildung 13a, b). Unter Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>, bei unterschiedlicher Dauer von 10 min bis 120 min, kann keine Änderung der Lokalisation von TRAF3IP3 beobachtet werden.



**Abbildung 13: Immunfluoreszenz-Färbung im Fluoreszenzmikroskop.**

Transient transfizierte HEK293-Zellen mit p3xFLAG-TRAF3IP3 (a-b), unter Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>-Stimulation (1 µg/ml, 40 min) (b), sowie untransfizierte HEK293-Zellen (c) mit Anti-Flag Antikörper und sekundärer Antikörper gekoppelt mit Alexa-Fluor 488.

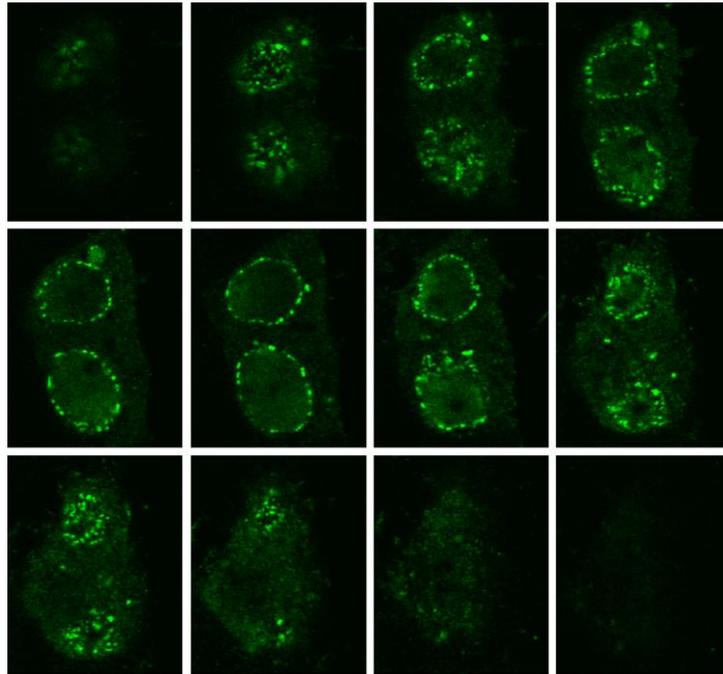
In Abbildung 14 sind konfokalmikroskopische Aufnahmen von HEK293-Zellen mit Fluoreszenz gefärbten TRAF3IP3 dargestellt. Im linken Bild (A) ist im mikroskopischen Schnitt die Lokalisation von TRAF3IP3 an der Zellkernmembran deutlich zu erkennen. In der Aufnahme auf der rechten Seite (B) ist eine Draufsicht auf den Zellkern und die dort fluoreszenzmarkierten Proteine TRAF3IP3 gezeigt.



**Abbildung 14: Immunfluoreszenz-Färbung mit der Konfokalmikroskopie.**

Transient transfizierter HEK293-Zellen mit p3xFLAG-TRAF3IP3 unter Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>-Stimulation (1 µg/ml, 40 min). Markierung mit M2-Anti-Flag Antikörper und sekundärer Antikörper, gekoppelt mit Alexa-Fluor 488. (A). Querschnitt durch die Zelle und den Zellkern. (B). Aufsicht auf den Zellkern.

Zur besseren Darstellung ist in Abbildung 15 eine Reihe an optischen Schnitten durch die Zellen mit fluoreszierendem TRAF3IP3 abgebildet. Dabei erkennt man die dreidimensionalen Zellen mit der deutlichen Lokalisation der Fluoreszenz an der Zellkernmembran.



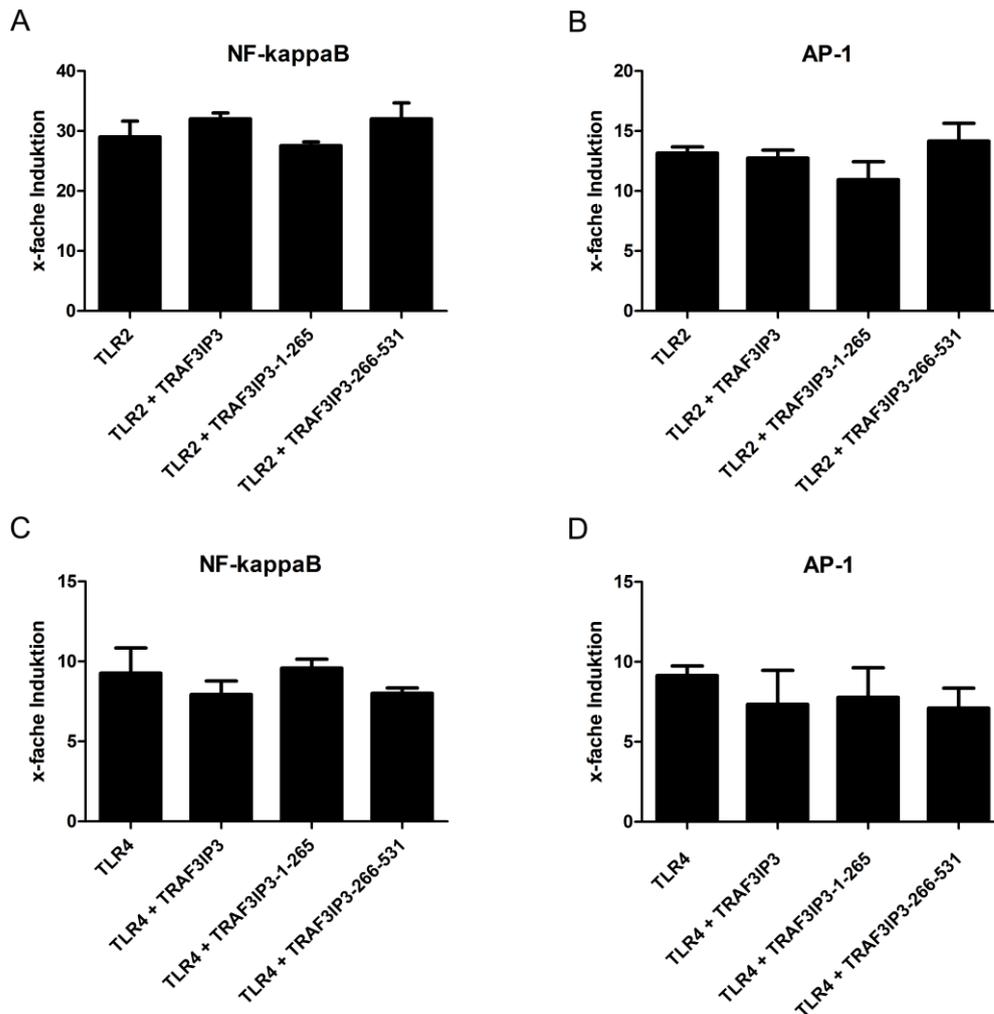
**Abbildung 15: Optische Schnitte mit der Konfokalmikroskopie.**

Waagerechte optische Schnitte durch Immunfluoreszenz gefärbte HEK293-Zellen, transient transfiziert mit p3xFLAG-TRAF3IP3 unter Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>-Stimulation (1 µg/ml, 40 min). Markierung mit M2-Anti-Flag Antikörper und sekundärer Antikörper, gekoppelt mit Alexa-Fluor 488.

#### 5.2.2.2 Reporteranalysen

Bei einer TLR-Stimulation werden die Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 aktiviert. Der Transkriptionsfaktor NF-κB nimmt im TLR-Signaltransduktionsweg eine Schlüsselrolle ein, indem er die Expression einer Reihe von proinflammatorischen Zytokinen steuert (Blackwell & Christman 1997). Im TLR-Signalweg wird AP-1 meist durch die MAP-Kinasen JNK, p38 oder ERK aktiviert. Um den Einfluss von TRAF3IP3 auf diesen Prozess zu beurteilen, wurden Experimente mit NF-κB- und AP-1-Reporterplasmiden durchgeführt. Mit diesem etablierten standardisierten Luziferase-Reportersystem lässt sich die NF-κB- und AP-1-Aktivität sensitiv bestimmen. Es wurde untersucht, ob TRAF3IP3 bzw. deren trunkeerte Versionen TRAF3IP3-1-265 und TRAF3IP3-266-531 Einfluss auf die TLR induzierte NF-κB- oder AP-1-Aktivierung ausüben. Im ersten Ansatz wurden HEK293-Zellen mit dem NF-κB-Luziferase-Reporterplasmid bzw. AP-1-Luziferase-Reporterplasmid, TLR2 und TRAF3IP3 bzw. dessen trunkeerte Versionen transient trans-

fiziert und mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> stimuliert. Überexpression von TRAF3IP3-Wildtyp führte nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> weder bei der TLR2 abhängigen NF-κB-Aktivität noch bei der AP-1-Aktivität zu einer signifikanten Veränderung (Abbildung 16A, B). Selbst die trunkierten Varianten von TRAF3IP3 haben die TLR2-abhängige NF-κB Aktivität sowie die AP-1-Aktivität nicht signifikant verändert.



**Abbildung 16: Einfluss von TRAF3IP3 auf TLR2 und TLR4 induzierte Luciferase-Aktivität.** Transient transfizierte HEK293-Zellen, kotransfiziert mit TLR2 (A, B), bzw. TLR4 und MD2 (C, D) und einem NF-κB (A, C) bzw. AP-1 (B, D) gesteuertem Luciferase-Reporterplasmid, sowie einem Renilla-Reporterplasmid. Zusätzlich wurde mit TRAF3IP3, TRAF3IP3-1-265 und TRAF3IP3-266-531 kotransfiziert. Stimulation der Zellen für 16 Stunden mit 1 µg/ml Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>. Die Zellen wurden mit einem 1 x Passivlyse-Puffer (Promega, Mannheim, Germany) lysiert. Die Aktivität der Firefly- und Renilla-Luziferase wurde mit dem Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, Mannheim, Germany) nach Angaben des Herstellers gemessen. Die vielfache Induktion berechnet sich aus dem Verhältnis der NF-κB- bzw. AP-1-Firefly-Luziferase und der TK Renilla-Luziferase. Dargestellt sind Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Aus den vorliegenden Untersuchungen übt TRAF3IP3 unter TLR2-Stimulation keinen Einfluss auf die NF- $\kappa$ B-Aktivität und die AP-1-Aktivität aus.

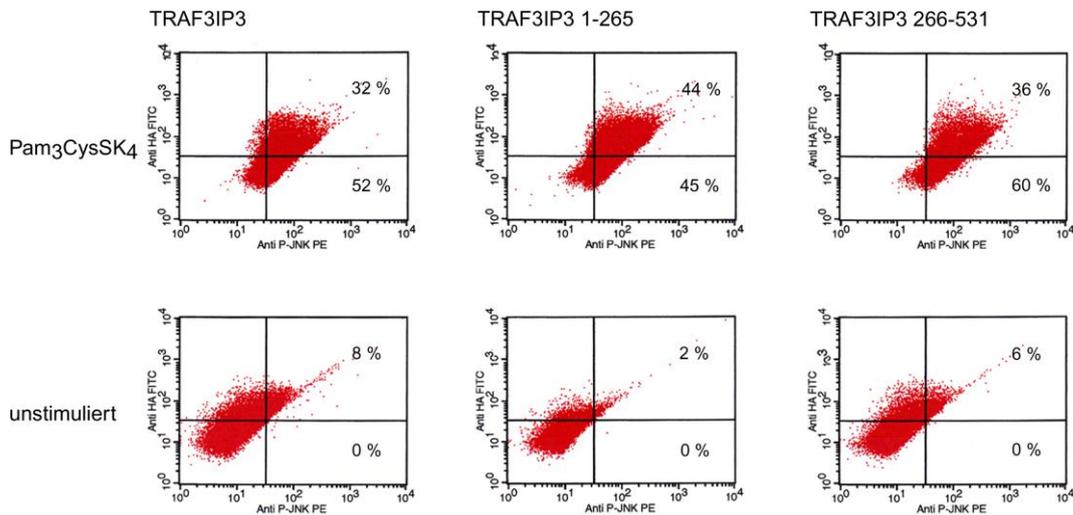
Aufgrund der genannten Unterschiede in der Signaltransduktion wurden in einem zweiten Ansatz die Zellen mit TLR4 transfiziert und mit LPS stimuliert. Ähnlich der Stimulation von TLR2 konnte kein Einfluss von TRAF3IP3 oder seiner trunkierten Versionen in der TLR4-abhängigen Aktivierung von NF- $\kappa$ B und AP-1 beobachtet werden (Abbildung 16C, D).

### 5.2.2.3 Durchflusszytometrie

Der Einfluss von TRAF3IP3 und deren trunkierte Mutanten wurde auf die Aktivierung der MAP Kinase JNK (c-Jun N-terminale Kinase), oder Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK), unter Stimulation von LPS hin untersucht. Von TRAF3IP3 ist bekannt, dass es als spezifischer Regulator der TRAF3-vermittelten JNK-Aktivierung wirkt (Dadgostar et al. 2003). Allein durch Ko-Expression von TRAF3IP3 und TRAF3 wird in der Arbeit von Dadgostar et al. JNK aktiviert. Dabei interagiert die C-terminal gelegene „Coiled-coil“-Domäne von TRAF3IP3 mit der Isoleucin-Zipper Domäne von TRAF3. Die Aktivierung von JNK kann man mit spezifischen Antikörpern nachweisen, die spezifisch die phosphorylierten Aminosäuren Threonin 183 und Tyrosin 185 detektieren. Die Phosphorylierung wurde mittels Durchflusszytometrie mit spezifischen Anti-Phospho-JNK Antikörpern bei transient transfizierten RAW264.7-Zellen unter Stimulation von TLR2 mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> durchgeführt. Das vollständige Gen von TRAF3IP3 sowie die trunkierte Versionen TRAF3IP3 1-265, die für die ersten 265 Aminosäuren kodiert, und TRAF3IP3 266-531 in einen Expressionsvektor mit einem dreifachen HA-Tag kloniert. Die trunkierte Versionen von TRAF3IP3 wurden mittels PCR aus dem Vektor pCR2.1-TRAF3IP3 amplifiziert. Die Plasmide wurden in RAW264.7 transient transfiziert und die Expression der Fusionsproteine mittels Western Blot mit Anti-HA Antikörpern später kontrolliert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 10 min mit 1  $\mu$ g/ml Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> stimuliert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Saponin permeabilisiert. Für die spätere Messung im Durchflusszytometer wurden zuerst mit An-

## 5. Ergebnisse

ti-HA Antikörper (Ratte) und Anti-Phospho-JNK Antikörper (Kaninchen) inkubiert, gewaschen und mit Ziegen- und Esel-Serum geblockt. Im nächsten Schritt wurde mit den Zweitantikörpern inkubiert, mit dem FITC-markierten Anti-Ratte Antikörper (aus Ziege) sowie PE-markierten Anti-Kaninchen Antikörper (aus Esel) inkubiert.



**Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse der JNK-Phosphorylierung.**

Transient transfizierte RAW264.7 mit TRAF3IP3-Wildtyp, bzw. die trunkierte Varianten TRAF3IP3-1-265 und TRAF3IP3-266-531 unter Stimulation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>. Exprimiertes TRAF3IP3 wurde mit einem Anti-HA-Antikörper und einem FITC-markiertem Zweitantikörper gefärbt (y-Achse), aktiviertes JNK wurden in den Zellen mit einem Anti-Phospho-JNK-Antikörper und einem Phycoerythrin-Zweitantikörper markiert (x-Achse). Dargestellt ist eine repräsentative Messung aus drei unabhängigen Experimenten.

Nach den Daten der FACS-Messungen übt die Überexpression von TRAF3IP3 keinen Einfluss auf die Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>-induzierte Aktivierung von JNK aus. In Abbildung 17 ist die Phosphorylierung von JNK in TRAF3IP3-, bzw. dessen trunkierte Varianten-exprimierenden RAW264.7-Zellen unter Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>-Stimulation dargestellt. Eine Phosphorylierung der Zellen ist deutlich zu erkennen. Transient exprimierendes TRAF3IP3 verändert die Phosphorylierung im Vergleich zu Kontroll-Zellen, transfiziert mit Leervektor, nicht messbar. Auch ist kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp von TRAF3IP3 und dessen trunkierten Varianten TRAF3IP3 1-265 und TRAF3IP3 266-531 nachzuweisen. Mit dieser Methode ist kein Einfluss von TRAF3IP3 oder seiner trunkierten Varianten auf die Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>-induzierten Phosphorylierung von JNK zu beobachten.

### 5.2.3 Identifikation von TLR2-Interaktionspartner mit ESI-MS

Für die Identifikation der Interaktionspartner von TLR2 mit Nano-LC-ESI-MS wurden in einem Ansatz HEK293-Zellen mit Flag-getaggetem TLR2 transient transfiziert. Die interagierenden Proteine wurden in gleicher Weise für die massenspektrometrische Messung vorbereitet. Die identifizierten Proteine, dargestellt in Tabelle 5, wurden nur in mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> stimulierten Zellen gefunden; nicht in unstimulierten Zellen oder der Mock-Kontrolle.

