

Erstellung einer Signaltransduktionskarte für das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1

Peter Wasiliew



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



with the motto: we are together
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Erstellung einer Signaltransduktionskarte für das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Peter Wasiliew

aus Frankfurt am Main

Gießen 2014

**Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie
Fachbereich Medizin,
Justus-Liebig-Universität Gießen**

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Michael Kracht

Gutachter: Prof. Dr. Michael Kracht

Gutachter: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Tag der Disputation: 18.12.2014

1	EINLEITUNG	- 1 -
1.1	Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1	- 1 -
1.1.1	Zytokine – Die Botenstoffe der Immunantwort	- 1 -
1.1.2	Die Interleukin-1-Familie	- 1 -
1.1.2.1	IL-1 α und IL-1 β	- 3 -
1.1.2.2	IL-1Ra – Der physiologische IL-1-Rezeptorantagonist	- 4 -
1.1.2.3	IL-18 – Ein naher Verwandter von IL-1 β	- 4 -
1.1.2.4	IL-1F5 – IL-1F11: Sieben weitere Mitglieder der IL-1-Familie	- 5 -
1.2	Die klinische Bedeutung von Interleukin-1	- 8 -
1.2.1	Die Rolle von Interleukin-1 bei entzündlichen Prozessen	- 8 -
1.2.1.1	Die Rolle von IL-1 bei autoinflammatorischen und autoimmunologischen Erkrankungen	- 9 -
1.2.1.2	Die Rolle von IL-1 bei Tumorerkrankungen	- 10 -
1.3	Pharmakologische Angriffspunkte im Interleukin-1-Signalweg	- 11 -
1.3.1	Interleukin-1-Hemmstoffe	- 11 -
1.3.1.1	Anakinra – Der rekombinante IL-1-Rezeptorantagonist	- 12 -
1.3.1.2	Rilonacept – Der lösliche IL-1-Rezeptor	- 12 -
1.3.1.3	Canakinumab – Der monoklonale anti-IL-1-Antikörper	- 12 -
1.4	Fragestellung	- 13 -
2	MATERIAL UND METHODEN	- 15 -
2.1	Software	- 15 -
2.2	Verbrauchsmaterial	- 16 -
2.3	Geräte	- 16 -
2.4	Chemikalien, Lösungsmittel und Wasser	- 17 -
2.5	Enzyme	- 17 -
2.6	Allgemeine Puffer und Lösungen	- 17 -

2.7	Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien.....	- 18 -
2.8	Stimuli, Antikörper und rekombinante Proteine	- 18 -
2.9	Visualisierung gesammelter Daten aus der Literatur.....	- 19 -
2.10	Gewinnen, Aufarbeiten, Stimulieren und Lysieren von humanen PBMC	- 19 -
2.11	Zellkulturtechniken.....	- 20 -
2.11.1	Zelllinien und primäre Zellen.....	- 20 -
2.11.2	Kultivieren und Passagieren adhärent wachsender Zellen	- 21 -
2.11.3	Zellzählung und Vitalitätsbestimmung.....	- 21 -
2.11.4	Aufteilen von Zellen.....	- 21 -
2.11.5	Stimulieren, Ernten und Lysieren von Zellen.....	- 21 -
2.12	Molekularbiologische Techniken für Genexpressionsanalysen	- 22 -
2.12.1	Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren.....	- 22 -
2.12.1.1	Isolierung von RNA aus humanen Zelllinien	- 22 -
2.12.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	- 22 -
2.12.2.1	Konzentrationsbestimmung von RNA.....	- 22 -
2.12.3	Real-Time RT-PCR zur Amplifikation spezifischer mRNA-Sequenzen	- 23 -
2.12.4	<i>Microarray</i> -Analysen	- 24 -
2.13	Proteinbiochemische Techniken	- 25 -
2.13.1	Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli	- 25 -
2.13.2	Westernblot.....	- 26 -
3	ERGEBNISSE.....	- 27 -
3.1	Schrittweises Vorgehen zur Erstellung einer Signaltransduktionskarte für das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1.....	- 27 -
3.1.1	Zusammenstellung ausgewählter Publikationen und der darin enthaltenen Beobachtungen zu Komponenten des IL-1-Signalwegs	- 27 -
3.1.2	Graphische Darstellung und Verknüpfung der gesammelten Erkenntnisse über den IL-1-Signalweg in einem virtuellen Netzwerk.....	- 28 -
3.1.2.1	Die IL-1-Signaltransduktionskarte	- 28 -
3.1.2.1.1	Prozessierung und Freisetzung von IL-1	- 35 -

3.1.2.1.2	IL-1-Rezeptoren	- 37 -
3.1.2.1.3	Rezeptornaher Teil des IL-1-Signalwegs.....	- 38 -
3.1.2.1.4	Zytosolischer Teil des IL-1-Signalwegs	- 40 -
3.1.2.1.5	Nukleärer Teil des IL-1-Signalwegs	- 44 -
3.1.2.1.6	Regulation IL-1-responsiver Gene auf mRNA-Ebene.....	- 45 -
3.1.2.1.7	Negative Rückkopplungselemente im IL-1-Signalweg	- 46 -
3.2	Bestimmung der mRNA-Expression ausgewählter Zielgene aus dem Interleukin-1-Signalweg.....	- 48 -
3.2.1	Etablierung der Versuchsbedingungen für die LPS-induzierte mRNA-Expression in humanen PBMC	- 48 -
3.2.1.1	Zeitkinetik der mRNA-Expression durch LPS in humanen PBMC	- 48 -
3.2.1.2	Dosis-Wirkungs-Beziehung von LPS zur mRNA-Expression ausgewählter IL-1-Zielgene in humanen PBMC	- 50 -
3.2.2	Der Einfluss von Anakinra auf die mRNA-Expression	- 51 -
3.2.2.1	Der Einfluss von Anakinra auf die LPS-induzierte mRNA-Expression in humanen PBMC.....	- 51 -
3.2.2.2	Überprüfung der Reinheit von Anakinra	- 52 -
3.2.2.3	Der Einfluss von Anakinra auf die IL-1-induzierte mRNA-Expression in kultivierten Zellen.....	- 53 -
3.2.2.3.1	Der Einfluss von Anakinra auf die IL-1-induzierte mRNA-Expression in HEK293IL-1R-Zellen.....	- 53 -
3.2.2.3.2	Der Einfluss von Anakinra auf die IL-1-induzierte mRNA-Expression in HeLa-tTA-Zellen.....	- 54 -
3.2.3	Dosis-Wirkungs-Beziehung von TNF- α zur mRNA-Expression ausgewählter IL-1-Zielgene in humanen PBMC.....	- 55 -
3.2.4	Der Einfluss von Adalimumab auf die LPS-induzierte IL-8 mRNA-Expression in humanen PBMC	- 56 -
3.3	Abbilden von Genexpressionsdaten auf der Interleukin-1-Signaltransduktionskarte	- 57 -
3.3.1	RNA-Qualitätskontrolle	- 57 -
3.3.2	Genomweite Bestimmung der mRNA-Expression in humanen PBMC und kultivierten Zellen	- 58 -

3.3.2.1	LPS-abhängige mRNA-Expression in humanen PBMC und der Einfluss von Anakinra	- 61 -
3.3.2.2	IL-1-abhängige mRNA-Expression in kultivierten Zellen und der Einfluss von Anakinra	- 64 -
3.3.2.3	Anteil der auf mRNA-Ebene regulierten Gene in der IL-1-Signaltransduktionskarte.....	- 69 -
3.3.3	Projizieren der mRNA-Expressionswerte mittels Farbcode auf die IL-1-Signaltransduktionskarte	- 71 -
4	DISKUSSION.....	- 75 -
4.1	Erstellung eines Wissensarchivs zur Interleukin-1-Signaltransduktion und Visualisierung der Informationen in Form einer Signaltransduktionskarte ..	- 75 -
4.1.1	Beispielhafte Diskussion der Kriterien für das Auswählen und Gewichten geeigneter Literatur über den IL-1-Signalweg	- 77 -
4.1.2	Limitationen der IL-1-Signaltransduktionskarte	- 80 -
4.2	Stimulusabhängige mRNA-Expression in humanen PBMC	- 81 -
4.2.1	Die Rolle von IL-1 bei der LPS-induzierten mRNA-Expression in humanen PBMC.....	- 81 -
4.2.2	Die Rolle von TNF- α bei der LPS-induzierten mRNA-Expression in humanen PBMC.....	- 83 -
4.3	Schlussfolgerung.....	- 84 -
4.4	Bedeutung, Anwendbarkeit und Zielsetzung der Interleukin-1-Signaltransduktionskarte	- 84 -
5	ZUSAMMENFASSUNG	- 86 -
6	ABSTRACT.....	- 87 -
7	VERZEICHNISSE.....	- 88 -
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	- 88 -
7.2	Abbildungsverzeichnis	- 89 -

7.3	Tabellenverzeichnis	- 92 -
7.4	Literaturverzeichnis.....	- 93 -
8	ANHANG.....	- 112 -
8.1	Abbildung A1.....	- 112 -
8.2	Abbildung A2.....	- 113 -
8.3	Abbildung A3.....	- 114 -
8.4	Abbildung A4.....	- 115 -
8.5	Abbildung A5.....	- 116 -
8.6	Publikationsliste	- 117 -
8.7	Ehrenwörtliche Erklärung	- 118 -
8.8	Danksagung.....	- 119 -

1 Einleitung

1.1 Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1

1.1.1 Zytokine – Die Botenstoffe der Immunantwort

Der Begriff „Zytokine“ umfasst mehrere hundert kleine Proteine oder Polypeptide, die als extrazelluläre und zum Teil auch als membranständige oder intrazelluläre Botenstoffe des Immunsystems an entzündlichen und immunologischen Prozessen beteiligt sind und darüber hinaus bei unzähligen biologischen Abläufen wie Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Zellproliferation eine zentrale Rolle einnehmen. Dazu gehören die Interferone, Interleukine, Chemokine, mesenchymale Wachstumsfaktoren, Tumornekrosefaktoren und Adipokine (Dinarello, 2007).

Prinzipiell sind alle kernhaltigen Zellen in der Lage, Zytokine zu produzieren. Diese entfalten im Rahmen einer Immunantwort sowohl lokal auf autokrinem, parakrinem bzw. juxtakrinem Wege als auch systemisch in endokriner Manier an ihren Zielzellen ihre hochpotente Wirkung. Gerade Vertreter der Interleukine wie IL-1 und IL-12 induzieren bereits in sehr geringen subnanomolaren Konzentrationen eine biologische Antwort (Dinarello, 2007).

In der Regel fungieren Zytokine als Liganden spezifischer Oberflächenrezeptoren auf ihren Zielzellen. Infolge ihrer Bindung werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, was zur Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren mit konsekutiver Genexpression führt. In manchen Fällen wirken Zytokine oder deren „Precursor“ auch direkter als intrazelluläre Transkriptionsfaktoren (Dinarello, 2007; Werman et al., 2004).

1.1.2 Die Interleukin-1-Familie

Die Interleukin-1 (IL-1)-Familie beinhaltet 11 Proteine (IL-1F1 bis IL-1F11), die im menschlichen Organismus von 11 verschiedenen Genen kodiert werden. Mit einer Ausnahme liegen diese allesamt auf dem langen Arm von Chromosom 2; einzig das Gen, das für IL-18 kodiert, befindet sich auf dem Chromosomenabschnitt 11q22. (Bensen et al., 2001; Busfield et al., 2000; Dinarello, 2009; Dunn et al., 2001; Nolan et al., 1998; Pizarro et al., 2007; Sims et al., 2001).

Die Hauptfunktion von IL-1 besteht in einer präzisen Regulierung proinflammatorischer Reaktionen, welche durch mechanischen, chemischen oder physikalischen Stress ausgelöst werden können. Weiterhin aktivieren exogene Noxen wie bakterielle, virale, fungale oder

parasitäre Moleküle, die der Gruppe der „Pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) zuzuordnen sind, ebenso wie endogene Noxen, z.B. Harnsäurekristalle, Adenosintriphosphat (ATP) oder sonstige Komponenten von zugrunde gegangenen Zellen aus der Gruppe der „Damage- or danger-associated molecular patterns“ (DAMPs), die Freisetzung von IL-1 (Gaestel et al., 2009a; Martinon et al., 2009). Somit ist IL-1 ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität (Abb.1).

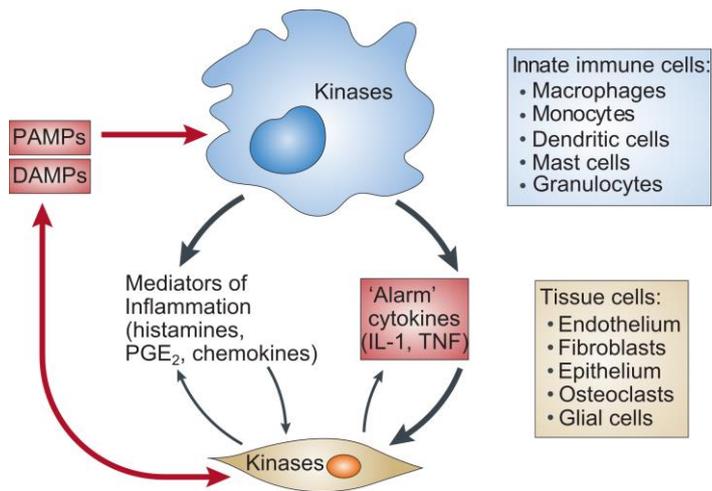


Abbildung 1: Immunantwort getriggert durch pleiotrope proinflammatorische Zytokine.

Exogene Noxen [„Pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs)] sowie endogene Noxen [„Damage- or danger-associated molecular patterns“ (DAMPs)] aktivieren Zellen der angeborenen Immunität, aber auch Zellen aus dem umliegenden Gewebe, wodurch es zur Freisetzung pleiotroper proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 kommt. (Modifiziert nach Prof. Dr. M. Kracht, Gießen aus Gaestel, M., Kotlyarov, A., Kracht M., Nature Reviews Drug Discovery 2009)

Im Folgenden werden Mitglieder der Interleukin-1-Familie vorgestellt, die von C.A. Dinarello mit den Namen IL-1F1 – IL-1F11 (Dinarello et al., 2010) charakterisiert worden sind (Tab.1).

Common Name	IL-1 Family Name	Function	Ligand-Binding Chain
IL-1 α	IL-1F1	Agonist	IL-1R type I
IL-1 β	IL-1F2	Agonist	IL-1R type I
IL-1Ra	IL-1F3	Antagonist	IL-1R type I
IL-18	IL-1F4	Agonist	IL-18R α
IL-36Ra	IL-1F5	Antagonist	IL-1Rrp2
IL-36 α	IL-1F6	Agonist	IL-1Rrp2
IL-37	IL-1F7	Antagonist	IL-18R α
IL-36 β	IL-1F8	Agonist	IL-1Rrp2
IL-36 γ	IL-1F9	Agonist	IL-1Rrp2
IL-38 ?	IL-1F10	Unknown	Unknown
IL-33	IL-1F11	Agonist	ST2

Tabelle 1: Die Interleukin-1-Familie.

(Modifiziert nach Prof. Dr. M. Kracht, Gießen aus Pizarro, T. et al., J. Immunol., 2007; Dinarello, Nat.Immunol. 2010)

1.1.2.1 IL-1 α und IL-1 β

IL-1 α (IL-1F1) und IL-1 β (IL-1F2) stellen die zuerst identifizierten und damit am besten erforschten Vertreter der IL-1-Familie dar. Es handelt sich hierbei um zwei sehr potente Zytokine (Dinarello, 2006), die in ihrer Aminosäuresequenz zwar nur eine 24 %-ige Übereinstimmung aufweisen, jedoch *in vitro* größtenteils die gleiche biologische Funktionalität besitzen (Dinarello, 1996; Dunn et al., 2001; Pizarro et al., 2007).

IL-1 α ist ein membrangebundenes Protein (Kurt-Jones et al., 1985), bestehend aus 159 Aminosäuren (March et al., 1985), und entfaltet seine biologische Wirkung über autokrine oder juxtakrine Mechanismen (Dinarello, 2009; Kaplanski et al., 1994). Ebenso wie IL-1 β , das sich seinerseits aus 153 Aminosäuren zusammensetzt (Kamogashira et al., 1988a; Kamogashira et al., 1988b; March et al., 1985), entsteht die reife Form von IL-1 α durch proteolytische Spaltung aus einem 31 kDa schweren Vorläuferprotein und besitzt eine molekulare Masse von 17 kDa (Auron et al., 1984; Dinarello, 1996). Beide Formen von IL-1 α sind biologisch aktiv (Dinarello, 2009), wohingegen IL-1 β erst nach enzymatischer Prozessierung seines 31 kDa-Vorläuferproteins in die 17 kDa-Form (Keller et al., 2008; Martinon et al., 2002) und nachfolgender Sekretion seine Wirkung parakrin oder systemisch entfaltet (Dinarello, 2005a; Dinarello, 2005b).

IL-1 α und IL-1 β werden überwiegend von Monozyten und Makrophagen, den sogenannten „Sentinel Cells“ oder Wachposten des angeborenen Immunsystems, sezerniert (Dinarello et al., 1987; Dinarello, 2009; Granowitz et al., 1992; Netea et al., 2009), können aber auch von vielen weiteren Körperzellen gebildet und ausgeschüttet werden. Sie induzieren über ihre Bindung an den Interleukin-1-Rezeptor Typ I (IL-1R1) rasch die mRNA-Expression von Hunderten von Genen in diversen Zellarten wie z.B. Monozyten bzw. Makrophagen (Allantaz et al., 2007; Jura et al., 2008), Epithelzellen (Hoffmann et al., 2005), Endothelzellen (Bandman et al., 2002), Chondrozyten (Joos et al., 2009; Vincenti et al., 2001) und Fibroblasten (Holzberg et al., 2003; Jeong et al., 2004; Wolter et al., 2008). Dabei bewirken IL-1 α und IL-1 β auch die Expression ihrer eigenen Gene in Form eines positiven Rückkopplungsmechanismus, was die zelluläre IL-1-Antwort auf auto- sowie parakrinem Wege nochmals vervielfacht (Dinarello et al., 1987; Dinarello, 1996; Gaestel et al., 2009a; Granowitz et al., 1992). Die Transkription IL-1-responsiver Zielgene erfolgt bereits innerhalb von Minuten und hält einige Stunden an (Hoffmann et al., 2005; Wolter et al., 2008). Die Genaktivierung wird über mehrere hochspezifische Mechanismen eingeleitet, in denen es vorübergehend zur reversiblen Bildung von Multiproteinkomplexen kommt, die sowohl aus nicht-enzymatischen Adapterproteinen bestehen als auch aus Enzymen, die nach ihrer

Aktivierung eine Reihe von Phosphorylierungen sowie K48-verknüpfte degradative oder K63-verknüpfte nicht-degradative Ubiquitylierungsprozesse in Gang setzen (Gaestel et al., 2009a).

Es existieren drei Ebenen, auf denen die starke und vielfältige proinflammatorische Aktivität von IL-1 α und IL-1 β eingedämmt wird:

- 1) Regulation der Prozessierung und Freisetzung durch das „NACHT-, leucine-rich repeat (LRR)- and PYD-containing protein 3“ (NALP3)-Inflammasom, ein Multiproteinkomplex, der die Aktivität der IL-1 β -prozessierenden Protease Caspase-1 moduliert (Martinon et al., 2009)
- 2) Regulation auf Höhe der Rezeptoren (Dinarello, 2005b)
- 3) Regulation der rezeptorvermittelten Signaltransduktion, die in der Transkription IL-1-responsiver Gene mit folgender Translation mündet (Gaestel et al., 2009a)

1.1.2.2 IL-1Ra – Der physiologische IL-1-Rezeptorantagonist

Mit IL-1Ra (IL-1F3) bindet ein weiteres Mitglied der IL-1-Familie an den IL-1-Rezeptor Typ I (Schreuder et al., 1997). Obwohl IL-1Ra zwei Bindungsstellen für IL-1R1 besitzt, die denen von IL-1 β ähnlich sind (Dinarello, 2009; Eisenberg et al., 1990), entfaltet es eine antagonistische Wirkung an IL-1R1 (Dinarello, 2009; Pizarro et al., 2007). Der Grund hierfür liegt in einer jeweils unterschiedlichen räumlichen Beziehung innerhalb der Ligand-Rezeptor-Bindung: Auf dem Knotenpunkt zweier Domänen sowie auf einer dritten Domäne trägt IL-1R1 zwei Bindungsstellen, über die IL-1 β an seinen Zielrezeptor bindet. Daraufhin lagern sich jene drei Domänen von IL-1R1 um IL-1 β herum zusammen und über diese Konformationsänderung wird eine Signalfortleitung induziert. IL-1Ra bindet zwar ebenfalls an die Bindungsstelle von IL-1R1 auf dem Knotenpunkt zwei seiner Domänen, jedoch kommt es im Zuge dessen zu einem Abweichen der dritten IL-1R1-Domäne von IL-1Ra. Daraus resultiert eine nur sehr schwache Bindung von IL-1Ra an die Bindungsstelle von IL-1R1 auf seiner dritten Domäne, wodurch ein für die Signalfortleitung obligates Zusammenlagern der drei IL-1R1-Domänen ausbleibt (Schreuder et al., 1997; Vigers et al., 2000) (Abb.2).

1.1.2.3 IL-18 – Ein naher Verwandter von IL-1 β

IL-18 (IL-1F4) besitzt hinsichtlich Aminosäuresequenz und dreidimensionaler Faltung große Ähnlichkeit mit IL-1 α , IL-1 β sowie IL-1Ra und weist in seiner biologischen Funktion mehrere Parallelen zu der von IL-1 β auf (Dunn et al., 2001; Pizarro et al., 2007; Sims et al.,

2001). Eine weitere Gemeinsamkeit mit IL-1 β besteht darin, dass es aus einem inaktiven Vorläuferprotein mit einer molekularen Masse von 24 kDa durch Caspase-1 proteolytisch in seine reife 18 kDa-Form überführt wird (Dinarello, 2009). IL-18 bindet an seinen Zielrezeptor IL-18R α und nach Komplexbildung mit IL-18R β induziert es in Abhängigkeit von IL-12 die Expression von Interferon- γ (IFN- γ) in TH1-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Boraschi et al., 2011; Dinarello, 2009; Okamura et al., 1995; Pizarro et al., 2007). Des Weiteren induziert es Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), „Granulocyte macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF), IL-8, IL-6, IL-1 β und Fas-Ligand (FasL) in verschiedenen Zelltypen. Mit dem sogenannten „IL-18-binding protein“ (IL-18BP) existiert gleichzeitig ein direkter Inhibitor von IL-18, welcher die IL-18-vermittelte TH1-Antwort triggert (Dinarello, 2009; Novick et al., 1999).

IL-18 lässt sich in Monozyten, Gewebsmakrophagen, dendritischen Zellen, Kupffer-Zellen, Osteoklasten, Keratinozyten, Epithelzellen und Tumorzelllinien nachweisen (Boraschi et al., 2011). Interessanterweise wird IL-18 in mononukleären Zellen des peripheren Bluts („Peripheral blood mononuclear cells“, PBMC) – im Gegensatz zu IL-1 β – konstitutiv exprimiert, sodass auch eine regulatorische Funktion in Bezug auf die zelluläre Homöostase diskutiert wird (Dinarello, 2009; Puren et al., 1999).

1.1.2.4 IL-1F5 – IL-1F11: Sieben weitere Mitglieder der IL-1-Familie

In den letzten zehn Jahren wurden die biologischen Funktionen von weiteren Genprodukten der IL-1-Familie bei der Regulation der angeborenen und erworbenen Immunität näher charakterisiert:

IL-36Ra (IL-1F5) ist zwar in der Aminosäuresequenz zu knapp 50 % mit IL-1Ra identisch und weist auch strukturell eine große Ähnlichkeit auf (Dinarello, 2009; Dunn et al., 2001) (Abb.2), zeigt jedoch an IL-1R1 weder einen agonistischen noch antagonistischen Effekt (Barton et al., 2000). Stattdessen ist IL-36Ra ein Ligand für das „IL-1 receptor-related protein-2“ (IL-1Rrp2) (Pizarro et al., 2007). Es besitzt in Neuronen und Gliazellen eine antiinflammatorische Funktion, indem es über „Toll- and IL-1R1-like“ (TIR8)/„Single Immunoglobulin IL-1 receptor-related molecule“ (SIGIRR) IL-4 induziert, das seinerseits die Aktivität von IL-1 herabsetzt (Costelloe et al., 2008). Außerdem hemmt IL-36Ra die über Bindung von IL-1F6, IL-1F8 und IL-1F9 an ihren Zielrezeptor IL-1Rrp2 und nachfolgendes Anheften von „IL-1 receptor accessory protein“ (IL-1RAcP) vermittelte Aktivierung von „Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“ (NF- κ B) (Boraschi et al., 2011). IL-36Ra wird in Keratinozyten, Monozyten, B-Zellen und dendritischen Zellen

exprimiert und kommt überwiegend in Plazenta, Uterus, Gehirn, Herz, Niere sowie in der Haut von Psoriasis-Patienten vor (Dunn et al., 2001).

IL-36 α (IL-1F6) ist ebenfalls ein Agonist von IL-1Rrp2 (Pizarro et al., 2007), über dessen Bindung und das Anlagern von IL-1RAcP seine proinflammatorische Wirkung durch die Aktivierung von NF- κ B und „Mitogen-activated protein kinases“ (MAPKs) entfacht wird (Boraschi et al., 2011; Dinarello, 2009). Es hat sich zwar nicht in Fibroblasten nachweisen lassen, dafür aber in Keratinozyten, in denen es möglicherweise eine Rolle bei der Psoriasis spielt (Dinarello, 2009). IL-36 α wird außerdem in Monozyten sowie B-Zellen und T-Zellen exprimiert, sodass es in Milz, Lymphknoten, Tonsillen und Knochenmark vorkommt (Dunn et al., 2001).

IL-37 (IL-1F7) ist, strukturell betrachtet, am engsten mit IL-18 verwandt und existiert in den fünf verschiedenen Splicevarianten IL-37a-e (Boraschi et al., 2011; Dinarello, 2009). IL-37b wird aus seinem Vorläuferprotein durch Caspase-1 aktiviert und zeigt eine antiinflammatorische Wirkung (Dinarello, 2009; Kumar et al., 2002). Wie IL-37b werden auch IL-37c-e durch Caspase-1 und weitere noch nicht identifizierte Proteasen in ihre reife Form gespalten. Wahrscheinlich regulieren sich die verschiedenen Splice-Varianten dabei gegenseitig durch kompetitive Hemmung. Die vermeintlich aktiven Formen sind IL-37a, das eine Elastase-Spaltstelle und nukleäre Lokalisationssequenz in sich trägt, IL-37b sowie IL-37d, wohingegen IL-37c und IL-37e nicht die komplette „IL-1-like“-Sequenz umfassen (Boraschi et al., 2011). Welche Bedeutung die Bindung von IL-37 an IL-18R α , dem Zielrezeptor von IL-18, hat, ist noch unklar (Pizarro et al., 2007). Jedenfalls scheint IL-37 weder eine direkt agonistische noch direkt antagonistische Funktion auszuüben (Bufler et al., 2002; Kumar et al., 2002). Möglicherweise reguliert IL-37 die proinflammatorische Wirkung von IL-18, indem es IL-18R α besetzt und dabei die für die Induktion von IFN- γ notwendige Rekrutierung von IL-18R β verhindert oder durch Anlagern der „Waisen-Rezeptoren“ TIR8/SIGIRR bzw. „Three immunoglobulin domain-containing IL-1 receptor-related“ (TIGIRR-1/2) an IL-18R α eine antiinflammatorische Antwort induziert (Boraschi et al., 2011; Lewis et al., 2006). Außerdem ist eine Komplexbildung von IL-37 mit IL-18BP beschrieben worden, welche durch Bindung von IL-18R β dessen Anlagern an den IL-18/IL-18R α -Komplex verhindert und dadurch die IL-18BP-bedingte Hemmung der IL-18-Immunantwort noch weiter verstärkt (Boraschi et al., 2011; Bufler et al., 2002). Die reife Form der Splice-Variante IL-37b übt im Zellkern möglicherweise über transkriptionelle Regulation zusätzlich eine antiinflammatorische Wirkung aus (Dinarello, 2009). Auch IL-37a ist in der Lage, in den Nukleus zu translozieren und auf transkriptioneller Ebene regulatorisch

wirksam zu werden – und zwar sowohl als Vorläuferprotein als auch in reifer Form (Boraschi et al., 2011). IL-37a-c werden in Monozyten, aktivierten B-Zellen, NK-Zellen und Keratinozyten gebildet und sind in Lymphknoten, Thymus, Knochenmark, Lunge, Hoden, Plazenta, Uterus, Haut und Dickdarm nachgewiesen worden (Dunn et al., 2001). IL-37d und IL-37e werden nur in Hoden und Knochenmark exprimiert. Im Gehirn kommt ausschließlich IL-37a vor, in der Niere IL-37b und im Herz IL-37c (Boraschi et al., 2011).

IL-36 β (IL-1F8) und IL-36 γ (IL-1F9) sind weitere IL-1Rrp2-Agonisten, die durch Anlagern von IL-1RAcP NF- κ B und MAPKs aktivieren (Boraschi et al., 2011; Dinarello, 2009).

IL-36 β ist an der Synthese von proinflammatorischen Mediatoren in Synovialfibroblasten und artikulären Chondrozyten beteiligt (Magne et al., 2006). Seine konstitutive Expression in primären Chondrozyten könnte auf eine Beteiligung bei Arthrose hindeuten (Dinarello, 2009). Überdies wird IL-36 β in Monozyten und B-Zellen gebildet und lässt sich in Knochenmark, Tonsillen, Herz, Plazenta, Lunge, Hoden und Dickdarm nachweisen (Dunn et al., 2001).

IL-36 γ ist ein proinflammatorisches Zytokin, auch wenn es bezüglich der dreidimensionalen Faltung eine große Ähnlichkeit zu IL-1Ra aufweist (Dinarello, 2009). Es wird in Epithelzellen und stimulierten Keratinozyten gebildet, ist dementsprechend in der Haut von Psoriasis-Patienten nachweisbar und zeigt eine Hochregulation seiner Expression bei chronischer Kontaktallergie sowie Herpes simplex (HSV)-Infektion, während es eine konstitutive Expression im Plattenepithel des Ösophagus und der Plazenta zeigt. Seine Aktivierung von NF- κ B in IL-1Rrp2-transfizierten Jurkat-Zellen wird durch IL-36Ra herabgesetzt (Boraschi et al., 2011; Dinarello, 2009; Dunn et al., 2001).

Zu IL-1F10 sind weder ein Zielrezeptor noch die eigentliche Funktion bekannt (Dinarello, 2009; Pizarro et al., 2007). Es besitzt eine zu 37 % mit IL-1Ra übereinstimmende Aminosäuresequenz (Lin et al., 2001) und bindet *soluble* IL-1R1 (sIL-1R1), die lösliche Variante von IL-1R1 (Boraschi et al., 2011). IL-1F10 kommt in den Basalzellen der Epidermis, B-Zellen in den Tonsillen sowie der Milz vor (Dinarello, 2009; Dunn et al., 2001).

IL-33 (IL-1F11) weist in seiner Struktur eine größere Ähnlichkeit zu IL-18 auf als zu IL-1 β (Schmitz et al., 2005). Durch Bindung an seinen Zielrezeptor „Interleukin-1 receptor-like receptor 1“ (T1/ST2), welcher Ähnlichkeit zu IL-1R1 und IL-18Ra aufweist (Bergers et al., 1994), und Komplexbildung mit IL-1RAcP leitet IL-33 infolge der Aktivierung von NF- κ B und MAPKs mit konsekutiver Induktion von IL-4, IL-5 und IL-13 eine TH2-Antwort ein (Boraschi et al., 2011; Schmitz et al., 2005). Neben seiner proinflammatorischen Wirkung, die es über eine Ligand-Rezeptor-Bindung entfaltet, ist IL-33 auf nukleärer Ebene als transkriptioneller Repressor durch Bindung an Heterochromatin und mitotische

Chromosomen (Carriere et al., 2007; Dinarello, 2009) auch an antiinflammatorischen Prozessen beteiligt (Gadina et al., 2007; Sanada et al., 2007). IL-33 wird konstitutiv in humanem Lungenepithel, glatten Muskelzellen, und Endothelzellen in hochendothelialen Venolen (HEV) exprimiert, nach Stimulation durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α in Fibroblasten, Keratinozyten und in geringer Konzentration auch in Knochenmarksmakrophagen und dendritischen Zellen. In ruhenden Makrophagen und dendritischen Zellen oder T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und PBMC kommt IL-33 nicht vor (Boraschi et al., 2011).

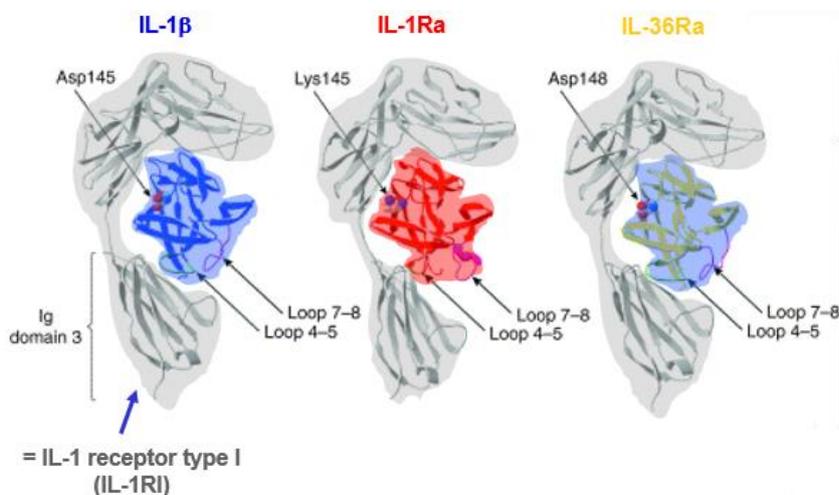


Abbildung 2: Strukturelle Ähnlichkeit zwischen IL-1 β , IL-1Ra und IL-36Ra.

IL-1 β (blau), IL-1Ra (rot) und IL-36Ra (gelb) binden allesamt über konservierte Stränge zwischen Schleife 4 und 5 (grün) sowie Schleife 7 und 8 (rosa) an die Immunglobulin-Domäne 3 des IL-1-Rezeptors Typ I (grau). Im Gegensatz zu IL-1 β und IL-36Ra bewegt sich dabei die Immunglobulin-Domäne 3 von IL-1RI nicht auf IL-1Ra zu. Angezeigt sind außerdem Liganden-spezifische Aminosäuren: Asp 145 in IL-1 β , Lys145 in IL-1Ra und Asp148 in IL-36Ra.

(Modifiziert nach Prof. Dr. M. Kracht, Gießen aus Dunn et O'Neill, Trends Immunol., 2001)

1.2 Die klinische Bedeutung von Interleukin-1

1.2.1 Die Rolle von Interleukin-1 bei entzündlichen Prozessen

Als multifunktionelles Zytokin, das entweder alleine oder in Kombination mit anderen Mediatoren auf annähernd jeder Zellart eine Wirkung entfalten kann, kommt Interleukin-1 eine immens wichtige Bedeutung bei der Einleitung, Aufrechterhaltung und Eindämmung entzündlicher Geschehen im menschlichen Organismus zu. Sowohl bei akut-entzündlichen Ereignissen wie z.B. akuten Infektionskrankheiten, Traumata oder akuter Ischämie als auch bei chronisch-entzündlichen Prozessen wie z.B. chronischen Infektionskrankheiten, autoimmunologischen und proliferativen Erkrankungen werden erhöhte IL-1-Konzentrationen

insbesondere im Blut aber auch in Geweben von Patienten gemessen. Bei Abstoßungsreaktionen in der Transplantationsmedizin nimmt IL-1 ebenfalls eine tragende Rolle ein (Dinarello, 1996).

Während viele andere Zytokine auf direktem Wege die Funktion, Differenzierung und Proliferation von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems steuern, erfolgt die IL-1-vermittelte Immunantwort indirekt über die aufgrund der Aktivierung zahlreicher positiver sowie negativer Rückkopplungsmechanismen sehr rasche wie transiente Expression eines großen Repertoires an Zielgenen. Beispielsweise induziert IL-1 die Synthese von Cyclooxygenase-2 (COX-2) und „Inducible nitric oxide synthase“ (iNOS), welche ihrerseits die Produktion von Prostaglandin-E2 (PGE2) bzw. Stickstoffmonoxid (NO) einleiten. PGE2 ist ebenso an der Entstehung von Fieber beteiligt wie auch an der Herabsetzung der Schmerzschwelle, während NO eine Vasodilatation bewirkt (Dinarello, 2009; Gaestel et al., 2009a).

Über die Expression von Chemokinen wie Interleukin-8 (Baggiolini et al., 1992) und Adhäsionsmolekülen wie „Intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) auf Mesenchymzellen oder „Vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1) auf Endothelzellen initiiert IL-1 den Übertritt von immunkompetenten Zellen aus dem systemischen Kreislauf an den Ort des entzündlichen Geschehens, was insbesondere bei chronisch-entzündlichen Prozessen, in denen die Balance zwischen den Rückkopplungsmechanismen gestört ist, einen Gewebeumbau zur Folge hat (Dinarello, 2009; Gaestel et al., 2009a).

1.2.1.1 Die Rolle von IL-1 bei autoinflammatorischen und autoimmunologischen Erkrankungen

Es gibt eine ganze Reihe an Erkrankungen, denen eine Fehlregulation bei der Generierung von oder Signalfortleitung durch IL-1 zugrunde liegt. Homozygote Mutationen oder Deletionen im Gen, das für IL-1Ra kodiert, führen zu Krankheitsbildern, die durch schwere systemische Entzündungsprozesse gekennzeichnet sind (Aksentijevich et al., 2009; Reddy et al., 2009). Ein Polymorphismus in diesem Gen könnte auch an der Entstehung von Psoriasis und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt sein (Dinarello, 1996).

Seltene autoinflammatorische (Erb-)Krankheiten wie etwa das familiäre Mittelmeerfieber (FMF) oder Formen des Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndroms (CAPS), die sich sowohl an der Haut als auch systemisch (z.B. durch Fieber, Arthralgien) manifestieren, sind auf Mutationen in Bestandteilen des NALP3-Inflammasoms, welches die Prozessierung und

Freisetzung von Interleukin-1 β reguliert, zurückzuführen (Dinarello, 2009; Farasat et al., 2008; Martinon et al., 2009).

Welche Rolle die neueren Mitglieder der IL-1-Familie bei autoinflammatorischen bzw. autoimmunologischen Erkrankungen spielen, ist noch weitgehend unklar; zumindest werden IL-18 und IL-36 α mit Psoriasis in Verbindung gebracht (Dinarello, 2009), während auch IL-36Ra und IL-36 γ in der Haut von Psoriasis-Patienten nachgewiesen worden sind (Dunn et al., 2001). IL-18 scheint überdies als Mediator u.a. bei systemischem Lupus erythematoses (SLE), rheumatoider Arthritis, Diabetes mellitus Typ I und Morbus Crohn zu fungieren (Dinarello, 2009).

Die hohe Effektivität von IL-1-Hemmstoffen bei der Therapie autoinflammatorischer Erkrankungen unterstreicht die zentrale Bedeutung von IL-1 α und IL-1 β für die Genese und Aufrechterhaltung einer Vielzahl von autoinflammatorischen Erkrankungen. Auch bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen, die in erster Linie von TNF- α und nur sekundär von IL-1 getriggert werden, kann sich der Einsatz von IL-1-Hemmstoffen vorteilhaft auswirken. (Dinarello, 2009; Gaestel et al., 2009a).

1.2.1.2 Die Rolle von IL-1 bei Tumorerkrankungen

Interleukin-1 β begünstigt im Knochenmark die Differenzierung von Stammzellen zu myeloischen Vorläuferzellen (Dinarello, 2009). Spontane Genexpression und Synthese von IL-1 β ist mehrfach in den leukämischen Zellen aus dem peripheren Blut oder Knochenmark von Patienten mit akut oder chronisch myeloischer Leukämie (AML/CML) nachgewiesen worden, aber auch in denen von Patienten mit akut oder chronisch lymphatischer Leukämie (ALL/CLL), adulter T-Zell-Leukämie, Haarzellleukämie und Plasmozytom. IL-1 β induziert in leukämischen Zellen die Produktion von Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) und fördert dadurch deren Proliferation (Dinarello, 1996).

Des Weiteren ist eine konstitutive Expression und Synthese von IL-1 α und IL-1 β in Melanomen, Hepatoblastomen, Sarkomen, Epithel-, Urothel- und Ovarialzellkarzinomen beschrieben worden. Hierbei induziert IL-1 die Produktion von Zytokinen wie IL-6, „Transforming growth factor- β “ (TGF- β), kolonie-stimulierenden Faktoren, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren, die entweder von den Tumorzellen selbst oder tumorzellabhängig in Fibroblasten bzw. Endothelzellen synthetisiert werden. Somit hat IL-1 eine zentrale Stellung für Wachstum, Metastasierung und Gefäßneubildung solider Tumoren (Dinarello, 1996; Voronov et al., 2003). Für IL-1 sind aber auch Effekte auf Mechanismen der Tumorzellwachstumshemmung/-reduktion wie vermehrte Induktion eines Zellzyklusarrests,

Freisetzung von Sauerstoffradikalen, und Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten gezeigt worden (Dinarello, 1996).

IL-1 steuert pro- bzw. antitumorogene Prozesse in Abhängigkeit davon, ob es – überwiegend in Form des membrangebundenen IL-1 α – auf unmittelbar benachbarte (Tumor-)Zellen einwirkt oder als IL-1 β in die Umgebung sezerniert wird und einwandernde Monozyten und neutrophile Granulozyten stimuliert (Dinarello, 2009). Membrangebundenes IL-1 α wirkt immunstimulatorisch. In niedriger Konzentration induziert auch IL-1 β eine lokale Entzündungsreaktion mit konsekutiver Tumorzellvernichtung durch spezifische Immunprozesse. In hoher Konzentration führt IL-1 β in der Mikroumgebung von Tumoren über Aktivierung und Rekrutierung sog. Tumor-assoziiertes Makrophagen (TAM), die sich aus unreifen myeloiden Zellen mit immunsuppressiver Funktion - deswegen auch als „Myeloid-derived suppressor cells“ (MDSC) bezeichnet - differenzieren (Gabrilovich et al., 2009), zu Tumorinvasion und Metastasenbildung (Apte et al., 2008). TAM sind ihrerseits genauso in der Lage, IL-1 zu sezernieren. Dies bewirkt in Endothelzellen die Synthese von „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF) und fördert dadurch Angiogenese und Tumorprogression. Hierbei induzieren sich IL-1 und VEGF gegenseitig. Die Beobachtung, dass die Hemmung von IL-1 die Differenzierung von unreifen myeloiden Zellen zu M1-Makrophagen begünstigt und sich dies negativ auf Tumorprogression auswirkt, bietet einen weiteren Ansatz für die Behandlung von Tumorerkrankungen (Carmi et al., 2013).

1.3 Pharmakologische Angriffspunkte im Interleukin-1-Signalweg

1.3.1 Interleukin-1-Hemmstoffe

In Anbetracht der Schlüsselrolle von Interleukin-1 für die Entstehung und Aufrechterhaltung chronisch-entzündlicher Prozesse, die sich zum Beispiel im Rahmen von autoinflammatorischen Erkrankungen bereits im Kindesalter in Form von teils sehr schweren systemischen Krankheitsbildern mit ungünstiger Prognose manifestieren, sind Hemmstoffe gegen IL-1 entwickelt worden, welche bereits auf Rezeptorebene die Einleitung IL-1-gesteuerter Mechanismen unterbinden und somit eine geeignete Therapieoption darstellen (Abb.3). Dabei gilt jedoch zu berücksichtigen, dass der individuelle klinische Nutzen für den Patienten das ausschlaggebende Kriterium für den Einsatz dieser Medikamente sein muss, denn es ist verständlich, dass die Blockade eines multifunktionellen Zytokins mit solcher potenter proinflammatorischer Wirkung mit unerwünschten bis hin zu lebensbedrohlichen Nebenwirkungen einhergehen kann.

1.3.1.1 Anakinra – Der rekombinante IL-1-Rezeptorantagonist

Anakinra (IL-1ra) ist ein in Analogie zu IL-1Ra synthetisch hergestellter IL-1-Rezeptorantagonist. Über eine hochaffine Bindung zu IL-1R1 verhindert er das Andocken von IL-1 α und IL-1 β an ihren Zielrezeptor und unterbindet somit die aus der Ligand-Rezeptor-Bindung hervorgehende Signaltransduktion (Abb.3B).

Anakinra ist zugelassen zur Therapie der rheumatoiden Arthritis und ist die Standardtherapie beim Morbus Still. Weitere Anwendungsgebiete sind autoinflammatorische Erkrankungen wie z.B. das Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrom, zu dem das familiäre kälteinduzierte autoinflammatorische Syndrom (FCAS), Muckle-Wells-Syndrom (MWS) und chronische infantile neuro-kutaneo-artikuläre Syndrom (CINCA-Syndrom) zählen, oder Pyogene Arthritis, Pyoderma gangraenosum und Akne-Syndrom (PAPA-Syndrom) (Dinarello, 2009).

Anakinra ist auch wirksam – aber nicht zugelassen – für die Behandlung von Diabetes mellitus Typ II sowie akuter und chronischer Gicht (Dinarello, 2009).

1.3.1.2 Rilonacept – Der lösliche IL-1-Rezeptor

Als dimeres Fusionsprotein, bestehend aus den Liganden-bindenden Domänen des extrazellulären Anteils von IL-1R1 sowie seines Co-Rezeptors IL-1RAcP in Verknüpfung mit dem Fc-Anteil von humanem Immunglobulin G1 (IgG1), hat Rilonacept die Funktion eines löslichen IL-1-Rezeptors, der sowohl IL-1 α als auch IL-1 β abfängt, bevor sie an ihren Zielrezeptor binden und ihre proinflammatorische Wirkung entfalten, wobei seine Affinität zu IL-1 β stärker ausgeprägt ist (Dinarello, 2009; Kapur et al., 2009) (Abb.3C).

Indikationen für die Anwendung von Rilonacept sind primär Krankheitsbilder aus dem Formenkreis des CAPS (Hoffman, 2009).

1.3.1.3 Canakinumab – Der monoklonale anti-IL-1-Antikörper

Mit Canakinumab ist ein komplett humaner monoklonaler anti-IL-1 β -Antikörper entwickelt worden (Abb.3D), der aufgrund seiner hohen Spezifität keinerlei Kreuzreaktionen zu anderen Mitgliedern der IL-1-Familie, insbesondere IL-1 α , aufweist. Sein therapeutischer Nutzen ist bei der Behandlung des CAPS nachgewiesen worden. Seine Vorteile bestehen darin, dass es im Gegensatz zu Anakinra (täglich) und Rilonacept (wöchentlich) nur einmal in acht Wochen appliziert werden muss und nach subkutaner Injektion an der Einstichstelle seltener allergische Reaktionen hervorruft (Church et al., 2009; Lachmann et al., 2009b; Lachmann et al., 2009a).

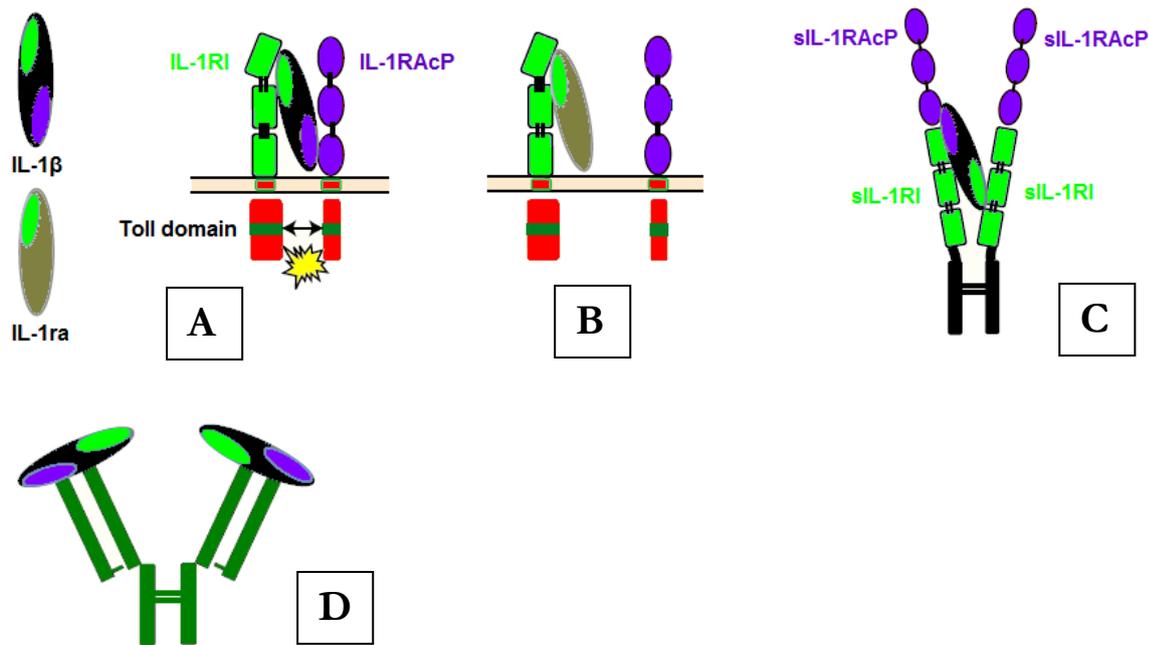


Abbildung 3: Interleukin-1-Hemmstoffe.

A) IL-1 β (schwarz) bindet an IL-1R1 (hellgrün) und den Co-Rezeptor IL-1RAcP (violett), welche in der Folge dimerisieren und eine Signalfortleitung bewirken.

B) Der IL-1-Rezeptorantagonist Anakinra (IL-1ra, olivgrün) bindet nur an IL-1R1 und verhindert die für die Signalfortleitung nötige Dimerisierung von IL-1R1 und IL-1RAcP.

C) Der lösliche IL-1-Rezeptor Rilonacept besteht aus löslichen IL-1R1- und IL-1RAcP-Anteilen und fängt IL-1 β ab.

D) Der monoklonale anti-IL-1-Antikörper Canakinumab (dunkelgrün) bindet spezifisch an IL-1 β und verhindert so das Andocken an IL-1R1.