**Tabelle 5: Liste der identifizierten mit TLR2 kopräzipitierten Proteine unter Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> mittels Nano-LC-ESI-MS.**

Symbol	Protein	Masse (kDa)	MASCOT Score	Sequenzierte Peptide <sup>#</sup>
1433T	14-3-3 theta	27,8	79	2(1)
HSP71	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	70,0	593	17(15)
HSP76	Heat shock 70 kDa protein 6	71,0	330	7(6)
HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein	71,0	274	5(5)
HSP90E	Heat shock 90 kDa protein B	83,3	554	15(12)
VIME	Vimentin	53,7	81	3(2)
TBB5	Tubulin beta	49,7	351	6(5)
TBB2A	Tubulin beta-2A	49,9	49	2(1)
TCPG	T-complex protein 1 subunit gamma	60,5	54	1(1)
UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	117,8	272	6(6)
RS27A	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27	18,0	76	1(1)
TFG	Protein TFG	43,4	51	4(2)
MRP	MARCKS-related protein	19,5	72	1(1)
EF1A3	Putative elongation factor 1-alpha-like 3	50,2	54	2(1)
EF2	Elongation factor 2	95,3	64	2(2)
DHX8	ATP-dependent RNA helicase DHX8	139,3	43	3(2)

\* UniProtKB/Swiss-Prot-Bezeichnung, <sup>#</sup>Anzahl gesamt, in Klammern Anzahl über Signifikanzschwelle

Hitzeschockproteine (HSPs) werden häufig in massenspektrometrischen Ansätzen identifiziert. Ihre funktionelle Relevanz für TLR wird im Moment diskutiert (Tsan & Gao 2009). Von HSPs ist beschrieben, dass sie neben der Funktion als molekulare Chaperone und intrazelluläre Transportfunktion an TLR binden und deren immunstimulierende

Wirkung verbessern (Asea 2008). Ihre Expression wird von Stressbedingungen wie Infektionen und Entzündungen ausgelöst (Santoro 2000). Intermediärfilamente des Zytoskeletts wie Vimentin und Tubulin-Proteine kolokalisieren nachweislich mit TLR2 (Hofer-Warbinek et al. 2004). Eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielen Proteine des Ubiquitin-Systems (Coll & O'Neill 2010). Die zur Ubiquitin-Familie gehörenden Proteine Ubc13, Uev1A und die E3-Ligasen TRAF6 und Pellino-1 sind bekannte wichtige Proteine des TLR-Signalweges (Cusson-Hermance et al. 2005; Deng et al. 2000). Die beiden in der Tabelle genannten Proteine dieser Familie sind allerdings nicht im Zusammenhang des angeborenen Immunsystems beschrieben. Das Protein TFG (*TRK-fused gene*) wurde bisher als Teil eines TLR-unabhängigen NF- $\kappa$ B-Signalweges vorgestellt (Miranda et al. 2006). Das *MARCKS-related* Protein (MRP) wird in Maus-Makrophagen unter LPS-Stimulation hochreguliert und spielt nach bisherigen Kenntnissen eine Rolle in der Auswanderung der Zellen (Chun et al. 2009). Elongationsfaktoren werden bei Aktivierung von TLR auch hochreguliert. Ebenfalls oft werden DNA- und RNA-Bindungsproteine wie die ATP-abhängige RNA-Helikase DHX8 in massenspektrometrischen Ansätzen identifiziert. In dieser Arbeit wurde 14-3-3 theta als Interaktionspartner des TLR2-Signalkomplexes identifiziert. 14-3-3 theta gehört der 14-3-3-Proteinfamilie an, deren Mitglieder zwar mehrmals im Zusammenhang mit Proteinen des TLR-Signaltransduktionsweges beschrieben wurden, allerdings deren direkte funktionelle Rolle für TLR bisher noch nicht erforscht wurde (Zuo et al. 2010). Mit einer quantitativen proteomischen Herangehensweise wurden Makrophagen unter TLR2-Stimulation auf differentiell exprimierte Proteine charakterisiert und dabei eine Hochregulation der 14-3-3 Isoformen beta/alpha, theta, gamma, zeta/delta und epsilon beobachtet (Xue et al. 2008).

### 5.2.4 Funktionelle Charakterisierung von 14-3-3

Nach der Identifikation von 14-3-3 in zwei unterschiedlichen Ansätzen mit zwei unterschiedlichen Proteinen des TLR-Signalweges unter Stimulation, im Proteinkomplex von MyD88 und TLR2, wurde die funktionelle Rolle von 14-3-3 im TLR-Signaling charakterisiert.

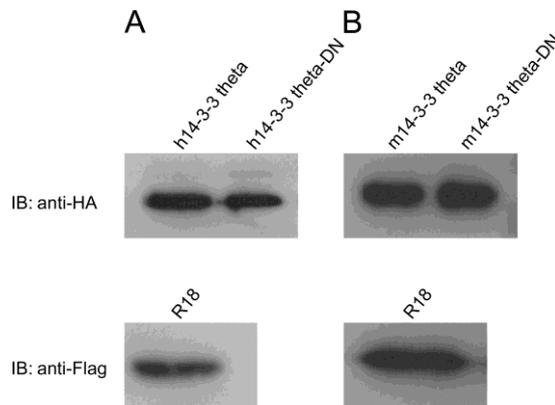
14-3-3 ist eine regulatorische Proteinfamilie, welche neun Isoformen einschließt. Sie binden eine große Anzahl an funktionell vielfältigen Proteinen unterschiedlicher Signalwege, wie z. B. Kinasen, Phosphatasen, aber auch Transmembranrezeptoren (Mhawech 2005). Da 14-3-3 theta im TLR-Signalkomplex entdeckt wurde, sollte nun umgekehrt 14-3-3 theta unter TLR-Stimulation mittels Immunpräzipitation aus HEK293-Zellen „gefischt“ werden, um mögliche gebundene bekannte Proteine des TLR-Signalweges zu finden. Zur Charakterisierung der funktionellen Rolle von 14-3-3 im TLR-Signalweg wurde dessen Effekt auf die MAP-Kinasen beobachtet und in einer Reporteranalyse den Einfluss auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B überprüft. Wegen der bekannten Rolle der 14-3-3 Proteine in mehreren apoptotischen Signalwegen stellte sich die Frage, ob auch der TLR-induzierte Zelltod durch 14-3-3 reguliert wird. Ein weiterer sinnvoller Ansatz zur funktionellen Charakterisierung von 14-3-3 ist die Messung der Zytokinsekretion, da das Ergebnis eines TLR-Engagements unter anderem die Hochregulation von proinflammatorischen Zytokinen ist.

### 5.2.4.1 Klonierung und Expression von 14-3-3

Humane DNA-Konstrukte von 14-3-3 und deren bekannten dominant negativen (DN) Mutante R56/60A wurden in Form der Plasmide pEF-HA-14-3-3 theta und pEF-HA-14-3-3 theta R56/60A mit einem N-terminalem HA-Tag freundlicherweise von Frau Dr. Angelika Hausser (Stuttgart) zur Verfügung gestellt. Nach einer Kontrollsequenzierung der Konstrukte wurden die Gene 14-3-3 theta und DN-14-3-3 theta für bestimmte Experimente in den Expressionsvektor p3xFLAG-CMV14 umkloniert. Das murine Gen für 14-3-3 theta wurden aus cDNA von mRNA aus RAW264.7-Zellen synthetisiert und in den Vektor pC-3xHA mit dreifachem HA-Tag kloniert und die DN-Mutante mit entsprechenden designten Oligonukleotiden mutagenisiert.

Für verschiedene Versuche wie Genreporteranalysen oder der Durchflusszytometrie wurden HEK293-Zellen transient mit den humanen 14-3-3 theta-Konstrukten und dem 14-3-3-Inhibitor R18, sowie RAW264.7-Zellen mit murinen 14-3-3 theta-Konstrukten und R18 transfiziert. Im Western Blot wurde die Expression der Fusionsproteine kontrolliert

(Abbildung 18). Es wurden auch stabile RAW264.7-Zellen generiert, die murines 14-3-3 theta und das Inhibitor-Peptid R18 stabil exprimieren.



**Abbildung 18: Expressionskontrolle von 14-3-3 mittels Western Blot.**

Expression von 14-3-3 theta und DN-14-3-3 theta sowie R18 in (A) transient transfizierten HEK293-Zellen und (B) RAW264.7-Zellen.

#### 5.2.4.2 Massenspektrometrische Identifikation von Protein-Protein-Interaktion von 14-3-3 theta

Nach der Identifikation von 14-3-3 in TLR-Signalkomplexen wurde der Frage nachgegangen, ob man auch umgekehrt in einer Immunpräzipitation von 14-3-3 theta direkt Interaktionen mit Proteinen des TLR-Signalweges nachweisen kann. Es wurden HEK293-Zellen mit HA-getagtem 14-3-3 theta und TLR2 kotransfiziert und nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> 14-3-3 theta über Anti-HA gekoppelte Sepharose präzipitiert. Die kopräzipitierten Proteine wurden über einen tryptischen Verdau in Lösung mittels Massenspektrometrie mit einem LTQ-Orbitrap identifiziert. Es wurden physikalische Wechselwirkungen von 14-3-3 theta mit anderen Mitgliedern der 14-3-3 Protein-familie unter TLR2-Stimulation beobachtet (Tabelle 6). Es ist bekannt, dass 14-3-3 theta Homo- und Heterodimere mit verschiedenen 14-3-3-Isoformen bildet, aber diese Verbindung unter TLR2-Stimulation wurde bisher noch nicht beschrieben (Jones et al. 1995). Weiter wurde in diesem Ansatz IRAK4 nachgewiesen, ein wichtiges Protein, das zur Signalweitergabe an TLR2 gebundenes MyD88 rekrutiert wird. Eine direkte Verbindung von IRAK4 mit 14-3-3-Proteinen ist bisher nicht bekannt. Vergleichbar mit den zuvor beschriebenen Proteom-Ansätzen konnten Proteine unterschiedlicher Funktion identifiziert werden, Proteine die

ein Rolle im Proteintransport spielen, Proteine der Proteinsynthese, Chaperone und Proteine der Posttranskriptionalen Modifikationen. Das Protein *Interleukin enhancer-binding factor 2* reguliert die Transkription während der T-Zell-Aktivierung und wurde bereits in einer anderen massenspektrometrischen Studie als Interaktionspartner von 14-3-3 epsilon identifiziert (Zuo et al. 2010). In einem ähnlichen proteomischen Versuchsansatz zur Analyse von Interaktionen mit 14-3-3 gamma wurde übereinstimmend mit den hier gewonnenen Daten ebenfalls Hitzeschockproteine, Vimentin, Histon-assoziierte Proteine, Splicing-Faktoren und Elongationsfaktoren nachgewiesen (Jin et al. 2004).

**Tabelle 6: Liste identifizierter mit 14-3-3 theta kopräzipitierter Proteine unter Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>.**

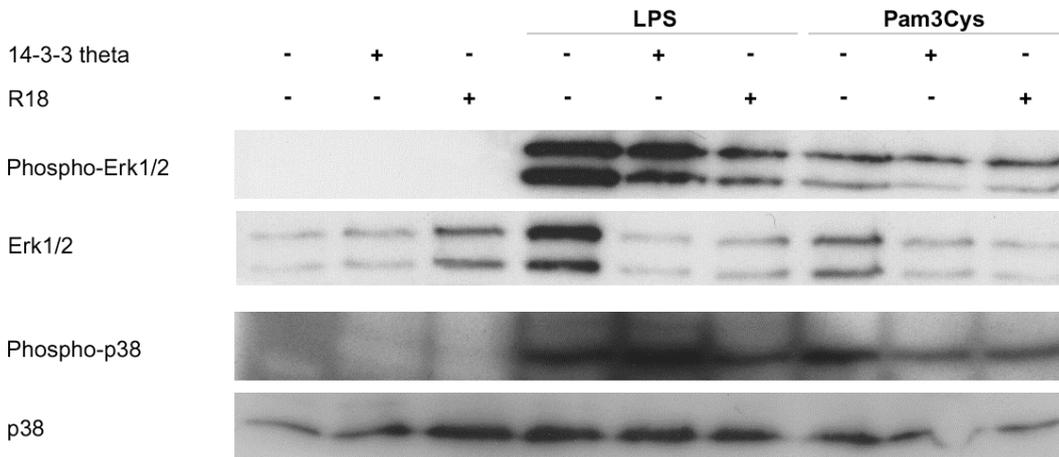
Symbol	Protein	Masse (kDa)	MASCOT Score	Sequenzier Peptide <sup>#</sup>
1433T	14-3-3 protein theta	27,8	656	11(8)
1433Z	14-3-3 protein zeta/delta	27,7	86	4(2)
1433S	14-3-3 protein sigma	27,8	70	3(2)
1433E	14-3-3 protein epsilon	29,2	63	4(2)
1433G	14-3-3 protein gamma	29,2	40	2(1)
14-3-3F	14-3-3 protein eta	28,2	54	3(2)
IRAK4	IL-1 receptor associated kinase 4	51,5	56	4(3)
TCPQ	T-complex protein 1 subunit theta	59,6	207	6(6)
TCPD	T-complex protein 1 subunit delta	58,0	144	3(2)
TCPA	T-complex protein 1 eta	60,8	60	1(1)
HSP71	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	70,0	196	11(6)
VIME	Vimentin	53,7	212	9(6)
H12	Histone H1.2	21,4	149	5(3)
SFPQ	Splicing factor, proline- and glutamin rich	76,1	153	4(3)
ILF2	Interleukin enhancer-binding factor 2	43,1	55	2(1)
EF1A1	Elongation factor 1-alpha 1	50,1	186	7(5)

\* UniProtKB/Swiss-Prot-Bezeichnung, <sup>#</sup>Anzahl gesamt, in Klammern Anzahl über Signifikanzschwelle

### 5.2.4.3 Einfluss von 14-3-3 auf die Aktivierung von MAP-Kinasen

Eine Folge der TLR-Stimulation ist neben der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B eine Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen wie z. B. Erk1/2 und p38. Um zu beurteilen, ob 14-3-3 diese beeinflusst, wurde die Phosphorylierung der MAP-Kinasen in Zellslysaten stabil transfizierter RAW264.7-Zellen mit 14-3-3 theta bzw. dessen Inhibitor R18 unter Stimulation mit LPS und Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> im Western Blot untersucht. Kinetiken zeigten, dass in diesen Zellen eine Stimulation mit LPS oder Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> zu einem raschen Anstieg der Phosphorylierung der MAP-Kinasen Erk1/2 und p38 führt. Die Inkubationszeit und optimale Konzentration der TLR-Liganden wurden empirisch ermittelt.

Die Stimulation von TLR2 mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> und TLR4 mit LPS führte zu einer deutlichen Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 und p38 (Abbildung 19). Die Aktivierung von p38 war bei allen stimulierten Zellen vergleichbar, sowohl bei Überexpression von 14-3-3 theta, dem Inhibitor R18 als auch bei untransfizierten Zellen. Unstimulierte Zellen zeigten keine Phosphorylierung von p38. Unter TLR-Stimulation wird in 14-3-3 theta und R18 exprimierenden Zellen sowie mit untransfizierten Zellen Erk1/2 aktiviert.



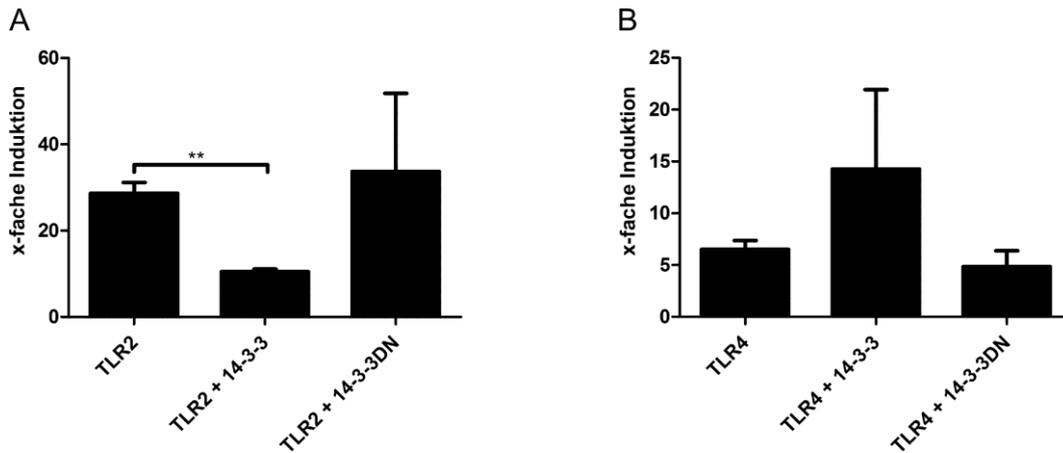
**Abbildung 19: Liganden-induzierte Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 und p38.**

Stabil transfizierte RAW264.7-Zellen mit TRAF3IP3 oder R18 wurden mit LPS (100 ng/ml, 20 min) und Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (1  $\mu$ g/ml, 20 min) stimuliert. Im Western Blot wurden spezifische Antikörper gegen phosphoryliertes Erk1/2, Gesamt-Erk1/2, phosphoryliertes p38 und Gesamt-p38 verwendet. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Experimente.