(Modifiziert nach Prof. Dr. M. Kracht, Gießen aus Dinarello, C., Nature Medicine, 2003)

1.4 Fragestellung

Für das Verständnis der vielfältigen und weitreichenden Wirkung von Interleukin-1 in physiologischen, aber vor allem auch in pathophysiologischen Situationen wäre eine recherchierbare Zusammenfassung der vorhandenen wissenschaftlichen Erkenntnisse über die molekularen Komponenten und Reaktionsmechanismen, die an der IL-1-Signaltransduktion beteiligt sind, in Form einer Datenbank und einer visualisierten Darstellung aller Informationen eine große Hilfe.

Zu Beginn dieser Doktorarbeit existierten bereits vereinfachte Abbildungen des IL-1-Signalwegs, in denen gut belegte Grundprinzipien und wichtige Schlüsselemente anschaulich dargestellt sind und welche Ansatzpunkte für weitere Forschung bieten:

<http://www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP195> (Stand 20.01.2010)

http://www.netpath.org/reactions?path_id=NetPath_13 (Stand 20.01.2010)

Da die Hauptfunktion von IL-1 in der Initiierung und Koordinierung hochkomplexer proinflammatorischer Prozesse besteht, wäre ein möglichst breites und detailliertes Wissen

über die Zusammenhänge sowie die zeitliche und räumliche Abfolge der einzelnen Reaktionsschritte innerhalb der Signalfortleitung mitsamt der Regulation durch Rückkopplungsmechanismen hilfreich, um in Zukunft spezifischere Ansätze für die Therapie von z.B. chronisch-entzündlichen Erkrankungen abzuleiten. Das Ganze basiert auf der Annahme, dass eine selektivere pharmakologische Hemmung einzelner Abschnitte des IL-1-Netzwerks eine individualisiertere oder auch nebenwirkungsärmere Therapie verschiedener entzündlicher Krankheitsbilder ermöglichen könnte (Gaestel et al., 2009b; Gaestel et al., 2009a).

Aus diesen Überlegungen ergibt sich die Rationale einer Erstellung einer Signaltransduktionskarte für die beiden Gründungsmitglieder der IL-1-Familie IL-1 α und IL-1 β (Auron et al., 1984; Lomedico et al., 1984). Diese sollte in folgenden Teilschritten erfolgen:

- 1) Auswählen geeigneter Literatur über IL-1
- 2) Extrahieren von Ergebnissen zu Komponenten des IL-1-Signalwegs
- 3) Graphische Darstellung der gewonnenen Erkenntnisse in einer IL-1-Signaltransduktionskarte
- 4) Verknüpfen von Informationen mit den jeweiligen Symbolen innerhalb der Signaltransduktionskarte
- 5) Projizieren von Genexpressionsdaten auf die IL-1-Signaltransduktionskarte

2 Material und Methoden

2.1 Software

	Software	Entwickler
Betriebssystem	Linux Kubuntu 8.0.4 (2.6.24-28-generic)	Ubuntu Foundation
Windows Emulator	CrossOver Linux 6.2.0	CodeWeavers
Internet Browser	Opera 11.00	Opera Software ASA
	Mozilla Firefox 3.6.13	Mozilla Foundation
Literaturverwaltung	Reference Manager 10	Thomson ResearchSoft
PDF-Dateibetrachter	Adobe Reader 9	Adobe Systems
Erstellung von Textdateien und Tabellen	Microsoft Office 2002 (Word, Excel)	Microsoft Corporation
Anzeige und Editierung biologischer Signalwege	PathVisio 2.0	BiGCaT Bioinformatics, Maastricht University
Texteditor	Notepad++ v5.4.5	Don Ho
	Kate 2.5.10 (KDE 3.5.10)	KDE
RNA-Qualitätskontrolle	Agilent 2100 expert software version B.02.05.SI360	Agilent Technologies
RNA- Konzentrationsbestimmung	ND-1000 V3.5.2	Coleman Technologies
Analyse der Real-Time PCR- Daten	Sequence Detection System Software v1.4, 7500 Fastsystem Software	Applied Biosystems
Analyse und Präsentation von wissenschaftlichen und technischen Daten	SigmaPlot 11.0	Systat Software

Tabelle 2: Überblick über die verwendete Software.

2.2 Verbrauchsmaterial

Plastikwaren, Einwegmaterial (z.B. Pipettenspitzen, Eppendorfgefäße) und Ähnliches wurden von den Firmen Biozym, Eppendorf, Gilson, Greiner, Integra Biosciences, Roth und Sarstedt bezogen.

2.3 Geräte

- *Elektrophorese-, Westernblotsysteme*

Biometra Power Pack P25

Biorad Mini PROTEAN™ 2 Elektrophoresekammer

Hoefer SemiPhor semi-dry transfer unit Blotting Apparatur

Roti®-PVDF Blotting-Membran

- *Mikroskope*

Leica DM IL LED

- *Verschiedenes*

Agilent 2100 Bioanalyzer

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System

Biometra TProfessional Thermocycler

ELMI Intelli-Mixer RM-2L

Eppendorf Thermomixer compact

Heidolph Vortex-Gerät

Peqlab Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000

Unitron HT-Infors Inkubationsschüttler

Ziegra Eismaschine

- *Zellkultur*

GFL Wasserbad

Heraeus Brutschrank CO₂ Autozero

Heraeus Sicherheitswerkbank HS 15

- *Zentrifugen*

Beckman Coulter TJ-25 Centrifuge

Eppendorf Centrifuge 5415 R

Eppendorf Centrifuge 5424

2.4 Chemikalien, Lösungsmittel und Wasser

Acrylamid/Bisacrylamid → Roth

APS → Merck

β-Mercaptoethanol → Sigma

DEPC-Wasser → Ambion

Ethanol → Sigma

Ficoll-Paque™ → GE Healthcare

Glycerol → Merck

Ponceau S Lösung 0,1 % (w/v) in 5 % Essigsäure → Sigma

SDS → Serva

TEMED → Sigma

Wasser für die Molekularbiologie → AppliChem

2.5 Enzyme

DNase I (RNase-frei), 2 U/μl → Applied Biosystems

M-MuLV Reverse Transkriptase, 20 U/μl → MBI Fermentas

2.6 Allgemeine Puffer und Lösungen

5x RT-Puffer → MBI Fermentas

10x Elektrophoresepuffer: 250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 0,1 % SDS → Merck

10x Semi Dry Blotpuffer: 30,25 g Tris; 144,2 g Glycin; 20 % Methanol → Merck

Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca & Mg → PAA Laboratories

R1-Lysepuffer → Macherey-Nagel NucleoSpin® RNA II Kit

Roti®-Load 1 Auftragspuffer (4fach-Konzentration) → Roth

Sammelgelpuffer: 1M Tris (pH 6,8) → Merck

Trenngelpuffer: 1M Tris (pH 8,8) → Merck

2.7 Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien

dNTP-Mix, 10mM → MBI Fermentas

Filterpapier → Whatman

Macherey-Nagel NucleoSpin® RNA II Kit

peqGOLD Prestained Protein-Marker IV → PEQLAB

Random Hexamer Primer → MBI Fermentas

TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x) → Applied Biosystems

TaqMan® Gene Expression Assays (*βACTIN*, *GADD45β*, *GUSβ*, *IL6*, *IL8*, *IRAK2*, *PELLINO1*) → Applied Biosystems

Zellkulturmaterial:

DMEM-Vollmedium (10 % (v/v) FKS, 2 mmol/l L-Glutamin, 1 mmol/l Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) → PAA Laboratories

Trypsin-EDTA → PAA Laboratories

Trypanblau 0,4 % → Sigma

2.8 Stimuli, Antikörper und rekombinante Proteine

Lipopolysaccharid (LPS), E. coli Serotyp O55:B5, 1 mg/ml

→ Sigma, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. M. Lienhard Schmitz, Gießen (Deutschland)

Humanes, rekombinantes IL-1 α , 10 µg/ml

→ Prof. Dr. Jeremy Saklatvala, London (England)

Humaner, rekombinanter TNF- α , 10 µg/ml

→ ImmunoTools

Humaner, rekombinanter IL-1-Rezeptorantagonist Anakinra (Kineret), 150 mg/ml

→ Amgen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ulf Müller-Ladner, Bad Nauheim (Deutschland)

Humaner, monoklonaler anti-TNF- α -Antikörper Adalimumab (Humira), 50 mg/ml

→ Abbott, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ulf Müller-Ladner, Bad Nauheim (Deutschland)

2.9 Visualisierung gesammelter Daten aus der Literatur

Mithilfe des Programms *Reference Manager 10*, das Literaturdatenbanken erstellt und verwaltet, wurde über eine integrierte Suchfunktion anhand spezifischer Kriterien wie Autor, Publikationsdatum, Journal, Schlüsselbegriff, etc. Literatur über IL-1 aus dem *World Wide Web* ausgewählt und mitsamt der bereits freundlicherweise von Prof. Dr. Michael Kracht, Gießen (Deutschland) ausgesuchten Literatur in einer Datenbank verwaltet. Die Verknüpfung zu *PubMed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> - Stand 17.01.2010) ermöglichte einen direkten Zugriff auf die Originalarbeiten im *PDF*-Format. Diese wurden lokal gespeichert und waren über Verlinkungen zur Datenbank stets abrufbar. Die Ergebnisse aus den Originalarbeiten wurden in einer *Excel*-Tabelle gesammelt und anschließend mit dem Tool *PathVisio* unter Verwendung von Grafiksymbolen wie farbigen Rechtecken, Pfeilen, etc. visualisiert. Dabei erfolgte die Bearbeitung der graphischen Darstellung entweder direkt in *PathVisio* oder indirekt über einen kompatiblen Texteditor (*Notepad ++* bzw. *Kate*).

2.10 Gewinnen, Aufarbeiten, Stimulieren und Lysieren von humanen PBMC

Zur Gewinnung der PBMC wurden antikoagulierte Vollblutproben von jeweils drei gesunden Donoren (D1, D2, D3) freundlicherweise von der Blutbank der Universitätsklinik Gießen zur Verfügung gestellt (entsprechend Ethikvotum der Blutbank, Aktenzeichen 05/00).

Die Vollblutproben wurden zunächst 20 min lang mit 1650 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dadurch entstand ein „Buffy Coat“ als Grenzschicht zwischen dem Plasma und den während der Zentrifugation entsprechend ihrer hohen Dichte in Richtung des Proben-Bodens gewanderten Erythrozyten. Der „Buffy Coat“ setzt sich aus Leukozyten und Thrombozyten zusammen. Um PBMC aus dem „Buffy Coat“ zu isolieren, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von Ficoll-Paque™ (spezifische Dichte 1,077 g/ml) durchgeführt: hierbei wurden jeweils 20 ml „Buffy Coat“ vorsichtig abpipettiert und in drei sterile 50 ml Falcon™ Tubes überführt. Anschließend erfolgte eine Verdünnung mit je 30 ml PBS. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 30 ml in vier weiteren sterilen 50 ml Falcon™ Tubes auf 15 ml Ficoll-Paque™ geschichtet und danach eine Zentrifugation über 30 min mit 360 g bei Raumtemperatur ohne Bremse durchgeführt. Dadurch sammelten sich die PBMC in einer Interphase zwischen dem aus Plasma und Thrombozyten bestehenden Überstand und der Ficoll-Schicht an. Das Zellsediment bildeten Granulozyten und Erythrozyten. Die Interphaseringe wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig abpipettiert, in

zwei sterile 50 ml Falcon™ Tubes überführt und darin mit PBS jeweils auf 50 ml verdünnt. Danach erfolgte eine Zentrifugation mit 460 g über 10 min. Der Überstand wurde verworfen und der letzte Waschschrift mit 80 g über 10 min wiederholt. Anschließend wurden die Zellpellets mit dem für die gesamten Proben vorgesehenen Volumen an zuvor aufgehobenem Plasma versehen und die Zellsuspension auf beschriftete RNase-freie Eppendorfgefäße verteilt (i.d.R. je 1 ml). Zusätzlich wurden 10 µl Zellsuspension auf ein Hämocytometer (Neubauer Zählkammer) aufgetragen und mikroskopisch gezählt (siehe 2.11.13).

Die Stimulation erfolgte mit LPS, das in einer Ausgangskonzentration von 1 mg/ml vorlag. Die jeweils erforderlichen Konzentrationen wurden mittels Verdünnungsreihe unter Verwendung des zuvor gesammelten Plasmaüberstands hergestellt. Wenn die Proben vorher mit Anakinra (Stammlösung 150 mg/ml) bzw. Adalimumab (Stammlösung 50 mg/ml) inkubiert wurden, waren die benötigten Konzentrationen jeweils durch Verdünnung in DEPC-Wasser hergestellt worden. Nach der Stimulation wurden die Eppendorfgefäße jeweils einmal vorsichtig geschwenkt und die Proben entweder gleich weiterverarbeitet oder nach Platzierung auf einem Eppendorfgefäßständer oder ELMI Intelli-Mixer RM-2L, der mit 2 min⁻¹ rotierte, bei 37 °C für die jeweilige Stimulationsdauer ohne kontrollierten CO₂-Gehalt in einem Wärmeschrank inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Stimulationsdauer wurden die Proben auf Eis gelegt und anschließend mit 1600 g 5 min lang bei 4 °C zentrifugiert. Gleich darauf wurden die Zellpellets mit je 0,5 ml PBS (4 °C) gewaschen und die Proben 5 min lang mit 300 g bei 4 °C zentrifugiert. Schließlich erfolgte das Lysieren der Zellen, indem die Pellets jeweils in einem Gemisch aus 350 µl RA1-Lysepuffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol resuspendiert wurden. In der Folge wurden die Proben entweder direkt weiterverarbeitet oder bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

2.11 Zellkulturtechniken

2.11.1 Zelllinien und primäre Zellen

- **HEK293IL-1R**: Humane, adenovirus-transformierte, embryonale Nierenzelle, welche stabil mit einem Expressionsvektor für den Typ I IL-1R transfiziert worden ist; Prof. Dr. K. Matsumoto, Nagoya, Japan
- **HeLa-tTA**: Humane, epitheloide Cervix-Carcinoma-Zelllinie, stabil transfiziert mit dem Tetrazyklin-Transaktivator; Prof. Dr. M. Lienhard Schmitz, Gießen

2.11.2 Kultivieren und Passagieren adhärent wachsender Zellen

Die verwendeten Zelllinien sind adhärent und wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 37 °C, 5 % CO₂ und einer wassergesättigten Atmosphäre in DMEM-Vollmedium [10 % (v/v) FKS, 2 mmol/l L-Glutamin, 1 mmol/l Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin] kultiviert.

Das Passagieren adhärent wachsender Zellen erfolgte, sobald die Zellen einen zusammenhängenden Zellrasen gebildet hatten. Zunächst wurden sie zweimal mit 10-15 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2-4 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Beklopfen der Zellkulturflasche abgelöst und in 26-28 ml DMEM-Vollmedium resuspendiert.

2.11.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch in einem Hämocytometer (Neubauer Zählkammer), indem die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau (0,4 %) versetzt wurde. Lebende Zellen sind in der Lage, Trypanblau aktiv auszuscheiden, wohingegen tote oder geschädigte Zellen dazu nicht mehr in der Lage sind und blau angefärbt werden. Um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten, wurde zunächst mit kleiner Vergrößerung kontrolliert, ob die Zellen gleichmäßig in der Kammer verteilt waren, anschließend wurden vier Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

Anzahl der Zellen/ml = $\text{Summe der Zellen aller Großquadrate} / 4 * 10.000 * \text{Verdünnungsfaktor}$.

2.11.4 Aufteilen von Zellen

Die Zellen wurden gleichmäßig auf eine 6-Well-Platte aufgeteilt, sodass je nach Platte die Zellzahl 3,5-10 x 10⁵ pro Well betrug. Die Wells wurden mit Medium auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt und die Platte bis zum Gebrauch bei 37 °C gelagert.

2.11.5 Stimulieren, Ernten und Lysieren von Zellen

Die Stimulation der Zellen erfolgte mit IL-1 α in einer Konzentration von 10 bzw. 20 ng/ml nach 0,5 h Vorinkubation mit 0,1 µg/ml; 1 µg/ml und 10 µg/ml oder ohne Anakinra, das aus seiner Ausgangskonzentration von 150 mg/ml mittels DEPC-Wasser verdünnt worden war. Die 6-Well-Platte wurde entsprechend der Stimulationsdauer bei 37 °C im Brutschrank

gelagert. Zum Ernten der Zellen wurden diese zunächst zweimal mit PBS (4 °C) gewaschen. Die Lyse wurde mit einem Gemisch aus 350 ml RA1-Lysepuffer und 3,5 ml β -Mercaptoethanol herbeigeführt. Die Zellysate wurden daraufhin abgeschabt, in beschriftete Eppendorfgefäße überführt und entweder direkt weiterverarbeitet oder bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

2.12 Molekularbiologische Techniken für Genexpressionsanalysen

2.12.1 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

2.12.1.1 Isolierung von RNA aus humanen Zelllinien

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Lysaten der PBMC sowie der Zellen vom Typ HEK293IL-1R bzw. HeLa-tTA erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des *RNeasy Mini-Kits* von Macherey und Nagel. Nach der Aufreinigung über Silicagel-Säulen erfolgte die Elution der RNA in 20 μ l RNase-freiem Wasser. In manchen Fällen wurde das Eluat nach dem Zentrifugieren nochmals auf die jeweilige Silicagel-Säule geladen, um die Ausbeute an RNA zu optimieren. Die RNA wurde gleich weiterverarbeitet oder bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

2.12.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.12.2.1 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung für RNA erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm. Um etwaige Verunreinigungen von Proteinen detektieren zu können, erfolgte die Aufnahme der Spektren stets in einem Bereich von 220-350 nm, wobei das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt wurde. Diese Ratio sollte für RNA idealerweise 2,0 betragen. Werte deutlich <2,0 sprechen für eine Kontamination mit Proteinen, wohingegen Werte, die weit >2,0 liegen, auf eine Verunreinigung mit DNA hinweisen. Der Berechnung der Konzentration wurde folgendes Verhältnis zur optischen Dichte bei 260 nm zugrunde gelegt: $OD_{260\text{ nm}} 1 \cong 40 \mu\text{g RNA/ml}$.

2.12.3 Real-Time RT-PCR zur Amplifikation spezifischer mRNA-Sequenzen

Um mRNA amplifizieren zu können, muss diese zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Für diesen Schritt werden als Reverse Transkriptasen bzw. RNA-abhängige DNA-Polymerasen bezeichnete Enzyme verwendet. Zur reversen Transkription der Zell-mRNA werden außerdem Oligo-(dT)-Primer (mit einer Länge von 12-20 Basen), die an den Poly(A)-Schwanz der mRNA binden, oder Gemische aus Zufalls-Hexamer-Primern (Random Hexamer Primer), bestehend aus sechs zufällig zusammengesetzten Basen, eingesetzt. Die Gesamtreaktion aus Reverser Transkription (RT) und Amplifikation der cDNA durch eine „Polymerase chain reaction“ (PCR) wird entsprechend als RT-PCR bezeichnet.

Ein Ansatz für eine RT-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

15,5 µl → 0,5-1 µg RNA mit RNase-freiem H₂O aufgefüllt

4 µl → 5x RT-Puffer

0,5 µl → Random Hexamer Primer

0,5 µl → dNTP-Mix (10 mM pro Nukleotid)

0,5 µl → M-MuLV Reverse Transkriptase (20 U/µl)

Die Reverse Transkription wurde bei folgenden Temperaturzyklen durchgeführt:

23 °C → 10 min (Annealing)

37 °C → 60 min (Extension)

95 °C → 5 min (Inactivation)

Im Anschluss wurden die Proben bis auf 4 °C runtergekühlt und die RT-Reaktion beendet. Die fertigen cDNA-Proben wurden entweder gleich weiterverarbeitet oder bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert. Es ist davon auszugehen, dass während einer RT-Reaktion die mRNA, welche etwa 5 % der Gesamt-RNA ausmacht, probenunabhängig komplett in cDNA umgewandelt wird, sodass für die anschließende PCR-Reaktion gleiche Volumina aus den Proben eingesetzt werden konnten.

Die nachfolgende Real-Time PCR-Reaktion wurde nach folgendem Schema angesetzt:

9 µl → 1,5-2 µl RT-Ansatz mit RNase-freiem H₂O aufgefüllt

10 µl → TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x)

1 µl → TaqMan® Assay

Bei der Real-Time PCR werden komplementäre DNA-Stränge durch die Taq-Polymerase amplifiziert. Dabei baut die Taq-Polymerase aufgrund ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität das 5'-Ende einer mit dem komplementären DNA-Strang hybridisierenden Sonde ab, sodass die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors nicht mehr durch den am 3'-Ende liegenden Quencher unterdrückt wird und gemessen werden kann. Dies ermöglicht eine quantitative Bestimmung des cDNA-Gehalts, welcher der Menge der ursprünglichen mRNA entspricht.

Das standardmäßig verwendete Temperaturprofil zeigte das folgende Schema (50 Zyklen):

95 °C → 20 min (Hot Start)

95 °C → 3 min (Denaturation)

60 °C → 30 min (Annealing and Extension)

2.12.4 Microarray-Analysen

Die aus eigens isolierten RNA-Proben generierten *Microarray*-Daten in dieser Arbeit wurden von Herrn Dr. Oliver Dittrich-Breiholz und Frau Heike Schneider, Medizinische Hochschule Hannover (MHH) erhoben und von Herrn Dr. Axel Weber, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie in Gießen analysiert.

Die Qualitätskontrolle der nach Hannover geschickten RNA-Proben war durch einen LabChip® der Firma Agilent (RNA 6000 LabChip® *Kit*) erfolgt. Diese Methode zur Nukleinsäureanalytik beruht auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese, wobei die Detektion der RNA-Fragmente anhand eines in die RNA eingelagerten Fluoreszenzfarbstoffes erfolgt. Hierfür wurde ein sehr geringes Probenvolumen von 1-2 µl bzw. eine Probenmenge von 40 ng verwendet. Die Proben bewegen sich aufgrund eines angelegten elektrischen Feldes durch eine Mikrokapillare, und die RNA-Fragmente werden ihrer Größe entsprechend separiert und anhand der Fluoreszenz detektiert. Die Ergebnisse wurden aufgezeichnet und mit der *Agilent 2100 BioAnalyzer Software* analysiert. Hierbei wird neben dem 28S-/18S-rRNA-Verhältnis, das idealerweise bei 2,0 liegt, ein Zahlenwert von 1 bis 10 gebildet, der die Einstufung der RNA-Integrität vereinfachen soll, wobei RNA geringster Qualität den Wert 1 erhält und intakte, nicht degradierte und nicht fragmentierte RNA den Wert 10.

Der verwendete *Whole Human Genome Oligo Microarray* (G4112F, ID 014850, Agilent Technologies) enthält 41.000 Oligonukleotidsequenzen, die das humane Transkriptom abdecken. Zunächst wurde mittels *Amino Alkyl MessageAmp™ II Kit*; Ambion nach Herstellerangaben aus RNA Cy3-markierte cRNA generiert. Die cRNA-Fragmentierung, Hybridisierung sowie die Waschschriffe entsprechen dem *Agilent's One-Color Microarray-*

Based Gene Expression Analysis-Protokoll V5.7 (<http://www.agilent.com> – Stand 19.01.2011), wobei 400 ng von jeder markierten cRNA-Probe für die Hybridisierung eingesetzt wurden. Die Slides wurden am Agilent Micro Array Scanner G2505 B in zwei verschiedenen Photomultiplier-Tube (PMT)-Einstellungen (100 % und 5 %) gescannt, um den dynamischen Messbereich zu erweitern. Die Datenextraktion wurde mithilfe der *Feature Extraction Software V9.5.3.1* unter Verwendung der empfohlenen Protokoll-Datei für eine Standardextraktion (GE1-v5_95_Feb07.xml) durchgeführt. Die erhobenen Rohdaten wurden mit der *Genespring GX-Software, Version 12.0* (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) normalisiert und analysiert. Die Daten wurden entsprechend der Standardvorgehensweise in *Genespring GX* log₂-transformiert und auf die 75. Perzentile des jeweiligen Arrays normalisiert. Für die Ermittlung der Zahlen von regulierten Genen wurden nur Gensonden ausgewertet, denen sich eine Entrez Gene-ID (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> - Stand: 20.01.2010) zuordnen ließ und deren Messwerte folgende Kriterien erfüllten: Die Regulation musste mindestens zweifach und in den entsprechenden experimentellen Wiederholungen konsistent in die gleiche Richtung gemessen sein und der „Roh“-Messwert der Fluoreszenz musste in mindestens der Hälfte der Fälle über 50 liegen. Messwerte, die in *GeneSpring GX* als „not detected“ oder „compromized“ markiert waren, wurden als nicht messbar gewertet. Sofern mehrere Gensonden für dasselbe Gen existierten, wurde die Sonde mit den meisten Regulationsereignissen über alle Experimente ausgewählt.

2.13 Proteinbiochemische Techniken

2.13.1 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli

Proteine werden in einem Polyacrylgel in Abhängigkeit von ihrer Gesamtladung und Größe aufgetrennt. Dabei können Größenunterschiede durch die Ladung ausgeglichen werden, sodass sich auch unterschiedlich große Proteine mit gleicher Geschwindigkeit auf die Anode zubewegen können. Durch die Verwendung von SDS (Natriumdodecylsulfat) werden alle nicht kovalenten Bindungen innerhalb eines Proteins zerstört, das Protein denaturiert und negative Ladungen in die denaturierte Polypeptidkette eingeführt, sodass die Proteine – entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt – zur Anode wandern, wobei die Beweglichkeit eine Funktion der Logarithmen ihrer Molekulargewichte ist (dies gilt streng nur für die Beweglichkeit von Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 12-70 kDa). Es wurde unter Verwendung von DEPC H₂O; 50 % Glycerol; Sammelgel Puffer (pH 6,8); Trenngel Puffer (pH 8,8); 30 % AA/BA; 2 % SDS; 40 % APS und TEMED ein 8-15 %-iges

SDS-Gradienten-Minigel hergestellt. Die Proben wurden im Verhältnis 4:1 mit Roti®-Load 1 Auftragspuffer versetzt, ggf. zur Proteindenaturierung 10 min bei 95 °C aufgekocht, kurz anzentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Der Proteinauftrag betrug 5 µg pro Lane. Die Elektrophorese erfolgte konstant bei 36 mA. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für einen Westernblot eingesetzt.

2.13.2 Westernblot

Der Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran erfolgte im „semi-dry“-Verfahren. Hierbei wurde eine auf das Gel zugeschnittene, nach Herstellerangaben voraktivierte PVDF-Membran luftblasenfrei auf das Gel gelegt und sowohl von oben als auch von unten in jeweils zwei Lagen Filterpapier von je 1,2 mm Dicke, das zuvor in 1x Blot-Puffer mit 20 % Methanol getränkt worden war, eingelegt. Da Luftblasen den Transfer des Gels auf die Membran behindern, wurde beim Aufbau des Blots darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen bilden. Geblottet wurde für 2 h bei 0,8 mA/cm². Schließlich wurde der Proteintransfer durch Färben der Membran mit *Ponceau-Rot* überprüft und das Proteinbandenmuster auf der Membran zu Dokumentationszwecken eingescannt.

3 Ergebnisse

3.1 Schrittweises Vorgehen zur Erstellung einer Signaltransduktionskarte für das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1

3.1.1 Zusammenstellung ausgewählter Publikationen und der darin enthaltenen Beobachtungen zu Komponenten des IL-1-Signalwegs

Aus insgesamt 503 Originalarbeiten sind Ergebnisse zu Komponenten aus dem IL-1-Signalnetzwerk sowie IL-1-abhängige Mechanismen verwendet worden. Dabei wurde das Augenmerk ausschließlich auf die am besten charakterisierten IL-1-Familienmitglieder IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra gelegt. Von den 503 Originalarbeiten wurden 291 von Prof. Dr. Michael Kracht, Gießen ausgewählt und zur Verfügung gestellt. 75 entstammen http://www.netpath.org/reactions?path_id=NetPath_13 (Stand 20.01.2010). Die übrigen 137 wurden über *Reference Manager 10* mittels Stichwortsuche in *PubMed* gefunden. Als Stichwörter dienten hierbei die Namen von Molekülen aus dem IL-1-Signalweg (zum Teil in Kombination mit „IL-1“, einem Interaktionspartner oder Reaktionsmechanismus), welche im Titel bzw. Abstrakt der Originalarbeit enthalten sein mussten.

Einzelne publizierte Sachverhalte wurden dann entsprechend dem Schema auf *NetPath* in drei große Gruppen eingeordnet: 1. Physikalische Interaktionen, 2. Enzymatische Katalyse, 3. Transport (Kandasamy et al., 2010).

Unter „Physikalische Interaktionen“ sind Bindungen von miteinander interagierenden Proteinen (Protein:Protein-Wechselwirkung), die Anheftung von Transkriptionsfaktoren an Zielgene (Protein:DNA-Wechselwirkung), Interaktionen zwischen Proteinen und mRNAs (Protein:mRNA-Wechselwirkung) wie auch Dissoziationen von Bindungspartnern zusammengefasst.

Die Gruppe „Enzymatische Katalyse“ beinhaltet katalytische Reaktionen wie Phosphorylierungen, Ubiquitinylierungen, Acetylierungen, etc.

In „Transport“ sind Translokationen von Molekülen/Molekülkomplexen innerhalb einer Zelle zwischen zwei verschiedenen Kompartimenten oder von intra- nach extrazellulär bzw. von extra- nach intrazellulär aufgelistet.

Zusammenfassend sind den Resultaten aus den oben genannten 503 Publikationen insgesamt 605 Reaktionen entnommen worden, von denen sich 363 der Gruppe „Physikalische Interaktionen“, 202 „Enzymatische Katalyse“ und 40 „Transport“ zuordnen lassen. Hiervon

entstammen 92 Reaktionen („Physikalische Interaktionen“: 55, „Enzymatische Katalyse“: 28 und „Transport“: 9) den 75 Publikationen aus *NetPath* (Tab.3).

	<i>NetPath</i>	IL-1-Signaltransduktionskarte
Publikationen	75	503
Physikalische Interaktionen	55	363
Enzymatische Katalyse	28	202
Transport	9	40
Reaktionen (gesamt)	92	605
Proteine	57	203
Splice-Varianten von Proteinen	-	3
Zielgene	-	40
mRNAs	-	10
Moleküle (gesamt)	57	256
Molekülkommentare	92	767

Tabelle 3: Informationsgehalt der IL-1-Signaltransduktionskarte im Vergleich zu der in *NetPath* (http://www.netpath.org/reactions?path_id=NetPath_13; Stand 20.01.2010) veröffentlichten Version.

3.1.2 Graphische Darstellung und Verknüpfung der gesammelten Erkenntnisse über den IL-1-Signalweg in einem virtuellen Netzwerk

3.1.2.1 Die IL-1-Signaltransduktionskarte

Die nächste Aufgabe bestand darin, die gesammelten Informationen systematisiert graphisch darzustellen, sodass zum einen die Rolle einzelner Moleküle, zum anderen das Zusammenspiel zwischen diesen in seiner Gesamtheit zu erkennen ist. Der *IL-1 Signaling Pathway* von <http://www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP195> (Stand 20.01.2010), in der die bis dato gesammelten Informationen aus *NetPath* mithilfe der Software *PathVisio* (van Iersel et al., 2008) entsprechend den Elementen einer angefügten Legende visualisiert wurden (Pico et al., 2008), diente hierbei als Vorlage.

Die größte im Rahmen dieser Arbeit erzeugte IL-1-Signaltransduktionskarte setzt sich aus Rechtecken – den „Pathway“-Komponenten – zusammen, deren mannigfaltige Interaktionen über Verbindungspfeile miteinander verknüpft sind.

Die schwarz umrandeten Rechtecke entsprechen physiologisch vorkommenden Proteinen (z.B. Enzyme oder Transkriptionsfaktoren), bei denen es sich um experimentell definierte Bestandteile des IL-1-Signalwegs handelt. Sie sind in der Mitte durch das Symbol für das jeweilige kodierende Gen gekennzeichnet und in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert, wo sie entweder einzeln oder zusammengelagert in Form von Proteinkomplexen vorliegen. Die Zellkompartimente sind innerhalb der zweidimensionalen Signaltransduktionskarte von oben nach unten grob in der Reihenfolge Extrazellulärraum – Zellmembran – Zytoplasma – Nukleus angeordnet. Da einige Proteine in verschiedenen Zellkompartimenten vorkommen und/oder mehrere Funktionen besitzen, die sich anhand eines einzelnen Rechtecks nicht vollständig abbilden lassen, wurden bisweilen gleiche Proteine jeweils mehrfach an verschiedenen Stellen eingefügt.

Die Verbindungspfeile zwischen den Rechtecken kennzeichnen biochemische/-physikalische Vorgänge, welche sich als Untergruppen in die drei oben genannten Großgruppen „Physikalische Interaktionen“, „Enzymatische Katalyse“, „Transport“ einordnen lassen. Dementsprechend werden die Pfeile mit unterschiedlichen Farben versehen. Beispielsweise erhält ein Pfeil, der eine Bindung zweier Proteine im Zytoplasma kennzeichnet, eine grüne Farbe.

Um dem Charakter jedes einzelnen Prozesses Rechnung zu tragen, wird jeweils ein individueller Pfeiltyp verwendet. Beispielsweise hat ein Pfeil, der eine Autophosphorylierung anzeigt, abgesehen von seiner blauen Farbe zusätzlich noch eine gewundene Form.

Im Vergleich zum *IL-1 Signaling Pathway* von *WikiPathways/NetPath* wurden sowohl die IL-1-Signaltransduktionskarte als auch die dazugehörige Legende erweitert (Abb.4 bzw. Abb.A1+A2 im Anhang). So stellen in der erweiterten IL-1-Signaltransduktionskarte Proteine nicht mehr die einzigen Entitäten dar. Zusätzlich sind Zielgene (rot umrandete Rechtecke) und die davon transkribierten mRNAs (grün umrandete Rechtecke) abgebildet. Als ein Beispiel für das gleichzeitige Vorkommen als reguliertes Zielgen, regulierte mRNA und reguliertes Protein innerhalb der IL-1-Signaltransduktionskarte ist IL-1 β selbst zu nennen (vgl. Abb.7+11+12). Des Weiteren werden lösliche Varianten von membrangebundenen Proteinen als blau umrandete Rechtecke abgebildet. Eine Protein:DNA-Interaktion (z.B. das Andocken eines Transkriptionsfaktors an ein Zielgen) wird nicht durch einen grünen Verbindungspfeil, wie es bei einer Protein-Protein-Interaktion der Fall ist, gekennzeichnet, sondern durch einen bordeauxroten. Auch die Pfeile, welche eine Stabilisierung bzw. Destabilisierung von mRNAs durch Protein:RNA-Wechselwirkungen repräsentieren, sind entsprechend farblich dargestellt.

Die Dissoziation von miteinander interagierenden Molekülpartnern wird jeweils durch einen gestrichelten, zweiköpfigen Pfeil gekennzeichnet, der seine Farbe in Abhängigkeit von den Interaktionspartnern erhält. Während in *NetPath 57* verschiedene Moleküle aufgeführt sind, von denen lediglich 37 im *IL-1 Signaling Pathway* auf *Wikipathways* abgebildet sind (Stand 20.01.2010), beinhaltet die erweiterte IL-1-Signaltransduktionskarte nun 256 verschiedene Moleküle, die sich aus 206 Proteinen, darunter 3 löslichen Splice-Varianten von membrangebundenen Proteinen, 40 Zielgenen und 10 mRNAs zusammensetzen (Tab.3).

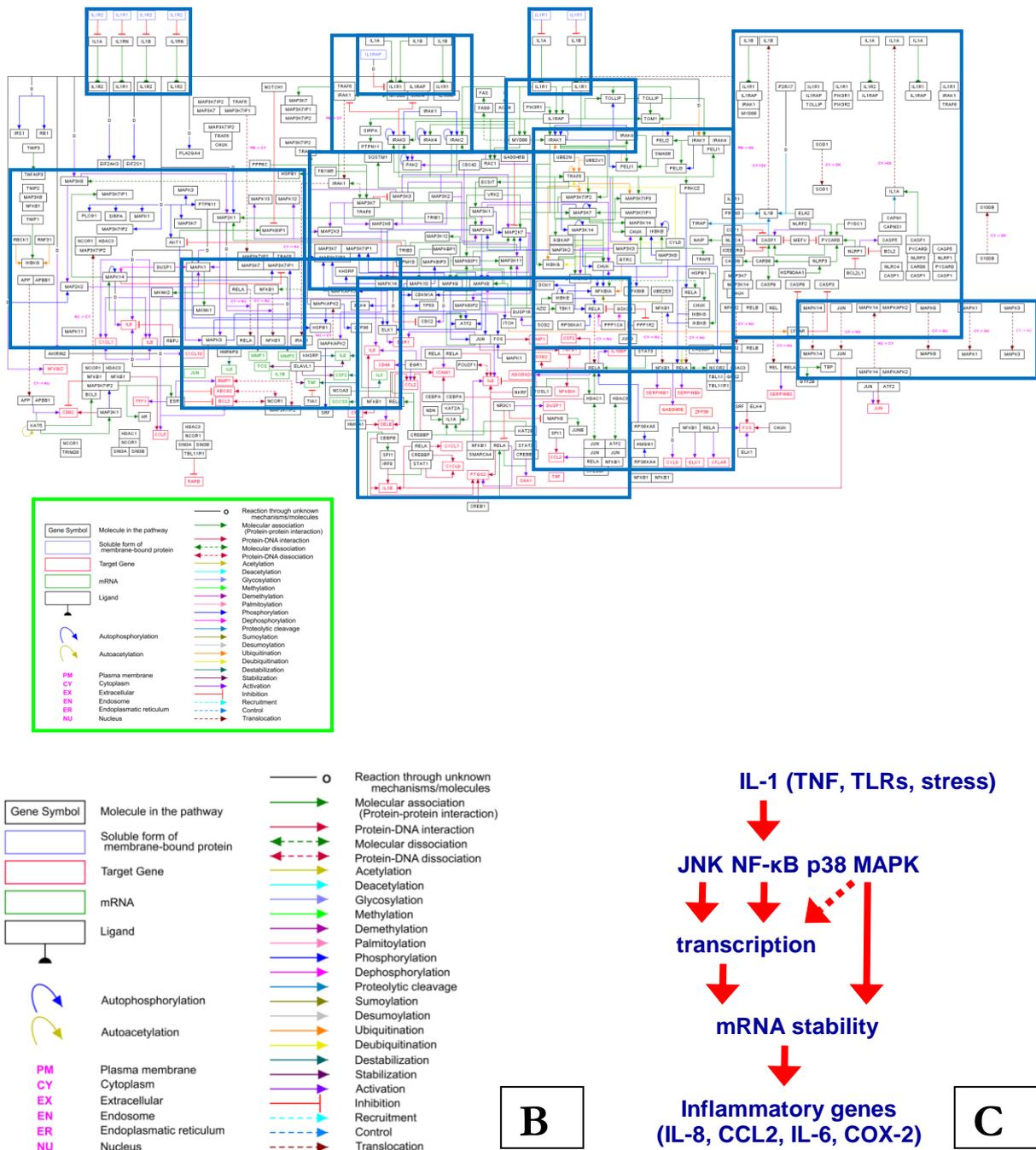


Abbildung 4: Die IL-1-Signaltransduktionskarte.

Beschriftungstext zur Abbildung 4 folgt auf der nächsten Seite.

Abbildung 4: Die IL-1-Signaltransduktionskarte.

A) Abbildung der IL-1-Signaltransduktionskarte, die 256 Moleküle (206 Proteine, 40 Zielgene und 10 mRNAs) und 605 Reaktionen (Physikalische Interaktionen: 363, Enzymatische Katalyse: 202, Transport: 40) umfasst. Blau eingerahmt sind Abschnitte, die in den Kapiteln 3.1.2.1.1-3.1.2.1.7 mit den Abbildungen 7-13 näher beschrieben werden. Eine vergrößerte Abbildung der Karte findet sich im Anhang als Abbildung A1.

B) Überblick über die Elemente der in A grün umrandeten Legende zur IL-1-Signaltransduktionskarte. Eine vergrößerte Abbildung der Legende findet sich im Anhang als Abbildung A2.

C) Vereinfachte schematische Übersicht der Ebenen des IL-1-Signalwegs. In den Abbildungen 7-13 dient ein grüner Kreis in dem Schema zur Orientierung, welcher Ausschnitt der IL-1-Signaltransduktionskarte gezeigt ist. (Modifiziert nach Prof. Dr. M. Kracht, Gießen aus Buss et al., J.Biol.Chem., 2004; Holzberg et al., J.Biol.Chem., 2003; Wolter et al., J.Biol.Chem., 2002; Hoffmann et al., J.Leuk.Biol, 2002; Winzen et al., EMBO J., 1999; Holtmann et al., Mol.Cell.Biol., 1999; Holtmann et al., J.Biol.Chem., 1998; Kracht et al., JEM, 1994)

Jeder in der IL-1-Signaltransduktionskarte abgebildete Prozess ist durch Originalergebnisse aus mindestens einer entsprechenden Originalarbeit belegt. Durch doppeltes Anklicken eines Reaktionspfeils kann man sich unter „Comments“ die im Zuge des Einfügens der Literatur selbst erzeugten Kommentare dazu anzeigen lassen. Auf diese Art kann jederzeit nachvollzogen werden, auf welcher wissenschaftlichen Grundlage die dargestellte Erkenntnis beruht. Entsprechend dem *NetPath*-Prinzip sind in jedem Kommentar der Erstautor der jeweiligen Publikation, das Jahr der Veröffentlichung, die prinzipielle Erkenntnis in Bezug auf IL-1 sowie der/die untersuchte(n) Zelltyp(en) angegeben.

Je mehr Evidenz es in der Literatur für einen bestimmten Zusammenhang zwischen einzelnen Molekülen gibt und umso mehr verschiedene Zelltypen beschrieben werden, in denen dieser gezeigt worden ist, desto höher ist naturgemäß der wissenschaftliche Evidenzgrad für die Einbindung eines Effektormoleküls in die IL-1-Signaltransduktion und auch für den dahinterstehenden molekularen Mechanismus. In analoger Weise erhöht der Nachweis des jeweiligen Phänomens mit mehreren unabhängigen Methoden diese Evidenz. Um die Nachverfolgung dieser Informationen mit der größtmöglichen Tiefe zu gewährleisten, können unter „Literature“ die Titel der Publikationen samt jeweiligem *PubMed*-Link sichtbar gemacht werden, sodass bei Bedarf auf die Originalquelle zugegriffen werden kann, um dargestellte Zusammenhänge in der Signaltransduktionskarte zu verifizieren (Abb.5).

Klickt man im Programm *PathVisio* ein Molekül der Karte doppelt an, öffnet sich ein Fenster, in dem unter „Comments“ alle Kommentare zu diesem Molekül hinterlegt sind (Abb.6A). In den Kommentaren sind Informationen enthalten, die an die Reaktionspfeile, welche vom jeweiligen Molekül ausgehen bzw. an diesem enden, geknüpft sind, oder auch Zusammenhänge beschreiben, die nicht als direkte Verknüpfungen über Pfeile darstellbar waren. Analog zu der Informationsablage an den Pfeilen sind die Titel der Publikationen samt jeweiligem *PubMed*-Link ebenfalls an die Moleküle geknüpft. Durch Hochladen einer humanspezifischen Datenbank von <http://www.pathvisio.org> (Hs_Derby_20090720.bridge - Stand 20.01.2010) ist es möglich, sich durch einfaches Anklicken zu jedem Molekül über die

jeweilige Gen-Identifikationsnummer (*Gene ID*) aus einer eingetragenen Gendatenbank weitere Informationen unter „Backpage“ anzeigen zu lassen. So erhält man zu jedem abgebildeten Gensymbol die in der Literatur gängigen Synonyme sowie die *Gene IDs* aus diversen anderen Gendatenbanken mitsamt Verlinkungen (Abb.6B).

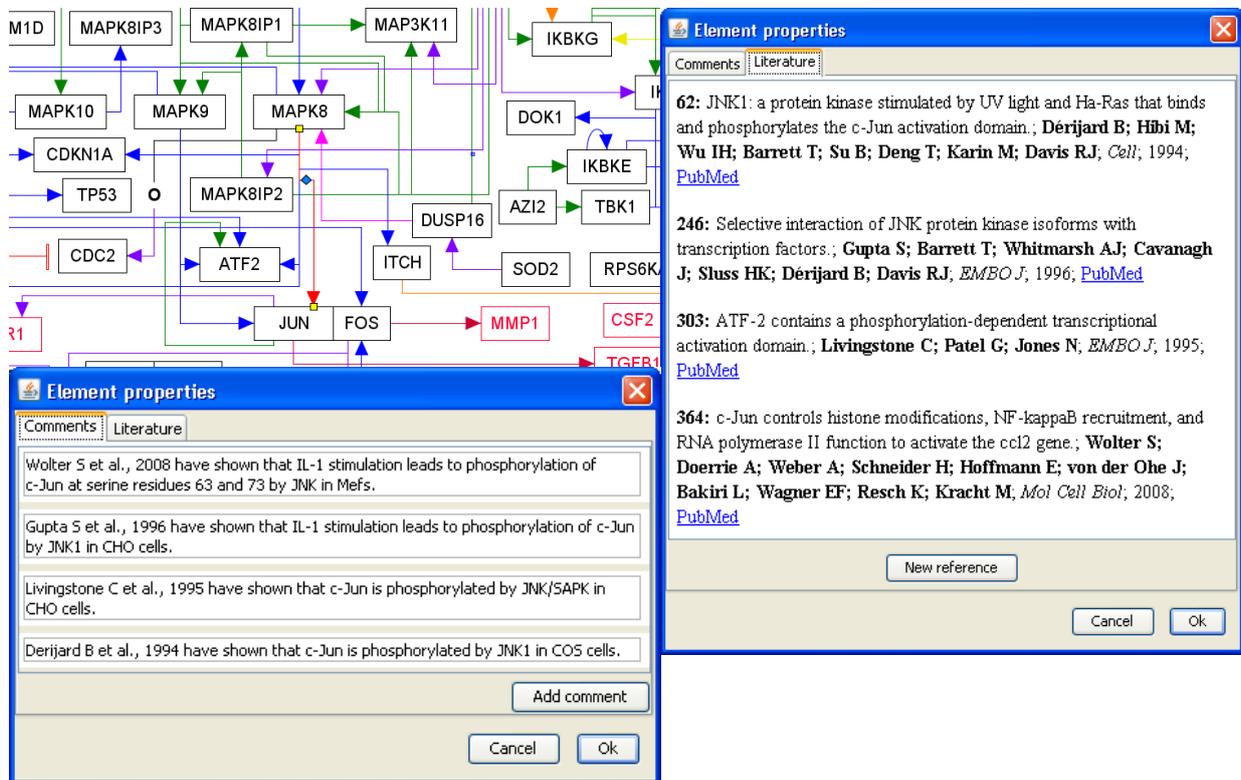


Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung der Verknüpfung von Informationen an Reaktionspfeilen in PathVisio.

Durch doppeltes Anklicken eines Reaktionspfeils in der IL-1-Signaltransduktionskarte öffnet sich ein Fenster, in dem unter „Comments“ zur abgebildeten Reaktion jeweils eine kurze Beschreibung aus den darauf verweisenden Publikationen (Erstautor, Erscheinungsjahr, Erkenntnis in Abhängigkeit von IL-1, untersuchter Zelltyp) angezeigt wird. Unter „Literature“ findet sich eine Auflistung der Publikationen samt jeweiligem *PubMed*-Link. Exemplarisch ist die Phosphorylierung von c-Jun [JUN] durch JNK [MAPK8] dargestellt (roter, gezackter Pfeil). Vollständige Molekülnamen sind dem Text entnehmbar. Eckige Klammern kennzeichnen die offiziellen Gensymbole von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> (Stand: 20.01.2010).

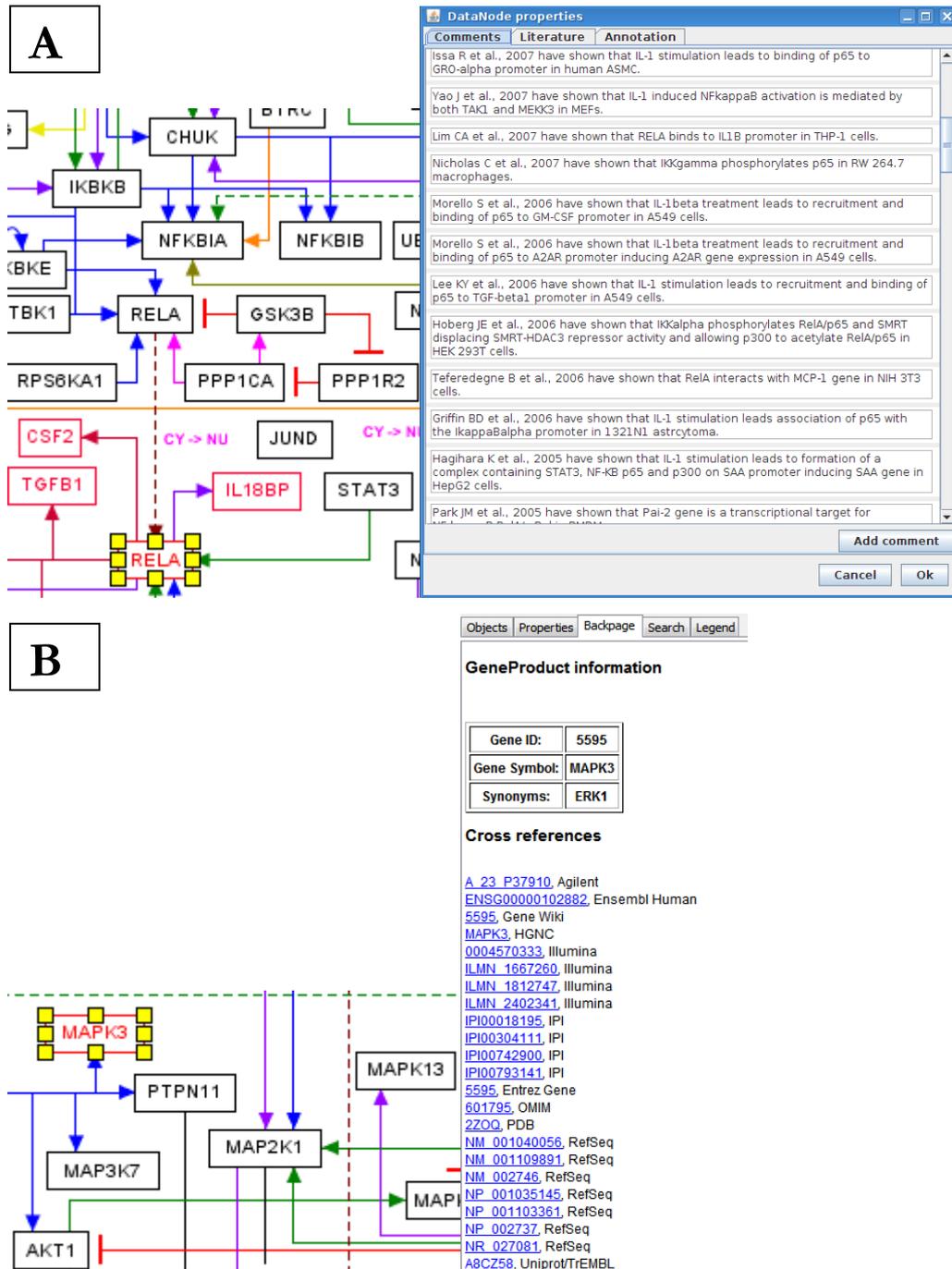


Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der Verknüpfung von Informationen an Molekülen in PathVisio.

A) Durch doppeltes Anklicken eines Moleküls in der IL-1-Signaltransduktionskarte öffnet sich ein Fenster, in dem unter „Comments“ zum einen alle mit dem jeweiligen Molekül verknüpften Reaktionen, zum anderen zusätzliche Informationen zum Molekül, die nicht durch Reaktionspfeile dargestellt sind, mitsamt einer Beschreibung aus den darauf verweisenden Publikationen (Erstautor, Erscheinungsjahr, Erkenntnis in Abhängigkeit von IL-1, untersuchter Zelltyp) angezeigt werden. Exemplarisch sind die unter NF-κB p65 [RELA] (mit kleinen gelben Rechtecken umrandet) abgelegten Informationen dargestellt.

B) Durch einfaches Anklicken eines Moleküls in der IL-1-Signaltransduktionskarte öffnet sich ein Fenster, in dem unter „Backpage“ nach dem Hochladen einer entsprechenden Datenbank über die jeweilige Gene ID aus einer eingetragenen Gendatenbank Informationen zum Molekül (Synonyme, Gene IDs aus anderen Gendatenbanken mitsamt Verlinkungen) aufgelistet sind. Als Beispiel ist die MAP Kinase ERK1 aufgeführt, welche das Gensymbol [MAPK3] (mit kleinen gelben Rechtecken umrandet) trägt.

Vollständige Molekülnamen sind dem Text entnehmbar. Die eingetragene Gene ID „5595“ stammt ebenso wie alle durch eckige Klammern gekennzeichneten Gensymbole aus der Gendatenbank Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> - Stand: 20.01.2010).

Schließlich bleibt noch zu erwähnen, dass sich die Größe der Signaltransduktionskarte negativ auf die Übersichtlichkeit auswirkt. Je mehr Moleküle nebeneinander abgebildet sind und umso größer die Anzahl der Reaktionen pro Molekül ist, desto schwieriger wird es, einzelne Symbole (z.B. Reaktionspfeile oder Beschreibungen der Verschiebung zwischen zwei Zellkompartimenten bei Translokationen) klar voneinander abzugrenzen. Natürlich wäre es eine Option, die Signaltransduktionskarte in ihrer Gesamtheit, insofern noch Platz vorhanden ist, nach allen Seiten hin zu strecken, um die Zwischenräume effizienter nutzen zu können. Dies ist jedoch mit viel Aufwand verbunden, weil selbst kleinste Verschiebungen auf anderen Seiten ausgeglichen werden müssen, um weiterhin eine saubere Abbildung zu gewährleisten. Da dies auf Dauer auch keine Lösung ist, wurde der Weg gewählt, jeweils ein und dasselbe Molekül mehrfach abzubilden. Die Duplikate unterscheiden sich in den an ihnen abgebildeten Verknüpfungspfeilen, sodass beim Betrachten eines einzelnen Duplikats nicht auf Anhieb alle Reaktionen des jeweiligen Moleküls innerhalb der IL-1-Signaltransduktionskarte ersichtlich sind. Doch an jedem Duplikat sind immer die gesamten Informationen als Kommentare und Literaturzitate zu dem jeweiligen Molekül abgelegt. Außerdem ist es möglich, über eine *PathVisio*-Suchfunktion alle Duplikate gleichzeitig innerhalb der Signaltransduktionskarte farblich sichtbar zu machen.

Aus Platzgründen fasst bisweilen ein einzelner Pfeil zwischen zwei Molekülen mehrere Reaktionen zusammen (z.B. ein blauer Pfeil die Phosphorylierung eines Moleküls durch ein Enzym, das gleichzeitig Interaktionspartner ist). Im Kommentar zum Verknüpfungspfeil sind aber alle Reaktionen aufgeführt. Zu den Informationen, die an den Molekülen abgelegt sind, zählen – wie oben bereits erwähnt – nicht nur die Kommentare, die bei direkter Beteiligung des Moleküls an bestimmten Vorgängen an die dazugehörigen Reaktionspfeile angehängt sind, sondern auch diejenigen, welche aufgrund der Aussagen über eine nur indirekte Rolle bei bestimmten Prozessen graphisch nicht abgebildet worden sind. Der Ausgangsversion der IL-1-Signaltransduktionskarte auf *Wikipathways* (Stand: 20.01.2010) folgend, sind Aktivierungen von Molekülen durch IL-1, welche bereits auf *NetPath* (Stand: 20.01.2010) aufgelistet sind, durch Kennzeichnung der nicht bekannten Zwischenschritte mit einer „0“ übernommen und sogar ergänzt worden wie z.B. die Phosphorylierung und Aktivierung von „Cancer Osaka thyroid/Tumor progression locus 2“ (Cot/Tpl-2) infolge der Stimulation von HEK293IL-1R-Zellen mit IL-1 β (Stafford et al., 2006); aber auf dieses Vorgehen wurde letztlich – insbesondere rezeptorfern – aus Platzgründen immer mehr verzichtet. Daraus resultiert, dass die Anzahl der gesammelten und in Form von Pfeilen abgebildeten Reaktionen 605 beträgt, doch die Gesamtzahl aller an den Molekülen angehängten Kommentare, welche

zum Teil auch nicht abgebildete Zusatzinformationen aus weiteren Publikationen liefern, mit 767 deutlich höher liegt.

Die gesamte Interleukin-1-Signaltransduktionskarte ist in mehrere Abschnitte gegliedert, anhand derer einzelne Schlüsselschritte der IL-1-Signalfortleitung verständlich werden. Im Folgenden werden wichtige Teile der IL-1-Signaltransduktionskarte genauer beschrieben.

3.1.2.1.1 Prozessierung und Freisetzung von IL-1

Die proteolytische Spaltung von Pro-Interleukin-1 β in die reife und sezernierte Form Interleukin-1 β wird über sogenannte NALP-Inflammasomkomplexe vermittelt (Dostert et al., 2008; Hornung et al., 2008; Martinon et al., 2002; Muruve et al., 2008; Srinivasula et al., 2002). Eine zentrale Rolle nimmt hierbei das NALP3-Inflammasom ein, welches sich aus NALP3, dem Adapterprotein ASC = „Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (CARD)“, CARD-8 und Caspase-1 (Interleukin-1 β -converting enzyme = ICE) zusammensetzt (Agostini et al., 2004; Duncan et al., 2007; Razmara et al., 2002; Srinivasula et al., 2002; Stehlik et al., 2003). Es gehört zur Klasse der NOD-like receptors (NLRs), die durch PAMPs wie virale DNA, bakterielle Peptidoglykane und Toxine aktiviert werden (Martinon et al., 2009; Meylan et al., 2006). Außerdem lässt es sich über DAMPs wie Harnsäurekristalle, Hypokaliämie, β -Amyloid, Sauerstoffradikale, Asbestfasern, Silikatkristalle, Hautirritanzien, UV-Licht oder ATP aktivieren (Cassel et al., 2008; Dostert et al., 2008; Feldmeyer et al., 2007; Halle et al., 2008; Hornung et al., 2008; Mariathasan et al., 2006; Martinon et al., 2006; Petrilli et al., 2007; Sutterwala et al., 2006). Durch die Komplexbildung kommt es zur Dimerisierung von Caspase-1, das daraufhin im Zytosol das 33 kDa schwere Pro-Interleukin-1 β enzymatisch in das reife 17 kDa schwere Interleukin-1 β spaltet (Feldmeyer et al., 2007; Howard et al., 1991; Kuida et al., 1995; Li et al., 1995; Petrilli et al., 2007; Thornberry et al., 1992; Wilson et al., 1994). Unter Aktivierung des Nukleotidrezeptors P2X7 durch extrazelluläres ATP wird reifes Interleukin-1 β schließlich über einen atypischen Proteinsekretionsweg (Dinarello, 2009) in den Extrazellularraum sezerniert (Cassel et al., 2008; Dostert et al., 2008; Halle et al., 2008; Hornung et al., 2008; Labasi et al., 2002; Netea et al., 2009; Perregaux et al., 2000; Solle et al., 2001; Stevenson et al., 1992; Sutterwala et al., 2006).

Über die Prozessierung und Freisetzung von Interleukin-1 α ist deutlich weniger bekannt: Pro-Interleukin-1 α wird vom Calpain-Komplex gespalten (Kawaguchi et al., 2007), wobei auch

Caspase-1 an Pro-Interleukin-1 α zu binden vermag (Keller et al., 2008), bevor reifes IL-1 α an die Membranaußenseite gelangt (Stevenson et al., 1992; Sutterwala et al., 2006) (Abb.7).

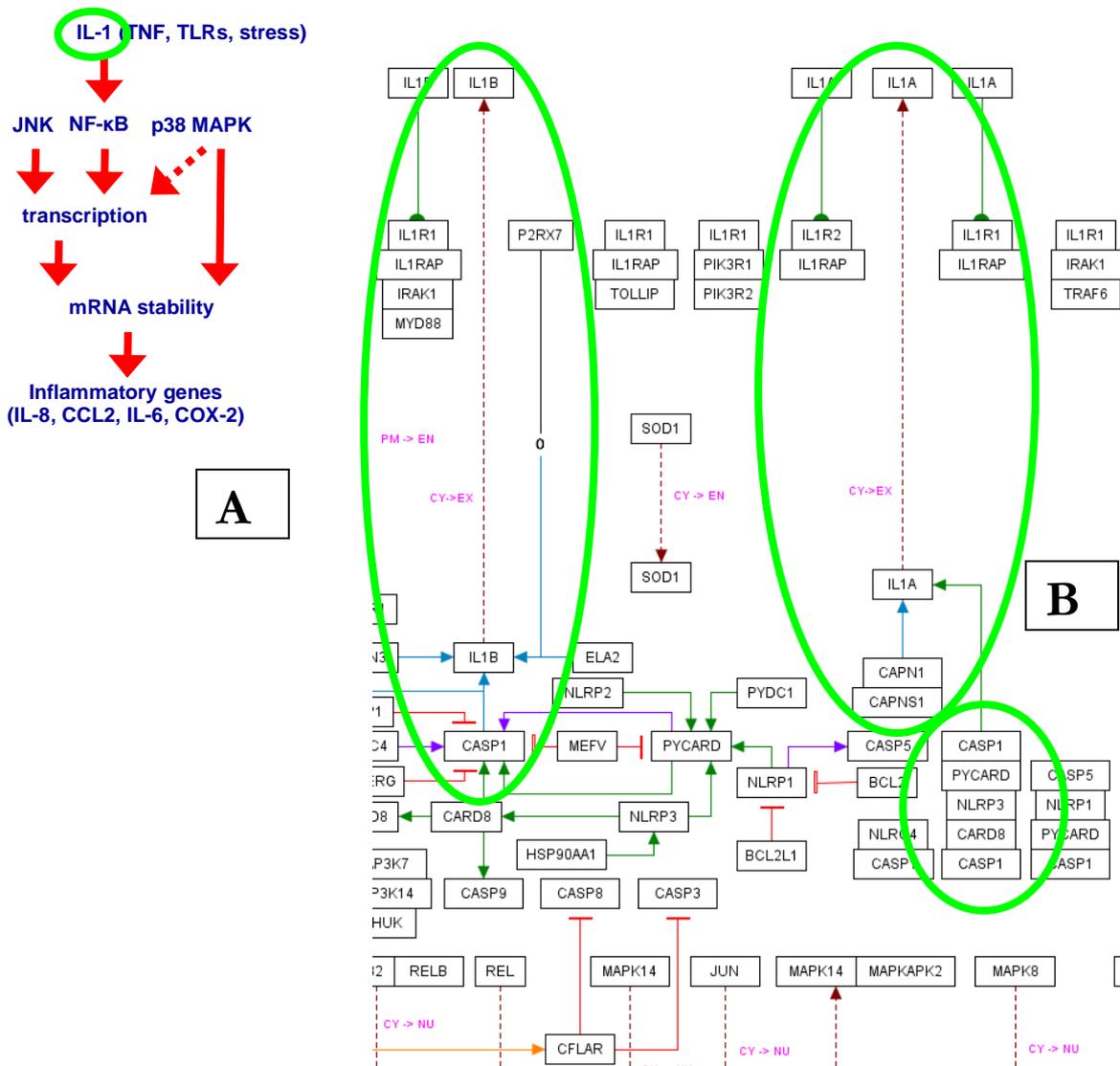


Abbildung 7: Prozessierung und Freisetzung von IL-1.

A) Siehe Legende von Abbildung 4C.

B) Das aktivierte NALP3-Inflammasom setzt sich aus NALP3 [NLRP3], ASC [PYCARD], CARD-8 [CARD8] und Caspase-1 [CASP1] zusammen. IL-1 β [IL1B] wird aus seinem Vorläuferprotein durch Caspase-1 [CASP1] und unter der ATP-abhängigen Aktivierung von P2X7 [P2RX7] in seine reife Form überführt (hellblaue Pfeile) und sezerniert (braun gestrichelter Pfeil). IL-1 α [IL1A] wird durch den Calpain-Komplex [CAPN1]/[CAPNS1] in seine reife Form gespalten (hellblauer Pfeil) und gelangt anschließend an die Membranaußenseite (braun gestrichelter Pfeil).

Alle beschriebenen Zusammenhänge sind grün eingekreist. Vollständige Molekülnamen sind dem Text entnehmbar. Eckige Klammern kennzeichnen die offiziellen Gensymbole von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> (Stand: 20.01.2010).

3.1.2.1.2 IL-1-Rezeptoren

Sowohl IL-1 β als auch das membrangebundene IL-1 α binden an den ubiquitär exprimierten Interleukin-1-Rezeptor Typ I IL-1R1 (Dower et al., 1986; Dower et al., 1990; Labriola-Tompkins et al., 1993; Sims et al., 1988; Sims et al., 1993; Vigers et al., 1997; Vigers et al., 2000) (Abb.8B). In Zusammenspiel mit IL-1RAcP, das als ein Liganden-abhängig rekrutierter Co-Rezeptor fungiert, kommt es zu einer Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktion (Greenfeder et al., 1995; Wesche et al., 1997) (Abb.8C). Für einen weiteren Liganden, den physiologischen Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (IL-1Ra), welcher mit einer ähnlich starken Affinität und Spezifität an IL-1R1 bindet, ist dies hingegen nicht der Fall (Schreuder et al., 1995; Schreuder et al., 1997; Vigers et al., 2000) (Abb.8D).

Der Interleukin-1-Rezeptor Typ II IL-1R2 bindet ebenfalls IL-1 α und IL-1 β , bedingt jedoch aufgrund des Fehlens einer zytosolischen TIR-Domäne keine Signaltransduktion (Sims et al., 1993; Symons et al., 1995) (Abb.8D).

Neben IL-1Ra und IL-1R2 existieren zusätzlich lösliche Domänen extrazellulärer Rezeptoranteile, namentlich sIL-1R1, sIL-1R2 und sIL-1RAcP, welche die IL-1-induzierte Signaltransduktion inhibieren (Arend et al., 1994; Jensen et al., 2000) (Abb.8B+C+D).

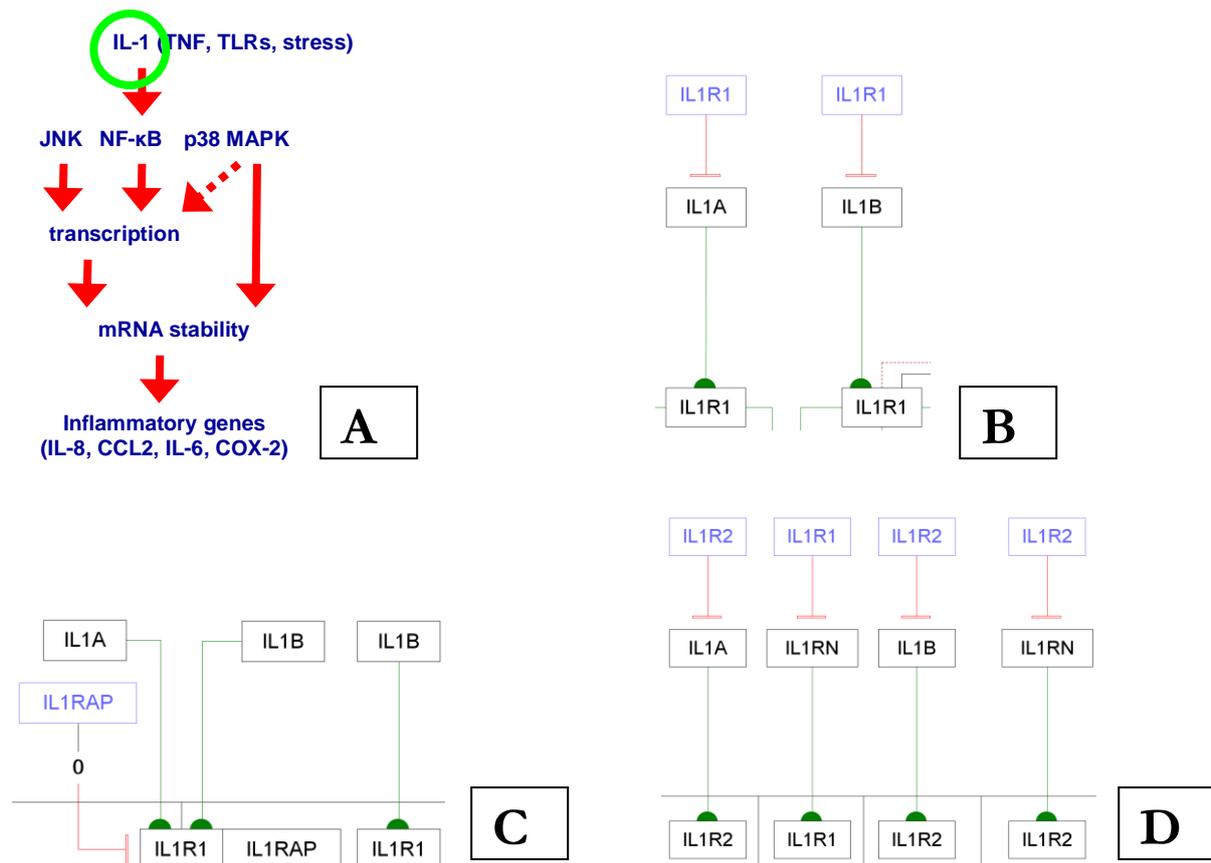


Abbildung 8: IL-1-Rezeptoren.

A) Siehe Legende von Abbildung 4C.

B+C) IL-1 α [IL1A] und IL-1 β [IL1B] sind Liganden von IL-1R1 [IL1R1] (B), über deren Bindung (grüne Pfeile) es mithilfe von IL-1RACp [IL1RAP] zu einer Signalfortleitung in das Zellinnere kommt (C).

D) Ebenfalls an IL-1R1 bindet IL-1Ra [IL1RN], das eine antagonistische Funktion besitzt. Mit IL-1R2 [IL1R2] existiert ein Oberflächenrezeptor, der zur Signalfortleitung nicht imstande ist und somit ebenfalls antagonistisch wirkt.

B)+C)+D) Blau dargestellt sind lösliche Varianten von IL-1R1 (B+D), IL-1RACp (C) und IL-1R2 (D), die IL-1 α , IL-1 β und IL-1-RA binden und damit die rezeptorvermittelte Signalfortleitung regulieren (rote Pfeile).

Vollständige Molekülnamen sind dem Text entnehmbar. Eckige Klammern kennzeichnen die offiziellen Gensymbole von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> (Stand: 20.01.2010).

3.1.2.1.3 Rezeptornaher Teil des IL-1-Signalwegs

Durch die Bindung von IL-1 α bzw. IL-1 β kommt es bei IL-1R1 zu einer Konformationsänderung in der extrazellulären Domäne, was das Anlagern von IL-1RACp und somit die Bildung eines trimeren Komplexes begünstigt (Casadio et al., 2001). Durch Bindung der intrazellulären Proteine „Myeloid differentiation primary response gene 88“ (MyD88) und „Interleukin-1 receptor-activated protein kinase (IRAK) 4“ über TIR-Domänen (Brikos et al., 2007; Burns et al., 2003; Janssens et al., 2002; Li et al., 2002; Muzio et al., 1997; Wesche et al., 1997) entsteht ein stabiler Komplex, bestehend aus IL-1, IL-1RI, IL-RAcP, MyD88, und IRAK-4 (Brikos et al., 2007) (Abb.9B).

Dabei kommt es zur Autophosphorylierung von IRAK-4 (Cheng et al., 2007), das daraufhin IRAK-1, welches ebenso wie IRAK-2 die Funktion eines Adapterproteins und einer

Proteinkinase zugleich besitzt (Muzio et al., 1997; Wesche et al., 1999), bindet und phosphoryliert (Burns et al., 2003; Kawagoe et al., 2007; Koziczak-Holbro et al., 2007; Li et al., 2002; Rao et al., 2005) (Abb.9C). Dies führt zur Anlagerung und Oligomerisierung von „Tumor necrosis factor-associated factor 6“ (TRAF-6) (Cao et al., 1996; Kollwe et al., 2004). Komplexe aus IRAK-1 und TRAF-6 lösen sich anschließend vom initialen Gesamtkomplex (Jiang et al., 2002) und übermitteln das Signal ins Zytosol (Abb.9B).

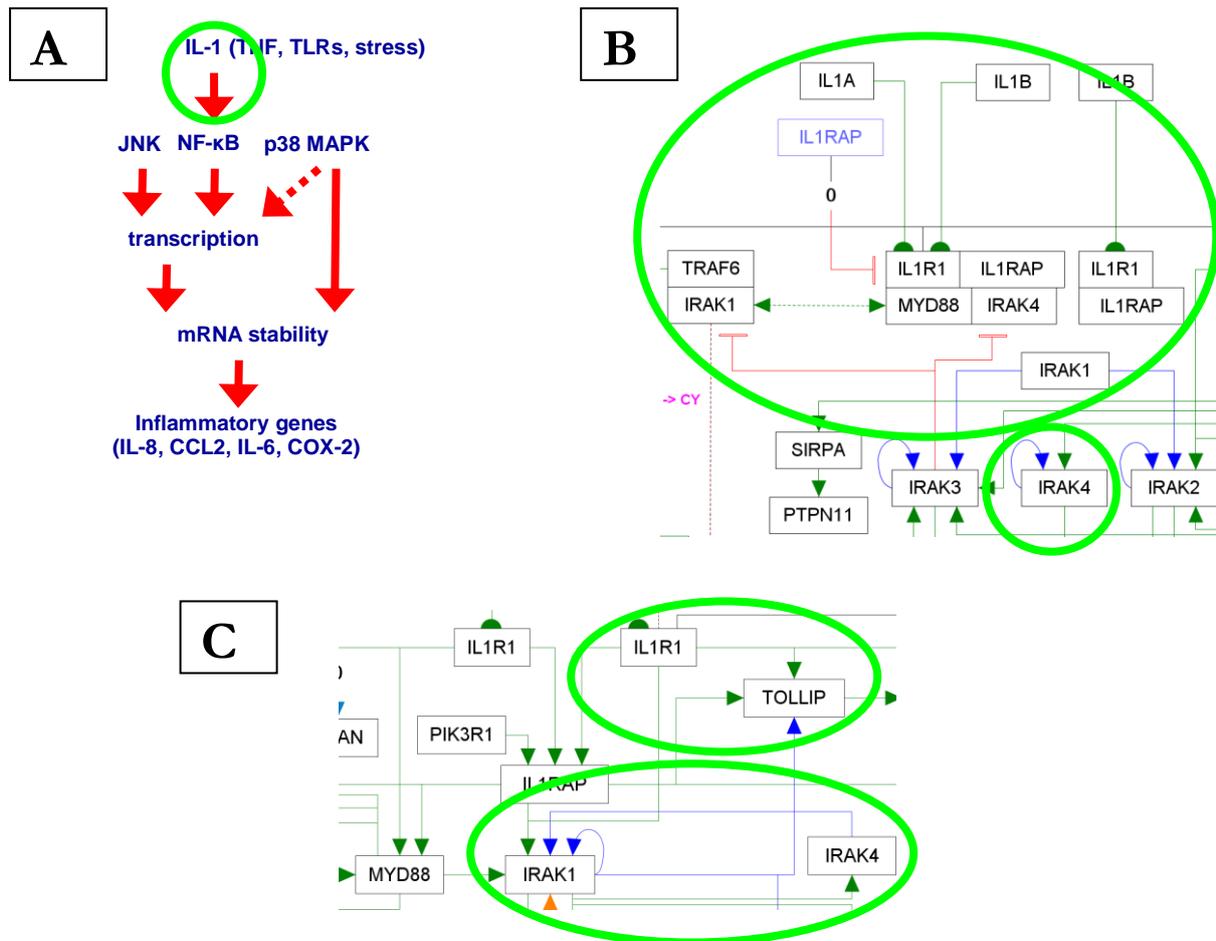


Abbildung 9: Rezeptornaher Teil des IL-1-Signalwegs.

A) Siehe Legende von Abbildung 4C.

B+C) Nach der Bindung von IL-1 α [IL1A] bzw. IL-1 β [IL1B] an IL-1R1 [IL1R1] (grüne Pfeile) lagern sich MyD88 [MYD88] und IRAK-4 [IRAK4] über IL-1RAcP [IL1RAP] an den Ligand-Rezeptor-Komplex an (B). IRAK-4 [IRAK4] phosphoryliert zunächst sich selbst (B, blau gewundener Pfeil) und anschließend IRAK-1 [IRAK1] (C, blauer Pfeil), wodurch TRAF-6 [TRAF6] an den Gesamtkomplex gebunden wird, um sich in der Folge zusammen mit IRAK-1 wieder davon abzulösen (B, grün gestrichelter Pfeil mit zwei Köpfen). Außerdem bindet IL-1R1 an TOLLIP (C, grüner Pfeil), was zur Internalisierung von IL-1R1 mit folgender Degradation an Endosomen führt.

Alle beschriebenen Zusammenhänge sind grün eingekreist. Vollständige Molekülnamen sind dem Text entnehmbar. Eckige Klammern kennzeichnen die offiziellen Gensymbole von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> (Stand: 20.01.2010).

3.1.2.1.4 Zytosolischer Teil des IL-1-Signalwegs

Zusammen mit „Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N“ (UBC13) und „Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1“ (UEV1A), die den E2-Ubiquitin-Ligase-Komplex bilden, modifiziert die E3-Ubiquitin-Ligase TRAF-6 sich selbst und eine Reihe von weiteren Signalproteinen. Dies geschieht durch kovalente Anlagerung von K63-verknüpften Polyubiquitinketten in Form einer Autoubiquitinylierung (Lamothe et al., 2007; Wang et al., 2001) und durch Ubiquitinylierung der Adapterproteine „Transforming growth factor- β (TGF- β)-activated protein kinase-binding protein“ (TAB) 2 und 3 (Ishitani et al., 2003), mit denen TRAF-6 einen Komplex bildet (Ishitani et al., 2003; Jiang et al., 2002; Kanayama et al., 2004; Takaesu et al., 2000; Takaesu et al., 2001).

Neben TRAF-6 spielen auch die E3-Ubiquitin-Ligasen Pellino homolog 1-3, die an IRAKs binden und von diesen phosphoryliert werden, bei der proximalen Signalweiterleitung eine Rolle (Jiang et al., 2003; Lin et al., 2008; Ordureau et al., 2008; Schaubliege et al., 2006; Yu et al., 2002) (Abb.10B).

Die Rekrutierung von „TGF- β -activated protein kinase 1“ (TAK1) (Besse et al., 2007; Cheung et al., 2004; Holtmann et al., 2001; Jiang et al., 2002; Lee et al., 2009; Minoda et al., 2009; Ninomiya-Tsuji et al., 1999; Ninomiya-Tsuji et al., 2003; Ono et al., 2001; Sakurai et al., 2000; Sakurai et al., 2002; Takaesu et al., 2000; Takaesu et al., 2001; Thiefes et al., 2006; Walsh et al., 2008; Wang et al., 2001; Yamazaki et al., 2009; Yao et al., 2007) und „Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3“ (MEKK3) (Huang et al., 2004), Mitgliedern der „Mitogen-activated protein kinase kinase kinase“ (MAPKKK)-Familie, sind Schlüsselschritte bei der Aktivierung von NF- κ B, „c-Jun N-terminal kinase“ (JNK) 1, 2 und 3 sowie „p38 mitogen-activated protein kinase“ (p38 MAPK) (Baud et al., 1999; Chen et al., 2002; Hammaker et al., 2007; Shim et al., 2005; Shirakabe et al., 1997; Yao et al., 2007).

Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt über den „Inhibitor of nuclear factor kappa-B (I κ B) kinase“ (IKK)-Komplex (Li et al., 1999a; Li et al., 1999b; Nicholas et al., 2007; Sakurai et al., 1999; Salmeron et al., 2001; Schmidt et al., 2003; Schwabe et al., 2005), welcher sich aus IKK1 (IKK α), IKK2 (IKK β) und „NF- κ B essential modifier“ (NEMO) zusammensetzt (Rothwarf et al., 1998; Solt et al., 2007; Zandi et al., 1997). NEMO bindet über eine Polyubiquitinkette an IRAK-1 (Conze et al., 2008; Lamothe et al., 2007; Newton et al., 2008; Ordureau et al., 2008; Windheim et al., 2008). Daraufhin wird I κ B α (NFKBIA) vom IKK-Komplex phosphoryliert (Mercurio et al., 1997; Zandi et al., 1998), was zu einer K48-verknüpften Polyubiquitinylierung mit anschließender proteasomaler Degradation führt (Hatakeyama et al., 1999). Dadurch werden die NF- κ B-Untereinheiten p105/p50 und p65

freigesetzt und ihre Kernlokalisierungssequenz exponiert, sodass sie in den Zellkern translozieren (Bertelsen et al., 2005; Crofford et al., 1997; de Souza et al., 2009; Hu et al., 1999; Jiang et al., 2001; Kondo et al., 2008; Liu et al., 2008; Muller et al., 2001; Nam et al., 2009; Puls et al., 1999; Vakkila et al., 2008; Veillat et al., 2009) (Abb.10B).

Die Aktivierung der „Mitogen-activated protein kinase kinases“ (MAPKKs) „Mitogen-activated protein kinase“ (MKK) 3,4,6 und 7 wird über TAK1 und MEKK3 vermittelt (Deacon et al., 1997; Deacon et al., 1999; Moriguchi et al., 1996). MKK4 und MKK7 aktivieren JNK (Finch et al., 1997; Tournier et al., 2001; Wu et al., 1997), während p38 MAPK von MKK3, MKK4 und MKK6 aktiviert wird (Cuenda et al., 1996; Derijard et al., 1995; Han et al., 1996; Inoue et al., 2005; Raingeaud et al., 1996; Tournier et al., 2001). Aktiviertes JNK und p38 MAPK befinden sich im Zytosol sowie im Zellkern (Bertelsen et al., 2005; Gonzalez et al., 2000) (Abb.10C+E).

Cot/Tpl-2 ist eine weitere MAPKKK. Sie bildet einen trimeren Komplex mit „A20-binding inhibitor of NF-kappa-B activation 2“ (ABIN-2) und NF- κ B p105 (Lang et al., 2004; Papoutsopoulou et al., 2006). Infolge IL-1-abhängiger Aktivierung löst sie sich von NF- κ B p105 ab (Waterfield et al., 2004; Waterfield et al., 2003) und aktiviert die MAPKKs „MAPK/ERK kinase“ (MEK) 1 und 2 (Dumitru et al., 2000). Diese aktivieren ihrerseits die MAPKs „Extracellular signal-regulated kinase“ (ERK) 1 und 2 (Saklatvala et al., 1993; Wu et al., 1993), welche auch in den Nukleus translozieren können (Chuderland et al., 2008; Costa et al., 2006; Marchi et al., 2008) (Abb.10D+E).

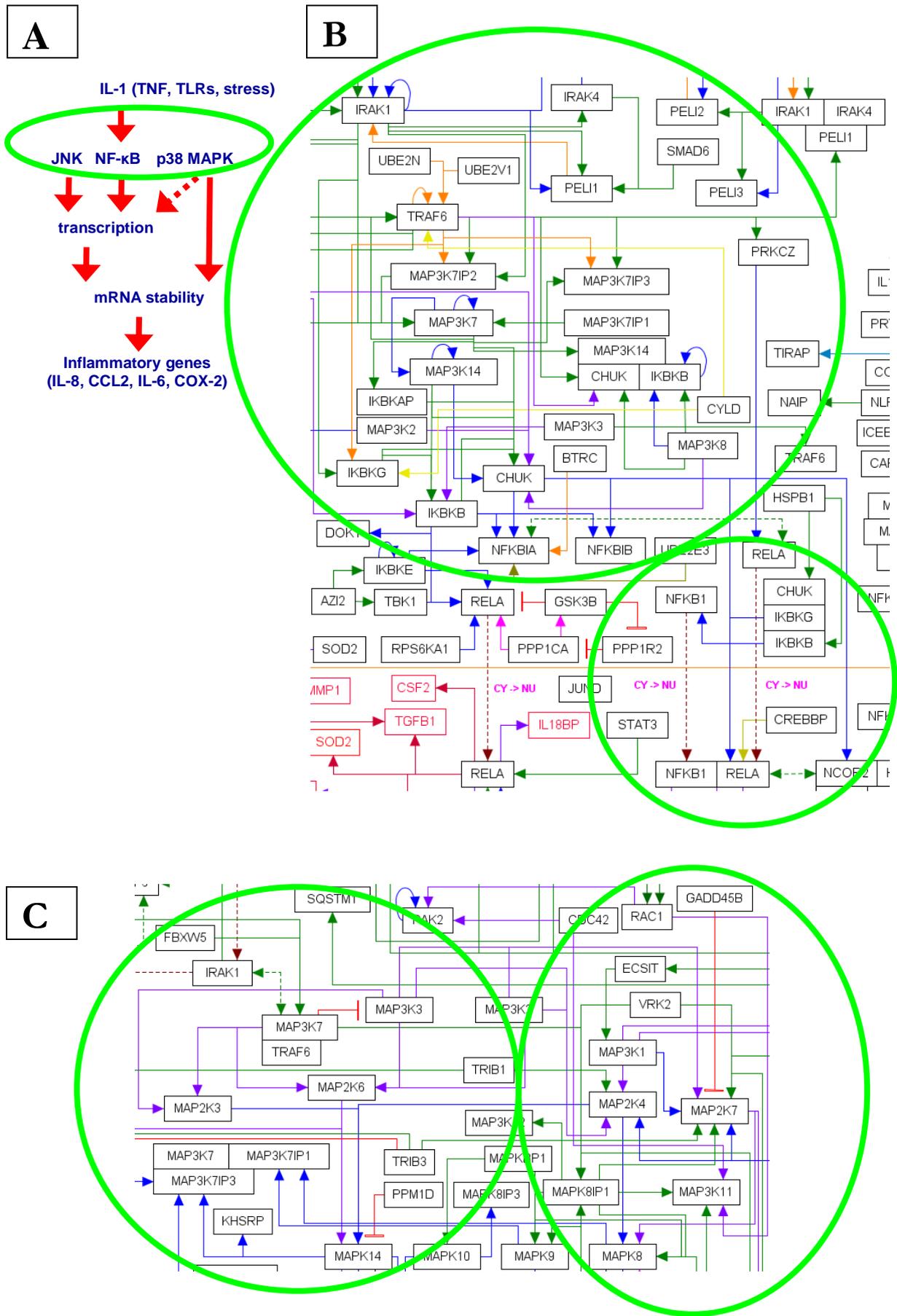


Abbildung 10: Zytosolischer Teil des IL-1-Signalwegs.

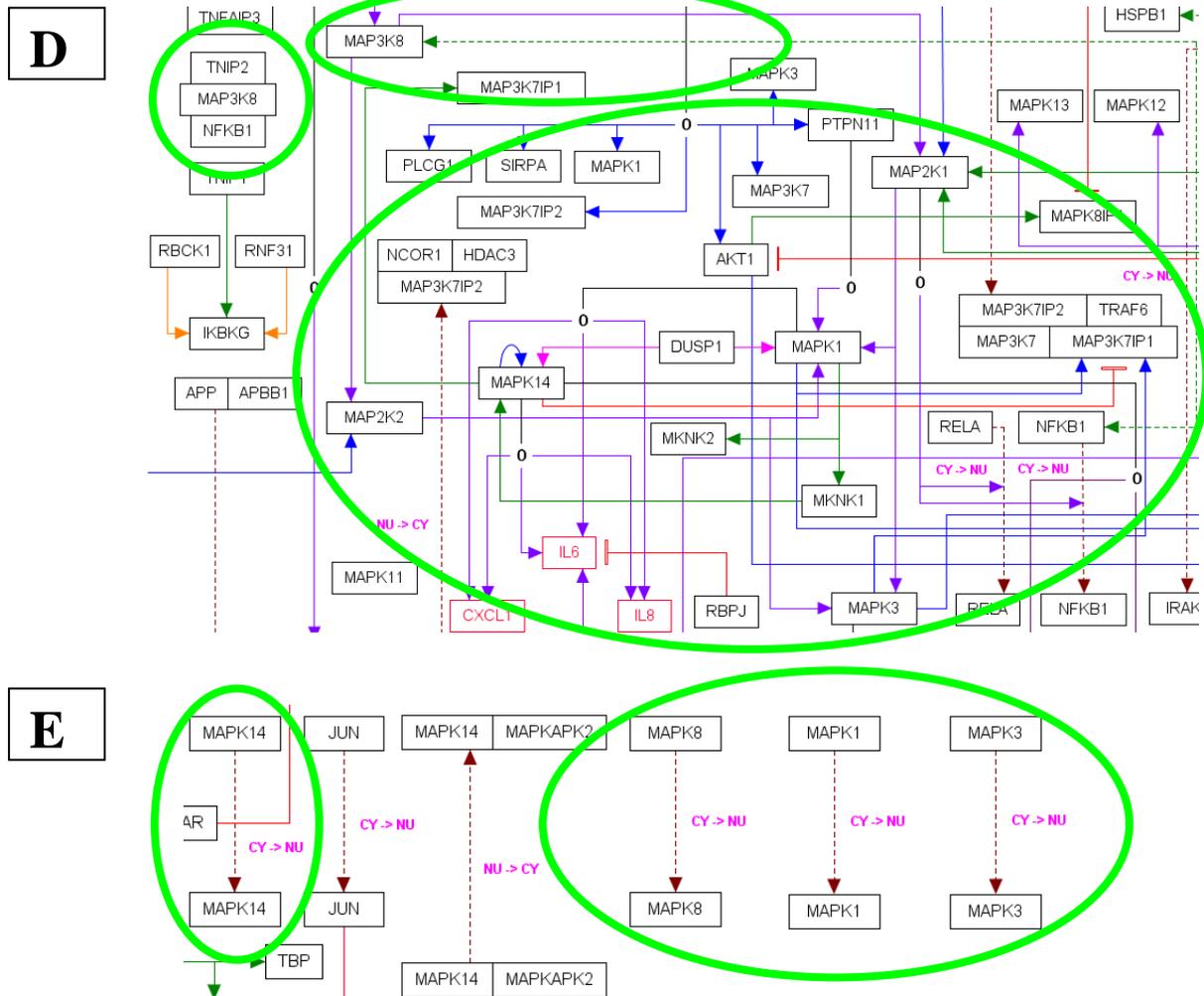


Abbildung 10: Zytosolischer Teil des IL-1-Signalwegs.

A) Siehe Legende von Abbildung 4C.

B) Neben den Mitgliedern der Pellino-Familie wie Pellino-1 (PELI1), das IRAK-1 [IRAK1] ubiquitinyliert (gelber Pfeil), fungieren UBC13 [UBE2N] und UEV1A [UBE2V1], über die es zur Autoubiquitinylierung von TRAF-6 [TRAF6] (gelb gewundener Pfeil) und Ubiquitinylierung der Adapterproteine TAB2 [MAP3K7IP2] sowie TAB3 [MAP3K7IP3] (gelbe Pfeile) kommt, als E3-Ubiquitin-Ligasen. Schließlich werden TAK1 [MAP3K7] und MEK3 [MAP3K3] rekrutiert. IRAK-1 bindet seinerseits an polyubiquitinyliertes NEMO [IKBKG] (grüner Pfeil), das zusammen mit IKK α [CHUK], IKK β [IKKBK] einen Komplex bildet, der I κ B α [NFKBIA] phosphoryliert (blauer Pfeil) und dadurch zu dessen proteasomaler Degradation führt, wodurch die NF- κ B-Untereinheiten p105/50 [NFKB1] und p65 [RELA] in den Nucleus translozieren (braun gestrichelter Pfeil). Außerdem ist die Deubiquitinylierung von NEMO [IKBKG] durch die Ubiquitinprotease CYLD gezeigt (hellgelber Pfeil), was ein Beispiel für einen negativen Rückkopplungsmechanismus ist.

C) TAK1 und MEK3 phosphorylieren und aktivieren MKK3 [MAP2K3], MKK4 [MAP2K4], MKK6 [MAP2K6] und MKK7 [MAP2K7] (violette Pfeile). Daraufhin phosphorylieren und aktivieren MKK3, MKK4 und MKK6 p38 MAPK [MAPK14] bzw. MKK4 und MKK7 JNK [MAPK8] (blaue und violette Pfeile). Als weiteres Beispiel für einen negativen Rückkopplungsmechanismus ist die Inhibierung von MKK7 durch GADD45 β [GADD45B] (roter Pfeil) gezeigt.

D) TPL2 [MAP3K8], welches sich in einem Komplex mit ABIN-2 [TNIP2] und NF- κ B p105 [NFKB1] befindet, dissoziiert von NF- κ B p105 (grün gestrichelter Pfeil mit zwei Köpfen) und aktiviert MEK1 [MAP2K1] sowie MEK2 [MAP2K2], woraufhin diese ERK1 [MAPK3] und ERK2 [MAPK1] aktivieren. Im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus wird TAB1 [MAP3K7IP1] von p38 MAPK phosphoryliert (roter Inhibitionspeil), wodurch es zu einer Hemmung von TAK1 kommt. Außerdem werden p38 MAPK und ERK2 durch MKP1 [DUSP1] dephosphoryliert (rosa Pfeile).

E) Aktivierte p38 MAPK, JNK, ERK1 und ERK2 MAP Kinasen werden auch im Nucleus gefunden.

Alle beschriebenen Zusammenhänge sind grün eingekreist. Vollständige Molekülnamen sind dem Text entnehmbar. Eckige Klammern kennzeichnen die offiziellen Gensymbole von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> (Stand: 20.01.2010).

3.1.2.1.5 Nukleärer Teil des IL-1-Signalwegs

Im Zellkern binden die NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 als Dimer an konservierte DNA-Motive IL-1-responsiver Zielgene. Wichtige Zielgene mit NF κ B-Bindestellen sind *I κ B α* (Griffin et al., 2006; Scott et al., 1993; Sun et al., 1993b), *IL6* (Georganas et al., 2000; Matsusaka et al., 1993; Okazaki et al., 2003; Vanden Berghe et al., 1998; Yamamoto et al., 2004), *IL8* (Baek et al., 2002; Hoffmann et al., 2002; Kunsch et al., 1994; Lomvardas et al., 2002; Matsusaka et al., 1993; Mukaida et al., 1990), „Monocyte chemoattractant protein 1“ (*MCPI*) (Teferedegne et al., 2006; Wolter et al., 2008) und Cyclooxygenase 2 (*COX2*) (Nakao et al., 2000; Newton et al., 1997a; Newton et al., 1997b; Nie et al., 2003; Yan et al., 2002). Mit Hilfe von Co-Aktivatoren wie z.B. „CREB-binding protein“ (CBP) induziert p65 über sein C-terminales Ende die Gentranskription (Hiroi et al., 2003; Hoberg et al., 2006; Zhong et al., 1998). JNK phosphoryliert nukleäre Proteine, die zur „Activated protein 1“ (AP-1)-Familie gehören, speziell c-Jun und „Activating transcription factor 2“ (ATF-2) (Derijard et al., 1994; Gupta et al., 1996; Livingstone et al., 1995; Morton et al., 2004; Wolter et al., 2008), wodurch JNK die Expression wichtiger IL-1-responsiver Gene bewirkt (Bennett et al., 2001; Grondin et al., 2007; Guan et al., 1998; Han et al., 2001; Hoffmann et al., 2008; Holzberg et al., 2003; Krause et al., 1998; Lee et al., 2006; Liu et al., 2003; Muegge et al., 1993; Read et al., 1997; Takeshita et al., 1995; van Dam et al., 1993; Wang et al., 1999; Wolter et al., 2008; Yamada et al., 2003). c-Fos, eine weitere AP-1-Untereinheit, wird von ERK1/2 phosphoryliert (Murphy et al., 2002), und aktiviert ebenfalls viele Zielgene (Hoffmann et al., 2005; Muegge et al., 1993; Takeshita et al., 1995; Wang et al., 1999). ERK, p38 MAPK und JNK phosphorylieren überdies den Transkriptionsfaktor Elk-1 (Cavigelli et al., 1995; Gupta et al., 1996; Janknecht et al., 1997; Raingeaud et al., 1996; Whitmarsh et al., 1997; Yang et al., 2008), der seinerseits die Expression von „Early growth response factor 1“ (*EGR1*) induziert (Hoffmann et al., 2008). „Early growth response factor 1“ (Egr-1) selbst ist ein Transkriptionsfaktor, der Zielgene wie *IL6*, *IL8*, *MCPI* und „Cluster of differentiation 44“ (*CD44*) aktiviert (Fitzgerald et al., 1999; Hoffmann et al., 2008) (Abb.11).

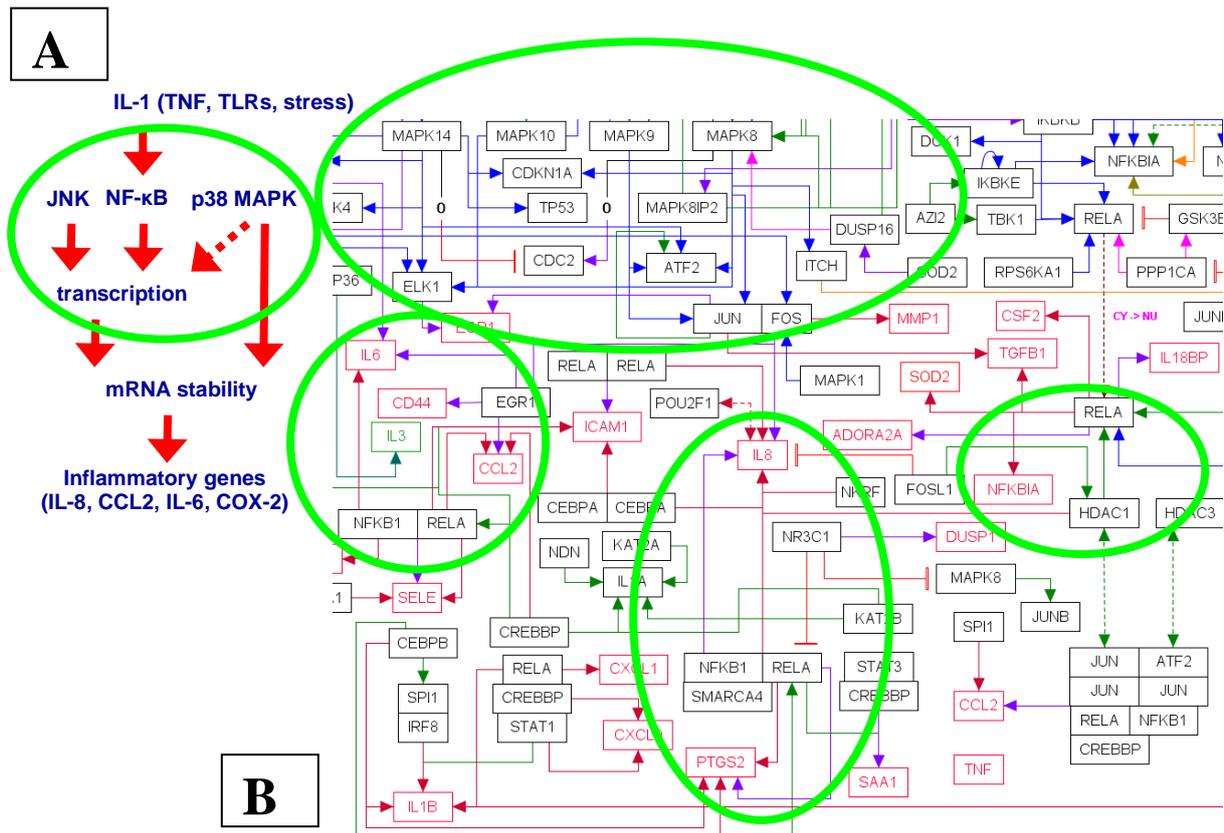


Abbildung 11: Nukleärer Teil des IL-1-Signalwegs.

A) Siehe Legende von Abbildung 4C.

B) NF-κB p50 [NFKB1] und p65 [RELA] binden an ihre Zielgene (bordeauxrote Pfeile) wie z.B. *IkBa* [NFKBIA], *IL6* [IL6], *IL8* [IL8], *MCPI* [CCL2] und *COX2* [PTGS2] (rot dargestellt). Weitere wichtige Transkriptionsfaktoren sind c-Jun [JUN], welches durch JNK [MAPK8] phosphoryliert wird, sowie ATF-2 [ATF2], das sowohl durch JNK als auch p38 MAPK [MAPK14] phosphoryliert wird (blaue Pfeile).