Die Phosphorylierung unter LPS-Stimulation scheint stärker zu sein als die bei Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>, allerdings ist die Bande bei Total-Erk1/2 ebenso stärker bei den Kontrollzellen. Auch eine Reproduktion des Versuches zeigte keine deutlichere Bande bei 14-3-3 theta exprimierenden Zellen im Vergleich zur Gesamt-Erk1/2-Bande. Weder eine Überexpression von 14-3-3 theta noch die Hemmung durch R18 hatte unter TLR2- und TLR4-Stimulation eine messbare Veränderung der Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 und p38 zur Folge.

### 5.2.4.4 Einfluss von 14-3-3 auf Gen-Reporter-Aktivität

Neben dem MAPK-Signalweg nimmt der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B im TLR-Signaltransduktionsweg eine Schlüsselrolle ein, indem er die Expression einer Reihe von inflammatorischen Zytokinen steuert (Blackwell & Christman 1997). Zur funktionellen Charakterisierung der Rolle von 14-3-3 theta im TLR-Signalweg wurden das etablierte und standardisierte NF- $\kappa$ B-Luziferase-Reportersystem verwendet. Es wurde der Frage nachgegangen, ob 14-3-3 Einfluss auf die TLR induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung ausübt. Im ersten Ansatz wurden HEK293-Zellen mit dem NF- $\kappa$ B-Luziferase-Reporterplasmid, TLR2 und 14-3-3 theta bzw. dessen negative Mutante (14-3-3DN) transient transfiziert und mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> stimuliert. Diese Doppelmutante R56A/R60A verhindert die Bindung zu bekannten Interaktionspartnern wie z.B. PDK1 (*3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1*) oder Raf (*Rapidly accelerated fibro sarcoma*)-1 (Wang et al. 1998; Sato et al. 2002). Überexpression von 14-3-3 theta-Wildtyp führte zu einer signifikant verminderten TLR2 abhängiger NF- $\kappa$ B-Aktivität nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (Abbildung 20A), im Gegensatz zu 14-3-3DN. Aufgrund eines unterschiedlichen Repertoires an Adapterproteinen nach Stimulation wurden in einem zweiten Ansatz die Zellen mit TLR4 transfiziert und mit LPS stimuliert. Im Gegensatz zu den TLR2 abhängigen Ergebnissen führte die Überexpression von 14-3-3 theta dagegen überraschenderweise zu einer erhöhten TLR4-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivität nach Stimulation mit LPS (Abbildung 20B). Die dominant negative Mutante 14-3-3DN hat die TLR4 abhängige NF- $\kappa$ B Aktivität nicht verändert.



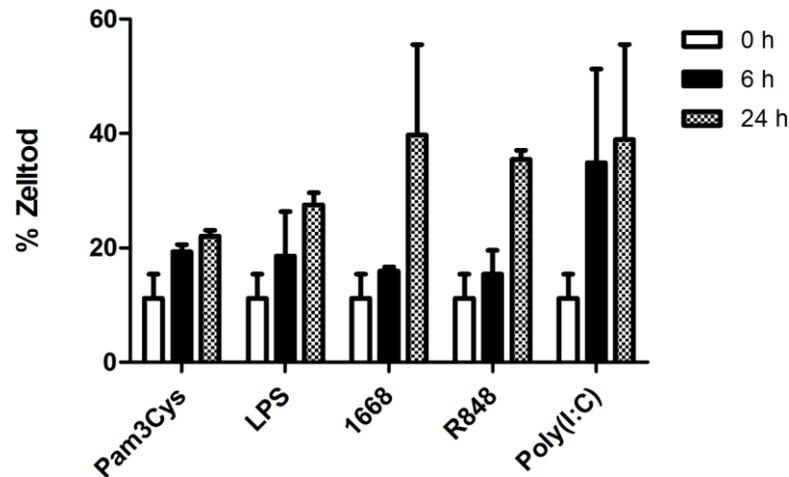
**Abbildung 20: Einfluss von 14-3-3 auf TLR-induzierte NF-κB-Luziferase-Aktivität.**

(A) Transient transfizierte HEK293-Zellen mit einem TLR2-Expressionsvector, einem NF-κB gesteuertem Luziferase-Reporterplasmid und einem Renilla-Reporterplasmid. Es wurde mit 14-3-3 theta, 14-3-3 theta-DN oder dem Kontrollvektor kotransfiziert. Stimulation der Zellen für 16 Stunden mit 1 µg/ml Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>. (B). HEK293-Zellen, transient transfiziert mit einem TLR4- und einem MD2-Vektor, zusammen mit Plasmide für einen NF-κB gesteuerten Luziferase-Reporter und einem Renilla-Reporter. Die Zellen von (A) und (B) wurden mit einem 1 x Passivlyse-Puffer (Promega, Mannheim, Germany) lysiert. Die Aktivität der Firefly- und Renilla-Luziferase wurde mit dem Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, Mannheim, Germany) nach Angaben des Herstellers gemessen. Die vielfache Induktion berechnet sich aus dem Verhältnis der NF-κB-Firefly-Luziferase und der TK Renilla-Luziferase. Das Schaubild zeigt Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Als Statistischer Test wurde der Student-t-Test verwendet, ein  $p \leq 0.01$  wurde als signifikant angesehen.

#### 5.2.4.5 Zelltod

Eine wichtige physiologische Rolle in eukaryotischen Zellen spielt der Transkriptionsfaktor NF-κB nicht nur in der Regulation der Immunantwort, sondern auch der Zellproliferation und des Zelltods. Von 14-3-3-Proteinen ist bekannt, Apoptose durch Bindung an pro-apoptische Proteine wie z. B. Bax, Bad und FOXO3 zu hemmen (Masters & Haiyan Fu 2001; Mancini et al. 2011). Es wurde der Frage nachgegangen, ob 14-3-3 theta diesen Effekt auch bei TLR induzierter Apoptose ausübt. Die Induktion des Zelltods wurde nach einer Färbung mit Annexin-V mit der Durchflusszytometrie gemessen. In Abbildung 22 ist die Fähigkeit der TLR gezeigt, unter Stimulation den Zelltod zu induzieren. Es wurden hier TLR2, TLR3, TLR4, TLR8 und TLR9 stimuliert. Alle stimulierten TLR zeigten eine Induktion der Zelltodrate, abhängig von der Stimulationszeit.

## 5. Ergebnisse

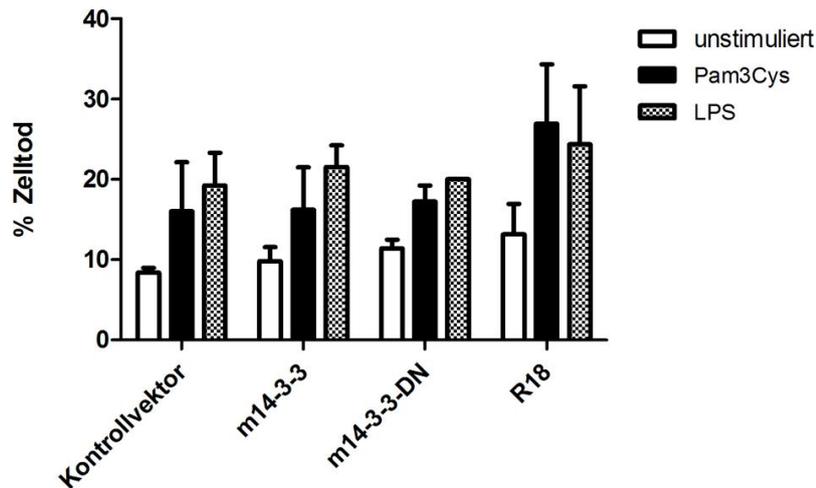


**Abbildung 21: Kinetik TLR induziertem Zelltod von RAW264.7-Zellen.**

Zelltod nach Stimulation mit 1 µg/ml Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (TLR2), 400 ng/ml LPS (TLR4), 1 µM/ml 1668 (TLR9), 1 µg/ml R848 (TLR7/8) und 25 µg/ml Poly (I:C) (TLR3) für 0, 3 oder 6 Stunden. Messung des Zelltods mittels Durchflusszytometrie mit Annexin-V. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus vier unabhängigen Versuchen.

Die RAW264.7 wurden mit GFP, sowie 14-3-3 zw. 14-3-3DN bzw. dem 14-3-3-Inhibitor R18 transient transfiziert. Nach Stimulation für verschiedene TLR wurden im Durchflusszytometer die GFP-positiven Zellen auf Annexin-V-Färbung analysiert. Eine Expression der Proteine konnte im Westernblot nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18).

Es wurde kein Einfluss von 14-3-3 theta oder 14-3-3DN auf die TLR2- und TLR4 induzierte Apoptose festgestellt (Abbildung 22). Trotz der bekannten Rolle anti-apoptische Signale zu beeinflussen (Dong et al. 2007), konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen und 14-3-3 theta-Wildtyp, 14-3-3DN oder dem Inhibitor R18 exprimierenden RAW264.7-Zellen auf TLR induzierten Zelltod nicht beobachtet werden. Anhand der Graphik kann man in den Zellen, in denen 14-3-3 durch R18 gehemmt wurde, eine erhöhte Rate an Zelltod annehmen, allerdings war die Steigerung nicht signifikant.



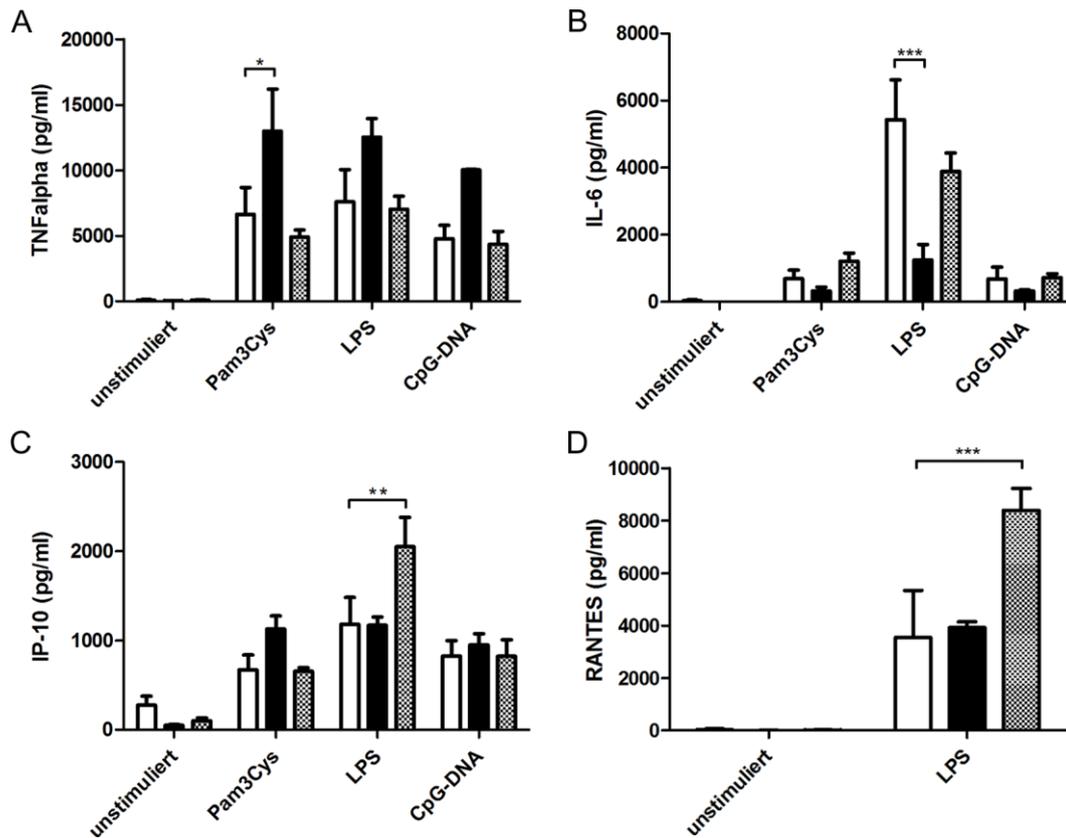
**Abbildung 22: Einfluss von 14-3-3 auf TLR-induzierten Zelltod von RAW264.7.**

RAW264.7-Zellen wurden mit GFP und 14-3-3 theta, 14-3-3 theta R56/60A bzw. 14-3-3 Inhibitor R18 transfiziert und mit 1µg/ml Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (TLR2) oder 400ng/ml LPS (TLR4) für 16 Stunden stimuliert. GFP-positive Zellen wurden mit der Durchflusszytometrie detektiert und gemessen. Messung von Zelltod mittels Durchflusszytometrie mit Annexin-V. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus vier unabhängigen Versuchen.

#### 5.2.4.6 Einfluss von 14-3-3 auf die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine

Eine wichtige Aufgabe der TLR ist die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen (Kawai & Akira 2010). Eine gute Möglichkeit den direkten Einfluss eines Moleküls auf die TLR-Signaltransduktionswege zu bewerten ist damit die TLR-induzierte Zytokinsekretion zu messen. Um die regulatorische Rolle von 14-3-3 im TLR-Signaltransduktionsweg zu bestätigen, wurde der Effekt von überexprimiertem 14-3-3 theta, bzw. deren Hemmung durch den Inhibitor R18, auf die Sekretion von verschiedenen pro-inflammatorischen Zytokinen nach Stimulation der TLR 2, 4 und 9 mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>, LPS und CpG-DNA überprüft. Hier wurde mit TLR9 ein dritter Toll-like Rezeptor in die Experimente mit einbezogen. Für die Untersuchung wurden murine RAW264.7 Zellen stabil mit 14-3-3 theta und dessen Inhibitor R18 transfiziert. R18 ist ein Peptid, das als genereller Inhibitor von 14-3-3-Liganden-Interaktionen aller 14-3-3-Isoformen dient (H. Wang et al. 1998). Die stabil transfizierten RAW264.7 Zellen sowie untransfizierte Zellen als Kontrolle wurden für 16 Stunden mit 1 µg/ml Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>, 100 ng/ml LPS oder 1 mM CpG-DNA stimuliert. Stimulation von TLR2, TLR4 und TLR4 führten zu einer erhöhten Sekretion der Zytokine TNFα, IL-6, IP-10 und RANTES (Abbildung 23).

## 5. Ergebnisse



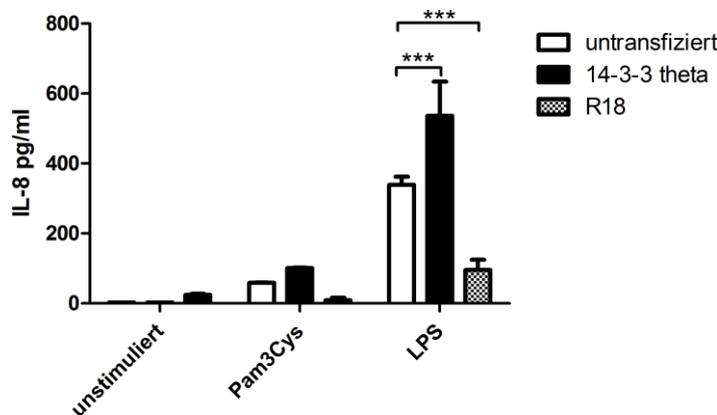
**Abbildung 23: Zytokinsekretion unter TLR-Stimulation.** Einfluss von 14-3-3 in murinen RAW264.7 Zellen, die 14-3-3 theta-Wildtyp stabil exprimieren (■), bzw. den 14-3-3 Inhibitor R18 (▨) oder nicht transfizierte Zellen (□) als Negativkontrolle. Es wurde mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (1 µg/ml), LPS (100 ng/ml) oder CpG-DNA (1mM) für 16 Stunden stimuliert. Die Überstände wurden gesammelt und die Zytokinsekretion mit einem Beads-basiertem Zytokin-Assay für TNFα (A), IL-6 (B), IP-10 (C) und RANTES (D) gemessen. Die Ergebnisse sind als Gesamt-Zytokin-Konzentration von drei unabhängigen Versuchen ± Standardabweichung dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mit dem zweifachen ANOVA-Test ermittelt, ein  $p \leq 0.05$  (\*) ,  $p \leq 0.01$  (\*\*) oder  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) wurde als signifikant angesehen.

Stimulierte RAW264.7-Zellen, die den Wildtyp von 14-3-3 theta überexprimieren, produzierten eine höhere Menge an TNFα als nicht transfizierte Zellen (Abbildung 23A). Die erhöhte TNFα-Sekretion war unter Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> signifikant, konnte allerdings als Trend auch bei Stimulation von TLR4 und TLR9 beobachtet werden. Die Hemmung der 14-3-3-Proteine durch den 14-3-3-Inhibitor R18 ergab bei allen Stimulationen keinen Unterschied in der TNFα-Sekretion im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen. Die Konzentration von IL-6 war im Gegensatz zu TNFα in allen 14-3-3 exprimierenden Zellen erniedrigt (Abbildung 23B). Signifikant niedriger im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen war der IL-6-Level nur im Überstand von LPS stimulierten 14-3-3

exprimierenden Zellen. Die gemessene IL-6-Sekretion in 14-3-3 gehemmten Zellen durch R18 war vergleichbar mit untransfizierten Zellen.

Die Sekretion des Chemokins IP-10 wurde durch 14-3-3 unter TLR-Stimulation nicht beeinflusst. Allerdings war die LPS induzierte Sekretion von IP-10 unter LPS-Stimulation bei durch R18 gehemmten 14-3-3 signifikant erhöht (Abbildung 23C). Einen gleichen Effekt von inhibiertem 14-3-3 unter LPS-Stimulation konnte in R18 exprimierenden Zellen auf die Sekretion des Chemokins RANTES beobachtet werden (Abbildung 23D).

Um die regulierende Aktivität von 14-3-3 auf die TLR-induzierte Zytokinsekretion auch in humanen Zellen zu bestätigen, wurden HEK293-Zellen mit 14-3-3, dem Inhibitor R18, oder einen leeren Kontrollvektor zusätzlich zu TLR2 oder TLR4 transient transfiziert. Es konnte bei TLR2- und TLR4-Stimulation eine erhöhte IL-8-Konzentration im Zellüberstand der 14-3-3 theta exprimierenden Zellen gemessen werden (Abbildung 24). 14-3-3-Hemmung durch Expression von R18 führte zu einer geringeren Sekretion des Zytokins IL-8. Beide Effekte waren allerdings nur bei TLR4-stimulierten Zellen signifikant.



**Abbildung 24: IL-8-Sekretion unter TLR-Stimulation.** Einfluss von 14-3-3 auf die IL-8-Sekretion in humanen HEK293-Zellen, transient transfiziert mit 14-3-3 theta Wildtyp, dem 14-3-3-Inhibitor R18, bzw. nicht transfizierte Zellen als Negativkontrolle. Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> (1 µg/ml) oder LPS (100 ng/ml) für 16 Stunden. Die Überstände wurden gesammelt und die Zytokinsekretion mit einem Beads-basierendem Zytokin-Assay für IL-8 gemessen. Die Ergebnisse sind als Gesamt-Zytokin-Konzentration von drei unabhängigen Versuchen ± Standardabweichung dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mit dem zweifachen ANOVA-Test ermittelt, ein  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) wurde als signifikant angesehen.

## 6 Diskussion

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden neue Interaktionspartner des IL-1/TLR-Signaltransduktionsweges identifiziert und umfassend funktionell charakterisiert. Eine wesentliche physiologische Funktion des angeborenen Immunsystems ist die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege durch IL-1- und Toll-like-Rezeptoren. In unterschiedlichen proteomischen Ansätzen wurden die Signalkomplexe und Protein-Protein-Interaktionen von TLR2, dessen Adapterprotein MyD88 und 14-3-3 theta unter TLR-Stimulation untersucht. Eine Analyse von Protein-Interaktionen ist aufgrund ihrer oft transienten Natur und Komplexität der beteiligten Partner schwierig. Die Massenspektrometrie schafft hier die Möglichkeit gleichzeitig so viele beteiligte Proteinen zu identifizieren (Gingras et al. 2005). Um mögliche unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden zur Validierung der Wechselwirkungen der identifizierten Proteine TRAF3IP3 und 14-3-3 im TLR-Signalweg umfangreiche Experimente zur funktionellen Charakterisierung durchgeführt.

Die Proteomik wird seit einiger Zeit zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen verwendet (Monti et al. 2007). Bisher wurden die Werkzeuge der Massenspektrometrie zur Analyse der TLR-Signalwege nur ansatzweise eingesetzt. So wurde von Weintz et al. das Phosphoproteom von TLR4-aktivierten Makrophagen analysiert (Weintz et al. 2010). Mit Hilfe der Massenspektrometrie wurden bei der Analyse des Tyrosin-Phosphoproteoms in zwei ähnlichen Versuchsansätzen BCAP-(L) als negativ regulierendes Protein und CsK als mögliche Regulierer der TLR4-induzierten Immunantwort nachgewiesen (Matsumura et al. 2010; Aki et al. 2005). Wie schon in der Einleitung erwähnt, hatte die Massenspektrometrie zur Identifikation von direkten Protein-Protein-Interaktionen im TLR-Signalweg wie TRAF3, TANK und RIP1 geführt (Brennan & Jefferies 2009).

### 6.1 Identifikation neuer Interaktionspartner von MyD88

Die Ergebnisse der Identifikation des MyD88-Proteinkomplexes der beiden unterschiedlichen massenspektrometrischen Methoden MALDI-TOF-MS und Nano-LC-ESI-MS ergaben eine gute Übereinstimmung. Da sich die Methoden in der Ionisierungstechnik und Detektion der Peptide unterscheiden, und mit keiner Methode alle Peptide der Probe gemessen werden können, ist eine vollständige Übereinstimmung in der Identifikation nicht möglich (Stapels et al. 2004). Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen Peptide, lassen sich z. B. hydrophobe Peptide besser mit ESI identifizieren, wohingegen MALDI mit einer höheren Wahrscheinlichkeit basische und aromatische Peptide ionisiert (Cech & Enke 2000; Krause et al. 1999). Bei einem direkten Vergleich der beiden Ionisierungstechniken MALDI und ESI werden nur 40 % der Peptide von beiden ionisiert (Yang et al. 2007). MALDI hat eine höhere Messgenauigkeit, ESI hat sich bei den moderneren Methoden der Proteom-Identifikationen allerdings durchgesetzt, nicht zuletzt wegen der Weiterentwicklung der Vorfraktionierungstechniken wie Nano-HPLC. Die Aufreinigung Strep-markierter Proteine, exprimiert in HEK293-Zellen, und die anschließende Identifikation der assoziierten Proteine konnte mittels MALDI-TOF-MS schon im Vorversuch mit einem bestimmten Kontrollplasmid erfolgreich demonstriert werden.

In dieser Arbeit wurde der Signal-induzierte Proteinkomplex des rekombinanten MyD88 über dessen Strep-Tag über Strep-Tactin-Säulen isoliert. Trotz stringenten Waschens wurden noch viele unspezifisch gebundene Proteine eluiert, was nach Auftrennen des Proteinkomplexes im SDS-PAGE und Färben der Proteinbanden deutlich wurde. Die hohe Komplexität der tryptisch verdauten Gelbanden hat im MALDI-TOF-Ansatz dazu geführt, dass weniger abundante Proteine, oder viele bereits bekannte Interaktionspartner von MyD88, nicht identifiziert wurden. Das Peptide Mass Fingerprinting hat hierbei nur die stärksten Signale der Spektren auswerten können. Das Problem der Identifikation von Proteinkomplexen in Signalwegen betrifft auch die schwachen und zeitlich sehr begrenzten Bindungen, die die Interaktionspartner in der Signaltransduktionskaskade eingehen (Ozbabacan et al. 2011). Es besteht Möglichkeit, transient Protein-Protein-Interaktionen

mit z. B. chemischen Methoden dauerhaft zu verknüpfen und dieses „Interaktom“ mit sogenannten „Cross-Linkern“ zu stabilisieren (Trakselis et al. 2005). Allerdings bringen diese Cross-Linking-Reagenzien wiederum auch Schwierigkeiten bei der Peptididentifikation mit der Massenspektrometrie mit sich (Sinz 2006). Eine Methode, die dieses Problem umgeht, ist z. B. Proteinkomplexe reversibel mit Formaldehyd zu vernetzen (Herzberg et al. 2007).

Im Gegensatz zum MyD88-Ansatz wurde mit TLR2 als „Bait-Protein“ mittels MALDI-TOF-MS einige bekannte Proteine des Signalweges wie TIRAP, IRAK4, IRAK2 und IRF7 identifiziert (Tabelle 4). Hierbei wurde allerdings sowohl ein anderer Tag verwendet, als auch der Proteinkomplex mit einer anderen Methode isoliert und aufgereinigt.

Mit der Verwendung der Nano-LC-ESI-MS konnte im weiteren Versuchsansatz übereinstimmend mit der Arbeit von Wang et al. im Komplex mit MyD88 verschiedene Proteine wie Tubulin und Hitzeschock-Proteine identifiziert werden (Wang, Gu, et al. 2005).

Das hierbei nachgewiesene Protein 14-3-3 epsilon, als Teil des MyD88-Proteinkomplexes, lässt neben der Identifikation von 14-3-3 theta als Teil des TLR2-Signalkomplexes den Schluss zu, dass noch mehr Mitglieder der 14-3-3 Proteinfamilie eine Rolle im TLR-Signaltransduktionsweg spielen könnten. Eine funktionelle Charakterisierung von 14-3-3 epsilon und anderer Isoformen könnte hier in Zukunft Klarheit schaffen.

In der oben erwähnten Arbeit von Wang et al. wurden mehrere Proteine identifiziert, die mit MyD88 unter LPS-Stimulation interagieren (Wang, Gu, et al. 2005). Hieraus wurden später die Proteine LRRFIP2 (*Leucine-rich repeat Fli-I-interacting protein 2*) und Flap-1 (*Fli-I LRR-associated protein 1*) im TLR4-Signalweg charakterisiert (Dai et al. 2009).

### 6.2 Identifikation von Interaktionspartner von TLR2

Hier wird eine Methode vorgestellt, mit der zum ersten Mal Proteine des TLR-Signalkomplexes mittels Massenspektrometrie identifiziert wurden. Bisher gab es eine Studie, in der die Massenspektrometrie dazu verwendet wurde, um für die Signalweiterleitung relevanten Phosphorylierungsstellen der TIR-Domäne von immunpräzipitiertem

TLR5 zu lokalisieren (Iverson et al. 2007). Weiter ist keine Studie bekannt, in der TLR direkt massenspektrometrisch untersucht wurden.

### **6.2.1 Identifikation von TRAF3IP3 als Interaktionspartner des TLR2-Signaltransduktionsweges**

TRAF3IP3 wurde als Teil TLR2-Protein-Signalkomplexes mit Hilfe der MALDI-TOF-MS und des *Peptide mass fingerprintings* als neuer Interaktionspartner des TLR-Signaltransduktionsweges nachgewiesen. TRAF3IP3 wurde ursprünglich als T3JAM (*TRAF3-interacting JNK-activating modulator*) beschrieben. Bisher ist von diesem Protein bekannt, dass es synergistisch mit TRAF3 die MAP-Kinase JNK, aber nicht NF- $\kappa$ B, aktiviert (Dadgostar et al. 2003). TRAF3 spielt im TLR-Signalweg sowohl bei der Aktivierung von TBK1-IKK $\epsilon$  in der TRIF-abhängigen Signaltransduktion eine Rolle (Oganesyan et al. 2006), als auch beim MyD88-abhängigen TLR9-Signalweg (Dadgostar et al. 2003). Mit myeloischen Zellen aus TRAF3-defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass TRAF3 essentiell für die Induktion von Interferon  $\alpha$  und dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 ist, aber entbehrlich für die Expression pro-inflammatorischer Zytokine (Häcker et al. 2006). Das Fehlen von TRAF3 beeinträchtigt die Transkription von Interferon  $\alpha$  nach Stimulation von TLR3, aber auch von TLR7 und TLR9. Im MyD88-abhängigen Signaltransduktionsweg wird TRAF3 nach TLR4-Stimulation degradiert. Dies führt zu einer Translokation des Membran-nahen MyD88-Signalkomplexes in das Zytoplasma, was zur Aktivierung von TAK1 führt (Tseng et al. 2010). TRAF3 fördert nicht nur die Produktion von Typ I Interferonen über IRF3, sondern hemmt auch im MyD88-abhängigen Signaltransduktionsweg die Aktivierung von MAPKs und NF- $\kappa$ B (Häcker et al. 2011). Die Identifikation von TRAF3IP3 unter TLR2-Stimulation könnte daher die Entdeckung eines neuen Regulatorproteins von TRAF3 im TLR-Signaling sein. TRAF3IP3 bindet über seine *Coiled-coil*-Domäne an die Isoleucin-Zipper-Domäne von TRAF3. Seine regulatorische Funktion von TRAF3IP3 auf den TLR-Signaltransduktionsweg wurde in dieser Arbeit eingehend charakterisiert.

Bei der Fluoreszenzfärbung von TRAF3IP3 zeigte sich unter Stimulation von TLR2 mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub> keine Rekrutierung von TRAF3IP3 an bestimmte Kompartimente oder zur

Zellmembran-ständigen TIR-Domäne von TLR2. Unter Stimulation wird der TLR2-Komplex internalisiert und wandert in Endolysosomale Kompartimente (Dietrich et al. 2010). Diese Wanderung wurde von fluoreszenz-gefärbtem TRAF3IP3 nicht beobachtet. Aber unabhängig von Stimulation ist TRAF3IP3 hauptsächlich an der Zellkernmembran lokalisiert. Daraus lässt sich schließen, dass TRAF3IP3 seine potentielle regulatorische Rolle im TLR-Signaltransduktionsweg dort ausübt.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse der Reportergenanalysen und der Durchflusszytometrie hat TRAF3IP3 keinen Einfluss auf die MAP-Kinase JNK und die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1. Wenn es gelingt, stabile Zellen mit TRAF3IP3 und seinen trunkierten Varianten zu generieren, bestünde potentiell die Möglichkeit, die Aktivierung der MAP-Kinasen besser zu detektieren. Da hier die wichtigsten TLR-abhängigen Transkriptionsfaktoren abgedeckt waren, wurde der Fokus auf die funktionelle Charakterisierung eines anderen identifizierten Interaktionspartners von TLR2, das Protein 14-3-3 theta, gelegt. Mittlerweile ist nach Abschluss der experimentellen Arbeiten zu TRAF3IP3 beschrieben worden, dass TLR2 auch die Expression von Interferonen induziert und dabei auch andere Transkriptionsfaktoren wie z. B. IRF3 und IRF7 aktiviert (Dietrich et al. 2010). Zusätzlich gibt es noch weitere Transkriptionsfaktoren, die durch TLR aktiviert werden können, wie z. B. ATF3 (*Activating transcription factor 3*) (Gilchrist et al. 2006), IRF4 (Negishi et al. 2005), IRF5 (Takaoka et al. 2005), XBP1 (*X-box binding protein 1*) (Martinon et al. 2010), LITAF (*LPS-induced TNF $\alpha$  factor*), STAT6 (*signal transducer and activator of transcription 6(B)*) (Tang et al. 2005), C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) und CREB (*cAMP response element (CRE)-binding protein*) (Hershko et al. 2002). Sinnvoll wäre, auch den Einfluss von TRAF3IP3 auf die TLR-induzierte Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen zu analysieren. Eine Hemmung von TRAF3IP3 durch RNA-Interferenz könnte weiteren Aufschluss auf dessen Rolle geben. Bisher ist auch noch keine Knock-out-Maus von TRAF3IP3 beschrieben worden.

In dieser Arbeit konnte die Rolle von TRAF3IP3 im TLR-Signaltransduktionsweg, sowie die Frage, inwieweit TRAF3IP3 das Protein TRAF3 unter TLR-Stimulation beeinflusst noch nicht vollständig geklärt werden. Eine spätere Identifikation von TRAF3IP3, das mit

MyD88 aus LPS-stimulierten RAW264.7-Zellen kopräzipitiert wurde, bestätigte unseren Nachweis von TRAF3IP3 im TLR-Signalkomplex. Es wäre äußerst interessant, TRAF3IP3 als Regulator des TLR-Signaltransduktionsweges weiter zu untersuchen und seine physiologische Rolle dort zu entschlüsseln.

### **6.3 Identifikation von 14-3-3 als Interaktionspartner der TLR-Signaltransduktionswege**

14-3-3 wurde als Interaktionspartner des TLR-Signaltransduktionsweges nachgewiesen und seine funktionelle Rolle in diesem Signalweg charakterisiert. In verschiedenen Ansätzen wurden die Signalkomplexe und dessen Protein-Protein-Interaktionen von TLR2 und des Adapterprotein MyD88 analysiert und dabei 14-3-3 theta bzw. 14-3-3 epsilon identifiziert.

Wie schon erwähnt ist von Xue et al. gezeigt worden, dass unter TLR2-Stimulation die 14-3-3-Proteine hochreguliert werden (Xu et al. 2000). In diesem Versuchsansatz wurde eine quantitative Methode der Proteomik verwendet, in der die Proteine in Zellkulturen mit isotopischen Aminosäuren metabolisch markiert wurden. Somit können, im Vergleich zu einem Kontrollansatz, über den Massenshift differentiell regulierte Protein ausfindig gemacht werden (Zhu et al. 2002). Es wurde angenommen, dass 14-3-3 in der inflammatorischen Signaltransduktion von TNF- $\alpha$  beteiligt ist und die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges ermöglicht (Bouwmeester et al. 2004). Diese Hypothese wurde mit der funktionellen Charakterisierung von 14-3-3 theta in dieser Arbeit diskutiert. Da 14-3-3-Proteine im Zusammenhang des TLR-Signalweges bisher kaum beschrieben wurden, wird an dieser Stelle kurz auf diese Proteinfamilie eingegangen.