Alle beschriebenen Zusammenhänge sind grün eingekreist. Vollständige Molekülnamen sind dem Text entnehmbar. Eckige Klammern kennzeichnen die offiziellen Gensymbole von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> (Stand: 20.01.2010).

3.1.2.1.6 Regulation IL-1-responsiver Gene auf mRNA-Ebene

Abgesehen davon, dass p38 MAPK im Nukleus auch in der Lage ist, ATF-2 zu aktivieren (Jiang et al., 1996; Raingeaud et al., 1996), kommt ihr eine wichtige Funktion im Zytoplasma als Stabilisator von „Adenine-uridine-rich elements“ (AREs)-enthaltenden mRNAs zu – insbesondere derjenigen, die für IL-6, IL-8 und IL-1β kodieren (Frevel et al., 2003; Reunanen et al., 2002; Ridley et al., 1997; Winzen et al., 1999; Zhao et al., 2008), indem sie entweder direkt oder indirekt über „MAPK-activated protein kinase 2“ (MK2) (Ronkina et al., 2007; Stoeklin et al., 2004; Stokoe et al., 1992a; Winzen et al., 1999) mRNA-destabilisierende Proteine inhibiert: p38 MAPK phosphoryliert „KH-type splicing regulatory protein“ (KSRP) (Briata et al., 2005), während MK2 Tristetraprolin (TTP) phosphoryliert (Chrestensen et al., 2004; Mahtani et al., 2001). Außerdem phosphoryliert MK2 auch „Heat shock protein

27“ (HSP27) (Mahtani et al., 2001; Stokoe et al., 1992b), was seinerseits für die TAK1-vermittelte Signalfortleitung durch IL-1 benötigt wird (Alford et al., 2007).

Während „AU-rich element RNA-binding protein 1“ (AUF1) ein weiteres Beispiel für einen mRNA-destabilisierenden Faktor darstellt (Paschoud et al., 2006), dient „Hu antigen R“ (HuR) als mRNA-stabilisierendes Protein (Dean et al., 2001; Fan et al., 1998; Peng et al., 1998; Suswam et al., 2005). „Cytotoxic granule-associated RNA binding protein“ (TIA-1) hingegen hat die Rolle eines „translational silencer“, welcher z.B. an der mRNA von Tumornekrosefaktor- α (*TNF α*) die Translation in das entsprechende Protein inhibiert (Piecyc et al., 2000) (Abb.12).

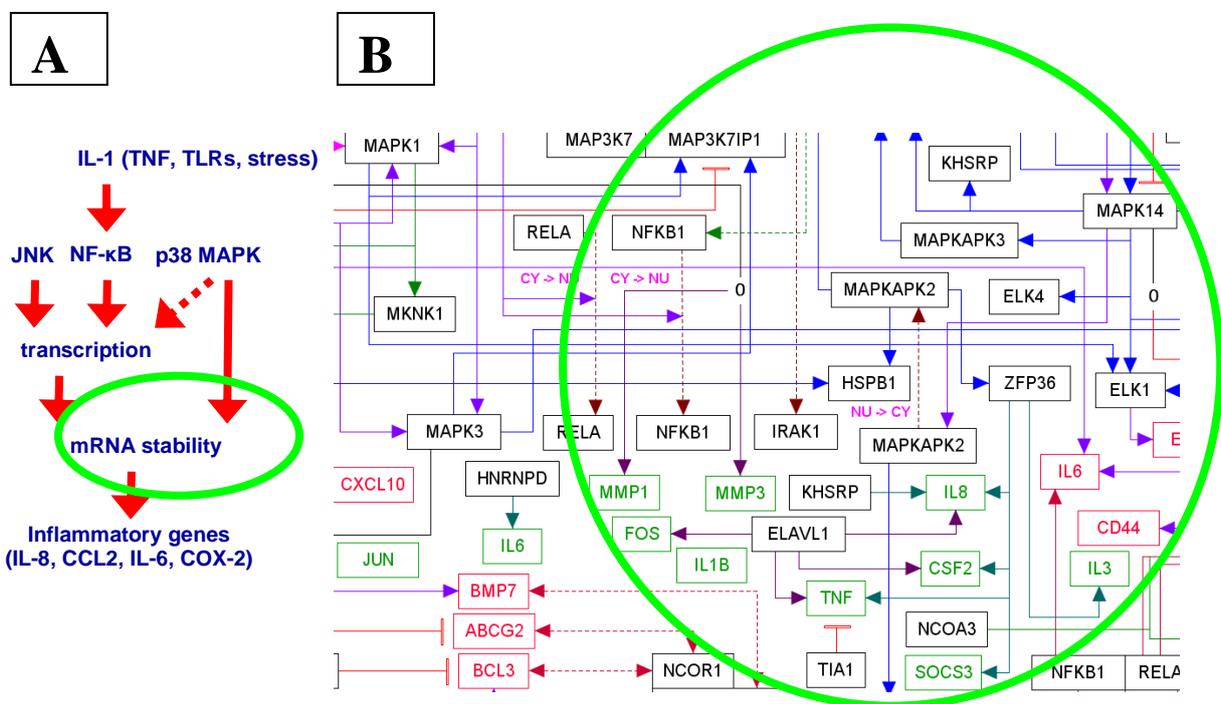


Abbildung 12: Regulation IL-1-responsiver Gene auf mRNA-Ebene.

A) Siehe Legende von Abbildung 4C.

B) p38 MAPK [MAPK14] phosphoryliert KSRP [KHSRP] (blauer Pfeil) und initiiert über die Aktivierung von MK2 [MAPKAPK2] (violetter Pfeil) die Phosphorylierung von TTP [ZFP36] (blauer Pfeil). KSRP und TTP destabilisieren (blaugüne Pfeile) mRNAs (grün dargestellt). HuR [ELAVL1] hingegen ist ein Stabilisator von mRNA (purpurne Pfeile).

Alle beschriebenen Zusammenhänge sind grün eingekreist. Vollständige Molekülnamen sind dem Text entnehmbar. Eckige Klammern kennzeichnen die offiziellen Gensymbole von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> (Stand: 20.01.2010).

3.1.2.1.7 Negative Rückkopplungselemente im IL-1-Signalweg

Ein wichtiges Charakteristikum des IL-1-Signalwegs ist, dass über eine Kombination an Mechanismen neben der initialen Induktion und Amplifikation der Signale auch eine Abschaltung der Signale eingeleitet wird. Dadurch bleibt ein typisches IL-1-vermitteltes Signal immer transient. Folgende abschaltende Moleküle sind in die IL-1-

Signaltransduktionskarte integriert: „Toll-interacting protein“ (TOLLIP) bindet an IL-1R1 (Abb.9C), geleitet internalisiertes IL-1R1 zu Endosomen und sorgt für dessen adäquate Degradation (Brissoni et al., 2006; Burns et al., 2000). Infolge p38-vermittelter Phosphorylierung von TAB1 wird TAK1 inaktiviert (Cheung et al., 2003) (Abb.10D). Durch die mRNA- und Proteinsynthese von $I\kappa B\alpha$, welche durch Bindung der NF- κ B-Untereinheit p65 an das entsprechende Zielgen initiiert wird (Abb.13), wird rückläufig die IL-1-induzierte NF- κ B-Antwort gehemmt (Griffin et al., 2006; Scott et al., 1993; Sun et al., 1993b). Diese wird ebenso infolge der Deubiquitylierung von NEMO durch den Tumorsuppressor Cylindromatosis (CYLD) (Abb.10A), dessen transkriptionelle Regulation selbst NF- κ B-abhängig ist (Abb.13), inhibiert (Jono et al., 2004; Kovalenko et al., 2003). NF- κ B aktiviert außerdem die Expression von „Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta“ (*GADD45 β*) (De Smaele et al., 2001) (Abb.13), das MKK7 direkt hemmt (Papa et al., 2004) (Abb.10C). Einen Rückkopplungsmechanismus zur Dephosphorylierung aktivierter MAPKs (Abb.10D) stellt die IL-1-abhängige Expression von „MAPK phosphatases“ (MKPs) wie z.B. *MKP1* dar (Hutter et al., 2000; Issa et al., 2007; Lasa et al., 2002; Sun et al., 1993a; Toh et al., 2004) (Abb.13). Weitere Beispiele für endogene Inhibitoren des IL-1-Signalwegs sind alternative Splice-Varianten von MyD88 (MyD88short) und IRAK-1 (IRAK-1c) sowie IRAK-M, welche vermutlich als dominant-negative Inhibitoren wirken (Burns et al., 2003; Kobayashi et al., 2002; Rao et al., 2005).

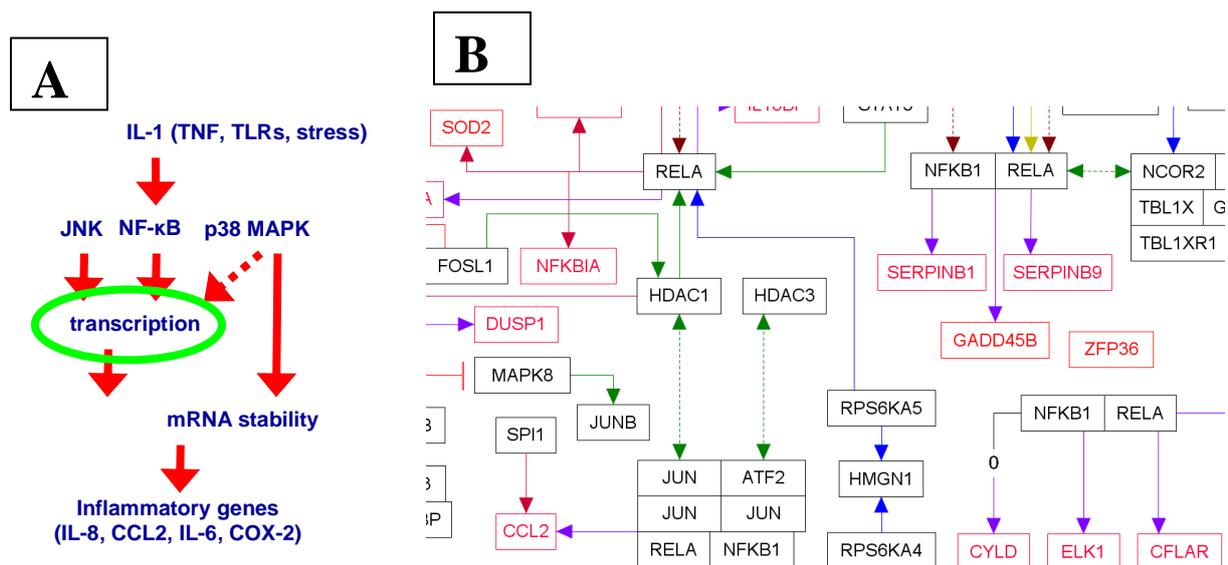


Abbildung 13: Induzierbare Expression von Komponenten negativer Rückkopplungsmechanismen.

A) Siehe Legende von Abbildung 4C.

B) Rot dargestellt sind Zielgene des IL-1-Signalwegs wie *I κ B α* [NFKBIA], *MKP1* [DUSP1], *GADD45 β* [GADD45B] und *CYLD*, deren Expression negative Rückkopplungsmechanismen einleiten.

Vollständige Molekülnamen sind dem Text entnehmbar. Eckige Klammern kennzeichnen die offiziellen Gensymbole von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> (Stand: 20.01.2010).

3.2 Bestimmung der mRNA-Expression ausgewählter Zielgene aus dem Interleukin-1-Signalweg

In der IL-1-Signaltransduktionskarte sind vielfach vernetzte Mechanismen dargestellt, über die IL-1 die mRNA-Expression von Zielgenen reguliert. Es gibt bereits viele veröffentlichte, aber auch eigene transkriptomweite mRNA-Expressionsdaten aus der AG Kracht, die Informationen über die Gesamtheit an IL-1-regulierten Zielgenen in verschiedenen biologischen Systemen enthalten. Die Generierung der IL-1-Signaltransduktionskarte bietet jetzt die Möglichkeit, die Veränderungen von Signalwegkomponenten auf mRNA-Ebene über den Verlauf der gesamten graphisch dargestellten IL-1-Signaltransduktion abzubilden, indem die Informationen aus *Microarray*-Experimenten auf die IL-1-Signaltransduktionskarte projiziert werden. Ebenso interessant ist die sich daran anknüpfende Frage, welchen Einfluss eine Hemmung des Signalwegs auf das jeweilige Genexpressionsmuster hat. LPS induziert sowohl die Transkription des IL-1 β -Gens über *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs) als auch die Prozessierung des IL-1 β -Vorläuferproteins in die reife Form (Dinarello, 2009; Martinon et al., 2009), woraus sich die Idee entwickelte, die LPS-vermittelte Immunantwort auf Ebene der mRNA-Expression IL-1-responsiver Gene in humanen PBMC und den Effekt einer Vorinkubation mit dem IL-1-Rezeptorantagonisten Anakinra zu untersuchen. Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurde daher versucht, die Bedingungen für die Erstellung von geeigneten mRNA-Expressionsprofilen zu etablieren und die erhaltenen Ergebnisse auf die IL-1-Signaltransduktionskarte zu übertragen.

3.2.1 Etablierung der Versuchsbedingungen für die LPS-induzierte mRNA-Expression in humanen PBMC

3.2.1.1 Zeitkinetik der mRNA-Expression durch LPS in humanen PBMC

Als ein (patho-)physiologisch relevantes Modellsystem wurden aus menschlichem Blut isolierte mononukleäre Zellen gewählt, die sehr stark auf LPS reagieren (Schindler et al., 1990). Um zu überprüfen, welche Stimulationsdauer mit LPS in humanen PBMC zu einer adäquaten Genexpression führt, wurde die Zeitkinetik der mRNA-Expression von *IL8*, einem infolge der Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine, bakterielle und virale Bestandteile sowie zellulären Stress rapide exprimierten Chemokin (Hoffmann et al., 2002), durch 100 ng/ml LPS bestimmt. Es zeigten sich sehr hohe LPS-induzierbare Genantworten, welche im Folgenden beschrieben werden:

Während 0,5 h Inkubation nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS im Vergleich zur Kontrolle zu einer Steigerung der IL-8 mRNA-Expression auf etwa 800-fach führte, rief 1 h Inkubation mit

der gleichen Konzentration gar eine 10^5 -fach erhöhte Antwort hervor, die nach 3 h nur noch ein Drittel dessen betrug (Abb.14A).

Außerdem wurde die mRNA-Expression von drei weiteren Genen bestimmt, deren Proteine an der IL-1-vermittelten Signalfortleitung (IRAK2, Pellino-1) bzw. negativen Rückkopplung (GADD45 β) beteiligt sind (vgl. 3.1.2.1), und deren mRNA anhand von *Microarray*-Ergebnissen aus der AG Kracht als LPS-reguliert gemessen worden war.

Im Vergleich zur Kontrolle lag die Induktion der GADD45 β mRNA-Expression nach 0,5 h bzw. 1 h bei 20- bis 30-fach und stieg nach 3 h noch auf fast 80-fach an. 1 h Inkubation mit 100 ng/ml LPS bedeutete eine ca. 30-fach erhöhte IRAK2 mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle, die nach 3 h nochmal um den Faktor 9 anstieg. Die LPS-induzierte mRNA-Expression von *PELLINO1* fiel im Vergleich zu den anderen Genen über die gesamte Zeit hin nicht so hoch aus. Nach 1 h war sie 4-fach und nach 3 h knapp 25-fach erhöht (Abb.14B).

Zusammenfassend bewirkte eine dreistündige Inkubation mit 100 ng/ml LPS eine hohe Expressionssteigerung der untersuchten Gene auf mRNA-Ebene. Da diese jedoch nach 1 h bereits deutlich ausgeprägt war, wurde dieser Zeitpunkt für die folgenden Versuche verwendet.

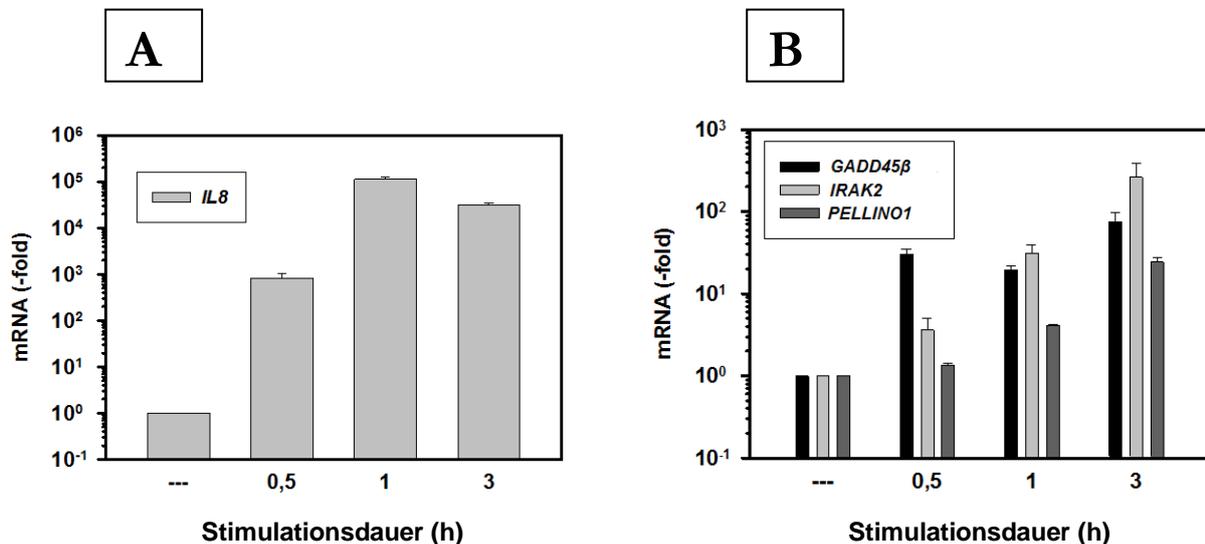


Abbildung 14: Zeitkinetik der LPS-induzierten mRNA-Expression in humanen PBMC.

PBMC wurden mit 100 ng/ml LPS stimuliert und für 0,5; 1; 3 h bei 37 °C inkubiert oder blieben unstimuliert und wurden direkt lysiert. Die mRNA-Expression von *IL8* (A) sowie *GADD45 β* , *IRAK2* und *PELLINO1* (B) wurde im Vergleich zur Kontrolle [mRNA(-fold) = 1] bestimmt. Die Expressionswerte sind auf einer logarithmischen Skala aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus einem Experiment unter Verwendung der PBMC von Donor 1 (D1) und einem technischen Replikat.

3.2.1.2 Dosis-Wirkungs-Beziehung von LPS zur mRNA-Expression ausgewählter IL-1-Zielgene in humanen PBMC

Anschließend war es das Ziel, die LPS-Konzentration nach unten zu titrieren, um die niedrigste Konzentration zu bestimmen, die in den PBMC noch zu einer adäquaten Expression der IL-8 mRNA führte. Dazu wurden humane PBMC mit jeweils 1; 10 und 100 ng/ml LPS stimuliert und für 1 h inkubiert. Gleichzeitig sollte untersucht werden, inwieweit sich die Genexpression durch äußere Faktoren wie Inkubation bei 37 °C (thermisch) bzw. eine kontinuierliche Resuspension der Zellen in den Eppendorfgefäßen mittels Rotator (mechanisch) beeinflussen lässt.

Im Vergleich zu einer Kontrollprobe, die ohne Inkubation sofort verarbeitet wurde, bedingte bereits die alleinige Inkubation einer Kontrollprobe für 1 h bei 37 °C eine 7-fach erhöhte IL-8 mRNA-Expression. Anstatt noch eine weitere Steigerung dieser Antwort hervorzurufen, führte die mechanische Resuspension der Zellen während der Inkubation nur zu einem halb so großen Effekt. Die verschiedenen LPS-Konzentrationen bewirkten allesamt eine >1000-fache Induktion von *IL8* (Abb.15A), woraufhin niedrigere LPS-Konzentrationen getestet wurden. Außerdem wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Proben fortan als Kontrolle eine unstimulierte Probe gewählt, die wie die anderen Proben auch für eine Stunde bei 37 °C inkubiert wurde. Weil die mechanische Resuspension der Zellen in der Kontrollprobe während der Inkubation eine nur etwa 3-fach erhöhte Expression von IL-8 mRNA im Vergleich zur nicht inkubierten und direkt weiterverarbeiteten Kontrollprobe bewirkte, stellte sich die Frage, ob in allen Proben die Zellen während der Inkubation mechanisch resuspendiert werden sollten. Da es sich jedoch bei den mRNA-Expressionswerten um Vergleichswerte zum Referenzwert der Kontrolle handelt, ist dies unerheblich. Es ist lediglich wichtig, alle Proben exakt den gleichen Bedingungen auszusetzen. Also wurde aus praktischen Gründen auf eine mechanische Resuspension der Zellen in den Proben während der Inkubation verzichtet.

0,01 bzw. 0,1 ng/ml LPS induzierten eine im Vergleich zur Kontrolle 60-80-fache Steigerung der IL-8 mRNA-Expression, die durch 1 ng/ml LPS noch einmal um den Faktor 3-4 zunahm (Abb.15B). Bei dieser Konzentration wurde gleichzeitig ein Maximum erreicht (Abb.15A). Um etwa den gleichen Faktor erhöhten sich auch die mRNA-Expressionswerte von *GADD45β*, *IRAK2* und *PELLINO1* 1 h nach Stimulation der PBMC mit 1 ng/ml LPS im Vergleich zur Stimulation mit 0,1 ng/ml (Abb.15C). Somit wurde 1 ng/ml als geeignete LPS-Konzentration für die sich anschließenden Versuche festgelegt.

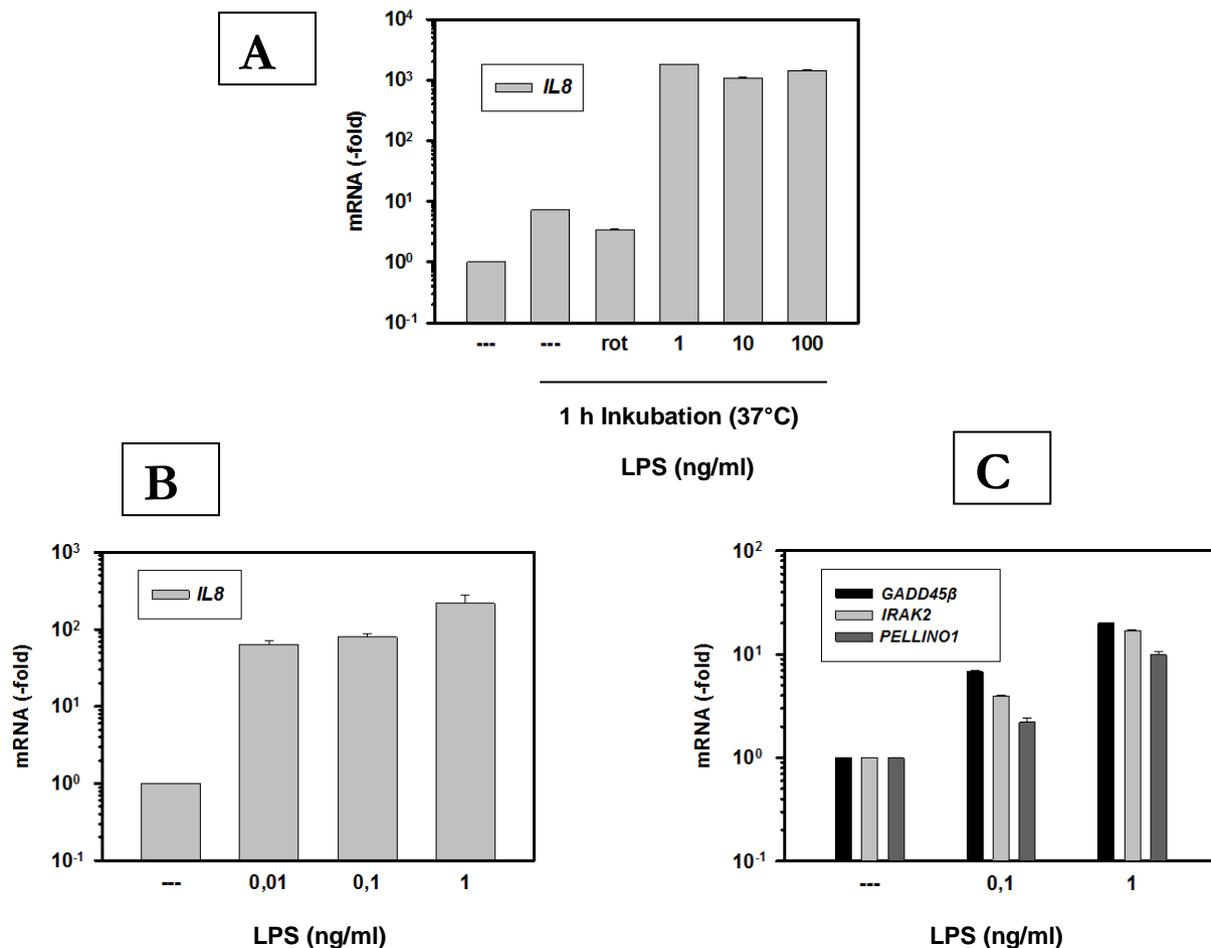


Abbildung 15: Dosis-Wirkungs-Beziehung von LPS zur mRNA-Expression in humanen PBMC.

A) PBMC wurden mit 1; 10; 100 ng/ml LPS stimuliert und für 1 h bei 37 °C inkubiert oder blieben unstimuliert und wurden entweder direkt lysiert oder mit (rot) oder ohne Rotation von 2 min⁻¹ für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die IL-8 mRNA-Expression wurde im Vergleich zur Kontrolle [mRNA(-fold) = 1] bestimmt. Die Expressionswerte sind auf einer logarithmischen Skala aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. aus einem Experiment unter Verwendung der PBMC von D2 und einem technischen Replikat.

B)+C) PBMC wurden mit 0,01; 0,1; 1 ng/ml LPS stimuliert oder blieben unstimuliert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die mRNA-Expression von *IL8* (B) sowie *GADD45β*, *IRAK2* und *PELLINO1* (C) wurde im Vergleich zur Kontrolle [mRNA(-fold) = 1] bestimmt. Die Expressionswerte sind auf einer logarithmischen Skala aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. aus zwei unabhängigen Experimenten unter jeweiliger Verwendung der PBMC von D1.

3.2.2 Der Einfluss von Anakinra auf die mRNA-Expression

3.2.2.1 Der Einfluss von Anakinra auf die LPS-induzierte mRNA-Expression in humanen PBMC

In weiteren Versuchen sollte getestet werden, welcher Teil der LPS-Antwort auf LPS-induzierte auto- oder parakrine IL-1-Wirkungen zurückzuführen war.

PBMC wurden im Anschluss an eine 0,5 h Vorinkubation bei 37 °C mit 1 ng/ml LPS behandelt. 1 h Stimulationsdauer führte zu einer Induktion der mRNA-Expression von *IL8* um etwa 100-fach, *IL6* 140-fach, *GADD45β* 8-fach, *IRAK2* 15-fach und *PELLINO1* nur <1,5-fach.

Diese Effekte blieben nach 0,5 h Vorinkubation mit dem IL-1-Rezeptorantagonisten Anakinra im 10.000-fachen Überschuss unverändert (Abb.16A+B). Gleichzeitig fiel auf, dass die LPS-induzierte Genexpression deutlich geringer ausfiel als in den Versuchen, in denen die Proben ohne Vorinkubation direkt für 1 h mit LPS stimuliert wurden.

Es stellte sich die Frage, inwieweit IL-1 überhaupt eine Rolle bei der LPS-vermittelten Immunantwort in den PBMC spielte und welche intra-/interzellulären Prozesse unter Vorinkubation bei 37 °C in Gang gesetzt wurden, nachdem gezeigt werden konnte, dass bereits 1 h Inkubation bei 37 °C eine 7-fache Induktion der IL-8 mRNA-Expression bewirkte (vgl. 3.2.1.2).

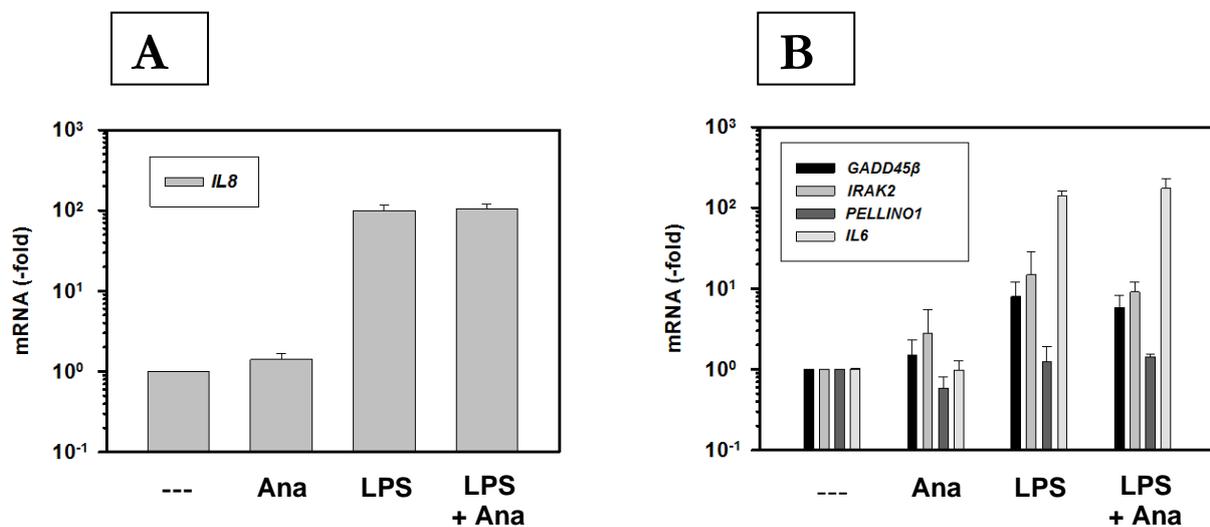


Abbildung 16: Der Einfluss von Anakinra auf die LPS-induzierte mRNA-Expression in humanen PBMC.

PBMC wurden bei 37 °C entweder mit 10 µg/ml Anakinra (Ana) oder unbehandelt für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 1 ng/ml LPS stimuliert oder unstimuliert für 1 h inkubiert. Die mRNA-Expression wurde im Vergleich zur Kontrolle [mRNA(-fold) = 1] bestimmt. Die Expressionswerte sind auf einer logarithmischen Skala aufgetragen.

A) mRNA-Expression von *IL8*; dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. aus drei unabhängigen Experimenten unter jeweiliger Verwendung der PBMC von D1, D2 und D3.

B) mRNA-Expression von *GADD45β*, *IRAK2*, *PELLINO1* und *IL6*; dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. aus zwei unabhängigen Experimenten unter jeweiliger Verwendung der PBMC von D1 und D3.

3.2.2.2 Überprüfung der Reinheit von Anakinra

Durch Analyse der Anakinra-Präparation mittels SDS-Gelelektrophorese wurde daraufhin die Reinheit und Konzentration überprüft. Ein Teil der Probe wurde vorab durch Erhitzen für 10 min bei 95 °C denaturiert. Es wurde für das erhitzte Anakinra eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von knapp über 17 kDa sichtbar (Abb.17). Diese entsprach der Proteinbande von unbehandeltem Anakinra, welches parallel auf das 8-15 %-ige SDS-Gradienten-Minigel aufgetragen worden war, sowie den Angaben in der Literatur (Schreuder

et al., 1995). Ansonsten wurden keine weiteren Proteinbanden detektiert, sodass zumindest von keiner Verunreinigung des Anakinras durch Proteine ausgegangen werden konnte.

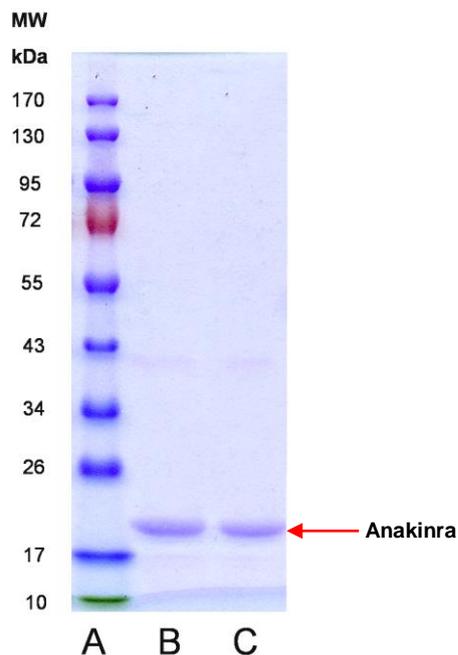


Abbildung 17:

Überprüfung der Reinheit von Anakinra im 8-15 %-igen SDS-Gradienten-Minigel.

Anakinra wurde entweder für 10 min bei 95 °C erhitzt (Spalte C) oder blieb unbehandelt (Spalte B). Anschließend wurden pro Lane auf dem Gel 5 µg der entsprechenden Anakinra-Probe aufgetragen. Die entstandenen Proteinbanden wurden im Vergleich zum PeqLab Proteinmarker IV (Spalte A) abgelesen.

3.2.2.3 Der Einfluss von Anakinra auf die IL-1-induzierte mRNA-Expression in kultivierten Zellen

Um die Wirkung von Anakinra in einem weiteren Modellsystem zu überprüfen, wurden kultivierte Zelllinien mit IL-1 α stimuliert und der dosisabhängige Effekt von Anakinra auf die mRNA-Expression bestimmt.

3.2.2.3.1 Der Einfluss von Anakinra auf die IL-1-induzierte mRNA-Expression in HEK293IL-1R-Zellen

Die Stimulation von HEK293IL-1R-Zellen mit 10 ng/ml IL-1 α führte nach 3 h zu einer fast 200-fachen Erhöhung der IL-8 mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle. 0,5 h Vorinkubation mit 10 µg/ml Anakinra (1000-facher Überschuss) hemmte diesen Effekt zu über 90 % (Abb.18A).

Für *GADD45 β* , *IRAK2*, *PELLINO1* und *IL6* lag die Steigerung der mRNA-Expression infolge der Stimulation mit IL-1 jeweils <2-fach im Vergleich zur Kontrolle. Dies könnte an einer zu niedrigen IL-1-Konzentration, zu kurzen Stimulationsdauer oder der grundsätzlich fehlenden Fähigkeit zur Aktivierung in den HEK293-Zellen gelegen haben. Dadurch ließ sich für diese Gene keine Aussage zur Wirkung von Anakinra treffen (Abb.18B).

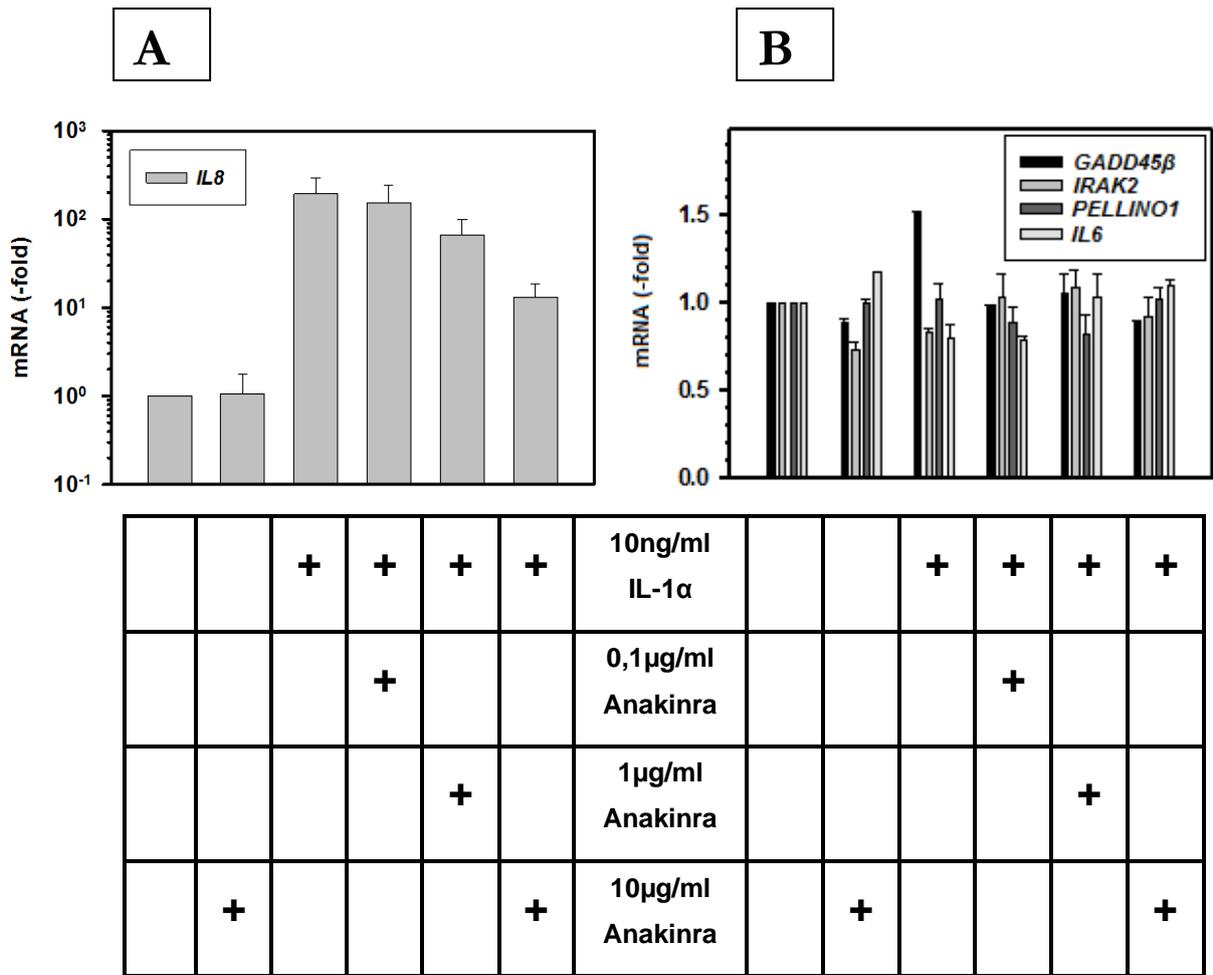


Abbildung 18: Der Einfluss von Anakinra auf die IL-1-induzierte mRNA-Expression in HEK293IL-1R-Zellen.

HEK293IL-1R-Zellen wurden bei 37 °C mit 0,1; 1; 10 µg/ml Anakinra oder unbehandelt für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 10 ng/ml IL-1α stimuliert oder unstimuliert für 3 h inkubiert. Die mRNA-Expression von *IL8* (A) sowie *GADD45β*, *IRAK2*, *PELLINO1* und *IL6* (B) wurde im Vergleich zur Kontrolle [mRNA(-fold) = 1] bestimmt. Die Expressionswerte sind in A) auf einer logarithmischen, in B) auf einer linearen Skala aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. aus einem Experiment und einem technischen Replikat.

3.2.2.3.2 Der Einfluss von Anakinra auf die IL-1-induzierte mRNA-Expression in HeLa-tTA-Zellen

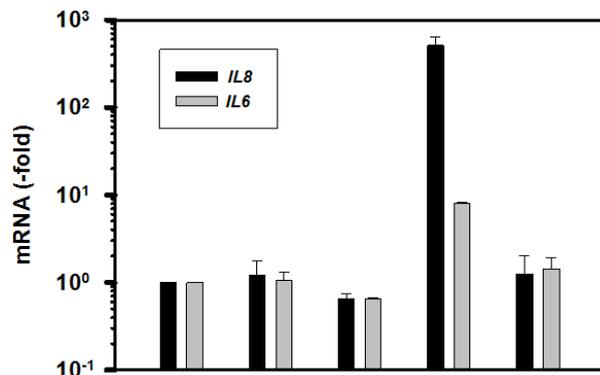
Anschließend wurde der Hemmeffekt von 10 µg/ml Anakinra in HeLa-tTA-Zellen untersucht. 20 ng/ml IL-1α für 4 h bewirkten eine knapp 500-fach gesteigerte Expression der IL-8 mRNA im Vergleich zur Kontrolle, die durch 0,5 h Vorinkubation mit Anakinra im 500-fachen Überschuss komplett gehemmt wurde (Abb.19). Somit fielen sowohl die IL-1-induzierte *IL8*-Antwort als auch die Anakinra-vermittelte Hemmung noch deutlicher aus als in den HEK293IL-1R-Zellen (vgl. 3.2.2.3.1). Des Weiteren kam es durch IL-1 in den HeLa-Zellen – im Gegensatz zur Beobachtung in den HEK293-Zellen – zu einer >2-fachen Steigerung der mRNA-Expression von *IL6* (8-fach). Auch dieser Effekt wurde durch Anakinra vollständig blockiert (Abb.19).

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die HeLa-tTA-Zellen zwar sehr gut auf IL-1 ansprechen, aber im Vergleich zu den HEK293IL-1R-Zellen entweder von vornherein weniger IL-1-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche trugen oder nach IL-1-Stimulation in der Zwischenzeit nicht ausreichend neue durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus generierten, um der Hemmung durch Anakinra entgegenzuwirken.

Abbildung 19:

Der Einfluss von Anakinra auf die IL-1-induzierte mRNA-Expression in HeLa-tTA-Zellen.

HeLa-tTA-Zellen wurden bei 37 °C mit 10 µg/ml Anakinra, H₂O oder unbehandelt für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 20 ng/ml IL-1 α stimuliert oder unstimuliert für 4 h inkubiert. Die mRNA-Expression von *IL8* und *IL6* wurde im Vergleich zur Kontrolle [mRNA (-fold) = 1] bestimmt. Die Expressionswerte sind auf einer logarithmischen Skala aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus einem Experiment und einem technischen Replikat.



20ng/ml IL-1 α				+	+
10µg/ml Anakinra		+			+
H ₂ O			+		

3.2.3 Dosis-Wirkungs-Beziehung von TNF- α zur mRNA-Expression ausgewählter IL-1-Zielgene in humanen PBMC

LPS induziert über *Toll-like*-Rezeptoren auch die Expression von TNF- α (Gaestel et al., 2009a). Es ist durchaus möglich, dass ein Teil der LPS-Effekte nicht über den IL-1-, sondern über den TNF- α -Signalweg vermittelt wurde. Dies wurde an denselben Zielgenen, wie oben beschrieben, untersucht. Es zeigte sich durch TNF- α nach 1 h eine dosisabhängige Zunahme von *IL8* mit einer im Vergleich zur Kontrolle 15-fachen Steigerung der mRNA-Expression unter Verwendung von 10 ng/ml (Abb.20A).

Während die mRNA-Expression von *PELLINO1* durch TNF- α unbeeinflusst blieb, bewirkte eine Konzentration von 10 ng/ml immerhin eine 2-3-fache Steigerung der mRNA-Expression von *GADD45 β* und *IRAK2* nach 1 h. Dieses Resultat wurde für *GADD45 β* bereits mit 1 ng/ml erzielt (Abb.20B). Auch wenn die Effekte für *GADD45 β* und *IRAK2* nur schwach ausgeprägt waren, ließen die Beobachtungen vermuten, dass TNF- α in humanen PBMC durchaus in der Lage ist, Komponenten des IL-1-Signalwegs auf genetischer Ebene zu induzieren.

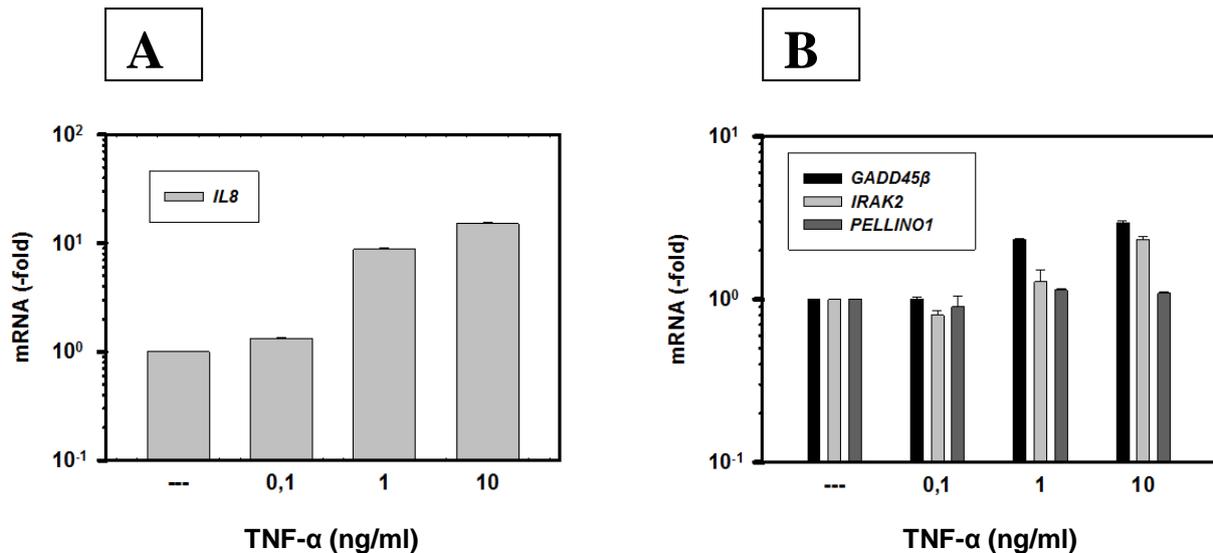


Abbildung 20: Dosis-Wirkungs-Beziehung von TNF- α zur mRNA-Expression in humanen PBMC.

PBMC wurden mit 0,1; 1; 10 ng/ml TNF- α stimuliert oder blieben unstimuliert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die mRNA-Expression von *IL8* (A) sowie *GADD45 β* , *IRAK2* und *PELLINO1* (B) wurde im Vergleich zur Kontrolle [mRNA(-fold) = 1] bestimmt. Die Expressionswerte sind auf einer logarithmischen Skala aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus einem Experiment unter Verwendung der PBMC von D3 und einem technischen Replikat.

3.2.4 Der Einfluss von Adalimumab auf die LPS-induzierte IL-8 mRNA-Expression in humanen PBMC

In Analogie zur Untersuchung des Einflusses von Anakinra auf die LPS-induzierte mRNA-Expression wurde der humane, monoklonale anti-TNF- α -Antikörper Adalimumab eingesetzt, um die durch LPS initiierte TNF- α -Signalfortleitung zu inhibieren. 1 ng/ml LPS bewirkte nach 1 h eine etwa 100-fache Erhöhung der IL-8 mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle und daran änderten 0,5 h Vorinkubation mit 10 μ g/ml Adalimumab nichts (Abb.21). Somit vermochte Adalimumab ebenso wenig wie Anakinra, in einer Konzentration von 10 μ g/ml die innerhalb von 1 h durch 1 ng/ml LPS induzierte mRNA-Expression zu hemmen.

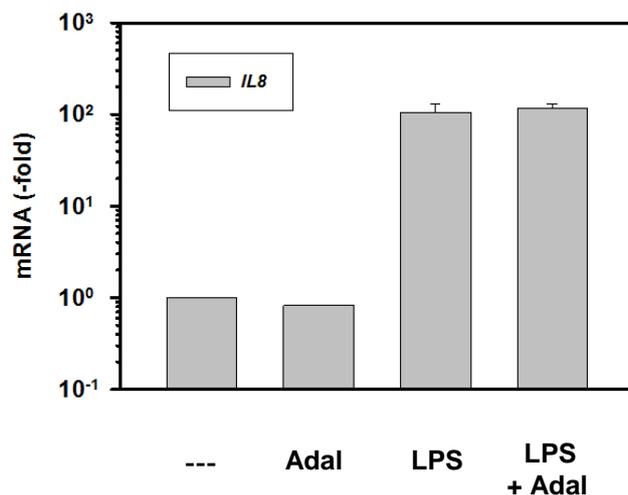


Abbildung 21:

Der Einfluss von Adalimumab auf die LPS-induzierte IL-8 mRNA-Expression in humanen PBMC.

PBMC wurden bei 37 °C entweder mit (Adal) oder ohne 10 μ g/ml Adalimumab für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 1 ng/ml LPS stimuliert oder unstimuliert für 1h inkubiert. Die IL-8 mRNA-Expression wurde im Vergleich zur Kontrolle [mRNA (-fold) = 1] bestimmt. Die Expressionswerte sind auf einer logarithmischen Skala aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus einem Experiment unter der Verwendung der PBMC von D3 und einem technischen Replikat.

3.3 Abbilden von Genexpressionsdaten auf der Interleukin-1-Signaltransduktionskarte

Obwohl die Analyse der Literaturdaten und die im Labor der AG Kracht erhobenen Westernblot-Daten zeigten, dass eine Reihe der zentralen intrazellulären Regulatoren des IL-1-Systems konstitutiv exprimiert vorliegen und daher wohl nicht auf mRNA-Ebene reguliert werden, war unklar, wie viele andere Signalwegkomponenten identifiziert werden könnten, die sehr wohl auch auf mRNA-Ebene reguliert werden. In einem nächsten Schritt sollte deshalb die IL-1-abhängige Genregulation unter Verwendung des Hemmstoffs Anakinra in verschiedenen Zellpopulationen mittels *Microarray*-Analyse untersucht werden. Mit der neu geschaffenen IL-1-Signaltransduktionskarte besteht die Möglichkeit, experimentelle Daten direkt auf den Netzwerkkomponenten abzubilden. So lassen sich mRNA-Expressionsdaten aus Versuchen mit verschiedenen Stimuli, Hemmstoffen oder Zeitpunkten in der Karte sogar vergleichend darstellen.

Im Folgenden wurden die geeignetsten aus den Vorversuchen stammenden RNA-Proben verwendet, um in Kooperation mit dem *Microarray*-Labor des SFB566, MH Hannover genomweite mRNA-Expressionsprofile zu erstellen und die Daten auf die IL-1-Signaltransduktionskarte zu projizieren.

3.3.1 RNA-Qualitätskontrolle

Bevor die RNA-Proben ausgewählter Experimente zur mRNA-Expressionsanalyse verwendet werden konnten, musste die Integrität der RNAs untersucht werden. Bei der Analyse mittels *Agilent 2100 Bioanalyzer* lagen die 28S-/18S-rRNA-Ratios allesamt zwischen 1,3 und 2,2 bei einer *RNA Integrity Number (RIN)* von jeweils 8,1 bis 10,0. Zudem waren die RNA-Elektropherogramme der einzelnen Proben untereinander vergleichbar, sodass von einer geringen Degradation und ausreichenden RNA-Qualität ausgegangen werden konnte (Abb.22).

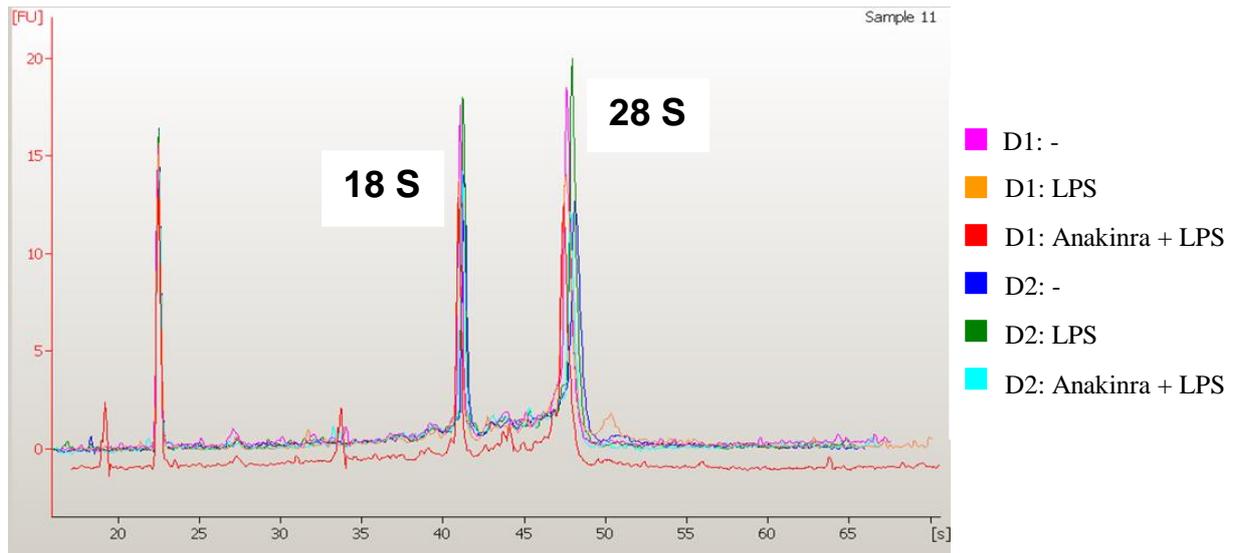


Abbildung 22: RNA-Qualitätskontrolle mittels Agilent 2100 Bioanalyzer.

Exemplarisch abgebildet sind die Elektropherogramme der aus den PBMC von D1 und D2 gewonnenen RNA-Proben, welche vom *Microarray*-Labor des SFB566, MHH bearbeitet wurden. Die 28S-/18S-rRNA-Ratios lagen hierbei allesamt zwischen 1,3 und 1,9 bei einer *RNA Integrity Number (RIN)* zwischen 8,1 und 9,4. Zuvor waren die PBMC bei 37 °C entweder mit oder ohne 10 µg/ml Anakinra für 0,5 h vorinkubiert und anschließend mit 1 ng/ml LPS stimuliert oder unstimuliert für 1 h inkubiert worden (siehe nebenstehende Legende).

3.3.2 Genomweite Bestimmung der mRNA-Expression in humanen PBMC und kultivierten Zellen

Mittels *Microarray*-Analyse wurden aus den RNA-Proben mRNA-Expressionsprofile erstellt: Die Fluoreszenzintensitätswerte für die Gensonden wurden in *Genespring GX* \log_2 -transformiert und auf die 75. Perzentile der einzelnen Arrays normalisiert (vgl. 2.12.4). Tabelle 4 gibt eine Übersicht des Rechenwegs für die mRNA-Messungen von *IL8*.

Mittels Kastengrafik („Box-Whisker-Plot“) lässt sich die Verteilung der Expressionswerte aller Sonden relativ zur jeweiligen Kontrollvariante darstellen (Abb.23). In den HEK293IL-1R-Zellen fand im Gegensatz zu den HeLa-tTA-Zellen und PBMC viel weniger stimulusabhängige Regulation statt. Dies ist ersichtlich an der geringen Änderung bzw. Verschiebung der Verteilung in der dritten Spalte von links in Abb.23B. Anakinra zeigte in den HeLa-tTA-Zellen im Gegensatz zu den Beobachtungen in den PBMC einen starken Hemmeffekt (vgl. Abb.23B, Spalte 8 mit Abb.23B, Spalte 12 bzw. Abb.23B, Spalte 16).

A

<i>IL8</i>	roh		normalisiert (log ₂)		Ratio (log ₂)	mRNA-Expression (-fold)
	K	LPS	K	LPS	LPS-K	
D1	685	60228	0	6,670	6,670	101,84
D2	2134	80223	0	5,262	5,262	38,39

B

<i>IL8</i>	roh		normalisiert (log ₂)		Ratio (log ₂)	mRNA-Expression (-fold)
	LPS	LPS Ana	LPS	LPS Ana	(LPS Ana)-LPS	
D1	60228	50132	6,670	6,159	-0,512	-1,43
D2	80223	94671	5,262	5,487	0,224	1,17

Tabelle 4: Verrechnung von mRNA-Expressionswerten aus den *Microarray*-Analysen.

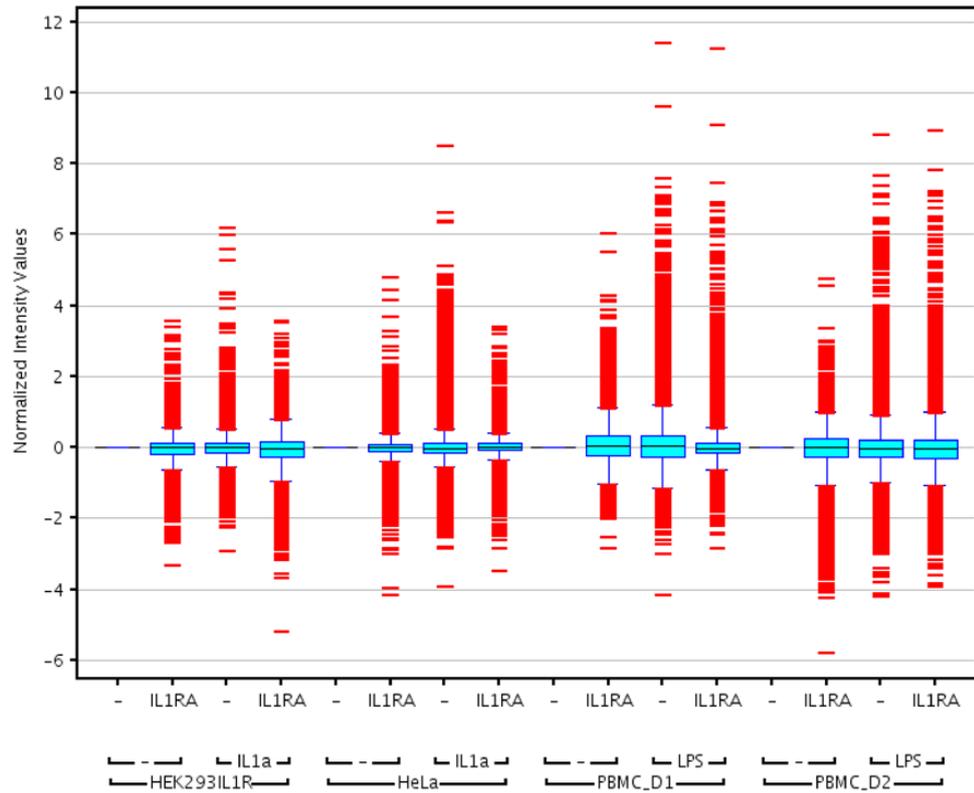
Die Fluoreszenzintensitäten wurden in *Genespring GX* log₂-transformiert und auf das 75. Perzentils des jeweiligen Arrays normalisiert. Die Spalte „roh“ zeigt die zurücktransformierten Expressionswerte der Gensonde für *IL8*. Um eine Vergleichbarkeit zwischen mehreren Experimenten zu ermöglichen, wurden alle Werte relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Ratios wurden in logarithmischer Form durch Differenz ermittelt und nach Exponieren als Vielfache der mRNA-Expression dargestellt. Aus Ratios <1 wurde zur besseren Lesbarkeit der negative Kehrwert gebildet. Exemplarisch ist die Bestimmung der *IL-8* mRNA-Expression in den PBMC von D1 und D2 gezeigt.

A) PBMC von D1 und D2 wurden bei 37 °C für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 1 ng/ml LPS stimuliert (LPS) oder unstimuliert (K) für 1 h inkubiert.

B) PBMC von D1 und D2 wurden bei 37 °C entweder mit (Ana) oder ohne 10 µg/ml Anakinra für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 1 ng/ml LPS stimuliert (LPS) und für 1 h inkubiert.

(Auswertung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Axel Weber, AG Kracht)

A



B

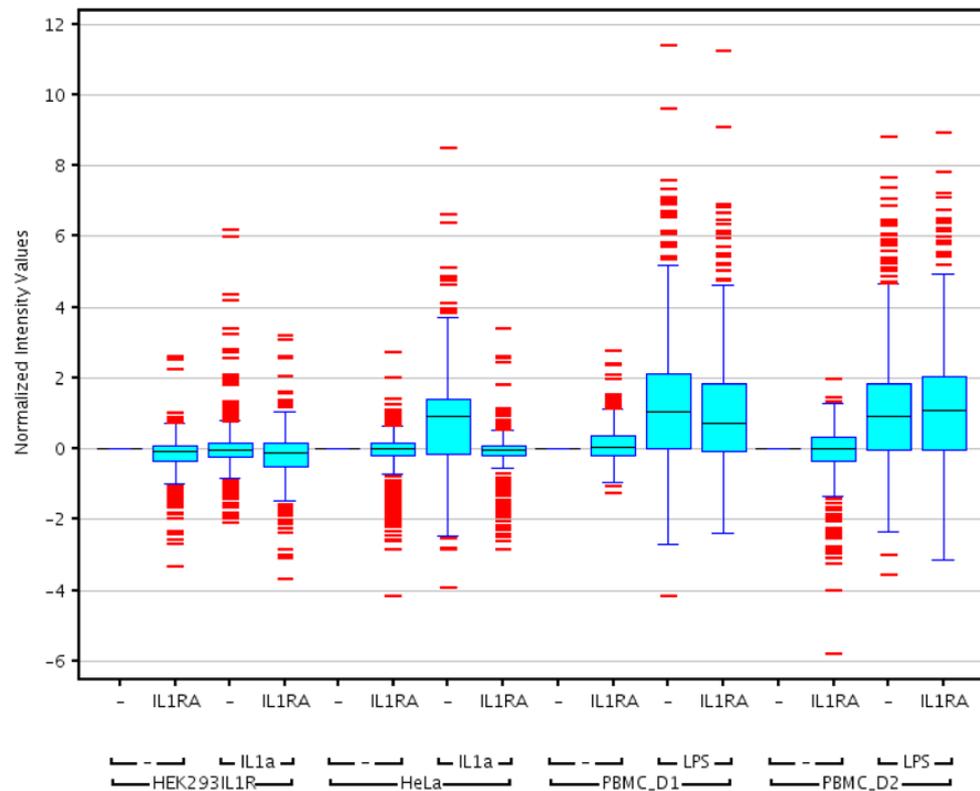


Abbildung 23: Verteilung der Messwerte aller Sonden relativ zur Kontrolle.

Beschriftungstext zur Abbildung 23 folgt auf der nächsten Seite.

Abbildung 23: Verteilung der Messwerte aller Sonden relativ zur Kontrolle.

HEK293IL-1R-Zellen wurden bei 37 °C mit 10 µg/ml Anakinra (IL1RA) oder unbehandelt für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 10 ng/ml IL-1α (IL1a) stimuliert oder unstimuliert für 3 h inkubiert („Box Whiskers“ 1-4 von links).

HeLa-tTA-Zellen wurden bei 37 °C mit 10 µg/ml Anakinra (IL1RA) oder unbehandelt für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 20 ng/ml IL-1α (IL1a) stimuliert oder unstimuliert für 4 h inkubiert („Box Whiskers“ 5-8 von links).

PBMC von D1 und D2 wurden bei 37 °C entweder mit 10 µg/ml Anakinra (IL1RA) oder unbehandelt für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 1 ng/ml LPS stimuliert oder unstimuliert für 1 h inkubiert („Box Whiskers“ 9-16 von links).

Die Kastengrafik zeigt die Verteilung der log₂-transformierten Expressionswerte in den jeweiligen Experimenten. Ein Kasten mit Antenne („Whisker“) bildet den Median als Linie im Kasten sowie die 25. und 75. Perzentile bzw. das untere und obere Quartil ab. Die Antennen sind Verlängerungen des Kastens, die sich bis zum 1,5-fachen des Interquartilabstands erstrecken. Die roten Markierungen außerhalb der Antennen stellen Ausreißer dar (in diesem Fall sehr stark oder schwach exprimierte Transkripte).

In A sind die Messwerte von 25913 in allen Experimenten messbaren Sonden dargestellt, in B ausschließlich die Messwerte von 559 Sonden, die in mindestens einem von vier Experimenten eine mindestens 2-fache Regulation durch IL-1 bzw. LPS zeigten.

(Auswertung und Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Axel Weber, AG Kracht)

3.3.2.1 LPS-abhängige mRNA-Expression in humanen PBMC und der Einfluss von Anakinra

In PBMC von zwei verschiedenen Spendern (D1 und D2) wurde die LPS-abhängige mRNA-Expression untersucht. Die Verwendung des IL-1-Rezeptorantagonisten Anakinra sollte die Rolle von IL-1 bei der LPS-Antwort klären. Besonderes Augenmerk galt hierbei den Genen, die in den Zellen beider Spender – entweder auf gleiche oder gegensätzliche Weise – reguliert wurden, sowie denen, welche nur in den Zellen eines Spenders eine Regulation zeigten.

In den PBMC von D1 und D2 fand durch LPS-Stimulation eine starke Induktion von *IL1α* [IL1A] (2760- bzw. 460-fache Steigerung der mRNA-Expression) und *IL1β* [IL1B] (105- bzw. 22-fache Steigerung der mRNA-Expression) statt. Die Gabe von Anakinra bewirkte bei beiden Donoren keine Hemmung des Effekts. Auch wurde durch LPS eine etwa 100-fache Zunahme des mRNA-Levels von *TNFα* [TNF] bei beiden Donoren detektiert, welche sich ebenfalls nicht durch Anakinra inhibieren ließ. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die starke Induktion der genannten Gene nicht auf die LPS-abhängige Produktion und Freisetzung von IL-1 zurückzuführen ist, sondern auf andere LPS-vermittelte Signalwege (Dinarello, 2009; Gaestel et al., 2009a; Martinon et al., 2009). Des Weiteren führte LPS bei D1 und D2 zu einer verstärkten Expression der NALP3 [NLRP3] mRNA (jeweils um den Faktor 8,5-11,5) im Vergleich zur Kontrolle. Dies war insofern zu erwarten, als dass LPS die Prozessierung und die sich daran anschließende Freisetzung von reifem IL-1β über die Aktivierung des NALP3-Inflammasoms reguliert (Martinon et al., 2009). Außerdem bewirkte LPS bei beiden Donoren eine 13- bzw. 4,5-fache Induktion der mRNA-Expression für den physiologischen IL-1-Rezeptorantagonisten IL-1Ra [IL1RN].

Hinsichtlich der MAPKKs wurde bei beiden Spendern eine knapp 5,5-fache Induktion des Cot/Tpl-2 [MAP3K8] mRNA-Levels durch LPS detektiert. Bei den MAPKKs zeigte sich in den Zellen beider Spender für MKK3 [MAP2K3], das den p38 MAPK-Signalweg aktiviert, eine kaum nennenswerte Erhöhung der LPS-abhängigen Expression (1,3-1,4-fach).

Die PBMC beider Donoren zeigten infolge der LPS-Stimulation ein ähnliches Expressionsverhalten für die beiden Transkriptionsfaktoren NF- κ B-Untereinheit p105/p50 [NFKB1] (1,5-2,5-fach) und Egr-1 [EGR1] (30- bzw. 15-fach). Die bei beiden Donoren deutliche Steigerung des Egr-1 mRNA-Levels muss jedoch aufgrund der jeweils fehlenden Hemmung durch Anakinra unabhängig von IL-1 gewesen sein.

Bezüglich wichtiger IL-1-responsiver Zielgene war bei beiden Donoren ein LPS-induzierter mRNA-Anstieg deutlich erkennbar: sowohl bei D1 als auch D2 zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine erhebliche Zunahme der mRNA von *IL8* [IL8] (>100- bzw. ca. 40-fach), *IL6* [IL6] (55- bzw. ca. 140-fach), *MCP1* [CCL2] (4,5- bzw. 3,5-fach), *COX2* [PTGS2] (jeweils ca. 50-fach), „Chemokine (C-X-C motif) ligand (*CXCL*)“ 1 [CXCL1] (knapp 200- bzw. 90-fach) und *IL10* [CXCL10] (>20- bzw. >10-fach). Der Anteil von IL-1 daran war jedoch dahingehend gering, dass ein Hemmeffekt durch Anakinra nur bei D1 gezeigt werden konnte und dabei lediglich für *IL6* [IL6] (2-fach), *CXCL1* [CXCL1] (1,6-fach) und *CXCL10* [CXCL10] (1,5-fach) nennenswert ausfiel.

Bei der Betrachtung von Komponenten negativer Rückkopplungsmechanismen zeigte sich, dass in den PBMC von D1 und D2 durch LPS-Gabe das I κ B α [NFKBIA] mRNA-Level um den Faktor 6 bzw. 4,2 und das von TTP [ZFP36] mRNA 2,3- bzw. 7-fach zunahm. Auch die „Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase 1“ (MKP-1) [DUSP1] mRNA stieg bei beiden Spendern LPS-abhängig an (2-3-fach). Das gleiche galt für die GADD45 β [GADD45B] mRNA (ca. 6-bzw. 3-fach). Aus der fehlenden Hemmung von *I κ B α* , *MKP1* und *GADD45 β* durch Anakinra lässt sich schließen, dass diese Gene ebenso wie *IL1A* nicht ausschließlich durch Stimulation mit IL-1 im Sinne eines autoregulatorischen „Feedback Loops“ exprimiert werden. Dies unterstreicht die breite Regulation der fein aufeinander abgestimmten Mechanismen im hochkomplexen LPS-Signalweg und demonstriert, dass zumindest einige der eben genannten Moleküle auch in anderen Signalwegen eine Rolle spielen. Dass bei D1 die LPS-abhängige Induktion des mRNA-Levels von *TTP* durch Anakinra geblockt wurde, lässt einen nicht unerheblichen Stellenwert der mRNA-Degradation für die Selbstlimitierung des IL-1-Signalwegs vermuten.

Als Beispiel für interindividuelle Schwankungen zeigten die PBMC der beiden Donoren für die rezeptornahen Adapterproteine ein unterschiedliches Expressionsverhalten: in den Zellen

von D1 kam es durch LPS-Stimulation zu einer Repression von *IRAK1* [IRAK1] und *TAB1* [MAP3K7IP1] (jeweils um einen Faktor >2), wohingegen die vorherige Gabe von Anakinra im Vergleich dazu eine Zunahme der mRNA-Levels bewirkte (1,75- bzw. 2,5-fach): Dies ist Ausdruck eines negativen Rückkopplungsmechanismus durch IL-1. Bei D2 hingegen wurden die beiden Gene infolge der LPS-Stimulation jeweils 1,9-fach hochreguliert, wobei Anakinra keinen nennenswerten Hemmeffekt hatte (1,2- bzw. 1,3-fach).

Auch für die MAPKKs wiesen die PBMC von D1 und D2 unterschiedliche Expressionsmuster auf: bei D1 stieg das MEKK1 [MAP3K1] mRNA-Niveau LPS-abhängig 4,6-fach an und fiel Anakinra-vermittelt um den Faktor 3,8 wieder ab. Bei D2 fand dagegen eine 5-fache Abnahme durch LPS und im Vergleich dazu ein 1,3-facher Anstieg durch vorherige Anakinra-Gabe statt. Das MEKK3 [MAP3K3] mRNA-Niveau stieg durch LPS bei D1 um den Faktor 1,3 und sank durch die zusätzliche Gabe von Anakinra im Vergleich dazu um fast den gleichen Faktor wieder ab. Bei der Betrachtung der MAPKKs des ERK-Signalwegs zeigte sich für *MKK2* [MAP2K2] bei D1 eine durch LPS-bedingte knapp 2-fache Repression der mRNA-Antwort, die durch die vorherige Gabe von Anakinra >1,5-fach zunahm. Bei D2 ließ sich eine, wenn auch nur geringe, LPS-vermittelte Induktion des mRNA-Levels von *MKK2* [MAP2K2] (1,6-fach) feststellen. Im Bereich der anderen MAPKKs zeigten sich insgesamt nur geringe Effekte. So wurde durch LPS in den PBMC von D2 eine 1,5-fache Expression von *MKK1* [MAP2K1] beobachtet, in denen von D1 eine 1,2-1,3-fache Expression von *MKK4/6* [MAP2K4/MAP2K6], jedoch immerhin eine >7-fache von *MKK7* [MAP2K7]. Das inter- sowie intraindividuell unterschiedliche mRNA-Expressionsmuster und Ausmaß der IL-1-Abhängigkeit für einzelne MAPKKs und MAPKKs vergegenwärtigt deutlich die große Streubreite der aus humanen PBMC gewonnenen Daten.

Während die mRNA-Expression von *P38 MAPK* [MAPK14] und *JNK* [MAPK8] nach LPS-Stimulation bei D1 1,3- bzw. 2,4-fach anstieg, ließ sich bei D2, wenn überhaupt, jeweils eine Abnahme (1,2- bzw. 2-fach) verzeichnen. Gleichzeitig sanken die mRNA-Levels dieser beiden Gene in den PBMC von D1 durch zusätzliche Gabe von Anakinra auf den Ausgangswert. Die mRNA-Expression für die NF-κB-Untereinheit p65 [RELA] fiel bei D1 durch LPS 2,7-fach erhöht aus. Für den Transkriptionsfaktor Elk-1 [ELK1] ergab sich bei beiden Donoren ein umgekehrtes Bild: LPS führte bei D1 zu einer Induktion der mRNA (2,3-fach), Anakinra setzte die LPS-Antwort 1,8-fach herab. Bei D2 bedingte LPS eine 1,4-fache mRNA-Repression.

Von den Komponenten des Transkriptionsfaktors AP-1 zeigte sich für ATF-2 [ATF2] und c-Fos [FOS] nur bei D1 eine merkliche, wenn auch nicht signifikante, Veränderung des

mRNA-Gehalts (Zunahme von ATF-2 [ATF2] mRNA und Abnahme von c-Fos [FOS] mRNA jeweils um den Faktor 1,3). Für c-Jun [JUN] zeigte sich ein deutlicher spenderabhängiger Unterschied: bei D1 führte LPS zu einer >70-fachen mRNA-Expression, die durch Anakinra >10-fach geringer ausfiel, was für eine starke IL-1-Abhängigkeit spricht. Bei D2 zeigte sich ein LPS-vermittelter Anstieg der c-Jun [JUN] mRNA, welcher durch Anakinra im Vergleich dazu sogar noch zunahm, beide Effekte waren jedoch <2-fach (Tab.5).

3.3.2.2 IL-1-abhängige mRNA-Expression in kultivierten Zellen und der Einfluss von Anakinra

Mehrere Gene wurden abhängig von IL-1 sowohl in den HEK293IL-1R- als auch den HeLa-tTA-Zellen reguliert. IL-1 bewirkte für die MAPKKK Cot/Tpl-2 [MAP3K8], welche zu einer Aktivierung des ERK-Signalwegs führt, in beiden Zelllinien eine 1,5-2,5-fache Zunahme der mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Dabei ließ sich durch vorherige Gabe von Anakinra jeweils eine Hemmung der IL-1-Antwort feststellen, die in den HeLa-Zellen nahezu vollständig war. In beiden Zelllinien wurde die NF- κ B p105/p50 [NFKB1] mRNA durch Stimulation mit IL-1 verstärkt exprimiert (1,3-fach in den HEK293-Zellen vs. 3,2-fach in den HeLa-Zellen); diese Effekte wurden unter Vorinkubation mit Anakinra jeweils komplett aufgehoben. Kaum nennenswert ist hingegen die 1,2-1,4-fache Hochregulation des Egr-1 [EGR1] mRNA-Niveaus in beiden Zelllinien durch IL-1, welche infolge von Anakinra-Gabe vollständig inhibiert wurde.

Zu den wichtigsten Zielgenen des IL-1-Signalwegs, welche in beiden Zelllinien IL-1-abhängig reguliert wurden, gehörten *IL8* [IL8] und *CXCL1* [CXCL1]. In den HEK293-Zellen wurde IL-8 mRNA durch IL-1 um den Faktor 73 verstärkt exprimiert. Die mRNA-Expression von *CXCL1* [CXCL1] wurde infolge der IL-1-Stimulation 19-fach induziert und dieser Effekt durch die Gabe von Anakinra um den Faktor 3 reprimiert. Deutlicher fielen die Effekte in den HeLa-Zellen aus: IL-1 bewirkte im Vergleich zur Kontrolle eine fast 365-fache Induktion der Expression von IL-8 mRNA. Das *CXCL1* [CXCL1] mRNA-Niveau stieg IL-1-abhängig um den Faktor 85. Dieser Effekt wurde durch Anakinra komplett inhibiert.

Für folgende Komponenten wichtiger negativer Rückkopplungsmechanismen zeigten beide Zelllinien ein ähnliches Expressionsmuster: Das I κ B α [NFKBIA] mRNA-Niveau wurde durch IL-1-Stimulation jeweils 2-2,5-fach hochreguliert und dieser Effekt durch Anakinra in den HEK293-Zellen weitestgehend (1,6-fach) und in den HeLa-Zellen vollständig aufgehoben. In beiden Zelllinien war außerdem eine ganz minimale IL-1-vermittelte Induktion der MKP-1 [DUSP1] mRNA-Expression zu erkennen (1,2-1,3-fach).

In den HeLa-Zellen kam es durch IL-1 zu einer Steigerung der mRNA-Expression von *IL1 α* [IL1A] um etwa den Faktor 17 sowie von *IL1 β* [IL1B] ca. 8-fach. Außerdem ließ sich in den HeLa-Zellen eine IL-1-abhängige Zunahme der mRNA-Expression von *IL1R1* [IL1R1] (1,8-fach) zeigen, die durch Vorinkubation mit Anakinra komplett gehemmt wurde. Diese Beobachtungen sind als Beispiele für positive Rückkopplungsmechanismen aufzufassen.

Außerdem zeigte sich nur in den HeLa-Zellen für die MAPKKs, die den p38-Signalweg aktivieren, eine Regulation: das MKK3 [MAP2K3] mRNA-Niveau wurde IL-1-abhängig um den Faktor 1,7 angehoben und Anakinra-vermittelt vollständig auf das Ausgangsniveau verringert. Das MKK6 [MAP2K6] mRNA-Level wurde durch IL-1 allenfalls geringfügig herunterreguliert (1,3-fach). Dies könnte auf die besondere Bedeutung von p38 MAPK bei der posttranskriptionellen mRNA-Stabilisierung hindeuten.

Bei den MAPKs war keine Änderung der mRNA-Expression detektierbar. Für die Transkriptionsfaktoren – insbesondere für die Komponenten von AP-1 – zeigten sich unterschiedliche Expressionsmuster: das ATF-2 [ATF2] mRNA-Level wurde in beiden Zelllinien nicht reguliert. Demgegenüber wurde das c-Jun [JUN] mRNA-Level in den HeLa-Zellen durch IL-1 fast 1,7-fach hochreguliert und der Anstieg unter zusätzlicher Anakinra-Gabe komplett inhibiert. Die positive Rückkopplung des Transkriptionsfaktors c-Jun auf mRNA-Ebene unterstreicht seine wichtige Rolle als Aktivator IL-1-responsiver Gene. Demgegenüber wurde das c-Fos [FOS] mRNA-Niveau in den HeLa-Zellen IL-1-abhängig um einen Faktor >2 reprimiert und dieser Effekt durch Vorinkubation mit Anakinra vollständig aufgehoben. Die unterschiedliche Expression der AP-1-Komponenten trägt möglicherweise zu einem Gleichgewicht von AP-1 bei (Fuchs et al., 1997; Fuchs et al., 1999; Fuchs et al., 2000). Die NF- κ B-Untereinheit p65 [RELA] zeigte in den HeLa-Zellen eine geringfügige IL-1-abhängige Herunterregulation auf mRNA-Ebene (1,4-fach). Zwar war dieser Effekt nicht signifikant, doch könnte er auf einen negativen Rückkopplungsmechanismus hindeuten.

Des Weiteren wiesen die HeLa-Zellen eine Induktion der mRNA-Expression von *IL6* [IL6] (13-fach), *MCPI* [CCL2] (3-fach) und *COX2* [PTGS2] (3-fach) durch IL-1-Stimulation auf, wobei Anakinra diese Effekte komplett aufhob. Dass die eben genannten IL-1-responsiven Zielgene nicht in den HEK293-Zellen reguliert wurden, könnte entweder dadurch bedingt sein, dass manche Gene in ihnen einfach nicht IL-1-abhängig reguliert werden, oder die Transkription mitsamt anschließender Translation im Vergleich zu den HeLa-Zellen zeitlich versetzt abgelaufen ist (Gowrishankar et al., 2006; Wolter et al., 2008).

Außerdem wurden ein paar Komponenten wichtiger negativer Rückkopplungsmechanismen reguliert: Durch IL-1 erfolgte jeweils eine >1,7-fache Induktion des mRNA-Levels von

GADD45β [GADD45B] in den HEK293-Zellen bzw. desjenigen von *CYLD* [CYLD] in den HeLa-Zellen. Die IL-1-abhängige Expression von *CYLD* [CYLD] in den HeLa-Zellen wurde durch Anakinra komplett inhibiert.

Dass in den HeLa-tTA-Zellen deutlich mehr Gene als in den HEK293IL-1R-Zellen durch IL-1 reguliert wurden, ist am ehesten auf die unterschiedliche Ansprechbarkeit der beiden Zelltypen auf IL-1 zurückzuführen. In den HeLa-Zellen zeigte sich im Gegensatz zu den HEK293-Zellen eine erhöhte Expression von *IL1R1* [IL1R1], was im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus außerdem zu einer verstärkten IL-1-Antwort beigetragen haben könnte (Tab.5).

Tabelle 5

Gensymbol	Sonden ID	Entrez Gene ID	PBMC Donor 1				PBMC Donor 2				HEK293IL-1R-Zellen				HeLa-tTA-Zellen				
			-	Ana	LPS	LPS + Ana	-	Ana	LPS	LPS + Ana	-	Ana	IL-1	IL-1 + Ana	-	Ana	IL-1	IL-1 + Ana	
1	ABCG2	A_23_P18713	9429	102	90	85	92	229	343	274	229	427	456	487	394	1182	1321	1272	1181
2	ACAN	A_23_P307310	176	193	148	186	157	122	152	112	120	229	155	200	112	81	84	92	72
3	ADORA2A	A_23_P237270	135	1259	479	836	1597	572	1268	1819	1402	106	87	105	121	6 *	5 *	10 *	5 *
4	AKIRIN2	A_23_P428827	55122	4508	3256	3320	4094	3546	5099	3776	3453	1636	1851	2016	2080	1419	1440	1422	1571
5	AKT1	A_23_P2960	207	280	184	178	316	224	211	319	253	69	71	70	79	409	424	374	459
6	APBB1	A_24_P372613	322	1488	808	896	1763	874	981	1301	932	604	573	631	571	135	91	62	68
7	APP	A_24_P314159	351	317	407	2798	358	1954	296	270	785	6524	7538	6725	7489	3429	3427	3362	3226
8	AR	A_23_P113111	367	184	155	163	161	137	120	128	121	14	14 *	13 *	11 *	1449	2127	1738	1392
9	ATF2	A_24_P128145	1386	347	306	383	413	437	318	414	388	295	370	350	362	363	405	393	413
10	AZ12	A_24_P51805	64343	2882	2566	2908	3279	3204	3461	3024	3641	1688	2159	2082	2307	2329	2736	2585	2657
11	BCL2	A_23_P352266	596	12810	13304	12832	14453	11899	12926	11418	12420	367	457	449	503	209	252	184	244
12	BCL2L1	A_24_P101030	598	29	49	91	12 *	41	12 *	12 *	10 *	6 *	17	14 *	21	82	86	92	84
13	BCL3	A_23_P4662	602	7925	7563	14735	18483	13425	15073	15212	17138	125	120	148	120	3372	3863	5662	3708
14	BMP7	A_23_P68487	655	3 *	4 *	4 *	4 *	4 *	5 *	3 *	5 *	7886	9595	9808	10742	5 *	3 *	5 *	5 *
15	BTRC	A_23_P46819	8945	1639	1201	1078	1575	1322	1766	1425	1558	1808	1909	1860	1677	914	1022	843	963
16	CAPN1	A_23_P138835	823	1098	674	767	1143	760	910	892	874	143	152	175	164	315	349	278	363
17	CAPNS1	A_23_P67648	826	33658	29699	25334	30589	30888	35682	28406	23792	9725	9760	10103	9459	27228	29282	27272	31605
18	CARD8	A_23_P27721	22900	1562	1033	1308	1554	1337	1735	1524	1631	81	96	105	132	40	43	34	34
19	CASP1	A_23_P202978	834	31760	33604	34090	30515	34817	34513	33273	32274	2 *	3 *	3 *	2 *	339	358	386	335
20	CASP3	A_23_P92410	836	14650	11854	14296	18608	14268	15519	14380	15439	9167	9511	9687	8624	3404	3504	3353	2996
21	CASP5	A_23_P47304	838	21550	23518	24164	21632	26402	26774	23029	24315	13	15 *	14 *	12 *	4422	4905	6284	5156
22	CASP8	A_24_P148499	841	218	518	724	205	664	282	202	169	70	114	88	128	342	374	383	383
23	CASP9	A_24_P111342	842	5747	5433	6371	6392	7742	8308	6431	6875	4536	4846	4687	4834	8174	9531	8264	8836
24	CCL2	A_23_P89431	6347	173	221	665	764	248	380	848	842	35	30	48	33	67	61	206	65
25	CCL5	A_23_P152838	6352	160822	183519	173833	147728	215563	254926	206867	243643	14	14 *	15 *	7 *	18 *	20	125	19 *
26	CD44	A_23_P24870	960	44750	42705	50469	49521	44716	53823	44235	50186	1713	2133	2179	2234	23322	25323	30875	23733
27	CD82	A_23_P1782	3732	3267	2894	4029	3402	3021	2738	2479	2018	179	152	162	134	1973	2133	2194	2436
28	CDC42	A_23_P300056	998	476	572	664	583	436	732	539	660	317	528	501	600	414	398	538	464
29	CDK1	A_23_P138507	983	343	398	1987	1694	356	355	2361	2467	30031	34597	35679	36396	25714	27586	24911	26301
30	CDKN1A	A_23_P59210	1026	10120	5947	15744	23130	8520	16481	19000	15482	625	529	644	523	3209	3542	3375	3645
31	CEBPA	A_24_P216165	1050	2986	1904	2116	1939	9514	2411	2136	1694	5249	1899	2704	1686	5580	3934	4011	4080
32	CEBPB	A_23_P143242	1051	1236	3453	4308	2380	2915	1070	1401	2182	1181	914	1099	931	3230	2813	2866	2732
33	CFAR	A_23_P209394	8837	3078	3079	6836	6073	3721	2659	5956	6110	97	128	105	116	2395	2096	3426	2459
34	CHUK	A_23_P46748	1147	1199	1074	1269	1491	1405	1333	1382	1517	3538	3610	3511	3511	1376	1691	1492	1403
35	COP1	A_23_P64173	114769	23152	27354	29534	24983	23020	27011	29555	32766	4 *	3 *	3 *	3 *	185	205	294	193
36	CREB1	A_23_P79231	1385	3082	2589	2781	2939	3152	3230	3336	4679	905	1160	1057	1201	754	1000	1079	785
37	CREBBP	A_24_P322025	1387	10154	10080	8042	9977	9919	12483	10677	12992	4537	6510	5777	7656	2828	2940	2885	2946
38	CRP	A_24_P342484	1401	3 *	5 *	4 *	4 *	12 *	7 *	12 *	8 *	33	12 *	21	14 *	6 *	7 *	6 *	4 *
39	CSF2	A_23_P133408	1437	26	35	43	8 *	37	39	29	38	2 *	3 *	3 *	3 *	5 *	3 *	37	4 *
40	CXCL1	A_23_P7144	2919	213	407	35511	26320	660	1117	56326	61082	9 *	7 *	204	67	541	599	46970	544
41	CXCL10	A_24_P303091	3627	361	499	7187	5515	538	667	5596	6020	2 *	3 *	56	16	7 *	4 *	213	4 *
42	CXCL9	A_23_P18452	4283	313	269	290	323	296	286	232	270	14	17 *	9 *	10 *	6 *	11 *	9 *	5 *
43	CYLD	A_23_P65996	1540	2669	2066	2577	3401	2597	2355	2924	3413	257	230	256	198	161	188	283	142
44	DOK1	A_23_P5610	1796	1722	857	718	932	1058	1369	924	740	258	269	274	302	102	106	84	133
45	DUSP1	A_23_P110712	1843	38186	31654	91010	101607	34344	46860	77435	76074	8249	9811	10910	10572	14845	17049	20046	16114
46	DUSP16	A_24_P189739	80824	1014	582	791	1167	830	1445	1159	1033	591	618	615	588	261	270	340	234
47	ECST1	A_23_P119295	51295	2358	2001	1809	2057	1750	2847	1897	1749	4383	5328	5500	5372	3545	3386	3125	3920
48	EGR1	A_23_P214080	1958	326	386	8383	7616	591	936	8353	10252	444	406	579	460	94	118	137	90
49	EIF2AK3	A_23_P135857	9451	1571	989	1035	1779	1426	2551	2065	2353	249	308	297	382	176	197	203	165
50	EIF2S1	A_24_P356015	1965	609	815	913	742	1389	773	562	596	2243	2575	2254	2495	2719	3459	2949	2717
51	ELANE	A_23_P130961	1991	861	748	611	787	593	776	633	537	65	96	84	100	118	122	126	125
52	ELAVL1	A_23_P208477	1994	4708	3376	3617	4904	3911	5561	4818	5184	8722	9699	10505	11663	4989	5224	4727	4982
53	ELK1	A_23_P171054	2002	294	597	588	384	599	308	418	429	565	600	615	608	365	384	334	383
54	ELK4	A_24_P902091	2005	10307	9404	9766	11882	12171	13936	10798	13005	1406	1811	1579	1610	2423	3119	2605	2183
55	ESR1	A_24_P325215	2099	3 *	7 *	11 *	4 *	8 *	5 *	5 *	5 *	2 *	2 *	8 *	2 *	5 *	3 *	11 *	3 *
56	FADD	A_23_P86917	8772	8981	8921	8546	8241	11665	12405	7159	7136	18419	19071	18821	17574	21149	23485	23653	21110
57	FAS	A_23_P63896	355	5818	5343	9379	9184	8306	9028	11077	12270	1327	1445	1533	1390	1514	1743	2313	1657
58	FBXW5	A_23_P112397	54461	10405	4975	4298	8347	5909	12260	8273	6614	3448	3751	3751	3253	4002	4007	3929	4095
59	FOS	A_23_P106194	2353	27007	16238	17372	24427	11923	17757	10412	9672	72	78	70	72	1747	1903	786	1896
60	FOSL1	A_23_P322519	8061	3 *	4 *	49	44	3 *	5 *	14 *	19 *	15	16	16	21	34	31	77	46
61	GADD45B	A_23_P142506	4616	6695	10194	39975	37308	11501	7197	30055	31618	2238	2478	3483	2738	5593	5768	5664	5778

Tabelle 5 – Fortsetzung

Gensymbol	Sonden ID	Entrez Gene ID	PBMC Donor 1				PBMC Donor 2				HEK293IL-1R-Zellen				HeLa-(TA-Zellen)				
			-	Ana	LPS	LPS + Ana	-	Ana	LPS	LPS + Ana	-	Ana	IL-1	IL-1 + Ana	-	Ana	IL-1	IL-1 + Ana	
62	GPS2	A_23_P218405	2874	2490	2310	1948	2239	2626	2550	2149	1796	3026	2928	2907	2784	3339	3071	2684	3635
63	GSK3B	A_24_P243044	2932	1011	708	676	1037	999	1402	925	1059	625	568	571	596	455	461	440	437
64	GTF2B	A_23_P34628	2959	14860	17793	21918	19566	20583	21290	20475	23862	22022	20144	22011	19609	11830	11599	11809	10759
65	HDAC1	A_23_P114656	3065	24923	21908	20475	23834	23810	35733	24134	23060	45818	45676	46135	43172	22004	22758	21041	23191
66	HDAC3	A_23_P7388	8841	4103	3051	3048	4122	3717	4461	3786	3385	7692	8952	8278	8741	3885	4232	3582	4258
67	HMGAI	A_23_P42331	3159	3704	1927	2397	3951	2149	4156	3300	2426	10806	10461	12035	10931	10032	10780	8854	9883
68	HMGNI	A_32_P167278	3150	42026	41811	47064	46897	57320	65299	48476	51699	159150	170076	181730	173671	96151	104687	96883	98070
69	HNRNPD	A_24_P226037	3184	17069	15317	17601	18671	16189	20948	17945	18753	41913	52256	50849	61415	36585	38793	36496	39172
70	HSP90AA1	A_32_P199252	3320	11068	10189	13000	13747	12886	13119	17309	17244	34876	45780	43427	44776	36953	51164	47763	45170
71	HSPB1	A_24_P86537	3315	18925	21280	17213	19415	15975	21374	14955	13504	4994	4531	5272	4148	152523	151576	147129	162068
72	ICAM1	A_23_P153320	3383	3049	1803	17202	30403	2830	4800	34289	31165	16	19	18	20	299	342	2695	341
73	ICEBERG	A_23_P86975	59082	4 *	6 *	4 *	5 *	4 *	4 *	3 *	6 *	2 *	4 *	4 *	3 *	7 *	4 *	5 *	5 *
74	IKBKAP	A_23_P169189	8518	5460	4071	4640	5933	5648	6960	5636	6287	10950	11954	11892	11918	8638	10358	9993	8624
75	IKKBK	A_24_P155058	3551	455	388	321	348	461	379	325	347	465	471	449	452	385	418	403	397
76	IKBKE	A_23_P887	9641	857	337	371	899	322	625	597	476	15	16	98	20	71	67	119	71
77	IKBKG	A_23_P159920	8517	2521	1972	2403	2386	2356	2615	2120	1674	406	389	417	364	672	742	655	812
78	IL18BP	A_23_P203629	10068	944	876	837	905	977	1293	769	753	67	51	64	49	65	73	68	65
79	IL1A	A_23_P72096	3552	26	114	60846	64800	169	509	75364	82170	4 *	3 *	3 *	3 *	8 *	7 *	151	10 *
80	IL1B	A_23_P79518	3553	4643	8692	421288	425196	18394	28139	398113	474341	15	7 *	10 *	6 *	10 *	15 *	83	13 *
81	IL1R1	A_24_P200023	3554	491	334	264	482	679	1083	927	1068	26	34	30	26	86	101	159	84
82	IL1R2	A_24_P63019	7850	474	584	1337	981	1468	1504	2199	1921	16	30	24	28	6 *	9 *	15 *	4 *
83	IL1RAP	A_24_P180165	3556	3 *	5 *	14 *	4 *	6 *	7 *	3 *	7 *	12 *	9 *	7 *	11 *	8 *	10 *	15 *	8 *
84	IL1RN	A_32_P38125	3557	38	34	434	236	62	30 *	277	273	110	61	116	49	30	40	31	42
85	IL3	A_23_P348831	3562	10 *	5 *	4 *	4 *	4 *	6 *	5 *	6 *	6 *	18	15 *	18	6 *	7 *	10 *	10 *
86	IL6	A_23_P71037	3569	68	52	3289	1940	91	143	12205	12386	59	50	49	48	4363	4533	58044	4382
87	IL8	A_32_P87013	3576	685	1221	60228	50132	2134	3866	80223	94671	2 *	3 *	213	14 *	6 *	3 *	2323	4 *
88	IRAK1	A_23_P73780	3654	4495	1871	1472	4298	2316	4454	4263	3573	2937	2930	2945	2927	2119	2172	1935	2230
89	IRAK2	A_23_P80635	3656	67	60	105	134	119	27 *	74	66	39	27	27	26	81	78	123	94
90	IRAK3	A_32_P83256	11213	12832	9984	9333	13614	14012	18783	15269	17263	5 *	2 *	2 *	2 *	220	266	367	221
91	IRAK4	A_24_P158903	51135	1940	1589	1740	2016	2273	2339	1883	1774	133	138	133	156	729	843	678	779
92	IRF8	A_23_P332190	3394	5141	4032	5803	6923	3467	4091	4791	5008	35	12 *	25	12 *	6 *	8 *	88	4 *
93	IRSI	A_24_P802145	3667	277	160	162	237	65	97	71	77	51	50	44	59	32	36	30	37
94	ITCH	A_24_P139191	83737	2438	1965	2327	2586	2369	3462	2604	2907	801	961	886	806	2285	2558	2139	2078
95	JUN	A_23_P201538	3725	46	127	3141	298	220	141	319	597	3328	3949	4126	3859	269	258	455	263
96	JUNB	A_23_P4821	3726	33336	25519	63865	75629	35598	44545	71367	67389	628	613	1208	934	9711	11855	11661	9422
97	JUND	A_23_P365610	3727	23906	17542	21970	28290	22659	30829	24334	25754	22265	20461	22296	19901	19498	20323	16974	11256
98	KAT2A	A_23_P66608	2648	6512	3917	5181	6244	6402	7519	6003	6242	15634	16735	14981	11598	9615	11860	10360	9281
99	KAT2B	A_23_P41128	8850	525	643	749	609	1112	660	795	806	106	144	109	154	104	106	87	101
100	KAT5	A_23_P138849	10524	5304	3779	3548	5060	4486	5962	4965	4250	3361	3696	3683	3466	3350	3334	3186	3564
101	KHSRP	A_24_P134235	8570	35	46	54	37	39	12 *	26	21 *	282	252	290	293	107	126	121	111
102	MAP2K1	A_23_P20248	5604	14677	9116	13243	16970	11283	17550	16111	16764	5411	5584	5775	5701	6451	6638	6405	6404
103	MAP2K2	A_23_P208835	5605	5685	2703	2683	4967	2937	6871	4757	3537	3766	3794	3970	3632	5341	5247	4959	5826
104	MAP2K3	A_24_P296698	5606	23927	15760	27232	33313	24570	32305	32858	32735	10466	9571	10018	9092	8273	9148	14626	7735
105	MAP2K4	A_32_P6344	6416	6274	5448	6346	7794	7307	9969	6973	8007	7178	7500	8201	7216	4616	5933	5511	4238
106	MAP2K6	A_23_P207445	5608	1372	1350	1445	1501	1582	1848	1393	1361	869	1002	998	1057	1720	1846	1325	1798
107	MAP2K7	A_23_P78628	5609	6 *	17 *	38	10 *	19 *	7 *	4 *	7 *	35	31	37	35	23 *	31	29	20 *
108	MAP3K1	A_24_P766204	4214	1784	7271	7050	2224	7645	1169	1526	2052	1436	1578	1728	1626	713	805	720	701
109	MAP3K11	A_23_P98275	4296	3929	1481	1461	3408	1593	3618	3018	1925	350	293	325	299	564	538	538	532
110	MAP3K12	A_23_P105409	7786	446	266	272	354	378	426	385	341	38	38	46	42	149	137	110	150
111	MAP3K14	A_23_P207319	9020	2908	1844	1818	2531	2663	3787	2555	2320	729	713	722	757	2515	2567	2738	2626
112	MAP3K2	A_23_P313645	10746	3548	2375	3089	2542	3527	3567	4143	4886	763	834	819	873	451	539	492	470
113	MAP3K3	A_23_P207138	4215	10294	5569	5092	9547	7349	11053	9490	7735	1213	1132	1101	1050	640	649	662	672
114	MAP3K7	A_23_P500773	6885	4709	3951	3710	4797	4705	4668	4322	4954	3159	3612	3959	3870	3433	3952	3832	3291
115	MAP3K7IP1	A_23_P80342	10454	1179	421	437	906	419	928	761	579	285	290	347	326	191	222	167	231
116	MAP3K7IP2	A_23_P19702	23118	24790	19478	22591	31292	21921	30090	25244	29564	14299	14539	15738	14463	4704	5677	5754	4271
117	MAP3K7IP3	A_23_P305033	257397	326	240	242	400	230	241	278	239	111	138	156	126	95	113	118	106
118	MAP3K8	A_23_P23947	1326	3932	2852	18857	22826	5769	8372	30710	31770	168	177	268	204	360	412	959	373
119	MAPK1	A_24_P237265	5594	2165	1568	1663	2434	1622	2181	2035	2289	1150	1291	1325	1307	1282	1290	1241	1240
120	MAPK10	A_23_P45025	5602	22	19 *	18 *	13 *	18 *	14 *	11 *	9 *	15	20	22	19	12 *	12 *	9 *	17 *
121	MAPK11	A_23_P502274	5600	690	591	570	663	522	640	495	426	371	353	358	311	1050	1086	1104	1140
122	MAPK12	A_23_P29347	6300	91	72	75	78	85	90	62	66	705	829	736	852	2046	2233	1763	2332
123	MAPK13	A_24_P406132	5603	1523	1098	1349	1656	1103	1472	1294	1083	160	191	204	192	74	66	60	74
124	MAPK14	A_24_P397566	1432	417	467	472	422	424	455	354	317	193	229	242	240	311	358	307	335
125	MAPK3	A_23_P37910	5595	812	765	698	797	811	448	721	600	1049	1126	1046	1155	746	803	672	965
126	MAPK8	A_23_P356152	5599	80	101	167	83	226	59	113	61	446	442	471	492	254	234	260	248
127	MAPK8IP1	A_23_P116007	9479	12 *	10 *	10 *	7 *	13 *	6 *	16	21 *	40	28	36	27	67	73	67	85
128	MAPK8IP2	A_23_P502078	23542	174	136	158	164	119	112	120	98	250	212	223	247	9			