14-3-3-Proteine bilden eine Familie von hoch konservierten regulatorischen Molekülen, die ubiquitär exprimiert werden. Sie spielen in den verschiedensten Signaltransduktionswegen eine Rolle. Es gibt sieben Isoformen ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\sigma$ ,  $\zeta$ ,  $\tau$ ,  $\eta$ ), die sieben verschiedene Genprodukte repräsentieren, sowie zwei kovalente modifizierte Formen ( $\alpha$ ,  $\delta$ ), die bei Menschen und Mäusen beschrieben wurden (Aitken, Howell, et al. 1995; Aitken, Jones, et

al. 1995). Der Name leitet sich aus der Fraktionierungsprobe der 14-3-3-Proteine einer DEAE-Zellulose-Chromatographie und der Migrationsposition in der 2-D-Gel-elektrophorese ab (Fu et al. 2000). 14-3-3-Proteine bilden Homo- und Heterodimere und interagieren mit einer Vielzahl an Signalproteinen, wie z. B. Kinasen und Transmembranrezeptoren. Sie sind an der Regulation von Metabolismus, Signaltransduktion, Zellzyklus-Kontrolle, Apoptose, Proteintransport, Transkription, Stressreaktion, aber auch maligner Transformation beteiligt (Darling et al. 2005; van Heusden 2009). Sie scheinen auch eine Rolle bei einer Reihe von Krankheiten zu spielen (Yang et al. 2006).

Zu den bekannten Interaktionspartnern von 14-3-3 gehören z. B. die Protein Kinase Raf-1 (Fantl et al. 1994), MEK-Kinasen (Widmann et al. 1998), Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Bonney-Bérard et al. 1995), die pro-apoptischen Proteine Bad und Bax aus der Bcl-2-Familie (Datta et al. 2000; Nomura et al. 2003) und die Protein Kinase C- $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ) (Oriente et al. 2005). Im direkten Zusammenhang mit TLR wurde 14-3-3 bisher noch nicht beschrieben. Faisal et al. haben lediglich die LPS-induzierte Bindung von 14-3-3 beta an PKC $\epsilon$  und Rekrutierung an TLR4, in Abhängigkeit des Adapters MyD88, beobachtet (Faisal et al. 2008). Allerdings sind Interaktionen von 14-3-3 auch mit anderen Proteinen des TLR-Signalweges wie PI3K, MEKK3, MEKK1, TBK1 und TAK1 bekannt (siehe unten).

Um die Ergebnisse der Identifikation der 14-3-3 Proteine mit der Massenspektrometrie zu validieren, wurde deren funktionelle Rolle im TLR-Signaltransduktionsweg intensiv charakterisiert. Mit Hilfe von dominant negativen Mutanten, 14-3-3-Inhibitoren und der Generierung von rekombinanten Fusionsproteinen konnte der funktionelle Stellenwert von 14-3-3 theta mit Hilfe von Immunpräzipitationen, Phosphorylierungs-Western Blots, Reporteranalysen, Apoptose-Assays und Messungen der proinflammatorischen Zytokinesekretion aufgeklärt werden.

In einem proteomischen Ansatz mit Präzipitation von 14-3-3 theta unter TLR-Stimulation konnten verschiedene daran gebundene 14-3-3-Isoformen nachgewiesen werden. Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass überexprimiertes 14-3-3 theta am ehesten Wechselbeziehungen mit anderen Isoformen der 14-3-3-Proteine eingehen (siehe

Tabelle 6). Diese Bildung von Homo- und Heterodimeren wurde bereits beschrieben (Jones et al. 1995). Diese Ergebnisse bestätigen die Daten von Jin et al., die in einem ähnlichen Versuchsansatz mit Hilfe der Massenspektrometrie 14-3-3-interagierende Proteine analysiert haben (Jin et al. 2004). Aber auch die anderen in Tabelle 6 aufgelisteten Interaktionspartner wurden, bis auf IRAK4, schon in früheren Untersuchungen massenspektrometrisch mit 14-3-3-assoziierten Proteinen bestätigt (Jin et al. 2004; Zuo et al. 2010). Dies spricht für die solide Methode der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels Isolierung von Protein-Komplexen mit der Affinitätschromatographie und anschließender massenspektrometrischer Identifikation.

Im gleichen Ansatz wurde IRAK4 im Proteinkomplex von 14-3-3 theta unter TLR-Stimulation beobachtet. In einer direkten Kopräzipitation von IRAK4 und 14-3-3 theta konnte allerdings keine physikalische Interaktion im Western Blot nachgewiesen werden. 14-3-3 Proteine sind an einer sehr großen Anzahl von Signalwegen beteiligt und gehen Bindungen mit sehr vielen unterschiedlichen Proteinen ein (Mhawech 2005). Daher ist die Wahrscheinlichkeit in einer Präzipitation von 14-3-3, selbst unter Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>, Moleküle des TLR-Signaltransduktionsweges nachzuweisen, vermutlich nicht sehr hoch. Umso interessanter ist die Tatsache, hier mit IRAK4 ein TLR-Signalmolekül im Proteinkomplex von 14-3-3 theta nachgewiesen zu haben. Die Kinase IRAK 4 ist wie oben schon beschrieben auch im Proteinkomplex von TLR2 zusammen mit IRAK2, IRF7 und TRAF3IP3 mittels MALDI-TOF-MS nachgewiesen worden (Tabelle 4).

Da man von 14-3-3-Proteinen weiß, dass sie Apoptose über differentielle Regulation des MAPK-Signaltransduktionsweges inhibieren (Xing et al. 2000), und TLR Apoptose auslösen können (Ruckdeschel et al. 2004), wurde der Zusammenhang zwischen 14-3-3-Proteinen und TLR-induzierter Apoptose untersucht. 14-3-3-Proteine hemmen Apoptose z. B. über Interaktion mit den pro-apoptotischen Proteinen BAD, Bax, FKHLR1 aber auch A20, ASK1 und MEKK1 (Datta et al. 2000; Nomura et al. 2003; Brunet et al. 1999; Zhang et al. 1999; Schlesinger et al. 2002). Die anti-apoptotische Eigenschaft zeigte Xing et al. durch die Verwendung der doppelt dominant negative Mutante R56/60A von 14-3-

3 theta, was die Bindung an Phosphoserin enthaltenden Peptiden verhindert (Thorson et al. 1998; Wang et al. 1998) und Apoptose ermöglicht (Xing et al. 2000).

Die in dieser Arbeit gemessene TLR-induzierte Apoptose wurde weder durch die Überexpression des Wildtyps von 14-3-3 theta, noch dessen dominant negativen Mutante R56/60A oder der Inhibierung der 14-3-3-Proteine über den exprimierten 14-3-3-Inhibitor R18 beeinflusst. Die Annahme, die TLR-induzierte Apoptose durch Blockierung von 14-3-3 zu erhöhen oder durch Überexpression von 14-3-3 theta zu verringern, hat sich nicht bestätigt. Apoptose ist eine wichtige schützende Immunantwort auf Pathogene (Srivastava et al. 2005). TLR induzieren Apoptose über FADD (*Fas-associated death domain protein*) und Caspase 8 (Aliprantis et al. 1999; Han et al. 2008). TLR2-rekrutiertes MyD88 kann mit seiner Death-Domäne (DD) mit der DD von FADD assoziieren, was Caspase 8 über dessen *Death Effector*-Domäne bindet. Aktivierte Caspase-8 aktiviert Caspase-3 und führt das apoptotische Programm aus (Salaun et al. 2007). Zusätzlich induziert die TLR2-Aktivierung die Generation von ROS (Reaktive Sauerstoffspezies) und die Aktivierung von ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) (Aliprantis et al. 1999). Da durch die Bindung von 14-3-3 eta an ASK1 Apoptose unterdrückt wird, hätte eine Hemmung der 14-3-3-Proteine eine höhere Verfügbarkeit von pro-apoptotischen ASK1-Molekülen auch damit auch eine erhöhte TLR2-induzierte Apoptose vermuten lassen. Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivierung der Apoptose über ASK1 im TLR-Signalweg keine große Rolle spielt, bzw. eine Manipulation dieses Signalweges mit dieser Methode der Apoptose-Detektion nicht messbar ist. Da weder 14-3-3 theta, noch deren dominant negativen Mutante oder der Inhibitor R18 einen Effekt auf die TLR induzierte Apoptose ausübt, kann daraus geschlossen werden, dass 14-3-3 auch den TLR2-Signalweg über FADD nicht reguliert. Endothelzellen begehen LPS-induzierter Apoptose abhängig von MyD88 über FADD und Caspase-8. In Makrophagen wie z. B. die hier verwendeten RAW264.7 wird die TLR4 abhängige Apoptose unabhängig von MyD88 über den Adapter TRIF induziert (Hsu et al. 2004). TRIF induziert Apoptose über RIP und FADD. Das erklärt den fehlenden Effekt von 14-3-3 bzw. dessen Hemmung auf TLR4 ausgelöste Apoptose.

Bis auf ASK1 spielen die bekannten Proteine, die von 14-3-3 reguliert werden, im TLR-induzierten Apoptose-Signalweg keine Rolle. Das Protein 14-3-3 scheint den Signalweg über FADD zu Caspase 8 nicht zu beeinflussen. Aufgrund der Ergebnisse in dieser Arbeit kann davon ausgegangen werden, dass 14-3-3 theta keine Rolle in der TLR induzierten Apoptose spielt.

Neben NF- $\kappa$ B und den IRFs aktivieren TLR auch den MAP-Kinase-Signalweg (Guha & Mackman 2001). Die Aktivierung der MAP-Kinasen erfolgt über ein dreistufiges hierarchisches System aus Protein-Phosphorylierungsprozessen, an deren Ende die der Induktion des Transkriptionsfaktors AP-1 steht. Je nach Aktivierung der MAP-Kinasen kommt es zur Phosphorylierung von c-Jun, c-Fos und ATF, Untereinheiten des AP-1-Komplexes, welcher die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine im Zellkern initiiert (Oeckinghaus et al. 2011).

In mehreren Studien wurde bereits die Regulation von MAP-Kinasen durch 14-3-3-Proteine bei unterschiedlichen Signalwegen beschrieben. So konnte in Fibroblasten durch Transfektion mit der Doppelmutante R56/60A von 14-3-3 zeta eine Hemmung der Serum-stimulierten Aktivierung von Erk1/2, aber eine gesteigerte Phosphorylierung von p38 erreicht werden (Xing et al. 2000). Durch Hitzestress wurde eine gesteigerte Aktivität von Erk1 durch 14-3-3 epsilon beobachtet (Wang et al. 2004). Allerdings kann man aufgrund der Ergebnisse davon ausgehen, dass 14-3-3 theta keinen Einfluss auf die TLR2- und TLR4-abhängigen Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 und p38 hat.

In der anschließenden Reportergergenanalysen konnte ein unterschiedlicher regulatorischer Effekt von 14-3-3 theta auf TLR2- und TLR4-induzierte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B beobachtet werden. Die Ergebnisse der Reportergergen-Analysen zur funktionellen Charakterisierung von 14-3-3 zeigten dessen inhibitorischen Effekt auf TLR2 induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Interessanterweise war die TLR4-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivität von 14-3-3 theta nicht gehemmt. Diesen unterschiedlichen Einfluss von 14-3-3 theta auf TLR2- und TLR4-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung deutet auf dessen Rolle in der Regulierung der TLR-Signaltransduktion. TLR2 und TLR4 können auf verschiedene Wege NF- $\kappa$ B aktivieren. Der am besten untersuchte Signaltransduktionsweg den TLR2 und TLR4

gemeinsam haben ist die MyD88-abhängige Signalkaskade, in der, wie beschrieben, der Reihe nach IRAK4 und IRAK1, TRAF6 und TAK1 aktiviert wird. Am Ende der Kaskade wird der I $\kappa$ B-Komplex phosphoryliert, der durch Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B freigibt und damit aktiviert. Es ist bekannt, dass 14-3-3-Proteine mit verschiedenen Proteinen dieser Signalkaskade interagieren. Matitau und Scheid haben gezeigt, dass Assoziation von 14-3-3 mit der Mitogen-aktivierten Protein Kinase Kinase Kinase 3 (MEKK3) unter Stimulation mit LPS und TNF $\alpha$  die NF- $\kappa$ B-Aktivität hemmt und dadurch ein wichtiger Weg darstellt, die Expression inflammatorische Zytokine zu kontrollieren (Matitau & Scheid 2008). MEKK3 ist ein essentieller Bestandteil des MyD88-IRAK-TRAF6-Komplexes im IL-1R- und TLR4-Signaltransduktionsweges (Huang et al. 2004). So führt z. B. ein Knockdown von MEKK3 in einer Makrophagen-Zelllinie zu einer beeinträchtigten LPS-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivität und Zytokinsynthese (Kim et al. 2007). Nach Di et al. wird die NF- $\kappa$ B-Aktivität durch die Assoziation von MEKK3 mit der TGF-beta-aktivierten Kinase 1 (TAK1) reguliert (Di et al. 2008). TAK1 führt unter TLR-Stimulation ebenfalls zur Aktivierung der MAP-Kinasen JNK und p38. Es wurde berichtet, dass die Isoform 14-3-3 eta die NF- $\kappa$ B-Aktivität nach Stimulation mit TNF $\alpha$  über die Interaktion mit den Proteine des TLR-Signalweges TAK1 oder TBK1 (*TANK-binding kinase*) unterschiedlich beeinflusst (Zuo et al. 2010). Dies entspricht der Identifikation von 14-3-3 eta in dieser Arbeit als Interaktionspartner von MyD88 und unterstreicht die gezeigte Rolle im TLR-Signalweg.

Eine weitere Möglichkeit der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch TLR ist der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Akt-Signalweg (Ojaniemi et al. 2003; Arbibe et al. 2000). In der Aktivierung dieses Weges unterscheiden sich die TLR. Im Gegensatz zu TLR2 ist im TLR4-Signalweg die Brückenfunktion des Adapters TIRAP zur Phosphorylierung von Akt, ein Zielprotein von PI3K, erforderlich (Kagan & Medzhitov 2006b). Es wurde gezeigt, dass die Aktivität von PI3K durch Interaktion mit 14-3-3 gehemmt werden kann (Bonney-Bérard et al. 1995). Die beobachtete Hemmung der TLR2-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivität in den beschriebenen Experimenten könnte auf die Regulierung von 14-3-3 theta verschiedener Proteine des TLR-Signaltransduktionsweges wie MEKK3, TAK1, TBK1 und PI3K

zurückzuführen sein. Vermutlich liegt die fehlende Hemmung der TLR4-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch 14-3-3 an dessen alternativen Signalweg über die Adapter TRAM/TRIF.

Die Protein Kinase C (PKC)-Familie könnte ein weiteres Ziel von 14-3-3 sein, die TLR-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivität zu kontrollieren. Verschiedene Mitglieder dieser Familie nehmen an der TLR-Signaltransduktion teil. So ist z. B. die Phosphorylierung von PKC $\epsilon$  und die Bindung an 14-3-3 beta für die TLR2- und TLR4-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung erforderlich (Faisal et al. 2008). Der TLR4-Adapter TRAM wurde als Substrat von PKC $\epsilon$  identifiziert, seine Phosphorylierung reguliert die Expression des Chemokins RANTES über die Aktivierung von IRF3 (McGettrick et al. 2006).

Hier wurde eingehend auf die unterschiedlichsten Signalmoleküle des TLR-Signaling eingegangen, die durch Wechselwirkung mit 14-3-3 die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B beeinflussen können. Der unterschiedliche Einfluss von 14-3-3 auf die NF- $\kappa$ B-Aktivität unter Stimulation von TLR 2 und TLR4 könnte darauf zurückzuführen sein, das 14-3-3 diese Signalwege unterschiedlich an verschiedenen Stellen regulieren.

Eine Regulation von NF- $\kappa$ B wirkt sich unter anderem auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine aus. Die TLR-induzierte Transkriptionsrate der Zytokingene wird von bestimmten Interaktionen von NF- $\kappa$ B mit anderen aktivierten Transkriptionsfaktoren wie z. B. AP-1 bestimmt (Blackwell & Christman 1997; Oeckinghaus et al. 2011).

Die differierende regulatorische Rolle von 14-3-3 auf verschiedene TLR-Signalwege ließ sich in der Bestimmung der Sekretion bestimmter Zytokine bestätigen. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass 14-3-3 theta und wahrscheinlich auch andere 14-3-3-Isoformen die Expression verschiedener Zytokine unterschiedlich regulieren.

Im Gegensatz zu den Reporteragen-Assays zur Untersuchung des Einflusses von 14-3-3 auf die TLR-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in HEK293-Zellen, wurden zur Analyse der TLR-induzierten Zytokinsekretion stabil transfizierte RAW264.7-Zellen verwendet.