Tabelle 5 – Fortsetzung

	Gensymbol	Sonden ID	Entrez Gene ID	PBMC Donor 1				PBMC Donor 2				HEK293IL-1R-Zellen				HeLa-(TA-Zellen			
				-	Ana	LPS	LPS + Ana	-	Ana	LPS	LPS + Ana	-	Ana	IL-1	IL-1 + Ana	-	Ana	IL-1	IL-1 + Ana
150	NKRF	A_23_P11214	55922	3674	2941	2929	4040	4155	5479	3620	4107	9567	9477	9789	8353	5504	6668	5745	5523
151	NLRC4	A_23_P119835	58484	5311	4380	3172	3768	5740	7897	3507	3513	14	13*	19	16	6*	9*	4*	6*
152	NLRP1	A_23_P89550	22861	14120	6381	6906	12228	7090	13586	10563	10157	131	87	113	84	861	907	978	914
153	NLRP2	A_24_P213161	55655	307	174	189	337	1091	1633	1461	1381	2*	11*	3*	20	6*	9*	9*	8*
154	NLRP3	A_23_P9883	114548	7032	4808	68632	75536	8704	11266	73219	85571	55	64	52	47	11*	14*	13*	4*
155	NOTCH1	A_23_P60387	4851	2443	2083	1953	3275	2412	1855	2502	2570	289	250	261	300	419	423	348	418
156	NR3C1	A_24_P214754	2908	6085	6417	6937	7127	7619	8825	6975	8415	1982	2367	2184	2364	3853	4251	4286	3877
157	P2RX7	A_24_P319113	5027	252	230	179	190	287	159	194	234	3*	2*	2*	2*	5*	3*	3*	12*
158	PAK2	A_32_P104075	5062	7431	7499	7435	8372	9530	10513	7143	8580	3166	2969	3076	2856	3907	4727	4081	3488
159	PELI1	A_23_P120345	57162	11867	9169	13464	16745	8972	11312	14377	18113	2274	2136	2291	2145	456	524	529	461
160	PELI2	A_23_P65532	57161	10865	7782	7246	10887	8451	13442	9280	10077	2426	2332	2361	1970	873	1044	810	854
161	PELI3	A_23_P104692	246330	763	521	584	721	384	615	406	393	198	207	228	195	447	476	433	432
162	PIK3R1	A_24_P29401	5295	21418	17757	20505	21325	32591	27601	32201	40234	1197	1074	1021	924	436	570	453	435
163	PIK3R2	A_23_P142361	5296	72	49	41	48	66	44	65	81	40	52	58	66	91	101	76	82
164	PLA2G4A	A_23_P11685	5321	1125	870	997	1343	1181	1591	1526	1528	2617	2658	2556	2442	30731	35963	36523	32540
165	PLCG1	A_23_P254801	5335	1136	1041	1317	1374	1358	753	948	738	496	561	505	553	820	852	702	842
166	POU2F1	A_24_P927182	5451	26	23*	30	33	14*	10*	14*	14*	16	7*	12*	5*	6*	4*	161	4*
167	PPM1D	A_32_P150030	8493	5865	4548	4514	6640	6696	9369	6312	7118	6001	6106	6056	5610	2731	3144	2870	2603
168	PPP1CA	A_23_P434710	5499	11133	15356	12790	11831	16433	12749	10730	9597	12402	14009	12204	12527	23887	23825	20662	27244
169	PP1R2	A_23_P17133	5504	4371	4958	5890	5744	4837	4333	4170	4306	2333	2903	2823	3430	7672	8364	7594	8612
170	PPP6C	A_23_P94623	5537	1515	1596	1766	1853	1909	1906	1552	1713	1759	1933	1849	1969	715	834	675	675
171	PRKCZ	A_23_P51187	5590	2980	2237	2796	3138	3512	3729	3070	3257	5815	5954	5833	5824	15390	17771	13470	15897
172	PRTN3	A_23_P142345	5657	254	249	229	256	127	142	137	96	85	72	80	66	71	73	73	76
173	PTGS2	A_24_P77008	5743	121	105	7473	5718	238	273	12727	15017	9*	3*	6*	4*	731	871	2886	742
174	PTPN11	A_23_P204090	5781	11*	22*	12*	28	86	16*	12*	19*	58	69	87	63	75	58	54	54
175	PYCARD	A_23_P26629	29108	27472	28896	19060	18177	22326	23538	14957	12517	32	33	55	23	25*	32	24	38
176	PYDC1	A_23_P407614	260434	3657	4085	2492	2411	3099	3244	2064	1875	17	20	17	21	44	55	59	60
177	RAC1	A_24_P194845	5879	45785	53319	46458	47415	47074	51041	39140	40400	42641	51846	55060	54272	43600	48007	55398	48554
178	RARB	A_24_P3249	5915	3*	4*	4*	4*	4*	6*	3*	6*	104	159	172	194	20*	19	18*	12*
179	RBI	A_24_P102636	5925	214	183	229	178	214	217	148	150	59	55	82	72	120	124	123	109
180	RBCK1	A_23_P166051	10616	6768	2942	2541	6263	2836	5682	4674	3246	245	267	268	288	514	489	469	543
181	RBPJ	A_24_P54797	3516	3257	3886	4879	3778	4856	3084	3754	3718	7943	9724	8870	9379	4053	4402	4027	4048
182	REL	A_23_P56938	5966	16253	11147	14771	26980	18627	13895	29294	29832	1791	2235	2057	2230	1403	1462	2738	1564
183	RELA	A_24_P937256	5970	16*	10*	38	10*	16*	6*	14*	7*	19	21	18	19	35	32	25	29
184	RELB	A_23_P55706	5971	6524	5361	7944	8994	8937	10732	9586	8406	684	628	1914	775	2062	2463	9439	2038
185	RNF31	A_23_P99632	55072	4430	2603	2630	3888	3715	5261	3529	3032	1020	1020	1055	911	978	1056	989	1002
186	RPS6KA1	A_24_P396650	6195	10112	4702	4706	8024	5341	9477	6459	4903	1114	1045	1155	1032	1135	1186	969	1131
187	RPS6KA4	A_23_P35791	8986	3974	2031	1339	2730	1645	4754	2422	2233	438	424	487	390	1220	1211	1175	1098
188	RPS6KA5	A_23_P37375	9252	7124	5630	7011	8407	8164	6819	7604	8322	3328	3724	3239	3159	1307	1724	1532	1347
189	SI00B	A_23_P143526	6285	2378	2492	2837	2807	821	1046	747	759	9*	6*	8*	3*	5*	6*	9*	4*
190	SAAI	A_24_P335092	6288	5*	4*	16*	14*	3*	18*	17	5*	2*	16	2*	2*	164	196	2677	188
191	SELE	A_23_P97112	6401	4*	6*	5*	5*	5*	6*	3*	6*	3*	3*	4*	3*	7*	4*	16*	5*
192	SERPINB1	A_23_P214330	1992	38100	38095	46073	46190	45422	42613	42166	37925	1059	1200	1202	1213	17000	18067	19894	18554
193	SERPINB2	A_24_P245379	5055	2782	2578	12276	8734	5942	7329	18430	19220	3*	3*	4*	4*	5*	3*	4*	4*
194	SERPINB9	A_32_P38323	5272	2204	1622	6288	6841	3417	2721	7399	7930	9*	9*	13*	25	7*	3*	4*	4*
195	SIN3A	A_24_P304760	25942	2167	1379	1548	2357	1650	2532	2126	2064	590	642	614	622	364	420	363	351
196	SIN3B	A_24_P39301	23309	866	826	949	861	825	905	725	787	1170	1320	1227	1173	2306	2481	2647	2429
197	SIRPA	A_24_P259083	140885	1303	845	960	1785	728	887	1961	2223	40	33	38	46	6*	3*	4*	4*
198	SMAD6	A_23_P65812	4091	169	108	96	162	82	104	114	99	761	672	674	620	515	519	334	557
199	SMARCA4	A_23_P39034	6597	8790	5521	6195	8659	7213	10688	8007	8517	21381	23126	23319	22340	11608	14395	13228	12035
200	SOD3	A_23_P351069	9021	127	130	321	144	145	64	117	92	69	69	71	66	138	141	130	142
201	SOD1	A_24_P151464	6647	50487	55534	53103	51193	48392	56962	43639	42822	140507	145444	153481	144312	114775	131603	119740	117816
202	SOD2	A_23_P134176	6648	46097	52723	217227	208869	54252	62609	210780	247588	25478	27828	29183	28246	13113	13286	50265	13946
203	SPI1	A_23_P115998	6688	1042	1875	1483	1050	1704	468	869	822	45	17	23	7*	5*	9*	9*	3*
204	SQSTM1	A_23_P81399	8878	24494	17126	23295	28352	19258	29627	25170	23063	4707	5434	5571	5669	26711	27640	33516	31752
205	SRF	A_24_P346277	6722	5101	4565	4469	5144	5041	6119	4582	4733	9318	8946	8789	8386	6007	6511	6970	5808
206	STAT1	A_23_P56630	6772	12839	9332	10029	13632	9095	10985	9718	10264	1333	1650	1533	1511	1872	2102	1797	1754
207	STAT3	A_24_P116805	6774	3518	3860	3941	4579	5144	3279	4166	3833	904	1004	938	981	2218	2369	2302	2299
208	TBKI	A_23_P44768	29110	9437	7979	9846	12775	12152	15899	13806	15480	8374	9063	8707	8834	4645	5348	4371	4176
209	TBLIX	A_24_P417162	6907	9353	5731	4805	9178	6693	12931	9397	8098	3274	3369	3756	3492	3884	4208	3593	3814
210	TBLIXR1	A_23_P212552	79718	5864	5724	5114	6890	5964	6630	5867	7004	3925	4521	4312	4658	3436	3818	3097	3355
211	TBP	A_23_P19131	6908	2709	2005	1973	2551	2422	3177	2643	2485	4780	5819	6002	6505	2061	2112	2049	1969
212	TFF1	A_24_P322771	7031	341	280	307	321	243	324	241	231	203	163	193	123	635	664	1060	632
213	TGFB1	A_24_P79054	7040	9932	5488	6405	10456	7181	6215	8689	7413	53	53	54	58	1799	2162	1995	2228
214	TIA1	A_24_P417474	7072	588	875	1178	673	1032	811	693	760	2770	3299	3261	3290	3322	3462	3426	3508
215	TIRAP	A_23_P397856	114609	358	358	275	353	537	316	279	287	136	206	162	172	118	140	113	144
216	TNF	A_24_P50759	7124	160	180	13085	17048												

Tabelle 5: mRNA-Expressionswerte der Gene aus der IL-1-Signaltransduktionskarte.

PBMC von D1 und D2 wurden bei 37 °C entweder mit 10 µg/ml Anakinra (Ana) oder unbehandelt für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 1 ng/ml LPS stimuliert oder unstimuliert für 1 h inkubiert (Spalten 4-11 von links). HEK293IL-1R-Zellen wurden bei 37 °C mit 10µg/ml Anakinra (Ana) oder unbehandelt für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 10 ng/ml IL-1α (IL-1) stimuliert oder unstimuliert für 3 h inkubiert (Spalten 12-15 von links). HeLa-tTA-Zellen wurden bei 37 °C mit 10 µg/ml Anakinra (Ana) oder unbehandelt für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 20 ng/ml IL-1α (IL-1) stimuliert oder unstimuliert für 4 h inkubiert (Spalten 16-19 von links). Für die in der IL-1-Signaltransduktionskarte mit einer *Entrez Gene ID* versehenen Gene (Spalten 1-3) sind die nach Normalisierung retransformierten und auf ganze Zahlen gerundeten mRNA-Expressionswerte aus der *Microarray*-Analyse gezeigt. Gelb markiert sind Expressionswerte, die im Logarithmischen ≥ 2 -fach bzw. $\leq 0,5$ -fach von der Kontrollvariante differieren. „*“-Zeichen kennzeichnen nicht messbare Werte, deren Fluoreszenzintensität nicht über der Hintergrundintensität lag. Grün markiert sind die Gene, die in den Passagen 3.3.2.1 und 3.3.2.2 besprochen werden.

(Auswertung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Axel Weber, AG Kracht)

3.3.2.3 Anteil der auf mRNA-Ebene regulierten Gene in der IL-1-Signaltransduktionskarte

Die IL-1-Signaltransduktionskarte enthält 256 Elemente, die in Zielgene, mRNAs, Proteine und Splice Varianten von Proteinen unterteilt werden (vgl. 3.1.2.1). Da alle Einträge in der Karte über das Gensymbol bezeichnet sind, gibt es in der Karte zwar 256 Elemente, aber nur 232 Einträge für Gene. Von den in der genomweiten *Microarray*-Analyse gemessenen Genen wurden durch 1 h Stimulation mit 1 ng/ml LPS insgesamt 223 in den PBMC beider Spender >2 -fach reguliert. Davon sind 28 in der IL-1-Signaltransduktionskarte abgebildet. Die LPS-abhängige Regulation wurde durch Anakinra bei keinem der 28 Gene >2 -fach beeinflusst.

In den HEK293IL-1R-Zellen wurden 18 Gene durch 3 h Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 >2 -fach reguliert, von denen 5 in der IL-1-Signaltransduktionskarte enthalten sind. Bei 2 von diesen 5 Genen bewirkte Anakinra eine >2 -fache Aufhebung des Effekts.

Bei den HeLa-tTA-Zellen wurden durch 4 h Stimulation mit 20 ng/ml IL-1 294 Gene >2 -fach reguliert. Davon sind 18 in der IL-1-Signaltransduktionskarte abgebildet. Eine >2 -fache Effektaufhebung durch Anakinra war bei 16 der 18 Gene nachweisbar (Tab.6A+B).

A

		Regulierte Gene in IL-1 Map	Regulierte Gene in <i>Microarray</i> -Analyse	%	IL-1 Map %
PBMC D1+D2	Induktion >2-fach	28	192	14,6 %	12,1 %
	Repression >2-fach	0	31	0 %	0 %
	Gesamt	28	223	12,6 %	12,1 %
HEK293IL-1R-Zellen	Induktion >2-fach	4	11	36,4 %	1,7 %
	Repression >2-fach	1	7	14,3 %	0,4 %
	Gesamt	5	18	27,8 %	2,2 %
HeLa-tTA-Zellen	Induktion >2-fach	16	202	7,9 %	6,9 %
	Repression >2-fach	2	92	2,2 %	0,9 %
	Gesamt	18	294	6,1 %	7,8 %

B

		Regulierte Gene in IL-1 Map
PBMC D1+D2	LPS Induktion >2-fach	28
	LPS+Anakinra Repression >2-fach	0
	%	0 %
	LPS Repression >2-fach	0
	LPS+Anakinra Induktion >2-fach	0
	%	
HEK293IL-1R-Zellen	IL-1 Induktion >2-fach	4
	IL-1+Anakinra Repression >2-fach	2
	%	50 %
	IL-1 Repression >2-fach	1
	IL-1+Anakinra Induktion >2-fach	0
	%	0 %
HeLa-tTA-Zellen	IL-1 Induktion >2-fach	16
	IL-1+Anakinra Repression >2-fach	15
	%	93,8 %
	IL-1 Repression >2-fach	2
	IL-1+Anakinra Induktion >2-fach	1
	%	50 %

Tabelle 6: Überblick über die Regulation der in der IL-1-Signaltransduktionskarte abgebildeten Gene in humanen PBMC und kultivierten Zellen.

Beschriftungstext zur Tabelle 6 folgt auf der nächsten Seite.

Tabelle 6: Überblick über die Regulation der in der IL-1-Signaltransduktionskarte abgebildeten Gene in humanen PBMC und kultivierten Zellen.

Angezeigt ist die jeweilige Anzahl der Gene, welche in den PBMC von D1 und D2 infolge von 1 h Stimulation mit 1 ng/ml LPS im Vergleich zur Kontrolle bzw. durch LPS-Stimulation nach 0,5 h Vorinkubation mit 10 µg/ml Anakinra im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation, in HEK293IL-1R-Zellen infolge von 3 h Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 α im Vergleich zur Kontrolle bzw. durch IL-1 α -Stimulation nach 0,5 h Vorinkubation mit 10 µg/ml Anakinra im Vergleich zur alleinigen IL-1 α -Stimulation sowie in HeLa-tTA-Zellen infolge von 4 h Stimulation mit 20 ng/ml IL-1 α im Vergleich zur Kontrolle bzw. durch IL-1 α -Stimulation nach 0,5 h Vorinkubation mit 10 µg/ml Anakinra im Vergleich zur alleinigen IL-1 α -Stimulation >2-fach reguliert wurden. Berücksichtigt wurden hierbei nur Gene, für die in der *Microarray*-Analyse mRNA-Expressionswerte gemessen wurden, die sich log₂-transformiert und normalisiert allesamt auf der 75. Perzentile des jeweiligen Arrays befinden.

A) Die Anzahl der in der IL-1-Signaltransduktionskarte (IL-1 Map) enthaltenen Gene, welche in den PBMC durch LPS sowie in den HEK293-Zellen bzw. HeLa-Zellen durch IL-1 reguliert wurden, wurde zu der jeweiligen Anzahl der in der *Microarray*-Analyse regulierten Gene ins Verhältnis gesetzt (%). Außerdem ist der prozentuale Anteil an den 232 mit einer *Gene ID* versehenen Gene in der IL-1-Signaltransduktionskarte angegeben (IL-1 Map %).

B) Angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil der in der IL-1-Signaltransduktionskarte (IL-1 Map) enthaltenen Gene, die sich nach stimulusabhängiger Induktion durch Behandlung mit dem IL-1-Rezeptorantagonisten Anakinra gegenregulieren ließen (%).

(Auswertung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Axel Weber, AG Kracht)

3.3.3 Projizieren der mRNA-Expressionswerte mittels Farbcode auf die IL-1-Signaltransduktionskarte

Eine Übersicht über die LPS-Zielgene in den PBMC von beiden Donoren und die Regulation in den Zelllinien nach Stimulation mit IL-1 zeigt Abb.24 bzw. Abb.A3 im Anhang: Die mRNA-Expressionswerte der 223 in den PBMC durch LPS-regulierten Gene und deren Änderungen durch den IL-1-Rezeptorantagonisten Anakinra wurden über Farbwerte als Heatmap dargestellt. Von den 223 LPS-Zielgenen in den PBMC zeigten sich 47 der Gene in den HeLa-tTA-Zellen und 12 Gene in den HEK293IL-1R-Zellen IL-1-reguliert (vgl. Farbskalen-Legende neben der Heatmap). Mit den genomweiten *Microarray*-Daten wurden die Effekte von LPS, IL-1 und Anakinra auf mRNA-Ebene für alle Elemente der IL-1-Signaltransduktionskarte erfasst. Die mRNA-Gehalte als log₂-normalisierte Intensitäten und die Änderung der Genregulation durch Anakinra als Verhältnis aus „Stimulus + Anakinra vs. Stimulus“ wurden mit einem Farbcode auf die Karte projiziert (Abb.25 bzw. Abb.A4+A5 im Anhang). Die mRNA-expressionsabhängige Färbung der molekularen Elemente überdeckt die ursprüngliche Umrandung der Rechtecke, sodass äußerlich nicht mehr zwischen Zielgenen, mRNAs und Proteinen, denen ein und dasselbe Gensymbol zugeordnet ist, unterschieden werden kann. Doch diese Darstellung lässt auf Anhieb die mRNA-Expression einzelner Genprodukte in ihrer Funktion innerhalb des IL-1-Signalwegs erkennen. Es ist somit wichtig, sich zu vergegenwärtigen, dass es sich stets um mRNA-Expressionsmuster handelt, auch wenn diese auf Zielgenen oder Proteinen abgebildet sind.

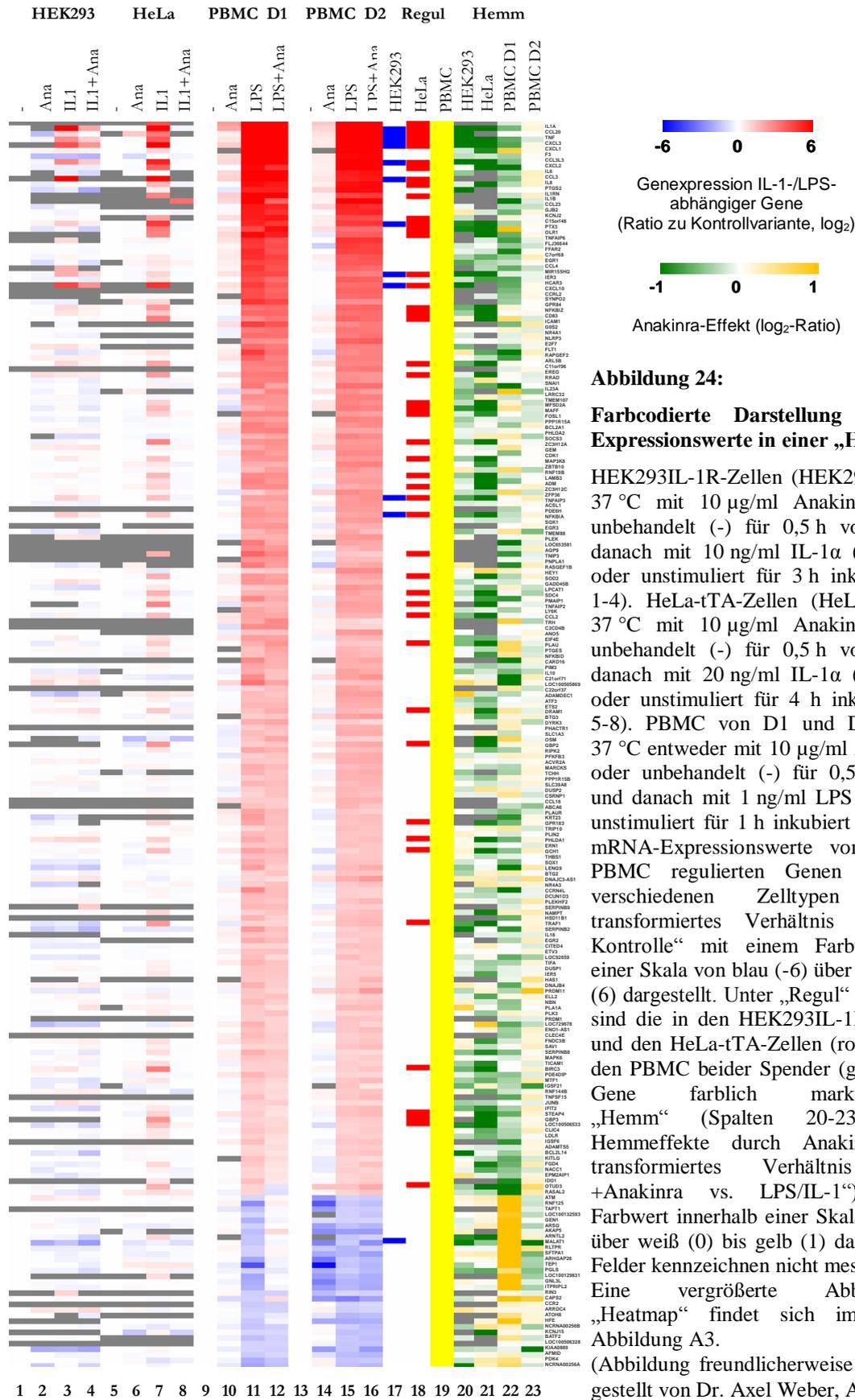


Abbildung 24:

Farbodierte Darstellung der mRNA-Expressionswerte in einer „Heatmap“.

HEK293IL-1R-Zellen (HEK293) wurden bei 37 °C mit 10 µg/ml Anakinra (Ana) oder unbehandelt (-) für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 10 ng/ml IL-1α (IL1) stimuliert oder unstimuliert für 3 h inkubiert (Spalten 1-4). HeLa-tTA-Zellen (HeLa) wurden bei 37 °C mit 10 µg/ml Anakinra (Ana) oder unbehandelt (-) für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 20 ng/ml IL-1α (IL1) stimuliert oder unstimuliert für 4 h inkubiert (Spalten 5-8). PBMC von D1 und D2 wurden bei 37 °C entweder mit 10 µg/ml Anakinra (Ana) oder unbehandelt (-) für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 1 ng/ml LPS stimuliert oder unstimuliert für 1 h inkubiert (Spalten 9-16). mRNA-Expressionswerte von 223 in den PBMC regulierten Genen sind für die verschiedenen Zelltypen als log₂-transformiertes Verhältnis „Stimulus vs. Kontrolle“ mit einem Farbwert innerhalb einer Skala von blau (-6) über weiß (0) bis rot (6) dargestellt. Unter „Regul“ (Spalten 17-19) sind die in den HEK293IL-1R-Zellen (blau) und den HeLa-tTA-Zellen (rot) neben den in den PBMC beider Spender (gelb) regulierten Gene farblich markiert. Unter „Hemm“ (Spalten 20-23) sind die Hemmeffekte durch Anakinra als log₂-transformiertes Verhältnis („LPS/IL-1 +Anakinra vs. LPS/IL-1“) mit einem Farbwert innerhalb einer Skala von grün (-1) über weiß (0) bis gelb (1) dargestellt. Graue Felder kennzeichnen nicht messbare Gene. Eine vergrößerte Abbildung der „Heatmap“ findet sich im Anhang als Abbildung A3.

(Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Axel Weber, AG Kracht)

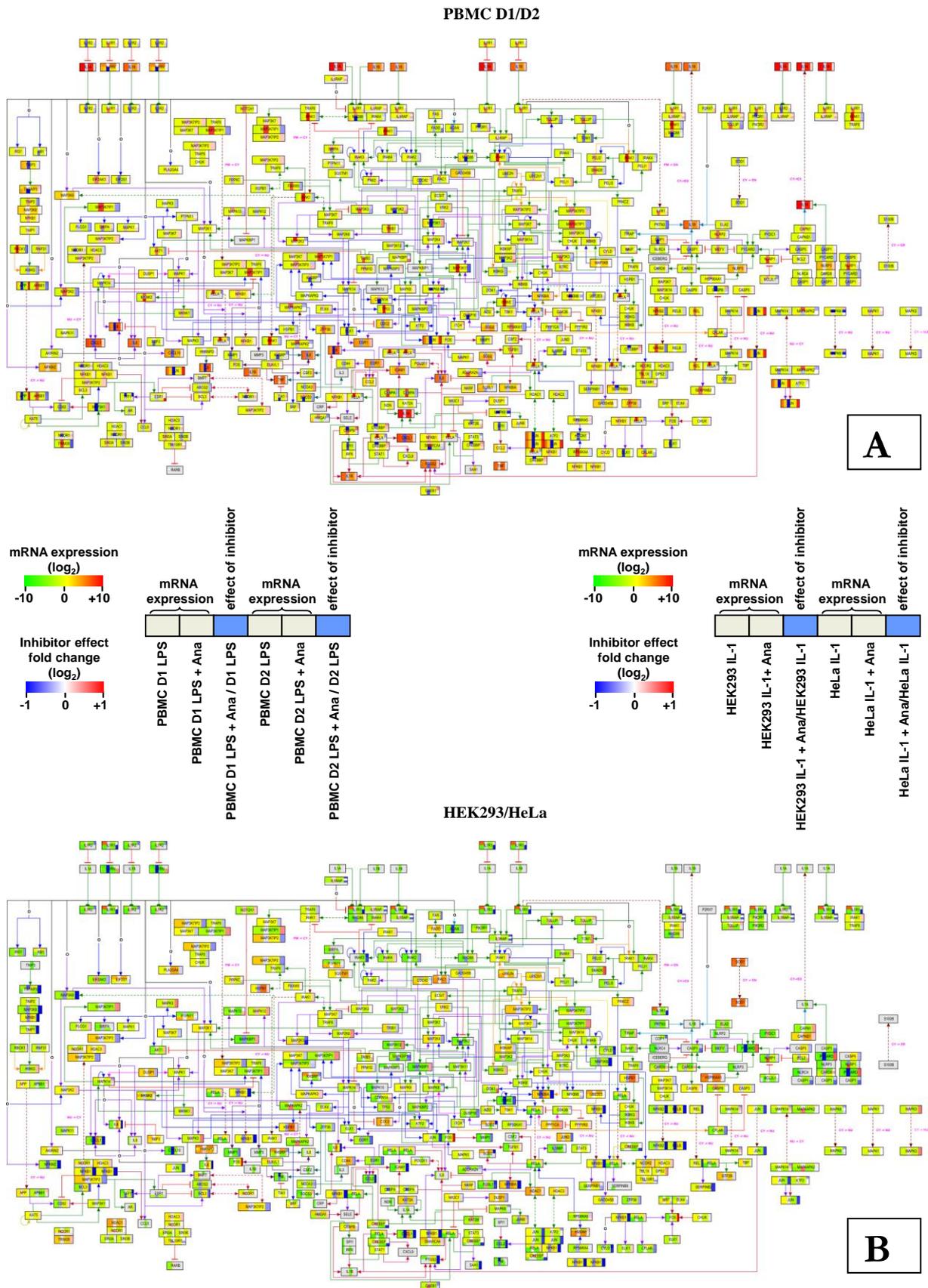


Abbildung 25: Farbcodierte Darstellung der mRNA-Expressionswerte und Effekte von Anakinra auf den molekularen Elementen in der IL-1-Signaltransduktionskarte.

Beschriftungstext zur Abbildung 25 folgt auf der nächsten Seite.

Abbildung 25: Farbcodierte Darstellung der mRNA-Expressionswerte und Effekte von Anakinra auf den molekularen Elementen in der IL-1-Signaltransduktionskarte.

A) PBMC von D1 und D2 wurden bei 37 °C entweder mit 10 µg/ml Anakinra (Ana) oder unbehandelt für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 1 ng/ml LPS stimuliert oder unstimuliert für 1 h inkubiert.

B) HEK293IL-1R-Zellen (HEK293) wurden bei 37 °C mit 10 µg/ml Anakinra (Ana) oder unbehandelt für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 10 ng/ml IL-1 α (IL-1) stimuliert oder unstimuliert für 3 h inkubiert. HeLa-tTA-Zellen (HeLa) wurden bei 37 °C mit 10 µg/ml Anakinra (Ana) oder unbehandelt für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 20 ng/ml IL-1 α (IL-1) stimuliert oder unstimuliert für 4 h inkubiert.

Jeweils abgebildet ist die IL-1-Signaltransduktionskarte samt Farbskalen-Legende [links: Legende zu A), rechts: Legende zu B)]. In dieser ist die Unterteilung eines Rechtecks in 6 gleich große Farbkompartimente zur vergleichenden Abbildung der Effekte in den verschiedenen Zelltypen („PBMC D1 vs. PBMC D2“ bzw. „HEK293 vs. HeLa“) erörtert:

Das \log_2 -transformierte Verhältnis „LPS/IL-1 vs. Kontrolle“ (Farbkompartiment 1+4 von links) und „LPS/IL-1+Anakinra vs. Kontrolle“ (Farbkompartiment 2+5 von links) ist mit einem Farbwert innerhalb einer Skala von grün (-10) über gelb (0) bis rot (10), das \log_2 -transformierte Verhältnis „LPS/IL-1+Anakinra vs. LPS/IL-1“ (Farbkompartiment 3+6 von links) mit einem Farbwert innerhalb einer Skala von blau (-1) über weiß (0) bis rot (1) dargestellt.

Vergrößerungen der Abbildungen 25A+B finden sich im Anhang als Abbildungen A4+A5. Die Legende mit den Elementen der Signaltransduktionskarte findet sich in Abbildung 4 bzw. im Anhang als Abbildung A2.

(Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Axel Weber, AG Kracht)

4 Diskussion

4.1 Erstellung eines Wissensarchivs zur Interleukin-1-Signaltransduktion und Visualisierung der Informationen in Form einer Signaltransduktionskarte

Die Grundlage dieser Arbeit bildet eine systematische Erfassung von experimentell erhobenen Daten zur Signaltransduktion des Zytokins Interleukin-1. Das zeitaufwändige Verfahren des Suchens, Lesens und Bewertens der zugrunde liegenden Originalarbeiten war ein komplexer Prozess, an dessen Ende die Aufnahme von Befunden in ein elektronisches Archiv zur IL-1-Signaltransduktion stand oder eben auch deren Ausschluss.

Eine weitere Ebene der Schwierigkeit der Beurteilung bestand darin, dass die Evidenz für die Involvierung eines Moleküls in einen intrazellulären Signalweg mit einer Reihe an sehr unterschiedlichen molekularen Methoden erhoben werden kann, deren Evidenzgrade sich im Laufe der Zeit auch erheblich wandeln können. Da die IL-1-Signaltransduktionskarte Literatur abdeckt, die bis zur molekularen Klonierung von IL-1 α und IL-1 β im Jahr 1984 zurückreicht, ist dies ein weiterer Faktor, der die hier dokumentierte Zusammensetzung der Signaltransduktionskarte beeinflusst.

Die hier abgebildete IL-1-Signaltransduktionskarte kann grob in zwei Teile unterschieden werden:

Den Kern bilden 87 Komponenten und ihre gegenseitigen Abhängigkeiten, die in dem sogenannten kanonischen Teil des IL-1-Netzwerks publiziert worden sind (Weber et al., 2010a; Weber et al., 2010b). Hierbei wurden die Originaldaten von 158 Papern von Prof. Dr. Michael Kracht und zum Teil von Dr. Axel Weber Ergebnis für Ergebnis gesichtet, bewertet und mit in der Datenbank von *Science Signaling* hinterlegten Kommentaren bewertet. Im Rahmen dessen wurde sehr viel Wert darauf gelegt, dass die Evidenz für die Involvierung eines Moleküls in die IL-1-Signaltransduktion in menschlichen und murinen Systemen erhoben worden war und dass die mechanistische Einordnung in den *IL-1 Pathway* mit einer Reihe von Methoden kausal abgesichert wurde. Als ein Beispiel wäre die Proteinkinase TAK1 zu nennen, deren IL-1-stimulierte Aktivierung und Interaktion mit TRAF6, TAB1, TAB2, TAB3 und die von diesem Multiproteinkomplex abhängende funktionelle Bedeutung für IL-1-induzierte Effekte in Zellen und Geweben durch Überexpression von Punkt- und Deletionssmutanten (Holtmann et al., 2001; Ishitani et al., 2003; Kanayama et al., 2004; Ninomiya-Tsuji et al., 1999; Yamazaki et al., 2009; Yu et al., 2008), *in vitro Kinase Assays*

(Cheung et al., 2003; Holtmann et al., 2001; Ishitani et al., 2003; Kanayama et al., 2004; Ninomiya-Tsuji et al., 1999), Koimmunpräzipitationsexperimenten mit überexprimierten und endogenen Partnern (Cheung et al., 2003; Ishitani et al., 2003; Kanayama et al., 2004; Ninomiya-Tsuji et al., 1999; Yamazaki et al., 2009; Yu et al., 2008), RNAi-vermitteltem „Knock-down“ (Alford et al., 2007; Yamazaki et al., 2009), Deletion des Gens in der Maus (Yamazaki et al., 2009; Yao et al., 2007), Proteinkinasehemmstoffen (Thiefes et al., 2006; Yao et al., 2007) und massenspektrometrischer Analyse der aktivierenden TAK1-Modifikationen (Yu et al., 2008) untersucht und belegt wurde.

Die Eigenschaft, dass die Beobachtungen in dieser *Map* mehrfach abgesichert und in mehr als einem Zellsystem/einer Spezies gemacht wurden, führte zu der Bezeichnung „kanonischer (im englischen Sprachgebrauch „canonical“) Signalweg“. In dem hier relevanten Kontext bezeichnet dies einen allgemein gültigen oder einen in der Regel verwendeten *Pathway*.

Schon dieser kanonische *Pathway* enthält deutlich mehr Informationen als die Darstellung des IL-1-Signalwegs in *NetPath* zu Beginn (April 2008: 39 Komponenten, 89 Reaktionen) oder in der revidierten Fassung am Ende der Arbeit (Februar 2014: 69 Komponenten, 130 Reaktionen). Andere in *KEGG* (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04010, Februar 2014: 124 Komponenten, 109 Reaktionen) oder *GeneGo* (http://www.genego.com/map_658.php, Februar 2014: 44 Komponenten, 78 Reaktionen) abgelegte ähnliche Signaltransduktionskarten von IL-1 enthalten ebenfalls weniger Informationen. Dies gilt auch für die aktuellste Version der in der *NCI/Nature Pathway Interaction Database* abgebildeten *IL-1 Map* (Februar 2014):

http://pid.nci.nih.gov/search/pathway_landing.shtml?what=graphic&jpg=on&pathway_id=200089&source=NATURE&output-format=graphic&ppage=1&genes_a=3552,3553sll).

Letztere enthält hauptsächlich den proximalen NF- κ B Signalweg und keine Informationen über die distal davon ablaufenden transkriptionellen und posttranskriptionellen Signalwege. Andere Beispiele für *Pathway Maps* finden sich in zum Teil aufwändig gestalteten kommerziellen, von Firmen erstellten graphischen Abbildungen (*NF- κ B Pathway* von *Cell Signaling*, Februar 2014: <http://www.cellsignal.com/pathways/nk-kappab-signaling.jsp>; *MAPK Pathway* von *Qiagen*, Februar 2014: http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=MAPK_Signaling) und enthalten in der Regel nur eine rudimentäre Angabe der Quellen (siehe hierzu <http://www.pathguide.org/#3>, Februar 2014).

Das größte in diesem Zusammenhang beschriebene Signalnetzwerk ist ein *Toll-like-Rezeptor* (TLR)-Netzwerk, welches bereits auch mathematisch modelliert wurde: 652 Komponenten

und 444 Reaktionen (Oda et al., 2006) bzw. 752 Komponenten und 909 Reaktionen (Li et al., 2009).

Es ist zu vermuten, dass auch viele Komponenten vor allem des kanonischen intrazellulären *IL-1 Signalings* in dieser *Map* enthalten sind. So gibt es aber auch Komponenten oder Signalwege, die sich zwischen beiden *Maps* unterscheiden. Beispielsweise initiieren im TLR-Signalweg sogenannte „Interferon Regulatory Factors“ (IRFs), die als Transkriptionsfaktoren fungieren, die Expression von Typ 1 Interferon-Genen (Gaestel et al., 2009a).

Während der ersten Phase der Erstellung der *IL-1 Map* erfolgte parallel die Erstellung der *Science Signaling Map*. In einem interaktiven Prozess wurde die *IL-1 Map* dahingehend revidiert, dass die gesamten Informationen aus der *Database of Cell Signaling* von *Science Signaling* in die „große“ *IL-1 Map* wieder zurückübertragen wurden, sodass der kanonische Teil des *IL-1 Signalings* zwischen diesen beiden Versionen übereinstimmt und mehrfach überprüft wurde.

Daneben gibt es sehr viele weitere *Signaling*-Ereignisse, die für IL-1 beschrieben wurden, welche aber zum Teil nur in bestimmten Zellarten gefunden oder methodisch (noch) nicht vollständig abgesichert wurden. Diese Informationen wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Erstellung der 256 Komponenten enthaltenden *Map* benutzt und bilden den zweiten Teil des IL-1-Netzwerks, sind jedoch noch nicht von anderen Wissenschaftlern der Arbeitsgruppe überprüft worden. Es ist denkbar, dass nach dem *Wiki*-Prinzip diese *IL-1 Map* in das Internet gestellt wird und Leser und Entwickler wiederum in einem interaktiven Prozess die Qualität und Gültigkeit aller hinterlegten Informationen überprüfen und verbessern. Durch die Hinzunahme sich neu ergebender Erkenntnisse kann die *Map* dann auch im Zeitverlauf qualitativ wachsen.

Im Folgenden wird noch einmal etwas präziser auf den Prozess der Datenerfassung und Beurteilung eingegangen.

4.1.1 Beispielhafte Diskussion der Kriterien für das Auswählen und Gewichten geeigneter Literatur über den IL-1-Signalweg

Für die Erstellung der IL-1-Signaltransduktionskarte wurden ausschließlich begutachtete, in Fachjournalen veröffentlichte Originalarbeiten verwendet, die in *PubMed* gelistet sind. Nicht ganz unerwartet lassen sich jedoch in verschiedenen Publikationen deutliche Unterschiede in der Beschaffenheit und Verwertung von Rohdaten feststellen. Nicht immer sind die Versuche sinnvoll gewählt oder es fehlen notwendige Negativ- und Positivkontrollen. Auch kommen an der Aussagekraft dann Zweifel auf, wenn zum Beispiel im Gegensatz zu der im Ergebnisteil

der Veröffentlichung beschriebenen Art der Effekte, die gezeigten Daten nicht eindeutig und/oder nicht gut kontrolliert sind. Beispielsweise lässt sich keine quantitative Aussage über die Phosphorylierung eines Proteins unter Gabe verschiedener Stimuli bzw. Inhibitoren treffen, wenn der endogene Gehalt des Proteins nicht bekannt ist [vgl. Fig.5D aus „Interleukin-1 (IL-1)-induced TAK1-dependent *Versus* MEKK3-dependent NFκB Activation Pathways Bifurcate at IL-1 Receptor-associated Kinase Modification” (Yao et al., 2007)].

Da die Bewertung der Ergebnisse einer Publikation letztlich dem Leser selbst obliegt – und nicht der Zitationshäufigkeit eines Fachjournals und dessen vermeintlicher Qualität –, wurde letzten Endes so verfahren, dass zunächst keine Originalarbeit aussortiert wurde und stattdessen Ergebnisse aus allen gesammelten Publikationen, die sich thematisch in das große Gebiet von Interleukin-1 einordnen lassen, in der IL-1-Signaltransduktionskarte abgebildet worden sind.

Da mit dem Suchbegriff „IL-1“ 64.878 (Stichtag 01.02.2014) und mit der Kombination „IL-1“ und „Signal“ unter „Title/Abstract“ 1957 Publikationen in *PubMed* (Stichtag: 01.02.2014) gelistet sind und es viele weitere Arbeiten gibt, die Daten zu wichtigen Befunden zum *IL-1 Signaling* enthalten, welche nicht im Titel oder im Abstrakt erwähnt werden [z.B. enthält „Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors“ (Gupta et al., 1996) eine der ersten Beobachtungen zur IL-1-induzierten MKP-1 mRNA-Expression], kann die hier dargestellte *IL-1 Map* naturgemäß keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben.

Trotzdem ist ein breites und kompaktes Konstrukt entstanden, dessen Grad der Evidenz vor allem von der Reproduzierbarkeit der gesammelten Erkenntnisse abhängig ist – und, wie bereits erwähnt, nicht von der vermeintlichen Qualität eines Journals, in dem eine einmalige Entdeckung beschrieben worden ist. Naturgemäß werden neue, interessante Erkenntnisse zunächst häufig in einem hochwertigen Journal publiziert, was jedoch nichts über ihre Reproduzierbarkeit aussagt. So wurde im Jahr 1988 in *Cell* publiziert, dass IL-1 zur intrazellulären Freisetzung des „Second messengers“ Diacylglycerol führt (Rosoff et al., 1988). Ein weiteres Beispiel für eine vergleichsweise schlecht abgesicherte Beobachtung auf dem Gebiet von IL-1 ist der Bericht über eine IL-1-abhängige Generierung von Ceramid als „Second messenger“ (Mathias et al., 1993). Diese Beobachtungen und die Schlussfolgerung, dass IL-1 über aus der Plasmamembran freigesetzte Botenstoffe die nachgeschaltete Signaltransduktion initiiert, beruhten auf Rückschlüssen anhand der damals verwendeten biochemischen Methoden und ist bis heute nicht weiter validiert worden, während die Beobachtung, dass der IL-1-Rezeptor über Protein:Protein-Wechselwirkungen und reversible

Phosphorylierungen/Ubiquitinylierungen TRAF6/IRAKs und schließlich TAK1 aktiviert, vielfach in der Literatur belegt ist (vgl. 3.1.2.1).

Daher wurde versucht, vor allem solche Experimente in die IL-1-Signaltransduktionskarte aufzunehmen, in denen eine bestimmte Beobachtung sowohl durch „Gain-of-function“- als auch insbesondere durch „Loss-of-function“-Ansätze (genetischer „Knockout“ oder durch RNA-Interferenz vermittelter „Knock-down“, spezifische Inhibitoren) zunächst in kultivierten Zelllinien, dann in primären Zellen, im Versuchstier und schließlich im Menschen abgesichert wurde. Ein positives Beispiel für einen solchermaßen sehr gut abgesicherten Befund ist die Implikation von IRAK-4 in den IL-1-Signalweg. Die initialen Studien enthielten Daten aus Überexpressionsversuchen mit dem IRAK-4-Wildtyp sowie einer dominant-negativen Mutante von IRAK-4 in HEK293-Zellen und aus Experimenten mit IRAK-4-defizienten embryonalen Fibroblasten, welche die Bedeutung von IRAK-4 bei der IL-1-induzierten NF- κ B-Aktivierung zeigten (Li et al., 2002; Suzuki et al., 2002). Die Relevanz von IRAK-4 zeigte sich aber auch in einer fehlenden IL-1-vermittelten Immunantwort in IRAK-4 „Knockout“-Mäusen sowie in Menschen mit angeborener IRAK-4-Defizienz (Picard et al., 2003; Suzuki et al., 2002).

Viele Publikationen beinhalten funktionelle Ergebnisse über Schlüsselmechanismen des IL-1-Signalwegs, die das Grundgerüst bilden. Um die genauen Interaktionen der dabei involvierten Komponenten aufzuschlüsseln, wurde gezielt nach Publikationen gesucht, die molekulare Reaktionen einzelner wichtiger Abschnitte des *IL-1-Pathways* enthalten. Hierbei wurde unter anderem auch auf Übersichtsarbeiten zurückgegriffen.

Eine Schwierigkeit bestand darin, Informationen aus Arbeiten zu extrahieren, in denen molekulare Reaktionen von einzelnen Komponenten des IL-1-Signalwegs in anderen Zusammenhängen untersucht wurden. So finden sich zum Beispiel viele Ergebnisse zu Bestandteilen der MAPK-Signalwege, die unter Einfluss von osmotischem Stress (z.B. durch Sorbitol), Bestandteilen pathogener Keime (z.B. LPS) oder anderer Zytokine (z.B. TNF- α) erzielt worden sind (Chen et al., 2002; Deacon et al., 1999; Park et al., 2003). Es existieren Überschneidungen zwischen dem IL-1-Signalweg und den Signalwegen anderer proinflammatorischer Stimuli (Gaestel et al., 2009a). Beispielsweise induziert LPS die Expression, Prozessierung und Freisetzung von Interleukin-1 (Dinarello, 2009; Martinon et al., 2009). Daher wurde so verfahren, dass alle gefundenen Ergebnisse zu den einzelnen Komponenten des IL-1-Netzwerks in die Signaltransduktionskarte integriert wurden. Für den Leser ist anhand des Kommentars zu einer bestimmten molekularen Reaktion ersichtlich, ob

dieser Vorgang explizit durch Stimulation mit IL-1 initiiert wurde (Chen et al., 2002; Jiang et al., 2002).

Das Eruiere der Datenlage zur IL-1-Signaltransduktion ist ein sehr komplexer Prozess. Es gilt noch viele Lücken zu schließen, zumal für eine Reihe von Signalkomponenten die Daten auch noch nicht komplett vorliegen.

4.1.2 Limitationen der IL-1-Signaltransduktionskarte

Die Entscheidung, die IL-1 Signaltransduktionsereignisse mit Hilfe einer zweidimensionalen graphischen Darstellung abzubilden, erzeugte intrinsisch eine Reihe von Limitationen.

Folgende Aspekte der Signaltransduktion können so nicht visualisiert werden:

- 1) Der Grundzustand und der aktivierte Zustand des Systems in separater Form. Im „Off“-Status dürften z.B. keine IL-1:IL-1R-Komplexe dargestellt sein.
- 2) Die zeitliche Auflösung, d.h. die Sequenz der Signaltransduktionsereignisse. Zunächst müssten sich innerhalb von Minuten die IL-1:IL-1R-Komplexe ausbilden, dann die phosphorylierten und K63-ubiquitylierten Formen der zytosolischen Signalkomponenten wie TAK1, IKKs, MKK3-7. Danach müssten die wichtigsten transkriptionellen Aktivatoren in den Zellkern translozieren (z.B. p65 NF- κ B) und schließlich müssten die mRNAs und dann die davon translatieren Proteine erscheinen.
- 3) Alle abschaltenden, negativ regulatorischen *Signaling*-Ereignisse. Prominentestes Beispiel hierfür wäre die nach ca. 30-60 Minuten beobachtbare Neusynthese der I κ B α -mRNA und das Erscheinen des I κ B α -Proteins, welches dann die NF- κ B Aktivierung abschaltet, sowie die induzierte Expression von MKP-1, welches die wichtigsten MAP Kinasen dephosphoryliert und somit inaktiviert.
- 4) Die zelltypspezifische Expression und Aktivierung von Signalkomponenten, welche den kanonischen *Pathway* modulieren. Beispiele hierfür wären das mRNA-destabilisierende Protein TTP, welches in epithelialen Zellen nur schwach oder gar nicht zu finden ist, oder eine Reihe von Proteinkinasen wie Cot/Tpl-2, IRAK-M, IKK ϵ und TBK1.
- 5) Die exakte Kompartimentalisierung der Signalkomponenten.

Diese Limitationen waren zu Beginn der Arbeit bekannt. Die übereinandergelagerten vielfältigen Informationen, die durch Erstellung der IL-1-Signaltransduktionskarte mit den dafür üblichen Programmen (*PathVisio*, *GenMAPP 2*) erzeugt worden sind, erlauben aber jetzt eine verfeinerte Darstellung. So wurde im Zuge einer Masterarbeit in der AG Kracht der kanonische IL-1-Signalweg an den Knotenpunkten der Signaltransduktion mit logischen

Operatoren verknüpft und wichtige Komponenten als inaktive, nicht phosphorylierte oder als aktivierte phosphorylierte Formen dargestellt. Hierzu wurde die graphische *MAP* als gezeichnetes Bild in die Software *CellNetAnalyzer Version 95b* überführt und die Reaktionen der Moleküle in logische Gleichungen umgeschrieben. Diese sogenannte *Boolesche MAP* ermöglicht es jetzt, den „Off“-/„On“-Zustand, einen weiteren Stimulationszeitpunkt und die Abschaltung der Signale über negative Feedback-Loops darzustellen (Schmitz et al, 2011).

Um die räumliche Anordnung von Molekülen/-komplexen oder deren exakte intrazelluläre Lokalisation besser abzubilden, könnte eine Projektion der Daten auf eine dreidimensionale Ebene mithilfe geeigneter Software z.B. von Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/> - Stand 20.01.2010) (Kohl et al., 2011) erfolgen. Dadurch ließen sich räumliche Bezüge von Molekülen zueinander und deren Verknüpfungen auch nach einzelnen Positionsverschiebungen übersichtlicher darstellen, was der großen Dynamik innerhalb des IL-1-Signalwegs wenigstens ansatzweise Rechnung trüge.

Eine Möglichkeit, jedes Molekül genau einem Kompartiment zuzuordnen, besteht darin, jedem Kompartiment eine Farbe zuzuordnen und die sich darin befindlichen Moleküle mit der entsprechenden zu versehen. Um zusätzlich zwischen verschiedenen Molekültypen (Protein, Zielgen, mRNA) differenzieren zu können, bietet sich die Idee an, von einer einheitlichen Darstellung mittels Rechtecken abzuweichen und jedes Molekül in einer festgelegten, typspezifischen Form abzubilden (Weber et al., 2010a; Weber et al., 2010b).

4.2 Stimulusabhängige mRNA-Expression in humanen PBMC

4.2.1 Die Rolle von IL-1 bei der LPS-induzierten mRNA-Expression in humanen PBMC

Die LPS-induzierte mRNA-Expression von *IL8*, welches ein typisches Zielgen von IL-1 ist (Buss et al., 2004; Hoffmann et al., 2002; Hoffmann et al., 2005), wurde durch Anakinra ebenso wenig beeinflusst wie diejenige von *GADD45β*, *IRAK2*, *PELLINO1* und *IL6*. Des Weiteren fiel auf, dass LPS in einer Konzentration von 1 ng/ml sein Maximum erreichte. Dies demonstrierte die enorme Potenz von LPS und warf die Frage auf, inwieweit die LPS-induzierte Genexpressionsantwort von IL-1 abhängig ist. Abgesehen von IL-1 und TNF- α induziert LPS nämlich noch eine ganze Reihe anderer Zytokine (z.B. Interferone), welche ihrerseits u.a. durch die Expression weiterer Zytokine zur Immunantwort beitragen (Dinarello, 2009; Gaestel et al., 2009a). Innerhalb des Zellgemischs aus Monozyten und Lymphozyten könnte es also durch LPS zur Aktivierung eines „Zytokinsturms“ gekommen sein, der eine

Vielzahl von Mechanismen in Gang setzte, die zur Immunantwort führten. Inmitten zahlreicher intrazellulärer Aktivierungsprozesse hat IL-1 möglicherweise einen nur unwesentlichen Anteil zur Immunantwort beigetragen. Daher dürfte die Hemmung von IL-1 durch Anakinra oder negative Rückkopplungsmechanismen (Schindler et al., 1990) keinen nennenswerten Einfluss auf die LPS-abhängige mRNA-Expression in den PBMC gehabt haben. Es ist durchaus denkbar, dass die Induktion der ERK-, p38-, JNK- und NF- κ B-Signalwege, welche konsekutiv zur *IL8*-Aktivierung führt, von anderen Zytokinen wie z.B. TNF- α mitübernommen wurde, deren Signalwege in die gleiche Endstrecke münden (Hoffmann et al., 2002).

Um die individuelle Bedeutung von IL-1 besser beurteilen zu können, wäre es zur Vermeidung einer kompletten Aktivierung aller an der Signalfortleitung beteiligten intrazellulären Prozesse sowie einer vollständigen Beladung der an der LPS-Antwort beteiligten Rezeptoren eine Idee gewesen, eine geringere LPS-Konzentration (0,01 oder 0,1 ng/ml anstatt 1 ng/ml) zu verwenden. Da eine 0,5 h-Inkubation mit LPS im Vergleich zu einer 1 h-Inkubation mit einem ca. 100-fach niedrigeren IL-8 mRNA-Expressionswert einherging, hätte andersherum auch der Einfluss von Anakinra auf 0,5 h Inkubation mit 1 ng/ml LPS überprüft werden können. Jedoch wurde gezeigt, dass während 1 h Inkubation mit 1 und 100 ng/ml LPS ähnliche mRNA-Expressionswerte für *GADD45 β* , *IRAK2* und *PELLINO1* bedingte, 3 h Inkubation mit 100 ng/ml LPS im Vergleich dazu zu einer weiteren Zunahme um jeweils den Faktor 3-9 führte. Zusammen mit der Erkenntnis, dass Anakinra keinen Effekt auf die mRNA-Expression von *GADD45 β* , *IRAK2* und *PELLINO1* nach 1 h Stimulation mit LPS hatte, wäre auch die Erklärung denkbar, dass IL-1 gar keine Rolle bei den beobachteten LPS-Effekten gespielt hat, zumal die Schrittfolge Expression, Translation, Prozessierung und schließlich Freisetzung von IL-1 erst nach einer Zeitspanne von wenigen Stunden abgeschlossen ist (Schindler et al., 1990). Es ist beschrieben worden, dass die Stimulation von humanen PBMC mit 100 ng/ml LPS erst nach 2 bzw. eher 3 h zu einem deutlichen IL-1 β mRNA-Level führt und dass nach 24 h Inkubation mit 10 ng/ml LPS die intrazelluläre Konzentration des IL-1 β -Vorläuferproteins ca. 3 ng/ml und die des freigesetzten IL-1 β etwa 1,5 ng/ml beträgt (Netea et al., 2009), wobei selbst 100 ng/ml IL-1 α bzw. IL-1 β nur zu einer Synthese von weniger als 10 ng/ml IL-1 im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus führen (Granowitz et al., 1992). Interessanterweise ist gezeigt worden, dass 10 μ g/ml Anakinra die Produktion von IL-1 α nach Stimulation mit 10 ng/ml LPS um ca. 40 % hemmt, aber die IL-6-Konzentration nicht signifikant herabsetzt (Netea et al., 2009). Dies deutet auf eine nicht IL-1-spezifische IL-6-Antwort als Reaktion auf einen

LPS-Reiz hin. Daher ist in den oben gezeigten Versuchen auch eine IL-1-unabhängige Induktion der mRNA-Expression von *IL8* und für weitere Komponenten aus dem IL-1-Signalweg durch 1h LPS-Stimulation anzunehmen. Da nur mRNA-Expressionsmuster und keine Protein-Konzentrationen gemessen worden sind, lässt sich überdies das Ausmaß der IL-1-abhängigen mRNA-Stabilisierung über p38 (Gowrishankar et al., 2006; Holtmann et al., 1999; Holtmann et al., 2001; Winzen et al., 1999; Winzen et al., 2007) nicht exakt abschätzen. Insgesamt betrachtet, ist es wichtig, sich zu vergegenwärtigen, dass es sich bei den verwendeten PBMC um humane Zellen handelt, die aus dem lebenden Organismus isoliert worden sind. Physiologische Veränderungen im menschlichen Körper können den Zustand der Zellen entscheidend beeinflussen, ggf. die Zellen „vorstimulieren“ (Brydon et al., 2005). Unterschiedlich ausgeprägte Antworten auf äußere Reize sind daher zu erwarten. Um den Einfluss von sowohl inter- als auch intraindividuellen Schwankungen weitestgehend zu minimieren, wäre ein möglichst großes Kollektiv an Donoren der PBMC ebenso sinnvoll wie die mehrmalige Wiederholung einzelner Experimente mit den PBMC des gleichen Spenders. Erst dann lassen sich genauere Angaben über eine geeignete LPS-Konzentration, Stimulationsdauer und Anakinra-Konzentration für die zu erwartende Hemmung der LPS-induzierten IL-1-Antwort durch Anakinra treffen.

4.2.2 Die Rolle von TNF- α bei der LPS-induzierten mRNA-Expression in humanen PBMC

Der monoklonale anti-TNF- α -Antikörper Adalimumab bewirkte ebenso wenig wie Anakinra eine Hemmung der LPS-vermittelten Induktion von *IL8* (vgl. 3.2.4). Auch hier stellte sich die Frage, ob 1 h Inkubation mit 1 ng/ml LPS zu einem „Zytokinsturm“ mit voller Aktivierung aller an der IL-8 mRNA-Expression beteiligten Signalwege und Sättigung der Rezeptoren führte, sodass die Hemmung von freiem TNF- α durch Adalimumab kompensiert werden konnte, oder einfach die LPS-induzierte *IL8*-Antwort innerhalb von 1 h völlig unabhängig von TNF- α war. Eine Induktion der IL-8 mRNA >2-fach wurde in diesem Zeitraum erst ab einer TNF- α -Konzentration von 1 ng/ml erzielt. Es ist in humanen PBMC gezeigt worden, dass eine LPS-Konzentration von 100 ng/ml erst nach 2 bzw. eher 3 h zu einem starken Anstieg des TNF- α mRNA-Levels führt und nach 24 h eine Synthese von <5 ng/ml TNF- α bewirkt (Netea et al., 2009). Zwar induziert IL-1 β als Bestandteil der LPS-abhängigen Immunantwort (Gaestel et al., 2009a) in PBMC neben der Produktion von Zytokinen wie IL-1 α und IL-6 auch diejenige von TNF- α , doch selbst 100 ng/ml IL-1 β reichen nicht für eine Synthese von 4 ng/ml TNF- α aus (Granowitz et al., 1992). Somit ist – entsprechend der

Schlussfolgerung bezüglich IL-1 – im beobachteten Zeitraum von einer TNF- α -unabhängigen *IL8*-Antwort durch LPS auszugehen, was auch schon in Versuchen mit humanem Vollblut beobachtet worden ist (DeForge et al., 1991).

4.3 Schlussfolgerung

Die oben gezeigten Ergebnisse zeigen die hohe Komplexizität einer Immunantwort deutlich auf. Faktoren wie Zell-/Gewebeart, Konzentration der Mediatoren und deren Verteilung, Zeit sowie individuelle Konstitution spielen hierbei eine entscheidende Rolle.

Es ist leicht vorstellbar, dass jede noch so kleine Dysfunktion innerhalb des extrem fein regulierten Immunsystems die optimale Funktionstüchtigkeit gefährdet, was schwere pathophysiologische Veränderungen nach sich ziehen kann.

4.4 Bedeutung, Anwendbarkeit und Zielsetzung der Interleukin-1-Signaltransduktionskarte

Die IL-1-Signaltransduktionskarte stellt in ihrer Gesamtheit eine kompakte Verknüpfung sämtlicher Moleküle aus dem IL-1-Signalweg dar, bei der jeder Baustein die komplette wissenschaftliche Evidenz aus seinen abgebildeten Verbindungen mitsamt nicht-abgebildeter Zusatzinformationen enthält.

Somit dient die IL-1-Signaltransduktionskarte als Wissensressource, mit deren Hilfe es über direkte Verknüpfung zu den Originalarbeiten im *PDF*-Format auf *PubMed* möglich ist, einzelne Abschnitte des IL-1-Signalwegs näher zu beleuchten und die Zusammenhänge tiefgründiger zu eruieren. Im Vergleich zu einem umfassenden *Toll-like-Rezeptor*-Signalnetzwerk aus dem Jahre 2009, welches 909 Reaktionen unter Beteiligung von 752 Komponenten zusammenfasst (Li et al., 2009), beträgt die Anzahl der verschiedenen Elemente in der IL-1-Signaltransduktionskarte 1/3 und die der aufgeführten Reaktionen 2/3, sodass die IL-1-Signaltransduktionskarte unter den größeren Signalnetzwerken anzusiedeln ist. Trotz der oben beschriebenen Einschränkungen kann die in dieser Arbeit generierte zweidimensionale *IL-1 MAP* auch für Ansätze genutzt werden, die über ihre Funktion als visualisierte Datenbank hinausgehen. Eine Anwendung besteht darin, den Komponenten der *MAP* mRNA-Expressionwerte aus transkriptomweiten mRNA-Untersuchungen zuzuordnen. Auf diese Art und Weise konnte in der Arbeit sichtbar gemacht werden, dass eine ganze Reihe an in die Signaltransduktion involvierten Proteinen bereits auf mRNA Ebene reguliert

werden. Für *GADD45β*, *IRAK2* und *PELLINO1* wurde dies auch mittels Real-Time RT-PCR validiert. Die Projektion von transkriptomweiten mRNA-Expressionsmessungen zeigte beim Vergleich zweier Spender, dass es interindividuelle Unterschiede in der Regulation von bestimmten Signalkomponenten gibt; so wurde z.B. c-Jun bei einem Spender reguliert und bei einem zweiten nicht. Würde man viele dieser Untersuchungen durchführen, wäre es denkbar, dass man Gruppen an Individuen erfasst, die jeweils spezifische Muster an auf mRNA-Ebene regulierten oder auch deregulierten Signalkomponenten zeigen. Diese Muster könnte man Krankheitszuständen zuordnen und so vielleicht zu verfeinerten Analysen gelangen.

Diese Art der Verwendung ist nicht auf mRNA-Expressionswerte beschränkt, sondern es könnten natürlich auch proteomweite Untersuchungen der Proteinexpression und posttranslationalen Modifikationen auf der IL-1-Signaltransduktionskarte abgebildet werden. Da viele der Signalprozesse durch Protein:Protein-Wechselwirkungen, die auf posttranslationalen Modifikationen basieren, reguliert werden, wären solche Ansätze womöglich noch informativer als die hier abgebildeten mRNA-Untersuchungen.

Insgesamt gesehen, kommt der IL-1-Signaltransduktionskarte somit die Funktion eines „virtuellen Chips“ zu. Zum einen ist auf ihr eine enorme Menge an wissenschaftlichen Daten gespeichert, die bei Bedarf sofort abrufbar sind; zum anderen lassen sich Genexpressionsdaten beliebiger Versuche farbcodiert abbilden. Um eine möglichst große Übereinstimmung der molekularen Prozesse in der Signaltransduktionskarte mit den tatsächlichen Verhältnissen in den Zellen des menschlichen Organismus zu erhalten, ist es notwendig, die IL-1-Signaltransduktionskarte kontinuierlich mit Wissen zu erweitern, um Lücken innerhalb des Netzwerks zu schließen und gleichzeitig einzelne Stellen zu präzisieren bzw. korrigieren. Dahingehend besteht das Ziel der IL-1-Signaltransduktionskarte in einer möglichst genauen Abbildung intrazellulärer Prozesse, um eine Übersicht über weitere potentielle Angriffspunkte für die pharmakologische Therapie entzündlicher Erkrankungen zu erhalten.

5 Zusammenfassung

Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1 (IL-1) ist ein zentraler Regulator entzündlicher Reaktionen. Seine hochpotente Wirkung entfaltet IL-1 über die rezeptorvermittelte Expression einer Vielzahl von weiteren entzündungsrelevanten Genen wie z.B. dem Chemokin IL-8. Diese Reaktion findet in fast allen menschlichen Geweben und Zelltypen statt. Intrazellulär ist jeder einzelne Reaktionsschritt innerhalb des IL-1-Signalwegs genauestens reguliert und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen involvieren eine Vielzahl von Signalmolekülen, deren Interaktionen durch reversible posttranslationale Modifikationen sehr fein koordiniert werden. Eine Störung dieser Balance kann auf jeder Ebene zur Dysregulation von zellulären Entzündungsreaktionen und zur Auslösung von entsprechenden organbezogenen oder systemischen Krankheitsbildern führen. Mittlerweile können IL-1-abhängige entzündliche Syndrome durch pharmakologische Blockade des IL-1-Rezeptors oder durch Neutralisation des Zytokins mittels Antikörpern erfolgreich behandelt werden, wodurch die zentrale pathophysiologische Rolle von IL-1 bei der Entzündung unterstrichen wird. Auf der Grundlage des seit der Entdeckung von IL-1 vor knapp 30 Jahren kumulierten molekularen Wissens wurde eine IL-1-Signaltransduktionskarte erstellt, in der Ergebnisse aus 503 Originalarbeiten abgebildet sind. Hierbei wurden 256 verschiedene Moleküle (206 Proteine, 40 Zielgene und 10 mRNAs) als Knotenpunkte und 605 molekulare Verknüpfungen (363 physikalische Interaktionen, 202 enzymatische Reaktionen und 40 Translokationen zwischen verschiedenen Zellkompartimenten) in Form von Verbindungspfeilen dargestellt. Alle Elemente sind mit den zugrunde liegenden Informationen zu den Originalarbeiten verknüpft. In dieser Arbeit wurde darüber hinaus demonstriert, dass sich auf der IL-1-Signaltransduktionskarte experimentelle Daten farbcodiert abbilden lassen. Genomweite Transkriptomdaten aus drei unterschiedlichen Zellsystemen (PBMC, HEK293IL-1R und HeLa-tTA) wurden auf die IL-1-Signaltransduktionskarte projiziert und zeigen die differentielle Expression von Komponenten aus dem IL-1-Signalnetzwerk in Abhängigkeit von Stimulus, Stimulationsdauer, der Verwendung eines Hemmstoffs und der untersuchten Zellart. Somit dient die IL-1-Signaltransduktionskarte zum einen als virtuelles „Gedächtnis“ für das sich stetig erweiternde molekulare Wissen, zum anderen bildet sie die ablaufenden Reaktionen bei Perturbationen des IL-1-Signalsystems ab und bietet so einen Überblick über mögliche pharmakologische Interventionen und ihre zellulären Konsequenzen bei der molekularen Therapie IL-1-abhängiger Entzündungsreaktionen.

Schlagwörter: proinflammatorische Zytokine, IL-1, Signaltransduktionskarte

6 Abstract

The proinflammatory cytokine Interleukin-1 (IL-1) is a central regulator of inflammatory reactions. IL-1 executes its potent effects through the receptor-mediated expression of a plethora of additional inflammatory genes such as the chemokine IL-8. This reaction occurs in almost all human tissues and cell types. At the intracellular level, every single step within the IL-1 signal transduction pathway is precisely regulated. The underlying molecular mechanisms involve multiple signaling molecules whose interactions are highly coordinated by reversible posttranslational modifications. Disruption of this intricate balance at any level can deregulate cellular inflammatory reactions and can thus result in organ-specific or systemic diseases. Today, IL-1-dependent inflammatory syndromes can be treated successfully by pharmacological blockade of the IL-1 receptor or by neutralizing antibodies underscoring the central pathophysiological role of this cytokine in inflammation. Based on the molecular knowledge that has accumulated since the discovery of IL-1 30 years ago, a signal transduction map of IL-1 was compiled which covers results from 503 original research articles. This map contains 256 different molecules (206 proteins, 40 target genes and 10 mRNAs) representing signaling nodes which together share 605 molecular connections (363 physical interactions, 202 enzymatic reactions and 40 subcellular translocations). All interactions are indicated by corresponding arrows. Every element is connected to the underlying research information by appropriate links. Additionally, in this thesis it was demonstrated that the IL-1 signaling map can be used to visualize color-coded experimental data. Genome-wide transcriptome data sets from three different cell types (PBMC, HEK293IL-1R and HeLa-tTA) were visualized on the map demonstrating the differential expression of components of the IL-1 signaling network according to stimulus, duration of stimulation, inhibitors and cell type. In conclusion, the IL-1 signal transduction map not only serves as a virtual “memory” for the existing and future molecular knowledge, but it can also be used to depict altered reactions during perturbation of the IL-1 signaling pathways, thereby generating a general view on possible pharmacological interventions and their resulting cellular consequences during molecular therapy of IL-1-dependent inflammatory reactions.

Key words: proinflammatory cytokines, IL-1, signaling map

7 Verzeichnisse

7.1 Abkürzungsverzeichnis

%	von hundert	MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
°C	Grad Celsius	MAPKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
µg	Mikrogramm	MAPKKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
µl	Mikroliter	MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i>
AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid	MEKK	<i>MAPK/ERK kinase kinase</i>
AAP	Agaroseauftragspuffer	mg	Milligramm
Abb.	Abbildung	min	Minuten
APS	Ammoniumpersulfat	min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
bzw.	beziehungsweise	MKK	<i>MAP kinase kinase</i>
ca.	circa	ml	Milliliter
cDNA	komplementäre DNA	mM	Millimolar
cm ²	Quadratzentimeter	mmol/l	Millimol pro Liter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	M-MuLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
cRNA	komplementäre RNA	mRNA	Boten-RNA
Cy	Cyanin	MW	Molekulargewicht
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>	ng	Nanogramm
D	Donor	nm	Nanometer
DEPC	Diethyldicarbonat	OD	optische Dichte (Absorption)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	PAA	Polyacrylamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
dT	Desoxythymidin	PELI	Pellino homolog
E.coli	<i>Escherichia coli</i>	PVDF	Polyvinylidenfluorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	R	rekombinant
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>	r	ribosomal
etc.	und so weiter	RNA	Ribonukleinsäure
FKS	Fetales Kälberserum	RT	Raumtemperatur/Reverse Transkription
g	Gramm/Erdbeschleunigung	s	Sekunden/ <i>soluble</i>
ggf.	gegebenenfalls	S	Svedberg
GUS	Glucuronidase	SDS	Natriumdodecylsulfat
h	Stunden	S.E.M.	Standardfehler des Mittelwerts
H ₂ O	Wasser	si	<i>small interfering</i>
ID	Identifikationsnummer	TAB	<i>Transforming growth factor-β-activated protein kinase binding protein</i>
i.d.R.	in der Regel	Tab.	Tabelle
IκB	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B</i>	TAK	<i>Transforming growth factor-β-activated protein kinase</i>
IKK	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase</i>	TEMED	Tetramethylethylendiamin
IL	Interleukin	TH	Thymus-Helferzelle
IL-1F	Interleukin-1-Familienmitglied	TIR	Toll- and IL-1R1-like
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>	U	Enzymeinheiten
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>	vs.	versus
K48	Lysin 48	vgl.	vergleiche
K63	Lysin 63	v/v	Volumen pro Volumen
kDa	Kilodalton	w/v	Gewicht pro Volumen
KO	<i>Knockout</i>	z.B.	zum Beispiel
log ₂	Logarithmus zur Basis 2		
M	Mol pro Liter		
mA	Milliampere		

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunantwort getriggert durch pleiotrope proinflammatorische Zytokine.

Abbildung 2: Strukturelle Ähnlichkeit zwischen IL-1 β , IL-1Ra und IL-36Ra.

Abbildung 3: Interleukin-1-Hemmstoffe.

Abbildung 4: Die IL-1-Signaltransduktionskarte.

Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung der Verknüpfung von Informationen an Reaktionspfeilen in *PathVisio*.

Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der Verknüpfung von Informationen an Molekülen in *PathVisio*.

Abbildung 7: Prozessierung und Freisetzung von IL-1.

Abbildung 8: Die IL-1-Rezeptoren.

Abbildung 9: Rezeptornaher Teil des IL-1-Signalwegs.

Abbildung 10: Zytosolischer Teil des IL-1-Signalwegs.

Abbildung 11: Nukleärer Teil des IL-1-Signalwegs.

Abbildung 12: Regulation IL-1-responsiver Gene auf mRNA-Ebene.

Abbildung 13: Induzierbare Expression von Komponenten negativer Rückkopplungsmechanismen.

- Abbildung 14: Zeitkinetik der LPS-induzierten mRNA-Expression in humanen PBMC.
- Abbildung 15: Dosis-Wirkungs-Beziehung von LPS zur mRNA-Expression in humanen PBMC.
- Abbildung 16: Der Einfluss von Anakinra auf die LPS-induzierte mRNA-Expression in humanen PBMC.
- Abbildung 17: Überprüfung der Reinheit von Anakinra im 8-15 %-igen SDS-Gradienten-Minigel.
- Abbildung 18: Der Einfluss von Anakinra auf die IL-1-induzierte mRNA-Expression in HEK293IL-1R-Zellen.
- Abbildung 19: Der Einfluss von Anakinra auf die IL-1-induzierte mRNA-Expression in HeLa-tTA-Zellen.
- Abbildung 20: Dosis-Wirkungs-Beziehung von TNF- α zur mRNA-Expression ausgewählter IL-1-Zielgene in humanen PBMC.
- Abbildung 21: Der Einflusses von Adalimumab auf die LPS-induzierte IL-8 mRNA-Expression in humanen PBMC.
- Abbildung 22: RNA-Qualitätskontrolle mittels *Agilent 2100 Bioanalyzer*.
- Abbildung 23: Verteilung der Messwerte aller Sonden relativ zur Kontrolle.
- Abbildung 24: Farbcodierte Darstellung der mRNA-Expressionswerte in einer „Heatmap“.
- Abbildung 25: Farbcodierte Darstellung der mRNA-Expressionswerte und Effekte von Anakinra auf den molekularen Elementen in der IL-1-Signaltransduktionskarte.

Abbildung A1: Die IL-1-Signaltransduktionskarte – Teil1.

Abbildung A2: Die IL-1-Signaltransduktionskarte – Teil2.

Abbildung A3: Farbcodierte Darstellung der mRNA-Expressionswerte in einer „Heatmap“.

Abbildung A4: Farbcodierte Darstellung der mRNA-Expressionswerte und Effekte von Anakinra auf den molekularen Elementen in der IL-1-Signaltransduktionskarte – Teil1.

Abbildung A5: Farbcodierte Darstellung der mRNA-Expressionswerte und Effekte von Anakinra auf den molekularen Elementen in der IL-1-Signaltransduktionskarte – Teil2.

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Interleukin-1-Familie.

Tabelle 2: Überblick über die verwendete Software.

Tabelle 3: Informationsgehalt der IL-1-Signaltransduktionskarte im Vergleich zu der in *NetPath* (http://www.netpath.org/reactions?path_id=NetPath_13; Stand 20.01.2010) veröffentlichten Version.

Tabelle 4: Verrechnung von mRNA-Expressionswerten aus den *Microarray*-Analysen.

Tabelle 5: mRNA-Expressionswerte der Gene aus der IL-1-Signaltransduktionskarte.

Tabelle 6: Überblick über die Regulation der in der IL-1-Signaltransduktionskarte abgebildeten Gene in humanen PBMC und kultivierten Zellen.

7.4 Literaturverzeichnis

- L. Agostini, F. Martinon, K. Burns, M. F. McDermott, P. N. Hawkins, J. Tschopp, NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*. **20**, 319 (2004).
- I. Aksentijevich, S. L. Masters, P. J. Ferguson, P. Dancy, J. Frenkel, A. Royen-Kerkhoff, R. Laxer, U. Tedgard, E. W. Cowen, T. H. Pham, M. Booty, J. D. Estes, N. G. Sandler, N. Plass, D. L. Stone, M. L. Turner, S. Hill, J. A. Butman, R. Schneider, P. Babyn, H. I. El Shanti, E. Pope, K. Barron, X. Bing, A. Laurence, C. C. Lee, D. Chappelle, G. I. Clarke, K. Ohson, M. Nicholson, M. Gadina, B. Yang, B. D. Korman, P. K. Gregersen, P. M. van Hagen, A. E. Hak, M. Huizing, P. Rahman, D. C. Douek, E. F. Remmers, D. L. Kastner, R. Goldbach-Mansky, An autoinflammatory disease with deficiency of the interleukin-1-receptor antagonist. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2426 (2009).
- K. A. Alford, S. Glennie, B. R. Turrell, L. Rawlinson, J. Saklatvala, J. L. Dean, Heat shock protein 27 functions in inflammatory gene expression and transforming growth factor-beta-activated kinase-1 (TAK1)-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* **282**, 6232 (2007).
- F. Allantaz, D. Chaussabel, D. Stichweh, L. Bennett, W. Allman, A. Mejias, M. Ardura, W. Chung, C. Wise, K. Palucka, O. Ramilo, M. Punaro, J. Banchereau, V. Pascual, Blood leukocyte microarrays to diagnose systemic onset juvenile idiopathic arthritis and follow the response to IL-1 blockade. *J. Exp. Med.* **204**, 2131 (2007).
- R. N. Apte, E. Voronov, Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? *Immunol Rev.* **222**, 222 (2008).
- W. P. Arend, M. Malyak, M. F. Smith, Jr., T. D. Whisenand, J. L. Slack, J. E. Sims, J. G. Giri, S. K. Dower, Binding of IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist by soluble IL-1 receptors and levels of soluble IL-1 receptors in synovial fluids. *J. Immunol.* **153**, 4766 (1994).
- P. E. Auron, A. C. Webb, L. J. Rosenwasser, S. F. Mucci, A. Rich, S. M. Wolff, C. A. Dinarello, Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**, 7907 (1984).
- S. H. Baik, K. A. Ohgi, D. W. Rose, E. H. Koo, C. K. Glass, M. G. Rosenfeld, Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell* **110**, 55 (2002).
- M. Baggiolini, I. Clark-Lewis, Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* **307**, 97 (1992).
- O. Bandman, R. T. Coleman, J. F. Loring, J. J. Seilhamer, B. G. Cocks, Complexity of inflammatory responses in endothelial cells and vascular smooth muscle cells determined by microarray analysis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **975**, 77 (2002).
- J. L. Barton, R. Herbst, D. Bosisio, L. Higgins, M. J. Nicklin, A tissue specific IL-1 receptor antagonist homolog from the IL-1 cluster lacks IL-1, IL-1ra, IL-18 and IL-18 antagonist activities. *Eur. J. Immunol.* **30**, 3299 (2000).
- V. Baud, Z. G. Liu, B. Bennett, N. Suzuki, Y. Xia, M. Karin, Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev.* **13**, 1297 (1999).
- B. L. Bennett, D. T. Sasaki, B. W. Murray, E. C. O'Leary, S. T. Sakata, W. Xu, J. C. Leisten, A. Motiwala, S. Pierce, Y. Satoh, S. S. Bhagwat, A. M. Manning, D. W. Anderson, SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 13681 (2001).
- J. T. Bensen, P. A. Dawson, J. C. Mychaleckyj, D. W. Bowden, Identification of a novel human cytokine gene in the interleukin gene cluster on chromosome 2q12-14. *J. Interferon Cytokine Res.* **21**, 899 (2001).

- G. Bergers, A. Reikerstorfer, S. Braselmann, P. Graninger, M. Busslinger, Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *EMBO J.* **13**, 1176 (1994).
- M. Bertelsen, A. Sanfridson, Inflammatory pathway analysis using a high content screening platform. *Assay. Drug Dev. Technol.* **3**, 261 (2005).
- A. Besse, B. Lamothe, A. D. Campos, W. K. Webster, U. Maddineni, S. C. Lin, H. Wu, B. G. Darnay, TAK1-dependent signaling requires functional interaction with TAB2/TAB3. *J. Biol. Chem.* **282**, 3918 (2007).
- D. Boraschi, D. Lucchesi, S. Hainzl, M. Leitner, E. Maier, D. Mangelberger, G. J. Oostingh, T. Pfaller, C. Pixner, G. Posselt, P. Italiani, M. F. Nold, C. A. Nold-Petry, P. Bufler, C. A. Dinarello, IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *Eur. Cytokine Netw.* **3**, 127 (2011).
- P. Briata, S. V. Forcales, M. Ponassi, G. Corte, C. Y. Chen, M. Karin, P. L. Puri, R. Gherzi, p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Mol. Cell* **20**, 891 (2005).
- C. Brikos, R. Wait, S. Begum, L. A. O'Neill, J. Saklatvala, Mass spectrometric analysis of the endogenous type I interleukin-1 (IL-1) receptor signaling complex formed after IL-1 binding identifies IL-1RAcP, MyD88, and IRAK-4 as the stable components. *Mol. Cell Proteomics.* **6**, 1551 (2007).
- B. Brissoni, L. Agostini, M. Kropf, F. Martinon, V. Swoboda, S. Lippens, H. Everett, N. Aebi, S. Janssens, E. Meylan, M. Felberbaum-Corti, H. Hirling, J. Gruenberg, J. Tschopp, K. Burns, Intracellular trafficking of interleukin-1 receptor I requires Tollip. *Curr. Biol.* **16**, 2265 (2006).
- L. Brydon, S. Edwards, H. Jia, V. Mohamed-Ali, I. Zachary, J. F. Martin, A. Steptoe, Psychological stress activates interleukin-1beta gene expression in human mononuclear cells. *Nat Immunol.* **19**, 540 (2005).
- P. Bufler, T. Azam, F. Gamboni-Robertson, L. L. Reznikov, S. Kumar, C. A. Dinarello, S. H. Kim, A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 13723 (2002).
- K. Burns, J. Clatworthy, L. Martin, F. Martinon, C. Plumpton, B. Maschera, A. Lewis, K. Ray, J. Tschopp, F. Volpe, Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat. Cell Biol.* **2**, 346 (2000).
- K. Burns, S. Janssens, B. Brissoni, N. Olivos, R. Beyaert, J. Tschopp, Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J. Exp. Med.* **197**, 263 (2003).
- S. J. Busfield, C. A. Comrack, G. Yu, T. W. Chickering, J. S. Smutko, H. Zhou, K. R. Leiby, L. M. Holmgren, D. P. Gearing, Y. Pan, Identification and gene organization of three novel members of the IL-1 family on human chromosome 2. *Genomics* **66**, 213 (2000).
- H. Buss, A. Dorrie, M. L. Schmitz, E. Hoffmann, K. Resch, M. Kracht, Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- κ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I κ B kinase (IKK)- α , IKK β , IKK ϵ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *J. Biol. Chem.* **279**, 55633 (2004).
- Z. Cao, J. Xiong, M. Takeuchi, T. Kurama, D. V. Goeddel, TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* **383**, 443 (1996).
- Y. Carmi, S. Dotan, P. Rider, I. Kaplanov, M. R. White, R. Baron, S. Abutbul, M. Huszar, C. A. Dinarello, R. N. Apte, E. Voronov, The role of IL-1 β in the early tumor cell-induced angiogenic response. *J Immunol.* **190**, 3500 (2013).
- V. Carriere, L. Roussel, N. Ortega, D. A. Lacorre, L. Americh, L. Aguilar, G. Bouche, J. P. Girard, IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 282 (2007).

- R. Casadio, E. Frigimelica, P. Bossu, D. Neumann, M. U. Martin, A. Tagliabue, D. Boraschi, Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1beta/IL-1R(I) complex. *FEBS Lett.* **499**, 65 (2001).
- S. L. Cassel, S. C. Eisenbarth, S. S. Iyer, J. J. Sadler, O. R. Colegio, L. A. Tephly, A. B. Carter, P. B. Rothman, R. A. Flavell, F. S. Sutterwala, The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 9035 (2008).
- M. Cavigelli, F. Dolfi, F. X. Claret, M. Karin, Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. *EMBO J.* **14**, 5957 (1995).
- W. Chen, M. A. White, M. H. Cobb, Stimulus-specific requirements for MAP3 kinases in activating the JNK pathway. *J Biol Chem* **277**, 49105 (2002).
- H. Cheng, T. Addona, H. Keshishian, E. Dahlstrand, C. Lu, M. Dorsch, Z. Li, A. Wang, T. D. Ocain, P. Li, T. F. Parsons, B. Jaffee, Y. Xu, Regulation of IRAK-4 kinase activity via autophosphorylation within its activation loop. *Biochem Biophys Res Commun* **352**, 609 (2007).
- P. C. Cheung, D. G. Campbell, A. R. Nebreda, P. Cohen, Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha. *EMBO J.* **22**, 5793 (2003).
- P. C. Cheung, A. R. Nebreda, P. Cohen, TAB3, a new binding partner of the protein kinase TAK1. *Biochem. J.* **378**, 27 (2004).
- C. A. Chrestensen, M. J. Schroeder, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, J. W. Pelo, M. T. Worthington, T. W. Sturgill, MAPKAP kinase 2 phosphorylates tristetraprolin on in vivo sites including Ser178, a site required for 14-3-3 binding. *J. Biol. Chem.* **279**, 10176 (2004).
- D. Chuderland, A. Konson, R. Seger, Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. *Mol. Cell* **31**, 850 (2008).
- L. D. Church, M. F. McDermott, Canakinumab, a fully-human mAb against IL-1beta for the potential treatment of inflammatory disorders. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **11**, 81 (2009).
- D. B. Conze, C. J. Wu, J. A. Thomas, A. Landstrom, J. D. Ashwell, Lys63-linked polyubiquitination of IRAK-1 is required for interleukin-1 receptor- and toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* **28**, 3538 (2008).
- M. Costa, M. Marchi, F. Cardarelli, A. Roy, F. Beltram, L. Maffei, G. M. Ratto, Dynamic regulation of ERK2 nuclear translocation and mobility in living cells. *J. Cell Sci.* **119**, 4952 (2006).
- C. Costelloe, M. Watson, A. Murphy, K. McQuillan, C. Loscher, M. E. Armstrong, C. Garlanda, A. Mantovani, L. A. O'Neill, K. H. Mills, M. A. Lynch, IL-1F5 mediates anti-inflammatory activity in the brain through induction of IL-4 following interaction with SIGIRR/TIR8. *J. Neurochem.* **105**, 1960 (2008).
- L. J. Crofford, B. Tan, C. J. McCarthy, T. Hla, Involvement of nuclear factor kappa B in the regulation of cyclooxygenase-2 expression by interleukin-1 in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum.* **40**, 226 (1997).
- A. Cuenda, G. Alonso, N. Morrice, M. Jones, R. Meier, P. Cohen, A. R. Nebreda, Purification and cDNA cloning of SAPKK3, the major activator of RK/p38 in stress- and cytokine-stimulated monocytes and epithelial cells. *EMBO J.* **15**, 4156 (1996).
- E. De Smaele, F. Zazzeroni, S. Papa, D. U. Nguyen, R. Jin, J. Jones, R. Cong, G. Franzoso, Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature* **414**, 308 (2001).
- D. F. de Souza, M. C. Leite, A. Quincozes-Santos, P. Nardin, L. S. Tortorelli, M. M. Rigo, C. Gottfried, R. B. Leal, C. A. Goncalves, S100B secretion is stimulated by IL-1beta in glial cultures and hippocampal slices of rats: Likely involvement of MAPK pathway. *J. Neuroimmunol.* **206**, 52 (2009).

- K. Deacon, J. L. Blank, Characterization of the mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4)/c-Jun NH2-terminal kinase 1 and MKK3/p38 pathways regulated by MEK kinases 2 and 3. MEK kinase 3 activates MKK3 but does not cause activation of p38 kinase in vivo. *J. Biol. Chem.* **272**, 14489 (1997).
- K. Deacon, J. L. Blank, MEK kinase 3 directly activates MKK6 and MKK7, specific activators of the p38 and c-Jun NH2-terminal kinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 16604 (1999).
- J. L. Dean, R. Wait, K. R. Mahtani, G. Sully, A. R. Clark, J. Saklatvala, The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol. Cell Biol.* **21**, 721 (2001).
- L. E. DeForge, D. G. Remick, Kinetics of TNF, IL-6, and IL-8 gene expression in LPS-stimulated human whole blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**, 18 (1991).
- B. Derijard, M. Hibi, I. H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin, R. J. Davis, JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**, 1025 (1994).
- B. Derijard, J. Raingeaud, T. Barrett, I. H. Wu, J. Han, R. J. Ulevitch, R. J. Davis, Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267**, 682 (1995).
- C. Dinarello, W. Arend, J. Sims, D. Smith, H. Blumberg, L. O'Neill, R. Goldbach-Mansky, T. Pizarro, H. Hoffman, P. Bufler, M. Nold, P. Ghezzi, A. Mantovani, C. Garlanda, D. Boraschi, A. Rubartelli, M. Netea, J. van der Meer, L. Joosten, T. Mandrup-Poulsen, M. Donath, E. Lewis, J. Pfeilschifter, M. Martin, M. Kracht, H. Muehl, D. Novick, M. Lukic, B. Conti, A. Solinger, P. Kelk, F. van de Veerdonk, C. Gabel, IL-1 family nomenclature. *Nat Immunol.* **11**, 973 (2010).
- C. A. Dinarello, Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**, 2095 (1996).
- C. A. Dinarello, Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J. Exp. Med.* **201**, 1355 (2005a).
- C. A. Dinarello, The many worlds of reducing interleukin-1. *Arthritis Rheum.* **52**, 1960 (2005b).
- C. A. Dinarello, Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 447S (2006).
- C. A. Dinarello, Historical insights into cytokines. *Eur. J. Immunol.* **37 Suppl 1**, S34 (2007).
- C. A. Dinarello, Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 519 (2009).
- C. A. Dinarello, T. Ikejima, S. J. Warner, S. F. Orencole, G. Lonnemann, J. G. Cannon, P. Libby, Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J. Immunol.* **139**, 1902 (1987).
- C. Dostert, V. Petrilli, R. Van Bruggen, C. Steele, B. T. Mossman, J. Tschopp, Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* **320**, 674 (2008).
- S. K. Dower, S. R. Kronheim, T. P. Hopp, M. Cantrell, M. Deeley, S. Gillis, C. S. Henney, D. L. Urdal, The cell surface receptors for interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta are identical. *Nature* **324**, 266 (1986).
- S. K. Dower, J. E. Sims, T. H. Stanton, J. Slack, C. J. McMahan, M. A. Valentine, K. Bomsztyk, Molecular heterogeneity of interleukin-1 receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **594**, 231 (1990).
- C. D. Dumitru, J. D. Ceci, C. Tsatsanis, D. Kontoyiannis, K. Stamatakis, J. H. Lin, C. Patriotis, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, G. Kollias, P. N. Tsichlis, TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* **103**, 1071 (2000).
- J. A. Duncan, D. T. Bergstralh, Y. Wang, S. B. Willingham, Z. Ye, A. G. Zimmermann, J. P. Ting, Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 8041 (2007).

- E. Dunn, J. E. Sims, M. J. Nicklin, L. A. O'Neill, Annotating genes with potential roles in the immune system: six new members of the IL-1 family. *Trends Immunol.* **22**, 533 (2001).
- S. P. Eisenberg, R. J. Evans, W. P. Arend, E. Verderber, M. T. Brewer, C. H. Hannum, R. C. Thompson, Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* **343**, 341 (1990).
- X. C. Fan, J. A. Steitz, Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J.* **17**, 3448 (1998).
- S. Farasat, I. Aksentjevich, J. R. Toro, Autoinflammatory diseases: clinical and genetic advances. *Arch. Dermatol.* **144**, 392 (2008).
- L. Feldmeyer, M. Keller, G. Niklaus, D. Hohl, S. Werner, H. D. Beer, The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr Biol.* **17**, 1140 (2007).
- A. Finch, P. Holland, J. Cooper, J. Saklatvala, M. Kracht, Selective activation of JNK/SAPK by interleukin-1 in rabbit liver is mediated by MKK7. *FEBS Lett.* **418**, 144 (1997).
- K. A. Fitzgerald, L. A. O'Neill, Characterization of CD44 induction by IL-1: a critical role for Egr-1. *J. Immunol.* **162**, 4920 (1999).
- M. A. Frevel, T. Bakheet, A. M. Silva, J. G. Hissong, K. S. Khabar, B. R. Williams, p38 Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent signaling of mRNA stability of AU-rich element-containing transcripts. *Mol. Cell Biol.* **23**, 425 (2003).
- S. Y. Fuchs, Z. Ronai, Ubiquitination and degradation of ATF2 are dimerization dependent. *Mol. Cell Biol.* **19**, 3289 (1999).
- S. Y. Fuchs, I. Tappin, Z. Ronai, Stability of the ATF2 transcription factor is regulated by phosphorylation and dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* **275**, 12560 (2000).
- S. Y. Fuchs, B. Xie, V. Adler, V. A. Fried, R. J. Davis, Z. Ronai, c-Jun NH2-terminal kinases target the ubiquitination of their associated transcription factors. *J. Biol. Chem.* **272**, 32163 (1997).
- D. I. Gaborovich, S. Nagaraj, Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* **9**, 162 (2009).
- M. Gadina, C. A. Jefferies, IL-33: a sheep in wolf's clothing? *Sci. STKE.* **2007**, e31 (2007).
- M. Gaestel, A. Kotlyarov, M. Kracht, Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat Rev. Drug Discov.* **8**, 480 (2009a).
- M. Gaestel, M. Kracht, Peptides as Signaling Inhibitors for Mammalian MAP Kinase Cascades. *Curr. Pharm. Des* **15**, 2471 (2009b).
- C. Georganas, H. Liu, H. Perlman, A. Hoffmann, B. Thimmapaya, R. M. Pope, Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun. *J. Immunol.* **165**, 7199 (2000).
- M. V. Gonzalez, B. Jimenez, M. T. Berciano, J. M. Gonzalez-Sancho, C. Caelles, M. Lafarga, A. Munoz, Glucocorticoids antagonize AP-1 by inhibiting the Activation/phosphorylation of JNK without affecting its subcellular distribution. *J. Cell Biol.* **150**, 1199 (2000).
- G. Gowrishankar, R. Winzen, O. Dittrich-Breiholz, N. Redich, M. Kracht, H. Holtmann, Inhibition of mRNA deadenylation and degradation by different types of cell stress. *Biol. Chem.* **387**, 323 (2006).
- E. V. Granowitz, B. D. Clark, E. Vannier, M. V. Callahan, C. A. Dinarello, Effect of interleukin-1 (IL-1) blockade on cytokine synthesis: I. IL-1 receptor antagonist inhibits IL-1-induced cytokine synthesis and blocks the binding of IL-1 to its type II receptor on human monocytes. *Blood* **79**, 2356 (1992).

- S. A. Greenfeder, P. Nunes, L. Kwee, M. Labow, R. A. Chizzonite, G. Ju, Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J. Biol. Chem.* **270**, 13757 (1995).
- B. D. Griffin, P. N. Moynagh, In vivo binding of NF-kappaB to the IkappaBbeta promoter is insufficient for transcriptional activation. *Biochem. J.* **400**, 115 (2006).
- B. Grondin, M. Lefrancois, M. Tremblay, M. Saint-Denis, A. Haman, K. Waga, A. Bedard, D. G. Tenen, T. Hoang, c-Jun homodimers can function as a context-specific coactivator. *Mol. Cell Biol.* **27**, 2919 (2007).
- Z. Guan, S. Y. Buckman, B. W. Miller, L. D. Springer, A. R. Morrison, Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 28670 (1998).
- S. Gupta, T. Barrett, A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, H. K. Sluss, B. Derijard, R. J. Davis, Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* **15**, 2760 (1996).
- A. Halle, V. Hornung, G. C. Petzold, C. R. Stewart, B. G. Monks, T. Reinheckel, K. A. Fitzgerald, E. Latz, K. J. Moore, D. T. Golenbock, The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol.* **9**, 857 (2008).
- D. R. Hammaker, D. L. Boyle, T. Inoue, G. S. Firestein, Regulation of the JNK pathway by TGF-beta activated kinase 1 in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Res. Ther.* **9**, R57 (2007).
- J. Han, J. D. Lee, Y. Jiang, Z. Li, L. Feng, R. J. Ulevitch, Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J. Biol. Chem.* **271**, 2886 (1996).
- Z. Han, D. L. Boyle, L. Chang, B. Bennett, M. Karin, L. Yang, A. M. Manning, G. S. Firestein, c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest* **108**, 73 (2001).
- S. Hatakeyama, M. Kitagawa, K. Nakayama, M. Shirane, M. Matsumoto, K. Hattori, H. Higashi, H. Nakano, K. Okumura, K. Onoe, R. A. Good, K. Nakayama, Ubiquitin-dependent degradation of IkappaBalpha is mediated by a ubiquitin ligase Skp1/Cul 1/F-box protein FWD1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 3859 (1999).
- M. Hiroi, Y. Ohmori, The transcriptional coactivator CREB-binding protein cooperates with STAT1 and NF-kappa B for synergistic transcriptional activation of the CXC ligand 9/monokine induced by interferon-gamma gene. *J. Biol. Chem.* **278**, 651 (2003).
- J. E. Hoberg, A. E. Popko, C. S. Ramsey, M. W. Mayo, IkappaB kinase alpha-mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300. *Mol. Cell Biol.* **26**, 457 (2006).
- H. M. Hoffman, Rilonacept for the treatment of cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS). *Expert. Opin. Biol. Ther.* **9**, 519 (2009).
- E. Hoffmann, J. Ashouri, S. Wolter, A. Doerrie, O. Dittrich-Breiholz, H. Schneider, E. F. Wagner, J. Troppmair, N. Mackman, M. Kracht, Transcriptional regulation of EGR-1 by the IL-1-JNK-MKK7-c-JUN pathway. *J. Biol. Chem.* (2008).
- E. Hoffmann, O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann, M. Kracht, Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 847 (2002).
- E. Hoffmann, A. Thiefes, D. Buhrow, O. Dittrich-Breiholz, H. Schneider, K. Resch, M. Kracht, MEK1-dependent delayed expression of Fos-related antigen-1 counteracts c-Fos and p65 NF-kappaB-mediated interleukin-8 transcription in response to cytokines or growth factors. *J. Biol. Chem.* **280**, 9706 (2005).
- H. Holtmann, J. Enninga, S. Kalble, A. Thiefes, A. Dorrie, M. Broemer, R. Winzen, A. Wilhelm, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto, K. Resch, M. Kracht, The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation. *J. Biol. Chem.* **276**, 3508 (2001).