Es hat sich heraus gestellt, dass die Überexpression von 14-3-3 theta unter Stimulation von TLR2, TLR4 und TLR9 die Sekretion von TNF $\alpha$  erhöhte, von IL-6 dagegen vermin-

derte. Dies unterstützt die Annahme der ambivalenten Rolle von 14-3-3 im TLR-Signaltransduktionsweg. Nach der unterschiedlichen NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch 14-3-3 theta unter TLR2- und TLR4-Stimulation war die Ähnlichkeit der TLR-induzierten Zytokinsekretion überraschend. Zusätzlich zu TLR2 und TLR4 wurde für das Experiment der Toll-like-Rezeptor TLR9 gewählt, weil er als ein im Endosom lokalisierter Rezeptor einen weiteren unterschiedlichen TLR-Signaltransduktionsweg repräsentiert. TLR2, TLR4 und TLR9 haben auf die Überexpression von 14-3-3 theta bzw. dessen Hemmung durch R18 in der Zytokinproduktion von TNF $\alpha$  und IL-6 gleich reagiert. Beide Zytokine werden abhängig von NF- $\kappa$ B transkribiert (Zhang et al. 2008). Die spezifische und zeitliche Steuerung der Zytokinproduktion als Antwort auf TLR-Stimuli werden wahrscheinlich durch komplexe Interaktionen von NF- $\kappa$ B mit einer Vielzahl von NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen und einer Reihe anderer Transkriptionsfaktoren und anderen NF- $\kappa$ B-unabhängigen Faktoren bestimmt (Blackwell & Christman 1997). In Makrophagen z. B. wird die Transkription von IL-6 und TNF $\alpha$  auch vom Transkriptionsfaktor IRF5 induziert (Takaoka et al. 2005). Die TNF $\alpha$ -Transkription wird auch durch den Transkriptionsfaktor LITAF (*LPS-induced TNF $\alpha$  factor*) im Komplex mit STAT6 (*signal transducer and activator of transcription 6(B)*) reguliert (X. Tang et al. 2005). Die transkriptionelle Regulation des IL-6-Gens ist recht komplex und enthält mindestens vier verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z. B. NF- $\kappa$ B, AP-1, C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) und CREB (*cAMP response element (CRE)-binding protein*) (Hershko et al. 2002). Hoshino et al. haben gezeigt, dass all diese vier genannten Transkriptionsfaktoren für die TLR4-induzierte IL-6-Produktion durch das HIV-1 akzessorische Protein Vpr erforderlich sind (Hoshino et al. 2010).

Es werden weitere Versuche zu Transkriptionsfaktor-Aktivierung nötig sein, um genau zu klären, welche der genannten Transkriptionsfaktoren im TLR-Signalweg durch 14-3-3 reguliert werden.

Im Allgemeinen hängt die Zytokinsekretion von der transkriptionellen Regulation, der posttranslationalen Modifikation, Proteinstabilität und der Art der Sekretion ab. So wurde z. B. gezeigt, dass die Stimulation von Makrophagen die Transkriptionsrate von TNF $\alpha$  um das 5- bis 50-fache erhöht, die Leistungsfähigkeit allerdings um das 100-fache ange-

stiegen ist (Jongeneel 1994). Im Gegensatz dazu hängt die Endotoxin-induzierte IL-6-Produktion in Makrophagen hauptsächlich von einer erhöhten Transkription des IL-6-Gens und der RNA-Prozessierung ab (Tang et al. 1998). Zusätzlich ist bekannt, dass Signaltransduktionswege nicht nur für die Stabilisierung der mRNAs der Zytokine relevant sind, sondern auch für den korrekten Transport der proinflammatorischen Zytokine (Dumitru et al. 2000).

Die erhöhte Chemokinsekretion von IP-10 und RANTES bei Hemmung der 14-3-3-Proteine durch R18 unter TLR4-Stimulation weist auf eine negative regulatorische Rolle von 14-3-3 im TLR4-Signalweg hin. Der TLR-Adapter TRAM wird wie beschrieben von PKC $\epsilon$  phosphoryliert und reguliert damit die TLR4-abhängige RANTES-Transkription über IRF3-Aktivierung (McGettrick et al. 2006). IRF3, verwandt mit IRF7, und NF- $\kappa$ B sollen zusammen für die Transkription von RANTES und IP-10 auf Antwort von TLR3- und TLR4-Stimulierung erforderlich zu sein (Genin et al. 2000; Sundstrom et al. 2001). Wie vorher schon erwähnt, scheint die Regulierung von PKC $\epsilon$  durch 14-3-3 die Expression der IRF3-abhängigen Gene IP-10 und RANTES zu vermindern.

Beim Messen der IL-8-Konzentration im Überstand der transient transfizierten HEK293 konnte auch hier ein deutlicher Einfluss von 14-3-3 theta auf die Zytokinsekretion beobachtet werden. Interessanterweise zeigte sich ein vergleichbares Profil wie die Produktion von TNF $\alpha$ . Allerdings war die erhöhte Zytokinsekretion unter Einfluss von 14-3-3 theta von TNF $\alpha$  nur unter Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CysSK<sub>4</sub>, bzw. von IL-8 in Gegenwart von LPS signifikant. Zusammen mit der gehemmten IL-8-Sekretion durch Inhibition von 14-3-3 lassen diese Ergebnisse auf eine positive regulatorische Funktion von 14-3-3 theta schließen. 14-3-3 hat einen ähnlichen Effekt auf die Sekretion von IL-8 und TNF $\alpha$ . Deren Transkription wird allerdings unterschiedlich reguliert. Der humane IL-8 Promotor enthält Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B, NF-IL-6, sowie AP-1 (Aihara et al. 1997). Der Transkriptionsfaktor NF-IL-6 aktiviert, synergistisch zusammen mit NF- $\kappa$ B, dagegen die Transkription von IL-6 und IL-8 (Matsusaka et al. 1993).

Abschließend soll festgehalten werden, dass 14-3-3 theta im TLR-Signaltransduktionsweg eine wichtige regulatorische Funktion auf die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine

ausübt und diese unter Stimulation von TLR2 im Vergleich zur TLR4-Stimulation unterschiedlich hoch- bzw. runterreguliert werden. Mit dem momentanen Kenntnisstand lässt sich nicht eindeutig beantworten, welche für die TLR-induzierte Zytokinexpression verantwortlichen Transkriptionsfaktoren noch außer NF- $\kappa$ B von 14-3-3 direkt oder indirekt reguliert werden. Diese Frage kann in weiterführenden Untersuchungen in möglichen Genreporteranalysen oder spezifische Transkriptionsfaktor-Inhibitoren geklärt werden.

Die bei der funktionellen Charakterisierung von 14-3-3 theta aufgedeckten ambivalenten Rolle im TLR-Signalweg, ist ein Merkmal, das einen besonderen Stellenwert in Signalkaskaden einnimmt. So ist von LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*) bekannt, dass das Protein im RIG-1-vermittelten angeborenen Immunantwort entweder positiv oder negativ reguliert (Chopy et al. 2011). Es gibt Proteine wie das SHIP (*Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1*), welches den MyD88-unabhängigen TLR-Signalweg positiv reguliert, Proliferation und Differenzierung und dagegen negativ reguliert (Antigiano et al. 2010). Strassheim et al. zeigten in Neutrophilen Granulozyten, dass SHIP bei der TLR2-induzierten Sekretion der Zytokine und Chemokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 und MIP-2 eine negativ regulatorische Rolle spielt (Strassheim et al. 2005). Ebenso kann der NOD2-Signalweg die TLR-Antwort positiv und negativ regulieren (Watanabe et al. 2005). Die MAPK Kinase Kinase, MEKK1, besitzt eine E3 Ligase-Aktivität und ist für die Ubiquitinierung und Degradierung von Erk1/2 verantwortlich, ist daher ein positiver und negativer Regulierer des TLR-induzierten Erk-Signalweges (Lu et al. 2002). Da 14-3-3 die TLR-Signalwege auf der einen Seite unterstützt und auf der anderen Seite hemmt, gehört es zu den wenigen Proteinen die im TLR-Signaltransduktionsweg eine positive und negative Rolle spielt.

Unter den beiden im TLR-Komplex nachgewiesenen 14-3-3-Proteinen haben sich die nachfolgenden Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung in diesem Signalweg auf 14-3-3 theta konzentriert. Es wäre interessant auch das identifizierte Protein 14-3-3 epsilon, sowie die anderen Isoformen der 14-3-3-Familie in der TLR-Kaskade zu analysieren und zu charakterisieren.

Anhand der unterschiedlichen NF- $\kappa$ B-Aktivierung und der unterschiedlichen Regulation der TLR-induzierten Zytokinexpression durch 14-3-3 lässt sich sehr wahrscheinlich auf Unterschiede in der TLR-Aktivierung und der beteiligten Komponenten in der Signalkaskade zurückführen. Es wäre interessant die Rolle der anderen Mitglieder der 14-3-3-Familie im TLR-Signaltransduktionsweg zu untersuchen. Studien mit Knockout-Mäusen für jede einzelne 14-3-3-Isoform könnten zur Klärung dieser Fragen beitragen. Arbeiten 14-3-3-defizienten Maus-Mutanten liegen vor für die Isoform 14-3-3 gamma, ohne ersichtliche Veränderung des Phänotyps (Steinacker et al. 2005). Die 14-3-3 sigma  $-/-$  Zellen sind nicht überlebensfähig (Chan et al. 1999) und Knock-out-Mäuse mit fehlender Expression von 14-3-3 epsilon zeigen Defekte in der Entwicklung des Gehirns und neuronalen Migration (Toyo-oka et al. 2003). Möglich wäre ein Knock-down mit RNA-Interferenz (RNAi). Weitreichende Untersuchungen zur Rolle der 14-3-3-Isoformen in den Signalwegen der verschiedenen TLR, besonders in der Zytokinregulation, könnten zu einem besseren Verständnis der Funktion von 14-3-3-Proteinen im TLR-Signaling führen.

Dieser Beitrag zum Verständnis der TLR ausgelösten Signalkaskade könnte eventuell ein Ziel zur Erforschung von Autoimmunerkrankungen sein und mögliche Kandidaten pharmakologischer Ansatzpunkte sein.

Die durchgeführte funktionellen Charakterisierung von 14-3-3 theta im TLR-Signalweg mit den gewonnenen Kenntnissen aus der NF- $\kappa$ B-Genreporteranalyse, der Untersuchungen der TLR-induzierten Apoptose, der Aktivierung der MAP-Kinasen und der Sekretion der verschiedenen pro-inflammatorischen Zytokine und Chemokine lassen zusammengekommen den Schluss zu, dass 14-3-3 theta eine wichtige regulatorische Funktion in der angeborenen Immunantwort ausübt.

## 7 Zusammenfassung

In der Aktivierung des angeborenen Immunsystems nehmen die Toll-like-Rezeptoren eine zentrale Rolle ein, indem sie Krankheitserreger an bestimmten konservierten Molekülstrukturen erkennen und eine Immunantwort auslösen. Das Engagement der verschiedenen TLR führt über mehrere Signaltransduktionskaskaden zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine und zur Hochregulation kostimulatorischer Moleküle. In dieser Arbeit wurden mittels Immunpräzipitation und Affinitätschromatographie in Kombination mit massenspektrometrischen Methoden neue Interaktionspartner dieser Signalwege identifiziert und umfassend funktionell charakterisiert. Damit wurde ein wichtiger Beitrag zum besseren Verständnis der TLR-induzierten Immunantwort geleistet.

Es ist gelungen, den Tag-markierten Toll-like Rezeptor 2 unter Stimulation als Signalproteinkomplex zu isolieren und zusammen mit bereits bekannten daran beteiligten Proteinen TRAF3IP3 als neuen potentiellen Interaktionspartner mittels MALDI-TOF-MS zu identifizieren. Trotz der Untersuchung der Funktion von TRAF3IP3 mittels Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie und Reporteranalysen konnte die Frage nach der Rolle von TRAF3IP3 im TLR-Signalweg noch nicht eindeutig beantwortet werden.

Als neues wichtiges regulatorisches Protein in der TLR-Signaltransduktion wurde 14-3-3 im Komplex mit TLR2 und MyD88 in unabhängigen Experimenten nachgewiesen und dessen Funktion aufgeklärt. Mit Hilfe von Doppelmutanten und Inhibitoren von 14-3-3 konnte bemerkenswerterweise dessen positiver, bzw. negativer regulatorischer Effekt auf verschiedene TLR beobachtet werden. So hat sich gezeigt, dass 14-3-3 theta die TLR2-aktivierte NF- $\kappa$ B-Aktivität hemmt, allerdings unter TLR4-Stimulation erhöht. Der Einfluss von 14-3-3 wird durch den unterschiedlich positiven bzw. negativen Effekt auf die Sekretion der Zytokine und Chemokine TNF $\alpha$ , IL-6, IP-10, RANTES und IL-8 deutlich.

Die verschiedenen möglichen Stellen im TLR-Signalweg, die direkt von 14-3-3 reguliert werden können, wurden diskutiert.

## 8 Summary

The Toll-like receptors play a central role in the activation of the innate immune system by recognizing specific pathogen-associated molecular patterns and triggering an immune response. The engagement of different TLRs induces the secretion of several pro-inflammatory cytokines and the upregulation of co-stimulatory molecules via several signaling transduction pathways. In this study, using immunoprecipitation and affinity chromatography combined with mass spectrometry novel interaction partners of these signaling pathways were identified and functionally characterized in detail. This provides a better understanding of the TLR-induced immune response.

We succeeded in isolation the signaling complex of the tag-labeled TLR2 upon stimulation. Thereby we detected TRAF3IP3 as a potential new interacting partner together with already known associated proteins by using MALDI-TOF-MS. Despite the functional analysis of TRAF3IP3 by fluorescence microscopy, flow cytometry and reporter gene analysis, the issue of the role of TRAF3IP3 in TLR signaling could still not be answered conclusively.

The protein 14-3-3 was identified as an important new regulatory protein in complex with TLR2 and MyD88 in separate experiments. His role was functionally characterized. The remarkably varying regulatory effect on different TLRs could be observed using double mutants and inhibitors of 14-3-3. It has been shown that 14-3-3 theta inhibits the TLR2-activated NF- $\kappa$  B activity, but is increased upon stimulation of TLR4. The different positive or negative effect of 14-3-3 on the secretion of the cytokines and chemokines TNF, IL-6, IP-10, RANTES and IL-8 demonstrates its great impact on TLR signaling.

The various possible locations in the TLR signaling pathway, which can be directly regulated by 14-3-3, were discussed.

## 9 Literaturverzeichnis

Acuner Ozbabacan, S.E. et al., 2011. Transient protein–protein interactions. *Protein Engineering Design and Selection*, 24(9), pp.635–648.

Ahmad-Nejad, P. et al., 2002. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *European Journal of Immunology*, 32(7), pp.1958–1968.

Aihara, M. et al., 1997. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infection and Immunity*, 65(8), pp.3218–3224.

Aitken, A, Howell, S., et al., 1995. 14-3-3 alpha and delta are the phosphorylated forms of raf-activating 14-3-3 beta and zeta. In vivo stoichiometric phosphorylation in brain at a Ser-Pro-Glu-Lys MOTIF. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(11), pp.5706–5709.

Aitken, A, Jones, D., et al., 1995. 14-3-3 proteins: biological function and domain structure. *Biochemical Society Transactions*, 23(3), pp.605–611.

Aki, D. et al., 2005. Modulation of TLR signalling by the C-terminal Src kinase (Csk) in macrophages. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 10(4), pp.357–368.

Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, Osamu, 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), pp.783–801.

Alexopoulou, L. et al., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857), pp.732–738.

Aliprantis, A.O. et al., 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science (New York, N. Y.)*, 285(5428), pp.736–739.

Anderson, K.V., 2000. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Current Opinion in Immunology*, 12(1), pp.13–19.

Anderson, K.V., Jürgens, G. & Nüsslein-Volhard, C., 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell*, 42(3), pp.779–789.

Antignano, F. et al., 2010. SHIP negatively regulates Flt3L-derived dendritic cell generation and positively regulates MyD88-independent TLR-induced maturation. *Journal of*

*Leukocyte Biology*, 88(5), pp.925 –935.

Aravalli, R.N. et al., 2005. Cutting edge: TLR2-mediated proinflammatory cytokine and chemokine production by microglial cells in response to herpes simplex virus. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(7), pp.4189–4193.

Arbibe, L. et al., 2000. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nature Immunology*, 1(6), pp.533–540.

Asea, A., 2008. Heat shock proteins and toll-like receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (183), pp.111–127.

Baetz, A. et al., 2004. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins indirectly regulate toll-like receptor signaling in innate immune cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(52), pp.54708–54715.

Baltruschat, S., 2009. *Untersuchung hochmolekularer Proteinkomplexe in menschlichen Leukämien mittels Proteomics Werkzeugen*. Frankfurt am Main,: Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Goethe-Universität. Available at: <http://publikationen.ub.uni-frankfurt.de/frontdoor/index/index/docId/7372>.

Banchereau, J. & Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), pp.245–252.

Bas, S., James, R.W. & Gabay, C., 2010. Serum lipoproteins attenuate macrophage activation and Toll-Like Receptor stimulation by bacterial lipoproteins. *BMC Immunology*, 11, p.46.

Beutler, B., 2004. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, 430(6996), pp.257–263.

Bhoj, V.G. & Chen, Z.J., 2009. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature*, 458(7237), pp.430–437.

Bieback, K. et al., 2002. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *Journal of Virology*, 76(17), pp.8729–8736.

Bienvenut, W.V. et al., 2002. Matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem mass spectrometry with high resolution and sensitivity for identification and characterization of proteins. *Proteomics*, 2(7), pp.868–876.

Blackwell, T.S. & Christman, J.W., 1997. The Role of Nuclear Factor-kappa B in Cytokine Gene Regulation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 17(1), pp.3–9.

- Bonnefoy-Bérard, N. et al., 1995. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by association with 14-3-3 proteins in T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(22), pp.10142–10146.
- Bouwmeester, T. et al., 2004. A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nature Cell Biology*, 6(2), pp.97–105.
- Bowie, A. & O’Neill, L., 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology*, 67(4), pp.508–514.
- Brennan, K. & Jefferies, C.A., 2009. Proteomic analysis of protein complexes in Toll-like receptor biology. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 517, pp.91–104.
- Brightbill, H.D. et al., 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5428), pp.732–736.
- Brizzard, B., 2008. Epitope tagging. *BioTechniques*, 44(5), pp.693–695.
- Brown, J. et al., 2011. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *Journal of Dental Research*, 90(4), pp.417–427.
- Brunet, A. et al., 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96(6), pp.857–868.
- Buchholz, B.M. & Bauer, A.J., 2010. Membrane TLR Signaling Mechanisms in the Gastrointestinal Tract during Sepsis. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 22(3), pp.232–245.
- Campos, M.A. et al., 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 167(1), pp.416–423.
- Cech, N.B. & Enke, C.G., 2000. Relating electrospray ionization response to nonpolar character of small peptides. *Analytical Chemistry*, 72(13), pp.2717–2723.
- Ceciliani, F., Giordano, A. & Spagnolo, V., 2002. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein and Peptide Letters*, 9(3), pp.211–223.
- Cell Signal Technology Inc., 2010. Toll-like Receptor Signaling. Available at: <http://www.cellsignal.com/pathways/nk-kappab-signaling.jsp> [Accessed March 2, 2012].
- Chan, T.A. et al., 1999. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, 401(6753), pp.616–620.

- Chopy, D. et al., 2011. Ambivalent Role of the Innate Immune Response in Rabies Virus Pathogenesis. *Journal of Virology*, 85(13), pp.6657–6668.
- Chow, J.C. et al., 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(16), pp.10689–10692.
- Christian Widmann et al., 1998. 14-3-3 Proteins Interact with Specific MEK Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 273(6), pp.3476–3483.
- Chun, K.-R. et al., 2009. Suppression of the lipopolysaccharide-induced expression of MARCKS-related protein (MRP) affects transmigration in activated RAW264.7 cells. *Cellular Immunology*, 256(1-2), pp.92–98.
- Coll, R.C. & O'Neill, L.A.J., 2010. New insights into the regulation of signalling by toll-like receptors and nod-like receptors. *Journal of Innate Immunity*, 2(5), pp.406–421.
- Collins, S.E., Noyce, R.S. & Mossman, K.L., 2004. Innate cellular response to virus particle entry requires IRF3 but not virus replication. *Journal of Virology*, 78(4), pp.1706–1717.
- Colonna, M., 2007. TLR pathways and IFN-regulatory factors: to each its own. *European Journal of Immunology*, 37(2), pp.306–309.
- Compton, T. et al., 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *Journal of Virology*, 77(8), pp.4588–4596.
- Cooper, M.D. & Alder, M.N., 2006. The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, 124(4), pp.815–822.
- Cusson-Hermance, N. et al., 2005. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- $\kappa$ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(44), pp.36560–36566.
- Dadgostar, H. et al., 2003. T3JAM, a novel protein that specifically interacts with TRAF3 and promotes the activation of JNK(1). *FEBS Letters*, 553(3), pp.403–407.
- Dai, P. et al., 2009. Modulation of TLR Signaling by Multiple MyD88-Interacting Partners Including Leucine-Rich Repeat Fli-I-Interacting Proteins. *J Immunol*, 182(6), pp.3450–3460.
- Darling, D.L., Yingling, J. & Wynshaw-Boris, A., 2005. Role of 14-3-3 proteins in eukaryotic signaling and development. *Current Topics in Developmental Biology*, 68, pp.281–315.
- Datta, S.R. et al., 2000. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Molecular Cell*, 6(1), pp.41–51.

- Deng, L. et al., 2000. Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, 103(2), pp.351–361.
- Di, Y. et al., 2008. Homeostatic interactions between MEKK3 and TAK1 involved in NF- $\kappa$ B signaling. *Cellular Signalling*, 20(4), pp.705–713.
- Diebold, S.S. et al., 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), pp.1529–1531.
- Dietrich, N. et al., 2010. Murine Toll-Like Receptor 2 Activation Induces Type I Interferon Responses from Endolysosomal Compartments. *PLoS ONE*, 5(4), p.e10250.
- Dong, S. et al., 2007. 14-3-3 Integrates prosurvival signals mediated by the AKT and MAPK pathways in ZNF198-FGFR1-transformed hematopoietic cells. *Blood*, 110(1), pp.360–369.
- Drexler, S.K. & Foxwell, B.M., 2010. The role of toll-like receptors in chronic inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(4), pp.506–518.
- Dumitru, C.D. et al., 2000. TNF- $\alpha$  Induction by LPS Is Regulated Posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-Dependent Pathway. *Cell*, 103(7), pp.1071–1083.
- Erridge, C. et al., 2004. Lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*, *Chlamydia trachomatis* and *Pseudomonas aeruginosa* signal via Toll-like receptor 2. *J Med Microbiol*, 53(8), pp.735–740.
- Ewald, S.E. et al., 2008. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature*, 456(7222), pp.658–662.
- Faisal, A. et al., 2008. The Scaffold MyD88 Acts to Couple Protein Kinase C $\epsilon$  to Toll-like Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 283(27), pp.18591–18600.
- Fantl, W.J. et al., 1994. Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature*, 371(6498), pp.612–614.
- Fenn, J.B. et al., 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4926), pp.64–71.
- Fenyő, D. & Beavis, R.C., 2003. A method for assessing the statistical significance of mass spectrometry-based protein identifications using general scoring schemes. *Analytical Chemistry*, 75(4), pp.768–774.
- Franchimont, D. et al., 2004. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with

- Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*, 53(7), pp.987–992.
- Frank, M.M. & Fries, L.F., 1991. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunology Today*, 12(9), pp.322–326.
- Fraser, I.P., Koziel, H. & Ezekowitz, R.A., 1998. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Seminars in Immunology*, 10(5), pp.363–372.
- Fu, Haian, Subramanian, R.R. & Masters, S.C., 2000. 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 40(1), pp.617–647.
- Galdiero, M. et al., 2004. Haemophilus influenzae porin induces Toll-like receptor 2-mediated cytokine production in human monocytes and mouse macrophages. *Infection and Immunity*, 72(2), pp.1204–1209.
- Gavin, A.-C. et al., 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 415(6868), pp.141–147.
- Gay, N.J. & Gangloff, M., 2007. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annual Review of Biochemistry*, 76, pp.141–165.
- Gay, N.J., Gangloff, M. & Weber, A.N.R., 2006. Toll-like receptors as molecular switches. *Nature Reviews. Immunology*, 6(9), pp.693–698.
- Genin, P. et al., 2000. Regulation of RANTES Chemokine Gene Expression Requires Cooperativity Between NF- $\kappa$ B and IFN-Regulatory Factor Transcription Factors. *The Journal of Immunology*, 164(10), pp.5352–5361.
- Geuking, M.B. et al., 2011. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity*, 34(5), pp.794–806.
- Gilchrist, M. et al., 2006. Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature*, 441(7090), pp.173–178.
- Girard, R. et al., 2003. Lipopolysaccharides from Legionella and Rhizobium stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 2), pp.293–302.
- Gorden, K.B. et al., 2005. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(3), pp.1259–1268.
- Govindaraj, R.G. et al., 2010. Molecular Modeling-Based Evaluation of hTLR10 and Identification of Potential Ligands in Toll-Like Receptor Signaling. , 5(9).

Grabiec, A. et al., 2004. Human but not murine toll-like receptor 2 discriminates between tri-palmitoylated and tri-lauroylated peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(46), pp.48004–48012.

Guan, Y. et al., 2010. Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(9), pp.5094–5103.

Guha, M. & Mackman, N., 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling*, 13(2), pp.85–94.

Häcker, H. et al., 2006. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature*, 439(7073), pp.204–207.

Häcker, H. & Karin, M., 2006. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2006(357), p.re13.

Häcker, H., Tseng, P.-H. & Karin, M., 2011. Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. *Nat Rev Immunol*, 11(7), pp.457–468.

Han, J.Y. et al., 2008. C-jun N-terminal kinase regulates the interaction between 14-3-3 and Bad in ethanol-induced cell death. *Journal of Neuroscience Research*, 86(14), pp.3221–3229.

Hasan, U. et al., 2005. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(5), pp.2942–2950.

Hawn, T.R. et al., 2003. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(10), pp.1563–1572.

Hayashi, F. et al., 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832), pp.1099–1103.

Hazeki, K., Nigorikawa, K. & Hazeki, O., 2007. Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30(9), pp.1617–1623.

Heil, F. et al., 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), pp.1526–1529.

Hemmi, H et al., 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813), pp.740–745.

Hemmi, Hiroaki et al., 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the

- TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunology*, 3(2), pp.196–200.
- Henzel, W.J. et al., 1989. The primary structure of a protein carboxyl methyltransferase from bovine brain that selectively methylates L-isoaspartyl sites. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(27), pp.15905–15911.
- Hershko, D.D. et al., 2002. Multiple transcription factors regulating the IL-6 gene are activated by cAMP in cultured Caco-2 cells. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283(5), p.R1140 –R1148.
- Herzberg, C. et al., 2007. SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions in vivo. *Proteomics*, 7(22), pp.4032–4035.
- van Heusden, G.P.H., 2009. 14-3-3 Proteins: insights from genome-wide studies in yeast. *Genomics*, 94(5), pp.287–293.
- Hirschfeld, M. et al., 2001. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infection and Immunity*, 69(3), pp.1477–1482.
- Hofer-Warbinek, R. et al., 2004. A highly conserved proapoptotic gene, IKIP, located next to the APAF1 gene locus, is regulated by p53. *Cell Death and Differentiation*, 11(12), pp.1317–1325.
- Honda, K. et al., 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, 434(7034), pp.772–777.
- Honda, K. et al., 2004. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(43), pp.15416 –15421.
- Hoshino, S. et al., 2010. HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *Journal of Leukocyte Biology*, 87(6), pp.1133 –1143.
- Hsu, L.-C. et al., 2004. The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature*, 428(6980), pp.341–345.
- Hu, Q. et al., 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 40(4), pp.430–443.
- Huang, Q. et al., 2004. Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3. *Nature Immunology*, 5(1), pp.98–103.
- IBA GmbH, 2010. IBA: Protein Tools. Available at: <http://www.iba->

go.com/prottools/index.php?prot\_p\_ppi-meth.html [Accessed March 2, 2012].

Iverson, S.M. et al., 2007. A phosphorylation site in the Toll-like receptor 5 TIR domain is required for inflammatory signalling in response to flagellin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(4), pp.936–941.

Janeway, Charles A & Medzhitov, Ruslan, 2002. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20, pp.197–216.

Janssens, S. et al., 2003. MyD88S, a splice variant of MyD88, differentially modulates NF-kappaB- and AP-1-dependent gene expression. *FEBS Letters*, 548(1-3), pp.103–107.

Jin, J. et al., 2004. Proteomic, Functional, and Domain-Based Analysis of In Vivo 14-3-3 Binding Proteins Involved in Cytoskeletal Regulation and Cellular Organization. *Current Biology*, 14(16), pp.1436–1450.

Jin, M.S. et al., 2007. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*, 130(6), pp.1071–1082.

Jones, D.H., Ley, S. & Aitken, Alastair, 1995. Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS Letters*, 368(1), pp.55–58.

Jongeneel, C.V., 1994. Regulation of the TNF alpha gene. *Progress in Clinical and Biological Research*, 388, pp.367–381.

Junttila, M.R. et al., 2005. Single-step Strep-tag purification for the isolation and identification of protein complexes from mammalian cells. *Proteomics*, 5(5), pp.1199–1203.

Kagan, J.C. et al., 2008. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-[beta]. *Nat Immunol*, 9(4), pp.361–368.

Kagan, J.C. & Medzhitov, Ruslan, 2006a. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*, 125(5), pp.943–955.

Kagan, J.C. & Medzhitov, Ruslan, 2006b. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*, 125(5), pp.943–955.

Karas, M. & Hillenkamp, F., 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60(20), pp.2299–2301.

Kavoosi, G. et al., 2010. Leishmania major lipophosphoglycan: discrepancy in Toll-like receptor signaling. *Experimental Parasitology*, 124(2), pp.214–218.

Kawai, T. & Akira, S., 2006. Innate immune recognition of viral infection. *Nature Immunol*

*nology*, 7(2), pp.131–137.

Kawai, T. & Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11(5), pp.373–384.

Kim, K. et al., 2007. MEKK3 is essential for lipopolysaccharide-induced interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production in macrophages. *Immunology*, 120(2), pp.242–250.

van der Kleij, D. et al., 2002. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(50), pp.48122–48129.

Kobayashi, K. et al., 2002. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, 110(2), pp.191–202.

Krause, E., Wenschuh, H. & Jungblut, P.R., 1999. The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins. *Analytical Chemistry*, 71(19), pp.4160–4165.

Kristensen, D.B. et al., 2000. Mass spectrometric approaches for the characterization of proteins on a hybrid quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer. *Electrophoresis*, 21(2), pp.430–439.

Lee, J. et al., 2006. Activation of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(6), pp.1828–1833.

Lemaitre, B. et al., 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6), pp.973–983.

LeMosy, E.K., Hong, C.C. & Hashimoto, C., 1999. Signal transduction by a protease cascade. *Trends in Cell Biology*, 9(3), pp.102–107.

Lin, S.-C., Lo, Y.-C. & Wu, H., 2010. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*, 465(7300), pp.885–890.

Liu, L. et al., 2008. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5874), pp.379–381.

Lottspeich, F & Zorbas, H., 1998. Massenspektrometrie. In C. Eckerskorn, ed. *Analytik*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag., pp. 323–368.

Lottspeich, Friedrich, Engels, J.W. & Lay, S.Z., 2006. *Bioanalytik* 2. Aufl. 2006. Nachdruck., Spektrum Akademischer Verlag.

Lu, Z. et al., 2002. The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. *Molecular Cell*, 9(5), pp.945–956.

Lund, J. et al., 2003. Toll-like Receptor 9-mediated Recognition of Herpes Simplex Virus-2 by Plasmacytoid Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(3), pp.513–520.

Mancini, M. et al., 2011. A new nonpeptidic inhibitor of 14-3-3 induces apoptotic cell death in chronic myeloid leukemia sensitive or resistant to imatinib. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 336(3), pp.596–604.

Mansell, A. et al., 2006. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nature Immunology*, 7(2), pp.148–155.

Martin, M.U. & Wesche, H., 2002. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1592(3), pp.265–280.

Martinon, F. et al., 2010. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nature Immunology*, 11(5), pp.411–418.

Masters, S.C. & Fu, Haiyan, 2001. 14-3-3 Proteins Mediate an Essential Anti-apoptotic Signal. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), pp.45193–45200.

Matitau, A.E. & Scheid, M.P., 2008. Phosphorylation of MEKK3 at threonine 294 promotes 14-3-3 association to inhibit nuclear factor kappaB activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(19), pp.13261–13268.

Matsumura, T. et al., 2010. Identification of BCAP-(L) as a negative regulator of the TLR signaling-induced production of IL-6 and IL-10 in macrophages by tyrosine phosphoproteomics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 400(2), pp.265–270.

Matsusaka, T. et al., 1993. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(21), pp.10193–10197.

Matsushima, N. et al., 2007. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics*, 8, p.124.

McGettrick, A.F. et al., 2006. Trif-related adapter molecule is phosphorylated by PKCε during Toll-like receptor 4 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), pp.9196–9201.

Means, T.K. et al., 1999. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide

differ in their requirement for Toll-like receptors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(12), pp.6748–6755.

Medzhitov, R, 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 1(2), pp.135–145.

Medzhitov, R & Janeway, C., Jr, 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, 173, pp.89–97.

Medzhitov, R, Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C A, 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), pp.394–397.

Merx, S. et al., 2007. Characterization and investigation of single nucleotide polymorphisms and a novel TLR2 mutation in the human TLR2 gene. *Human Molecular Genetics*, 16(10), pp.1225–1232.

Mhawech, P., 2005. 14-3-3 proteins--an update. *Cell Research*, 15(4), pp.228–236.

Miranda, C. et al., 2006. The TFG protein, involved in oncogenic rearrangements, interacts with TANK and NEMO, two proteins involved in the NF-kappaB pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 208(1), pp.154–160.

Miyake, A. et al., 2008. Negative regulation by SHPS-1 of Toll-like receptor-dependent proinflammatory cytokine production in macrophages. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 13(2), pp.209–219.

Mizel, S.B. et al., 2003. Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 170(12), pp.6217–6223.

Monti, M. et al., 2007. Functional proteomics: protein-protein interactions in vivo. *The Italian Journal of Biochemistry*, 56(4), pp.310–314.

Naiki, Y. et al., 2005. Transforming growth factor-beta differentially inhibits MyD88-dependent, but not TRAM- and TRIF-dependent, lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(7), pp.5491–5495.

Negishi, H. et al., 2005. Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44), pp.15989–15994.

Nomura, M. et al., 2003. 14-3-3 Interacts Directly with and Negatively Regulates Proapoptotic Bax. *Journal of Biological Chemistry*, 278(3), pp.2058–2065.

O'Neill, L.A. & Greene, C., 1998. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *Journal of Leukocyte Biology*, 63(6), pp.650–657.

O'Neill, L.A.J., 2006. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Current Opinion in Immunology*, 18(1), pp.3–9.

O'Neill, L.A.J. & Bowie, A.G., 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews. Immunology*, 7(5), pp.353–364.

Oeckinghaus, A., Hayden, M.S. & Ghosh, S., 2011. Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Nat Immunol*, 12(8), pp.695–708.

Oganesyan, G. et al., 2006. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature*, 439(7073), pp.208–211.

Ogus, A.C. et al., 2004. The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 23(2), pp.219–223.

Ojaniemi, M. et al., 2003. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages. *European Journal of Immunology*, 33(3), pp.597–605.

Olsen, J.V. et al., 2005. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 4(12), pp.2010–2021.

Oriente, F. et al., 2005. Protein kinase C- $\alpha$  regulates insulin action and degradation by interacting with insulin receptor substrate-1 and 14-3-3 epsilon. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(49), pp.40642–40649.

Park, Y., Lee, S.W. & Sung, Y.C., 2002. Cutting Edge: CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by up-regulating cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositide-3'-OH kinase pathway. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(1), pp.5–8.

Parroche, P. et al., 2007. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(6), pp.1919–1924.

Poltorak, A. et al., 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5396), pp.2085–2088.

Raetz, C.R.H. et al., 2006. Kdo2-Lipid A of Escherichia coli, a defined endotoxin that acti-

- vates macrophages via TLR-4. *Journal of Lipid Research*, 47(5), pp.1097–1111.
- Reese, M.G. et al., 2000. Genome annotation assessment in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 10(4), pp.483–501.
- Romijn, E.P., Krijgsveld, J. & Heck, A.J.R., 2003. Recent liquid chromatographic-(tandem) mass spectrometric applications in proteomics. *Journal of Chromatography. A*, 1000(1-2), pp.589–608.
- Rowe, D.C. et al., 2006. The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(16), pp.6299–6304.
- Royet, J., Reichhart, J.-M. & Hoffmann, J.A., 2005. Sensing and signaling during infection in *Drosophila*. *Current Opinion in Immunology*, 17(1), pp.11–17.
- Ruckdeschel, K. et al., 2004. 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. *The Journal of Immunology*, 173(5), pp.3320 – 3328.
- Salaun, B. et al., 2007. Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(15 Pt 1), pp.4565–4574.
- Samatey, F.A. et al., 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature*, 410(6826), pp.331–337.
- Santoro, M.G., 2000. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology*, 59(1), pp.55–63.
- Sardiu, M.E. & Washburn, M.P., 2011. Building protein-protein interaction networks with proteomics and informatics tools. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(27), pp.23645–23651.
- Sato, S., Fujita, N. & Tsuruo, T., 2002. Regulation of Kinase Activity of 3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1 by Binding to 14-3-3. *J. Biol. Chem.*, 277(42), pp.39360–39367.
- Scharton, T.M. & Scott, P., 1993. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 178(2), pp.567 –577.
- Schlesinger, T.K. et al., 2002. Apoptosis Stimulated by the 91-kDa Caspase Cleavage MEKK1 Fragment Requires Translocation to Soluble Cellular Compartments. *Journal of*

*Biological Chemistry*, 277(12), pp.10283 –10291.

Schmidt, T.G. & Skerra, A., 2007. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protocols*, 2(6), pp.1528–1535.

Schröder, N.W.J. et al., 2003. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(18), pp.15587–15594.

Schumann, R.R. et al., 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4975), pp.1429–1431.

Schwandner, R. et al., 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(25), pp.17406–17409.

Sheedy, F.J. & O'Neill, L.A.J., 2007. The Troll in Toll: Mal and Tram as bridges for TLR2 and TLR4 signaling. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(2), pp.196–203.

Sinz, A., 2006. Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(4), pp.663–682.

Srivastava, A. et al., 2005. The Apoptotic Response to Pneumolysin Is Toll-Like Receptor 4 Dependent and Protects against Pneumococcal Disease. *Infection and Immunity*, 73(10), pp.6479 –6487.

Stapels, M.D. et al., 2004. Proteomic analysis of novel marine bacteria using MALDI and ESI mass spectrometry. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, 15(3), pp.191–198.

Steen, H. et al., 2002. Tyrosine phosphorylation mapping of the epidermal growth factor receptor signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(2), pp.1031–1039.

Steinacker, P. et al., 2005. Unchanged Survival Rates of 14-3-3 $\gamma$  Knockout Mice after Inoculation with Pathological Prion Protein. *Mol. Cell. Biol.*, 25(4), pp.1339–1346.

Strassheim, D. et al., 2005. Involvement of SHIP in TLR2-induced neutrophil activation and acute lung injury. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(12), pp.8064–8071.

Stroschein, S.L. et al., 1999. Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5440), pp.771–774.

Sundstrom, J.B. et al., 2001. Hantavirus Infection Induces the Expression of RANTES and

IP-10 without Causing Increased Permeability in Human Lung Microvascular Endothelial Cells. *J. Virol.*, 75(13), pp.6070–6085.

Takaoka, A. et al., 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*, 434(7030), pp.243–249.

Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S., 2003. Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*, 21, pp.335–376.

Takeuchi, O et al., 2000. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasma lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(2), pp.554–557.

Takeuchi, O et al., 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11(4), pp.443–451.

Takeuchi, Osamu et al., 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(1), pp.10–14.

Tang, X. et al., 2005. LPS induces the interaction of a transcription factor, LPS-induced TNF- $\alpha$  factor, and STAT6(B) with effects on multiple cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(14), pp.5132–5137.

Tang, Y., Feng, Y. & Wang, Xian, 1998. Calcitonin gene-related peptide potentiates LPS-induced IL-6 release from mouse peritoneal macrophages. *Journal of neuroimmunology*, 84(2), pp.207–212.

Tanimura, N. et al., 2008. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(1), pp.94–99.

Thermo Scientific, 2006. File\_31081.pdf. Available at: [http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File\\_31081.pdf](http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_31081.pdf) [Accessed March 2, 2012].

Thorson, J.A. et al., 1998. 14-3-3 Proteins Are Required for Maintenance of Raf-1 Phosphorylation and Kinase Activity. *Molecular and Cellular Biology*, 18(9), pp.5229–5238.

Thuong, N.T.T. et al., 2007. A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis. *Genes and Immunity*, 8(5), pp.422–428.

Toyo-oka, K. et al., 2003. 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nature Genetics*, 34(3), pp.274–285.

Trakselis, M.A., Alley, S.C. & Ishmael, F.T., 2005. Identification and mapping of protein-protein interactions by a combination of cross-linking, cleavage, and proteomics. *Bioconjugate Chemistry*, 16(4), pp.741–750.

Trumpfheller, C. et al., 2008. The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), pp.2574–2579.

Tsan, M.-F. & Gao, B., 2009. Heat shock proteins and immune system. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(6), pp.905–910.

Tseng, P.-H. et al., 2010. Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nature Immunology*, 11(1), pp.70–75.

Underhill, D.M. et al., 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, 401(6755), pp.811–815.

Vabulas, R M et al., 2001. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(33), pp.31332–31339.

Vabulas, Ramunas M, Ahmad-Nejad, P., et al., 2002. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(17), pp.15107–15112.

Vabulas, Ramunas M., Braedel, S., et al., 2002. The Endoplasmic Reticulum-resident Heat Shock Protein Gp96 Activates Dendritic Cells via the Toll-like Receptor 2/4 Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), pp.20847 –20853.

Viriyakosol, S., Tobias, P.S. & Kirkland, T.N., 2006. Mutational analysis of membrane and soluble forms of human MD-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(17), pp.11955–11964.

Wald, D. et al., 2003. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nature Immunology*, 4(9), pp.920–927.

Wang, B. et al., 1999. Isolation of high-affinity peptide antagonists of 14-3-3 proteins by phage display. *Biochemistry*, 38(38), pp.12499–12504.

Wang, H. et al., 1998. Mutations in the hydrophobic surface of an amphipathic groove of 14-3-3zeta disrupt its interaction with Raf-1 kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(26), pp.16297–16304.

Wang, J. et al., 2009. Negative regulation of Toll-like receptor signaling pathway. *Microbes*

*and Infection / Institut Pasteur*, 11(3), pp.321–327.

Wang, J.P., Kurt-Jones, E.A., et al., 2005. Varicella-zoster virus activates inflammatory cytokines in human monocytes and macrophages via Toll-like receptor 2. *Journal of Virology*, 79(20), pp.12658–12666.

Wang, T., Gu, S., et al., 2005. In vivo dual-tagging proteomic approach in studying signaling pathways in immune response. *Journal of Proteome Research*, 4(3), pp.941–949.

Wang, XiaoZhe et al., 2004. Interactions between Extracellular Signal-regulated Protein Kinase 1, 14-3-3 $\epsilon$ , and Heat Shock Factor 1 during Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), pp.49460–49469.

Warren, H.S. & Smyth, M.J., 1999. NK cells and apoptosis. *Immunology and Cell Biology*, 77(1), pp.64–75.

Watanabe, T., Kitani, A. & Strober, W., 2005. NOD2 regulation of Toll-like receptor responses and the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*, 54(11), pp.1515–1518.

Weintz, G. et al., 2010. The phosphoproteome of toll-like receptor-activated macrophages. *Molecular Systems Biology*, 6, p.371.

Werts, C. et al., 2001. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nature Immunology*, 2(4), pp.346–352.

Wright, S.D. et al., 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4975), pp.1431–1433.

Wu, X. et al., 2010. Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(8), pp.4338–4348.

Xing, H. et al., 2000. 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. *EMBO J*, 19(3), pp.349–358.

Xu, Y. et al., 2000. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*, 408(6808), pp.111–115.

Xue, Y. et al., 2008. Proteomic Dissection of Agonist-Specific TLR-Mediated Inflammatory Responses on Macrophages at Subcellular Resolution. *J. Proteome Res.*, 7(8), pp.3180–3193.

Yamamoto, M. et al., 2002. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*, 420(6913), pp.324–329.

Yamamoto, M. et al., 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5633), pp.640–643.

Yang, X. et al., 2006. Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), pp.17237–17242.

Yang, Y. et al., 2007. A Comparison of nLC-ESI-MS/MS and nLC-MALDI-MS/MS for GeLC-Based Protein Identification and iTRAQ-Based Shotgun Quantitative Proteomics. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, 18(4), pp.226–237.

Zhang, C. et al., 2003. Nuclear coactivator-62 kDa/Ski-interacting protein is a nuclear matrix-associated coactivator that may couple vitamin D receptor-mediated transcription and RNA splicing. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(37), pp.35325–35336.

Zhang, L., Chen, J. & Fu, H, 1999. Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15), pp.8511–8515.

Zhang, Y. et al., 2008. NF-kappaB-dependent cytokines in saliva and serum from patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese population. *Cytokine*, 41(2), pp.144–149.

Zhu, H. et al., 2002. Amino acid residue specific stable isotope labeling for quantitative proteomics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 16(22), pp.2115–2123.

Zuo, S. et al., 2010. 14-3-3 Epsilon Dynamically Interacts with Key Components of Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Module for Selective Modulation of the TNF- $\alpha$ -Induced Time Course-Dependent NF- $\kappa$ B Activity. *Journal of Proteome Research*, 9(7), pp.3465–3478.



## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med. Michael Neumaier für die Möglichkeit bedanken, meine experimentelle Arbeit an seinem Institut anzufertigen, für die stetige Unterstützung, Förderung und die Übernahme des Co-Referats. Ich bin dankbar für die Erfahrungen, die ich in der Betreuung von Praktikanten sammeln durfte und für die Chance, meine Ergebnisse auf Kongressen vorzustellen zu können.

Ich danke Prof. Dr. Doris Wedlich, mich als externen Doktoranden angenommen zu haben, damit ich meine Dissertation in Mannheim anfertigen konnte.

Mein besonderer Dank gebührt Priv.-Dozent Dr. med. Parviz Ahmad-Nejad für das interessante und anspruchsvolle Thema und die intensive Betreuung. Er konnte mich jederzeit motivieren und hat mich für die Signaltransduktion der Toll-like Rezeptoren begeistert.

Priv.-Dozent Dr. med. Peter Findeisen danke ich für die große fachliche Unterstützung und die Möglichkeit, die Geräte des Proteomics-Labors umfassend zu nutzen.

Ich möchte mich bei meiner netten Kollegin Wilma Zimmer bedanken, von deren reichlichem Erfahrungsschatz ich stets profitiert habe und mit der ich sehr gerne zusammen gearbeitet habe.

Der großen Unterstützung und Einarbeitung in die Massenspektrometrie und die Multiplex-Assays bin ich Victor Costina zu Dank verpflichtet. Heike Pfeuffer hat mich jeden Tag zum Lachen gebracht. Evelyn Jäger war mir bei den LC-ESI-MS-Messungen eine große Hilfe.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre, insbesondere Ingrid, Tina, Septimia, Diego, Stefano, Carmen und Betty.

Finanziell wurde diese Arbeit von der DFG GZ:AH 176/1-1 gefördert.

Einen herzlichen Dank an Dr. Angelika Hausser für die freundliche Überlassung von Plasmiden mit humanen 14-3-3-Konstrukten.

Nicht zuletzt bin ich meinen Eltern und meiner Frau für ihre vielgestaltige Unterstützung während der Promotionszeit unendlich dankbar. Meine Frau war trotz allen Höhen und Tiefen und die Entbehrungen durch die vielen Wochenenden im Labor immer für mich da.



## Publikationen

### Veröffentlichungen

**Tobias B. Schuster**, Victor Costina, Peter Findeisen, Michael Neumaier, Parviz Ahmad-Nejad. 2011. Identification and functional characterization of 14-3-3 in TLR2 signaling. *Journal of Proteome Research*. 10(10), 4661-70.

Nuha M.K. Yousif, Melanie Huch, **Tobias Schuster**, Gyu-Sung Cho, Hamid A. Dirar, Wilhelm H. Holzapfel Charles M.A.P. Franz, 2010. Diversity of lactic acid bacteria from Hussuwa, a traditional African fermented sorghum food. *Food Microbiology*. 27(6), 757-68.

María G. Vizoso Pinto, **Tobias Schuster**; Karlis Briviba, Bernhard Watzl, Wilhelm H. Holzapfel, Charles M.A.P. Franz, 2007. Adhesive and chemokine stimulatory properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *Journal of Food Protection*. 70(1), 125-34.

François Lefebvre, **Tobias Schuster**, Marcel Munderle, Mike Hine, Robert Poulin, 2004. Anguillicolosis in the short-finned eel *Anguilla australis*: epidemiology and pathogenicity. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, Vol.38, 577-583.

### Vorträge

**Tobias B. Schuster**. 2008. Identification of new interaction partners of the IL-1/TLR signaling pathway by mass spectrometry. Vortrag beim Symposium Proteome Analysis in Clinical Diagnostics, 2008, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

### Poster

**Tobias B. Schuster**, Peter Findeisen, Evelyn Jäger, Wilma Zimmer, Michael Neumaier, Parviz Ahmad-Nejad. 2008. Mass spectrometric identification of new proteins of the IL-1/TLR signaling pathway upon stimulation. Posterpräsentation bei der DGKL (Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V.) Konferenz 2008, Mannheim.

**Tobias Schuster**; Vizoso Pinto, M. G.; Kostinek, M.; Rodriguez Gomez, M.; Specht, I; Holzapfel, W. H. und Franz, C. M. A. P, 2006. Competitive exclusion of pathogens by probiotic enterococci. Poster- Präsentation bei der 6. Konferenz der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 2006, Suhl.



## Lebenslauf

### **Tobias Benjamin Schuster**

geboren am 15.08.1978 in Pforzheim

09/1985 – 07/1989	Grundschule Bilfingen
09/1989 – 06/1998	Lise-Meitner-Gymnasium, Königsbach-Stein
09/1998 – 09/1999	Zivildienst bei der politischen und kirchlichen Gemeinde in Eisingen.
10/1999 – 12/2005	Studium der Biologie (Diplom) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) Hauptfächer: Zoologie und Mikrobiologie Nebenfächer: Biochemie und Wasserchemie Abschluss: Diplom
01/2005 – 12/2005	Diplomarbeit: „Kompetitive Hemmung pathogener Bakterien durch probiotische Enterokokken“ an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Institut für Hygiene und Toxikologie, Karlsruhe (jetzt: Max-Rubner Institut).
Seit 05/2006	Experimentelle Arbeiten zur vorliegenden Dissertation als externer Doktorand von Prof. Dr. Doris Wedlich, Zoologisches Institut II, Karlsruher Institut für Technik (KIT) am Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Mannheim, Medizinische Fakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg bei Prof. med. Michael Neumaier.