- H. Holtmann, R. Winzen, P. Holland, S. Eickemeier, E. Hoffmann, D. Wallach, N. L. Malinin, J. A. Cooper, K. Resch, M. Kracht, Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol. Cell Biol.* **19**, 6742 (1999).
- D. Holzberg, C. G. Knight, O. Dittrich-Breiholz, H. Schneider, A. Dorrie, E. Hoffmann, K. Resch, M. Kracht, Disruption of the c-JUN-JNK complex by a cell-permeable peptide containing the c-JUN delta domain induces apoptosis and affects a distinct set of interleukin-1-induced inflammatory genes. *J. Biol. Chem.* **278**, 40213 (2003).
- V. Hornung, F. Bauernfeind, A. Halle, E. O. Samstad, H. Kono, K. L. Rock, K. A. Fitzgerald, E. Latz, Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* **9**, 847 (2008).
- A. D. Howard, M. J. Kostura, N. Thornberry, G. J. Ding, G. Limjuco, J. Weidner, J. P. Salley, K. A. Hogquist, D. D. Chaplin, R. A. Mumford, IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31- kDa IL-1 alpha. *J. Immunol.* **147**, 2964 (1991).
- Y. Hu, V. Baud, M. Delhase, P. Zhang, T. Deerinck, M. Ellisman, R. Johnson, M. Karin, Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkkappaB kinase. *Science* **284**, 316 (1999).
- Q. Huang, J. Yang, Y. Lin, C. Walker, J. Cheng, Z. G. Liu, B. Su, Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3. *Nat. Immunol.* **5**, 98 (2004).
- D. Hutter, P. Chen, J. Barnes, Y. Liu, Catalytic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 by binding to p38 MAP kinase: critical role of the p38 C-terminal domain in its negative regulation. *Biochem. J.* **352 Pt 1**, 155 (2000).
- T. Inoue, D. Hammaker, D. L. Boyle, G. S. Firestein, Regulation of p38 MAPK by MAPK kinases 3 and 6 in fibroblast-like synoviocytes. *J. Immunol.* **174**, 4301 (2005).
- T. Ishitani, G. Takaesu, J. Ninomiya-Tsuji, H. Shibuya, R. B. Gaynor, K. Matsumoto, Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *EMBO J.* **22**, 6277 (2003).
- R. Issa, S. Xie, N. Khorasani, M. Sukkar, I. M. Adcock, K. Y. Lee, K. F. Chung, Corticosteroid inhibition of growth-related oncogene protein-alpha via mitogen-activated kinase phosphatase-1 in airway smooth muscle cells. *J. Immunol.* **178**, 7366 (2007).
- R. Janknecht, T. Hunter, Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *EMBO J.* **16**, 1620 (1997).
- S. Janssens, K. Burns, J. Tschopp, R. Beyaert, Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr. Biol.* **12**, 467 (2002).
- L. E. Jensen, M. Muzio, A. Mantovani, A. S. Whitehead, IL-1 signaling cascade in liver cells and the involvement of a soluble form of the IL-1 receptor accessory protein. *J. Immunol.* **164**, 5277 (2000).
- J. G. Jeong, J. M. Kim, H. Cho, W. Hahn, S. S. Yu, S. Kim, Effects of IL-1beta on gene expression in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 3 (2004).
- B. Jiang, P. Brecher, R. A. Cohen, Persistent activation of nuclear factor-kappaB by interleukin-1beta and subsequent inducible NO synthase expression requires extracellular signal-regulated kinase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1915 (2001).
- Y. Jiang, C. Chen, Z. Li, W. Guo, J. A. Gegner, S. Lin, J. Han, Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J. Biol. Chem.* **271**, 17920 (1996).
- Z. Jiang, H. J. Johnson, H. Nie, J. Qin, T. A. Bird, X. Li, Pellino 1 is required for interleukin-1 (IL-1)-mediated signaling through its interaction with the IL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4)-IRAK-tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) complex. *J. Biol. Chem.* **278**, 10952 (2003).

- Z. Jiang, J. Ninomiya-Tsuji, Y. Qian, K. Matsumoto, X. Li, Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol. Cell Biol.* **22**, 7158 (2002).
- H. Jono, J. H. Lim, L. F. Chen, H. Xu, E. Trompouki, Z. K. Pan, G. Mosialos, J. D. Li, NF-kappaB is essential for induction of CYLD, the negative regulator of NF-kappaB: evidence for a novel inducible autoregulatory feedback pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 36171 (2004).
- H. Joos, W. Albrecht, S. Laufer, R. E. Brenner, Influence of p38MAPK inhibition on IL-1beta-stimulated human chondrocytes: a microarray approach. *Int. J. Mol. Med.* **23**, 685 (2009).
- J. Jura, P. Wegrzyn, M. Korostynski, K. Guzik, M. Oczko-Wojciechowska, M. Jarzab, M. Kowalska, M. Piechota, R. Przewlocki, A. Koj, Identification of interleukin-1 and interleukin-6-responsive genes in human monocyte-derived macrophages using microarrays. *Biochim. Biophys. Acta* **1779**, 383 (2008).
- T. Kamogashira, Y. Masui, Y. Ohmoto, T. Hirato, K. Nagamura, K. Mizuno, Y. M. Hong, Y. Kikumoto, S. Nakai, Y. Hirai, Site-specific mutagenesis of the human interleukin-1 beta gene: structure-function analysis of the cysteine residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**, 1106 (1988a).
- T. Kamogashira, M. Sakaguchi, Y. Ohmoto, K. Mizuno, R. Shimizu, K. Nagamura, S. Nakai, Y. Masui, Y. Hirai, Site-specific mutagenesis of the human interleukin-1 beta gene: the role of arginine residue at the N-terminal region. *J. Biochem.* **104**, 837 (1988b).
- A. Kanayama, R. B. Seth, L. Sun, C. K. Ea, M. Hong, A. Shaito, Y. H. Chiu, L. Deng, Z. J. Chen, TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol. Cell* **15**, 535 (2004).
- K. Kandasamy, S. S. Mohan, R. Raju, S. Keerthikumar, G. S. Kumar, A. K. Venugopal, D. Telikicherla, J. D. Navarro, S. Mathivanan, C. Pecquet, S. K. Gollapudi, S. G. Tattikota, S. Mohan, H. Padhukasahasram, Y. Subbannayya, R. Goel, H. K. Jacob, J. Zhong, R. Sekhar, V. Nanjappa, L. Balakrishnan, R. Subbaiah, Y. L. Ramachandra, B. A. Rahiman, T. S. Prasad, J. X. Lin, J. C. Houtman, S. Desiderio, J. C. Renauld, S. N. Constantinescu, O. Ohara, T. Hirano, M. Kubo, S. Singh, P. Khatri, S. Draghici, G. D. Bader, C. Sander, W. J. Leonard, A. Pandey, NetPath: a public resource of curated signal transduction pathways. *Genome Biol.* **11**, R3 (2010).
- G. Kaplanski, C. Farnarier, S. Kaplanski, R. Porat, L. Shapiro, P. Bongrand, C. A. Dinarello, Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood* **84**, 4242 (1994).
- S. Kapur, M. E. Bonk, Riloncept (Arcalyst), an Interleukin-1 Trap for the Treatment of Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes. *P. T.* **34**, 138 (2009).
- T. Kawagoe, S. Sato, A. Jung, M. Yamamoto, K. Matsui, H. Kato, S. Uematsu, O. Takeuchi, S. Akira, Essential role of IRAK-4 protein and its kinase activity in Toll-like receptor-mediated immune responses but not in TCR signaling. *J. Exp. Med.* **204**, 1013 (2007).
- Y. Kawaguchi, A. Tochimoto, M. Hara, M. Kawamoto, T. Sugiura, S. Saito, N. Kamatani, Contribution of single nucleotide polymorphisms of the IL1A gene to the cleavage of precursor IL-1alpha and its transcription activity. *Immunogenetics* **59**, 441 (2007).
- M. Keller, A. Ruegg, S. Werner, H. D. Beer, Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* **132**, 818 (2008).
- K. Kobayashi, L. D. Hernandez, J. E. Galan, C. A. Janeway, Jr., R. Medzhitov, R. A. Flavell, IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* **110**, 191 (2002).
- M. Kohl, S. Wiese, B. Warscheid, Cytoscape: software for visualization and analysis of biological networks. *Methods Mol. Biol.* **696**, 291 (2011).
- C. Kollwe, A. C. Mackensen, D. Neumann, J. Knop, P. Cao, S. Li, H. Wesche, M. U. Martin, Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.* **279**, 5227 (2004).

- Y. Kondo, K. Fukuda, T. Adachi, T. Nishida, Inhibition by a selective IkappaB kinase-2 inhibitor of interleukin-1-induced collagen degradation by corneal fibroblasts in three-dimensional culture. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 4850 (2008).
- A. Kovalenko, C. Chable-Bessia, G. Cantarella, A. Israel, D. Wallach, G. Courtis, The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* **424**, 801 (2003).
- M. Koziczak-Holbro, C. Joyce, A. Gluck, B. Kinzel, M. Muller, C. Tschopp, J. C. Mathison, C. N. Davis, H. Gram, IRAK-4 kinase activity is required for interleukin-1 (IL-1) receptor- and toll-like receptor 7-mediated signaling and gene expression. *J. Biol. Chem.* **282**, 13552 (2007).
- A. Krause, H. Holtmann, S. Eickemeier, R. Winzen, M. Szamel, K. Resch, J. Saklatvala, M. Kracht, Stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase is required for interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB. *J. Biol. Chem.* **273**, 23681 (1998).
- K. Kuida, J. A. Lippke, G. Ku, M. W. Harding, D. J. Livingston, M. S. Su, R. A. Flavell, Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* **267**, 2000 (1995).
- S. Kumar, C. R. Hanning, M. R. Brigham-Burke, D. J. Rieman, R. Lehr, S. Khandekar, R. B. Kirkpatrick, G. F. Scott, J. C. Lee, F. J. Lynch, W. Gao, A. Gambotto, M. T. Lotze, Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN-gamma production. *Cytokine* **18**, 61 (2002).
- C. Kunsch, R. K. Lang, C. A. Rosen, M. F. Shannon, Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J. Immunol.* **153**, 153 (1994).
- E. A. Kurt-Jones, D. I. Beller, S. B. Mizel, E. R. Unanue, Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**, 1204 (1985).
- J. M. Labasi, N. Petrushova, C. Donovan, S. McCurdy, P. Lira, M. M. Payette, W. Brissette, J. R. Wicks, L. Audoly, C. A. Gabel, Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J. Immunol.* **168**, 6436 (2002).
- E. Labriola-Tompkins, C. Chandran, T. A. Varnell, V. S. Madison, G. Ju, Structure-function analysis of human IL-1 alpha: identification of residues required for binding to the human type I IL-1 receptor. *Protein Eng* **6**, 535 (1993).
- H. J. Lachmann, I. Kone-Paut, J. B. Kuemmerle-Deschner, K. S. Leslie, E. Hachulla, P. Quartier, X. Gitton, A. Widmer, N. Patel, P. N. Hawkins, Use of canakinumab in the cryopyrin-associated periodic syndrome. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2416 (2009a).
- H. J. Lachmann, P. Lowe, S. D. Felix, C. Rordorf, K. Leslie, S. Madhoo, H. Wittkowski, S. Bek, N. Hartmann, S. Bosset, P. N. Hawkins, T. Jung, In vivo regulation of interleukin 1beta in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. *J. Exp. Med.* **206**, 1029 (2009b).
- B. Lamothe, A. Besse, A. D. Campos, W. K. Webster, H. Wu, B. G. Darnay, Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation. *J. Biol. Chem.* **282**, 4102 (2007).
- V. Lang, A. Symons, S. J. Watton, J. Janzen, Y. Soneji, S. Beinke, S. Howell, S. C. Ley, ABIN-2 forms a ternary complex with TPL-2 and NF-kappa B1 p105 and is essential for TPL-2 protein stability. *Mol Cell Biol* **24**, 5235 (2004).
- M. Lasa, S. M. Abraham, C. Boucheron, J. Saklatvala, A. R. Clark, Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38. *Mol. Cell Biol.* **22**, 7802 (2002).
- J. Y. Lee, H. J. Lee, E. J. Lee, S. H. Jang, H. Kim, J. H. Yoon, K. C. Chung, Down syndrome candidate region-1 protein interacts with Tollip and positively modulates interleukin-1 receptor-mediated signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1790**, 1673 (2009).

- K. Y. Lee, K. Ito, R. Hayashi, E. P. Jazrawi, P. J. Barnes, I. M. Adcock, NF-kappaB and activator protein 1 response elements and the role of histone modifications in IL-1beta-induced TGF-beta1 gene transcription. *J. Immunol.* **176**, 603 (2006).
- E. C. Lewis, C. A. Dinarello, Responses of IL-18- and IL-18 receptor-deficient pancreatic islets with convergence of positive and negative signals for the IL-18 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 16852 (2006).
- F. Li, I. Thiele, N. Jamshidi, B. O. Palsson, Identification of potential pathway mediation targets in Toll-like receptor signaling. *PLoS. Comput. Biol.* **5**, e1000292 (2009).
- P. Li, H. Allen, S. Banerjee, S. Franklin, L. Herzog, C. Johnston, J. McDowell, M. Paskind, L. Rodman, J. Salfeld, ., Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* **80**, 401 (1995).
- Q. Li, D. Van Antwerp, F. Mercurio, K. F. Lee, I. M. Verma, Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science* **284**, 321 (1999a).
- S. Li, A. Strelow, E. J. Fontana, H. Wesche, IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 5567 (2002).
- Z. W. Li, W. Chu, Y. Hu, M. Delhase, T. Deerinck, M. Ellisman, R. Johnson, M. Karin, The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J. Exp. Med.* **189**, 1839 (1999b).
- C. C. Lin, Y. S. Huoh, K. R. Schmitz, L. E. Jensen, K. M. Ferguson, Pellino proteins contain a cryptic FHA domain that mediates interaction with phosphorylated IRAK1. *Structure.* **16**, 1806 (2008).
- H. Lin, A. S. Ho, D. Haley-Vicente, J. Zhang, J. Bernal-Fussell, A. M. Pace, D. Hansen, K. Schweighofer, N. K. Mize, J. E. Ford, Cloning and characterization of IL-1HY2, a novel interleukin-1 family member. *J. Biol. Chem.* **276**, 20597 (2001).
- G. Liu, Y. J. Park, E. Abraham, Interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) -1-mediated NF-kappaB activation requires cytosolic and nuclear activity. *FASEB J.* **22**, 2285 (2008).
- W. Liu, N. Reinmuth, O. Stoeltzing, A. A. Parikh, C. Tellez, S. Williams, Y. D. Jung, F. Fan, A. Takeda, M. Akagi, M. Bar-Eli, G. E. Gallick, L. M. Ellis, Cyclooxygenase-2 is up-regulated by interleukin-1 beta in human colorectal cancer cells via multiple signaling pathways. *Cancer Res.* **63**, 3632 (2003).
- C. Livingstone, G. Patel, N. Jones, ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J.* **14**, 1785 (1995).
- P. T. Lomedico, U. Gubler, C. P. Hellmann, M. Dukovich, J. G. Giri, Y. C. Pan, K. Collier, R. Semionow, A. O. Chua, S. B. Mizel, Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in Escherichia coli. *Nature* **312**, 458 (1984).
- S. Lomvardas, D. Thanos, Modifying gene expression programs by altering core promoter chromatin architecture. *Cell* **110**, 261 (2002).
- D. Magne, G. Palmer, J. L. Barton, F. Mezin, D. Talbot-Ayer, S. Bas, T. Duffy, M. Noger, P. A. Guerne, M. J. Nicklin, C. Gabay, The new IL-1 family member IL-1F8 stimulates production of inflammatory mediators by synovial fibroblasts and articular chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* **8**, R80 (2006).
- K. R. Mahtani, M. Brook, J. L. Dean, G. Sully, J. Saklatvala, A. R. Clark, Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. *Mol. Cell Biol.* **21**, 6461 (2001).
- C. J. March, B. Mosley, A. Larsen, D. P. Cerretti, G. Braedt, V. Price, S. Gillis, C. S. Henney, S. R. Kronheim, K. Grabstein, ., Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* **315**, 641 (1985).

- M. Marchi, A. D'Antoni, I. Formentini, R. Parra, R. Brambilla, G. M. Ratto, M. Costa, The N-terminal domain of ERK1 accounts for the functional differences with ERK2. *PLoS. ONE.* **3**, e3873 (2008).
- S. Mariathasan, D. S. Weiss, K. Newton, J. McBride, K. O'Rourke, M. Roose-Girma, W. P. Lee, Y. Weinrauch, D. M. Monack, V. M. Dixit, Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**, 228 (2006).
- F. Martinon, K. Burns, J. Tschopp, The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* **10**, 417 (2002).
- F. Martinon, A. Mayor, J. Tschopp, The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol* **27**, 229 (2009).
- F. Martinon, V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel, J. Tschopp, Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**, 237 (2006).
- S. Mathias, A. Younes, C. C. Kan, I. Orlow, C. Joseph, R. N. Kolesnick, Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a call-free system by IL-1 beta. *Science* **259**, 519 (1993).
- T. Matsusaka, K. Fujikawa, Y. Nishio, N. Mukaida, K. Matsushima, T. Kishimoto, S. Akira, Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 10193 (1993).
- F. Mercurio, H. Zhu, B. W. Murray, A. Shevchenko, B. L. Bennett, J. Li, D. B. Young, M. Barbosa, M. Mann, A. Manning, A. Rao, IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* **278**, 860 (1997).
- E. Meylan, J. Tschopp, M. Karin, Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* **442**, 39 (2006).
- Y. Minoda, H. Sakurai, T. Kobayashi, A. Yoshimura, G. Takaesu, An F-box protein, FBXW5, negatively regulates TAK1 MAP3K in the IL-1beta signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **381**, 412 (2009).
- T. Moriguchi, N. Kuroyanagi, K. Yamaguchi, Y. Gotoh, K. Irie, T. Kano, K. Shirakabe, Y. Muro, H. Shibuya, K. Matsumoto, E. Nishida, M. Hagiwara, A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J. Biol. Chem.* **271**, 13675 (1996).
- S. Morton, R. J. Davis, P. Cohen, Signalling pathways involved in multisite phosphorylation of the transcription factor ATF-2. *FEBS Lett.* **572**, 177 (2004).
- K. Muegge, M. Vila, G. L. Gusella, T. Musso, P. Herrlich, B. Stein, S. K. Durum, Interleukin 1 induction of the c-jun promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 7054 (1993).
- N. Mukaida, Y. Mahe, K. Matsushima, Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* **265**, 21128 (1990).
- M. R. Muller, S. D. Pfannes, M. Ayoub, P. Hoffmann, W. G. Bessler, K. Mittenbuhler, Immunostimulation by the synthetic lipopeptide P3CSK4: TLR4-independent activation of the ERK1/2 signal transduction pathway in macrophages. *Immunology* **103**, 49 (2001).
- L. O. Murphy, S. Smith, R. H. Chen, D. C. Fingar, J. Blenis, Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat. Cell Biol.* **4**, 556 (2002).
- D. A. Muruve, V. Petrilli, A. K. Zaiss, L. R. White, S. A. Clark, P. J. Ross, R. J. Parks, J. Tschopp, The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* **452**, 103 (2008).
- M. Muzio, J. Ni, P. Feng, V. M. Dixit, IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* **278**, 1612 (1997).

- S. Nakao, Y. Ogata, E. Shimizu-Sasaki, M. Yamazaki, S. Furuyama, H. Sugiya, Activation of NF-kappaB is necessary for IL-1beta-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in human gingival fibroblasts. *Mol. Cell Biochem.* **209**, 113 (2000).
- J. Nam, B. D. Aguda, B. Rath, S. Agarwal, Biomechanical thresholds regulate inflammation through the NF-kappaB pathway: experiments and modeling. *PLoS. ONE.* **4**, e5262 (2009).
- M. G. Netea, C. A. Nold-Petry, M. F. Nold, L. A. Joosten, B. Opitz, J. H. van der Meer, F. L. van de Veerdonk, G. Ferwerda, B. Heinhuis, I. Devesa, C. J. Funk, R. J. Mason, B. J. Kullberg, A. Rubartelli, J. W. van der Meer, C. A. Dinarello, Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* **113**, 2324 (2009).
- K. Newton, M. L. Matsumoto, I. E. Wertz, D. S. Kirkpatrick, J. R. Lill, J. Tan, D. Dugger, N. Gordon, S. S. Sidhu, F. A. Fellouse, L. Komuves, D. M. French, R. E. Ferrando, C. Lam, D. Compaan, C. Yu, I. Bosanac, S. G. Hymowitz, R. F. Kelley, V. M. Dixit, Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell* **134**, 668 (2008).
- R. Newton, L. M. Kuitert, M. Bergmann, I. M. Adcock, P. J. Barnes, Evidence for involvement of NF-kappaB in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 28 (1997a).
- R. Newton, D. A. Stevens, L. A. Hart, M. Lindsay, I. M. Adcock, P. J. Barnes, Superinduction of COX-2 mRNA by cycloheximide and interleukin-1beta involves increased transcription and correlates with increased NF-kappaB and JNK activation. *FEBS Lett.* **418**, 135 (1997b).
- C. Nicholas, S. Batra, M. A. Vargo, O. H. Voss, M. A. Gavrilin, M. D. Wewers, D. C. Guttridge, E. Grotewold, A. I. Doseff, Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation. *J. Immunol.* **179**, 7121 (2007).
- M. Nie, L. Pang, H. Inoue, A. J. Knox, Transcriptional regulation of cyclooxygenase 2 by bradykinin and interleukin-1beta in human airway smooth muscle cells: involvement of different promoter elements, transcription factors, and histone h4 acetylation. *Mol. Cell Biol.* **23**, 9233 (2003).
- J. Ninomiya-Tsuji, T. Kajino, K. Ono, T. Ohtomo, M. Matsumoto, M. Shiina, M. Mihara, M. Tsuchiya, K. Matsumoto, A resorcylic acid lactone, 5Z-7-oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase kinase. *J. Biol. Chem.* **278**, 18485 (2003).
- J. Ninomiya-Tsuji, K. Kishimoto, A. Hiyama, J. Inoue, Z. Cao, K. Matsumoto, The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* **398**, 252 (1999).
- K. F. Nolan, D. R. Greaves, H. Waldmann, The human interleukin 18 gene IL18 maps to 11q22.2-q22.3, closely linked to the DRD2 gene locus and distinct from mapped IDDM loci. *Genomics* **51**, 161 (1998).
- D. Novick, S. H. Kim, G. Fantuzzi, L. L. Reznikov, C. A. Dinarello, M. Rubinstein, Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity.* **10**, 127 (1999).
- K. Oda, H. Kitano, A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network. *Mol Syst Biol.* **2**, 2006.0015 (2006).
- H. Okamura, K. Nagata, T. Komatsu, T. Tanimoto, Y. Nukata, F. Tanabe, K. Akita, K. Torigoe, T. Okura, S. Fukuda, ., A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infect. Immun.* **63**, 3966 (1995).
- T. Okazaki, S. Sakon, T. Sasazuki, H. Sakurai, T. Doi, H. Yagita, K. Okumura, H. Nakano, Phosphorylation of serine 276 is essential for p65 NF-kappaB subunit-dependent cellular responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 807 (2003).
- K. Ono, T. Ohtomo, S. Sato, Y. Sugamata, M. Suzuki, N. Hisamoto, J. Ninomiya-Tsuji, M. Tsuchiya, K. Matsumoto, An evolutionarily conserved motif in the TAB1 C-terminal region is necessary for interaction with and activation of TAK1 MAPKKK. *J. Biol. Chem.* **276**, 24396 (2001).

- A. Ordureau, H. Smith, M. Windheim, M. Peggie, E. Carrick, N. Morrice, P. Cohen, The IRAK-catalysed activation of the E3 ligase function of Pellino isoforms induces the Lys63-linked polyubiquitination of IRAK1. *Biochem. J.* **409**, 43 (2008).
- S. Papa, F. Zazzeroni, C. Bubici, S. Jayawardena, K. Alvarez, S. Matsuda, D. U. Nguyen, C. G. Pham, A. H. Nelsbach, T. Melis, E. De Smaele, W. J. Tang, L. D'Adamio, G. Franzoso, Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat. Cell Biol.* **6**, 146 (2004).
- S. Papoutsopoulou, A. Symons, T. Tharmalingham, M. P. Belich, F. Kaiser, D. Kioussis, A. O'Garra, V. Tybulewicz, S. C. Ley, ABIN-2 is required for optimal activation of Erk MAP kinase in innate immune responses. *Nat Immunol* **7**, 606 (2006).
- K. J. Park, R. B. Gaynor, Y. T. Kwak, Heat shock protein 27 association with the I kappa B kinase complex regulates tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappa B activation. *J Biol Chem* **278**, 35272 (2003).
- S. Paschoud, A. M. Dogar, C. Kuntz, B. Grisoni-Neupert, L. Richman, L. C. Kuhn, Destabilization of interleukin-6 mRNA requires a putative RNA stem-loop structure, an AU-rich element, and the RNA-binding protein AUF1. *Mol. Cell Biol.* **26**, 8228 (2006).
- S. S. Peng, C. Y. Chen, N. Xu, A. B. Shyu, RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J.* **17**, 3461 (1998).
- D. G. Perregaux, P. McNiff, R. Laliberte, M. Conklyn, C. A. Gabel, ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood. *J. Immunol.* **165**, 4615 (2000).
- V. Petrilli, S. Papin, C. Dostert, A. Mayor, F. Martinon, J. Tschopp, Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death. Differ.* **14**, 1583 (2007).
- C. Picard, A. Puel, M. Bonnet, C. L. Ku, J. Bustamante, K. Yang, C. Soudais, S. Dupuis, J. Feinberg, C. Fieschi, C. Elbim, R. Hitchcock, D. Lammas, G. Davies, A. Al Ghonaïum, H. Al Rayes, S. Al Jumaah, S. Al Hajjar, I. Z. Al Mohsen, H. H. Frayha, R. Rucker, T. R. Hawn, A. Aderem, H. Tufenkeji, S. Haraguchi, N. K. Day, R. A. Good, M. A. Gougerot-Pocidalo, A. Ozinsky, J. L. Casanova, Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* **299**, 2076 (2003).
- A. R. Pico, T. Kelder, M. P. van Iersel, K. Hanspers, B. R. Conklin, C. Evelo, WikiPathways: pathway editing for the people. *PLoS. Biol.* **6**, e184 (2008).
- M. Piecyk, S. Wax, A. R. Beck, N. Kedersha, M. Gupta, B. Maritim, S. Chen, C. Gueydan, V. Kruys, M. Streuli, P. Anderson, TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *EMBO J.* **19**, 4154 (2000).
- T. T. Pizarro, F. Cominelli, Cloning IL-1 and the birth of a new era in cytokine biology. *J. Immunol.* **178**, 5411 (2007).
- A. Puls, A. G. Eliopoulos, C. D. Nobes, T. Bridges, L. S. Young, A. Hall, Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF(alpha) and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1. *J. Cell Sci.* **112** (Pt 17), 2983 (1999).
- A. J. Puren, G. Fantuzzi, C. A. Dinarello, Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 2256 (1999).
- J. Raingeaud, A. J. Whitmarsh, T. Barrett, B. Derijard, R. J. Davis, MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell Biol.* **16**, 1247 (1996).
- N. Rao, S. Nguyen, K. Ngo, W. P. Fung-Leung, A novel splice variant of interleukin-1 receptor (IL-1R)-associated kinase 1 plays a negative regulatory role in Toll/IL-1R-induced inflammatory signaling. *Mol. Cell Biol.* **25**, 6521 (2005).

- M. Razmara, S. M. Srinivasula, L. Wang, J. L. Poyet, B. J. Geddes, P. S. DiStefano, J. Bertin, E. S. Alnemri, CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 13952 (2002).
- M. A. Read, M. Z. Whitley, S. Gupta, J. W. Pierce, J. Best, R. J. Davis, T. Collins, Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* **272**, 2753 (1997).
- S. Reddy, S. Jia, R. Geoffrey, R. Lorier, M. Suchi, U. Broeckel, M. J. Hessner, J. Verbsky, An autoinflammatory disease due to homozygous deletion of the IL1RN locus. *N. Engl. J Med* **360**, 2438 (2009).
- N. Reunanen, S. P. Li, M. Ahonen, M. Foschi, J. Han, V. M. Kahari, Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. *J. Biol. Chem.* **277**, 32360 (2002).
- S. H. Ridley, S. J. Sarsfield, J. C. Lee, H. F. Bigg, T. E. Cawston, D. J. Taylor, D. L. DeWitt, J. Saklatvala, Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels. *J. Immunol.* **158**, 3165 (1997).
- N. Ronkina, A. Kotlyarov, O. Dittrich-Breiholz, M. Kracht, E. Hitti, K. Milarski, R. Askew, S. Marusic, L. L. Lin, M. Gaestel, J. B. Telliez, The mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinases MK2 and MK3 cooperate in stimulation of tumor necrosis factor biosynthesis and stabilization of p38 MAPK. *Mol. Cell Biol.* **27**, 170 (2007).
- P. M. Rosoff, N. Savage, C. A. Dinarello, Interleukin-1 stimulates diacylglycerol production in T lymphocytes by a novel mechanism. *Cell* **54**, 73 (1988).
- D. M. Rothwarf, E. Zandi, G. Natoli, M. Karin, IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I kappa B kinase complex. *Nature* **395**, 297 (1998).
- J. Saklatvala, L. M. Rawlinson, C. J. Marshall, M. Kracht, Interleukin 1 and tumour necrosis factor activate the mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase in cultured cells. *FEBS Lett.* **334**, 189 (1993).
- H. Sakurai, H. Chiba, H. Miyoshi, T. Sugita, W. Toriumi, I kappa B kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J. Biol. Chem.* **274**, 30353 (1999).
- H. Sakurai, H. Miyoshi, J. Mizukami, T. Sugita, Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1. *FEBS Lett.* **474**, 141 (2000).
- H. Sakurai, A. Nishi, N. Sato, J. Mizukami, H. Miyoshi, T. Sugita, TAK1-TAB1 fusion protein: a novel constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase kinase that stimulates AP-1 and NF-kappaB signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 1277 (2002).
- A. Salmeron, J. Janzen, Y. Soneji, N. Bump, J. Kamens, H. Allen, S. C. Ley, Direct phosphorylation of NF-kappaB1 p105 by the I kappa B kinase complex on serine 927 is essential for signal-induced p105 proteolysis. *J. Biol. Chem.* **276**, 22215 (2001).
- S. Sanada, D. Hakuno, L. J. Higgins, E. R. Schreiter, A. N. McKenzie, R. T. Lee, IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J. Clin. Invest* **117**, 1538 (2007).
- R. Schaubvliege, S. Janssens, R. Beyaert, Pellino proteins are more than scaffold proteins in TLR/IL-1R signalling: a role as novel RING E3-ubiquitin-ligases. *FEBS Lett.* **580**, 4697 (2006).
- R. Schindler, J. Mancilla, S. Endres, R. Ghorbani, S. C. Clark, C. A. Dinarello, Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* **75**, 40 (1990).
- C. Schmidt, B. Peng, Z. Li, G. M. Sclabas, S. Fujioka, J. Niu, M. Schmidt-Supprian, D. B. Evans, J. L. Abbruzzese, P. J. Chiao, Mechanisms of proinflammatory cytokine-induced biphasic NF-kappaB activation. *Mol. Cell* **12**, 1287 (2003).

- J. Schmitz, A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T. K. McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, D. M. Gorman, J. F. Bazan, R. A. Kastelein, IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. **23**, 479 (2005).
- H. Schreuder, C. Tardif, A. Soffientini, E. Sarubbi, A. Akeson, T. Bowlin, S. Yanofsky, R. W. Barrett, Crystals of soluble interleukin-1 receptor complexed with its natural antagonist reveal a 1:1 receptor-ligand complex. *FEBS Lett.* **373**, 39 (1995).
- H. Schreuder, C. Tardif, S. Trump-Kallmeyer, A. Soffientini, E. Sarubbi, A. Akeson, T. Bowlin, S. Yanofsky, R. W. Barrett, A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist. *Nature* **386**, 194 (1997).
- R. F. Schwabe, H. Sakurai, IKKbeta phosphorylates p65 at S468 in transactivation domain 2. *FASEB J.* **19**, 1758 (2005).
- M. L. Scott, T. Fujita, H. C. Liou, G. P. Nolan, D. Baltimore, The p65 subunit of NF-kappa B regulates I kappa B by two distinct mechanisms. *Genes Dev.* **7**, 1266 (1993).
- J. H. Shim, C. Xiao, A. E. Paschal, S. T. Bailey, P. Rao, M. S. Hayden, K. Y. Lee, C. Bussey, M. Steckel, N. Tanaka, G. Yamada, S. Akira, K. Matsumoto, S. Ghosh, TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev.* **19**, 2668 (2005).
- K. Shirakabe, K. Yamaguchi, H. Shibuya, K. Irie, S. Matsuda, T. Moriguchi, Y. Gotoh, K. Matsumoto, E. Nishida, TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem.* **272**, 8141 (1997).
- J. E. Sims, M. A. Gayle, J. L. Slack, M. R. Alderson, T. A. Bird, J. G. Giri, F. Colotta, F. Re, A. Mantovani, K. Shanebeck, ., Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 6155 (1993).
- J. E. Sims, C. J. March, D. Cosman, M. B. Widmer, H. R. MacDonald, C. J. McMahan, C. E. Grubin, J. M. Wignall, J. L. Jackson, S. M. Call, ., cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* **241**, 585 (1988).
- J. E. Sims, M. J. Nicklin, J. F. Bazan, J. L. Barton, S. J. Busfield, J. E. Ford, R. A. Kastelein, S. Kumar, H. Lin, J. J. Mulero, J. Pan, Y. Pan, D. E. Smith, P. R. Young, A new nomenclature for IL-1-family genes. *Trends Immunol.* **22**, 536 (2001).
- M. Solle, J. Labasi, D. G. Perregaux, E. Stam, N. Petrushova, B. H. Koller, R. J. Griffiths, C. A. Gabel, Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 125 (2001).
- L. A. Solt, L. A. Madge, J. S. Orange, M. J. May, Interleukin-1-induced NF-kappaB activation is NEMO-dependent but does not require IKKbeta. *J. Biol. Chem.* **282**, 8724 (2007).
- S. M. Srinivasula, J. L. Poyet, M. Razmara, P. Datta, Z. Zhang, E. S. Alnemri, The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J. Biol. Chem.* **277**, 21119 (2002).
- M. J. Stafford, N. A. Morrice, M. W. Pegg, P. Cohen, Interleukin-1 stimulated activation of the COT catalytic subunit through the phosphorylation of Thr290 and Ser62. *FEBS Lett.* **580**, 4010 (2006).
- C. Stehlik, S. H. Lee, A. Dorfleutner, A. Stassinopoulos, J. Sagara, J. C. Reed, Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain is a regulator of procaspase-1 activation. *J. Immunol.* **171**, 6154 (2003).
- F. T. Stevenson, F. Torrano, R. M. Locksley, D. H. Lovett, Interleukin 1: the patterns of translation and intracellular distribution support alternative secretory mechanisms. *J. Cell Physiol* **152**, 223 (1992).
- G. Stoecklin, T. Stubbs, N. Kedersha, S. Wax, W. F. Rigby, T. K. Blackwell, P. Anderson, MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *EMBO J.* **23**, 1313 (2004).

- D. Stokoe, D. G. Campbell, S. Nakielny, H. Hidaka, S. J. Leever, C. Marshall, P. Cohen, MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase. *EMBO J.* **11**, 3985 (1992a).
- D. Stokoe, K. Engel, D. G. Campbell, P. Cohen, M. Gaestel, Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.* **313**, 307 (1992b).
- H. Sun, C. H. Charles, L. F. Lau, N. K. Tonks, MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* **75**, 487 (1993a).
- S. C. Sun, P. A. Ganchi, D. W. Ballard, W. C. Greene, NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* **259**, 1912 (1993b).
- E. A. Suswam, L. B. Nabors, Y. Huang, X. Yang, P. H. King, IL-1beta induces stabilization of IL-8 mRNA in malignant breast cancer cells via the 3' untranslated region: Involvement of divergent RNA-binding factors HuR, KSRP and TIAR. *Int. J. Cancer* **113**, 911 (2005).
- F. S. Sutterwala, Y. Ogura, M. Szczepanik, M. Lara-Tejero, G. S. Lichtenberger, E. P. Grant, J. Bertin, A. J. Coyle, J. E. Galan, P. W. Askenase, R. A. Flavell, Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity*. **24**, 317 (2006).
- N. Suzuki, S. Suzuki, G. S. Duncan, D. G. Millar, T. Wada, C. Mirtsos, H. Takada, A. Wakeham, A. Itie, S. Li, J. M. Penninger, H. Wesche, P. S. Ohashi, T. W. Mak, W. C. Yeh, Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* **416**, 750 (2002).
- J. A. Symons, P. R. Young, G. W. Duff, Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 beta precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 1714 (1995).
- G. Takaesu, S. Kishida, A. Hiyama, K. Yamaguchi, H. Shibuya, K. Irie, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto, TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol. Cell* **5**, 649 (2000).
- G. Takaesu, J. Ninomiya-Tsuji, S. Kishida, X. Li, G. R. Stark, K. Matsumoto, Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* **21**, 2475 (2001).
- A. Takeshita, Y. Chen, A. Watanabe, S. Kitano, S. Hanazawa, TGF-beta induces expression of monocyte chemoattractant JE/monocyte chemoattractant protein 1 via transcriptional factor AP-1 induced by protein kinase in osteoblastic cells. *J. Immunol.* **155**, 419 (1995).
- B. Teferedegne, M. R. Green, Z. Guo, J. M. Boss, Mechanism of action of a distal NF-kappaB-dependent enhancer. *Mol. Cell Biol.* **26**, 5759 (2006).
- A. Thiefes, A. Wolf, A. Doerrie, G. A. Grassl, K. Matsumoto, I. Autenrieth, E. Bohn, H. Sakurai, R. Niedenthal, K. Resch, M. Kracht, The *Yersinia enterocolitica* effector YopP inhibits host cell signalling by inactivating the protein kinase TAK1 in the IL-1 signalling pathway. *EMBO Rep.* **7**, 838 (2006).
- N. A. Thornberry, H. G. Bull, J. R. Calaycay, K. T. Chapman, A. D. Howard, M. J. Kostura, D. K. Miller, S. M. Molineaux, J. R. Weidner, J. Aunins, ., A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**, 768 (1992).
- M. L. Toh, Y. Yang, M. Leech, L. Santos, E. F. Morand, Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1, a negative regulator of the mitogen-activated protein kinases, in rheumatoid arthritis: up-regulation by interleukin-1beta and glucocorticoids. *Arthritis Rheum.* **50**, 3118 (2004).
- C. Tournier, C. Dong, T. K. Turner, S. N. Jones, R. A. Flavell, R. J. Davis, MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev.* **15**, 1419 (2001).
- J. Vakkila, R. A. Demarco, M. T. Lotze, Coordinate NF-kappaB and STAT1 activation promotes development of myeloid type 1 dendritic cells. *Scand. J. Immunol.* **67**, 260 (2008).

- H. van Dam, M. Duyndam, R. Rottier, A. Bosch, L. Vries-Smits, P. Herrlich, A. Zantema, P. Angel, A. J. van der Eb, Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J.* **12**, 479 (1993).
- M. P. van Iersel, T. Kelder, A. R. Pico, K. Hanspers, S. Coort, B. R. Conklin, C. Evelo, Presenting and exploring biological pathways with PathVisio. *BMC. Bioinformatics.* **9**, 399 (2008).
- W. Vanden Berghe, S. Plaisance, E. Boone, K. De Bosscher, M. L. Schmitz, W. Fiers, G. Haegeman, p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* **273**, 3285 (1998).
- V. Veillat, C. H. Lavoie, C. N. Metz, T. Roger, Y. Labelle, A. Akoum, Involvement of nuclear factor-kappaB in macrophage migration inhibitory factor gene transcription up-regulation induced by interleukin- 1 beta in ectopic endometrial cells. *Fertil. Steril.* **91**, 2148 (2009).
- G. P. Vigers, L. J. Anderson, P. Caffes, B. J. Brandhuber, Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta. *Nature* **386**, 190 (1997).
- G. P. Vigers, D. J. Dripps, C. K. Edwards, III, B. J. Brandhuber, X-ray crystal structure of a small antagonist peptide bound to interleukin-1 receptor type 1. *J. Biol. Chem.* **275**, 36927 (2000).
- M. P. Vincenti, C. E. Brinckerhoff, Early response genes induced in chondrocytes stimulated with the inflammatory cytokine interleukin-1beta. *Arthritis Res.* **3**, 381 (2001).
- E. Voronov, D. S. Shouval, Y. Krelin, E. Cagnano, D. Benharroch, Y. Iwakura, C. A. Dinarello, R. N. Apte, IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 2645 (2003).
- M. C. Walsh, G. K. Kim, P. L. Maurizio, E. E. Molnar, Y. Choi, TRAF6 autoubiquitination-independent activation of the NFkappaB and MAPK pathways in response to IL-1 and RANKL. *PLoS. ONE.* **3**, e4064 (2008).
- C. Wang, L. Deng, M. Hong, G. R. Akkaraju, J. Inoue, Z. J. Chen, TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346 (2001).
- N. Wang, L. Verna, S. Hardy, J. Forsayeth, Y. Zhu, M. B. Stemerman, Adenovirus-mediated overexpression of c-Jun and c-Fos induces intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 2078 (1999).
- M. Waterfield, W. Jin, W. Reiley, M. Zhang, S. C. Sun, IkappaB kinase is an essential component of the Tpl2 signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* **24**, 6040 (2004).
- M. R. Waterfield, M. Zhang, L. P. Norman, S. C. Sun, NF-kappaB1/p105 regulates lipopolysaccharide-stimulated MAP kinase signaling by governing the stability and function of the Tpl2 kinase. *Mol. Cell* **11**, 685 (2003).
- A. Weber, P. Wasiliew, M. Kracht, Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci. Signal.* **3**, cm1 (2010a).
- A. Weber, P. Wasiliew, M. Kracht, Interleukin-1beta (IL-1beta) processing pathway. *Sci. Signal.* **3**, cm2 (2010b).
- A. Werman, R. Werman-Venkert, R. White, J. K. Lee, B. Werman, Y. Krelin, E. Voronov, C. A. Dinarello, R. N. Apte, The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 2434 (2004).
- H. Wesche, X. Gao, X. Li, C. J. Kirschning, G. R. Stark, Z. Cao, IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J. Biol. Chem.* **274**, 19403 (1999).
- H. Wesche, W. J. Henzel, W. Shillinglaw, S. Li, Z. Cao, MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity.* **7**, 837 (1997).
- A. J. Whitmarsh, S. H. Yang, M. S. Su, A. D. Sharrocks, R. J. Davis, Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol. Cell Biol.* **17**, 2360 (1997).

- K. P. Wilson, J. A. Black, J. A. Thomson, E. E. Kim, J. P. Griffith, M. A. Navia, M. A. Murcko, S. P. Chambers, R. A. Aldape, S. A. Raybuck, ., Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **370**, 270 (1994).
- M. Windheim, M. Stafford, M. Pegg, P. Cohen, Interleukin-1 (IL-1) induces the Lys63-linked polyubiquitination of IL-1 receptor-associated kinase 1 to facilitate NEMO binding and the activation of I κ B kinase. *Mol. Cell Biol.* **28**, 1783 (2008).
- R. Winzen, M. Kracht, B. Ritter, A. Wilhelm, C. Y. Chen, A. B. Shyu, M. Muller, M. Gaestel, K. Resch, H. Holtmann, The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J.* **18**, 4969 (1999).
- R. Winzen, B. K. Thakur, O. Dittrich-Breiholz, M. Shah, N. Redich, S. Dhamija, M. Kracht, H. Holtmann, Functional analysis of KSRP interaction with the AU-rich element of interleukin-8 and identification of inflammatory mRNA targets. *Mol. Cell Biol.* **27**, 8388 (2007).
- S. Wolter, A. Doerrie, A. Weber, H. Schneider, E. Hoffmann, O. J. von der, L. Bakiri, E. F. Wagner, K. Resch, M. Kracht, c-Jun controls histone modifications, NF- κ B recruitment, and RNA polymerase II function to activate the ccl2 gene. *Mol. Cell Biol.* **28**, 4407 (2008).
- J. Wu, J. K. Harrison, P. Dent, K. R. Lynch, M. J. Weber, T. W. Sturgill, Identification and characterization of a new mammalian mitogen-activated protein kinase kinase, MKK2. *Mol. Cell Biol.* **13**, 4539 (1993).
- Z. Wu, J. Wu, E. Jacinto, M. Karin, Molecular cloning and characterization of human JNK2, a novel Jun NH2-terminal kinase-specific kinase. *Mol. Cell Biol.* **17**, 7407 (1997).
- M. Yamada, S. Kim, K. Egashira, M. Takeya, T. Ikeda, O. Mimura, H. Iwao, Molecular mechanism and role of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 induction by vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1996 (2003).
- M. Yamamoto, S. Yamazaki, S. Uematsu, S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Kuwata, O. Takeuchi, K. Takeshige, T. Saitoh, S. Yamaoka, N. Yamamoto, S. Yamamoto, T. Muta, K. Takeda, S. Akira, Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I κ B ζ . *Nature* **430**, 218 (2004).
- K. Yamazaki, J. Gohda, A. Kanayama, Y. Miyamoto, H. Sakurai, M. Yamamoto, S. Akira, H. Hayashi, B. Su, J. Inoue, Two mechanistically and temporally distinct NF- κ B activation pathways in IL-1 signaling. *Sci. Signal.* **2**, ra66 (2009).
- X. Yan, X. C. Wu, M. Sun, B. K. Tsang, W. Gibb, Nuclear factor kappa B activation and regulation of cyclooxygenase type-2 expression in human amnion mesenchymal cells by interleukin-1beta. *Biol. Reprod.* **66**, 1667 (2002).
- H. T. Yang, P. Cohen, S. Rousseau, IL-1beta-stimulated activation of ERK1/2 and p38alpha MAPK mediates the transcriptional up-regulation of IL-6, IL-8 and GRO-alpha in HeLa cells. *Cell Signal.* **20**, 375 (2008).
- J. Yao, T. W. Kim, J. Qin, Z. Jiang, Y. Qian, H. Xiao, Y. Lu, W. Qian, M. F. Gulen, N. Sizemore, J. DiDonato, S. Sato, S. Akira, B. Su, X. Li, Interleukin-1 (IL-1)-induced TAK1-dependent Versus MEKK3-dependent NF κ B activation pathways bifurcate at IL-1 receptor-associated kinase modification. *J. Biol. Chem.* **282**, 6075 (2007).
- K. Y. Yu, H. J. Kwon, D. A. Norman, E. Vig, M. G. Goebel, M. A. Harrington, Cutting edge: mouse pellino-2 modulates IL-1 and lipopolysaccharide signaling. *J. Immunol.* **169**, 4075 (2002).
- Y. Yu, N. Ge, M. Xie, W. Sun, S. Burlingame, A. K. Pass, J. G. Nuchtern, D. Zhang, S. Fu, M. D. Schneider, J. Fan, J. Yang, Phosphorylation of Thr-178 and Thr-184 in the TAK1 T-loop is required for interleukin (IL)-1-mediated optimal NF κ B and AP-1 activation as well as IL-6 gene expression. *J. Biol. Chem.* **283**, 24497 (2008).
- E. Zandi, Y. Chen, M. Karin, Direct phosphorylation of I κ B by IKKalpha and IKKbeta: discrimination between free and NF- κ B-bound substrate. *Science* **281**, 1360 (1998).

E. Zandi, D. M. Rothwarf, M. Delhase, M. Hayakawa, M. Karin, The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* **91**, 243 (1997).

W. Zhao, M. Liu, K. L. Kirkwood, p38alpha stabilizes interleukin-6 mRNA via multiple AU-rich elements. *J. Biol. Chem.* **283**, 1778 (2008).

H. Zhong, R. E. Voll, S. Ghosh, Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol. Cell* **1**, 661 (1998).

8 Anhang

8.1 Abbildung A1

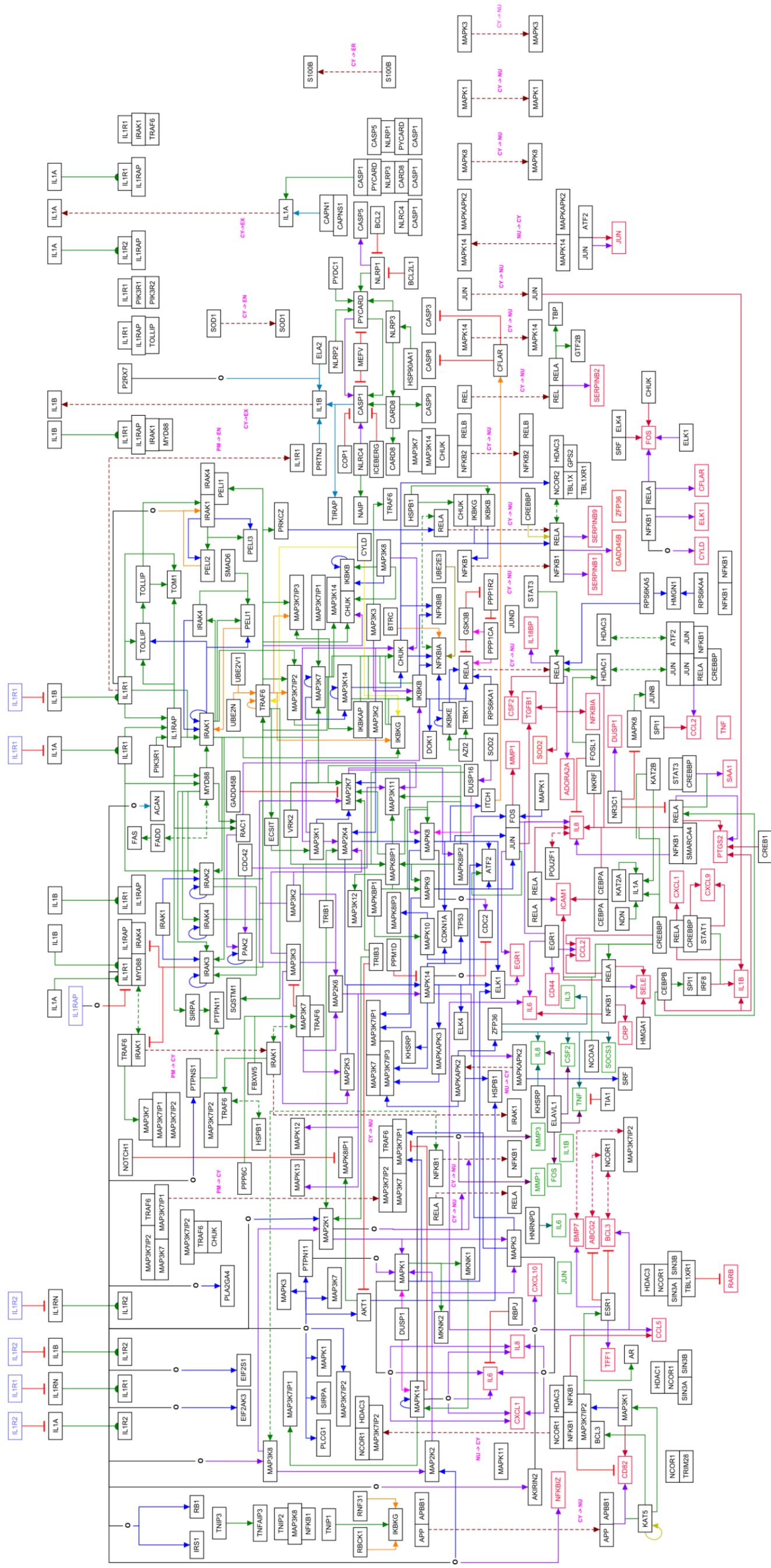


Abbildung A1: Die IL-1-Signaltransduktionskarte – Teil I.

Die IL-1-Signaltransduktionskarte umfasst 256 Moleküle (206 Proteine und 10 mRNAs) und 605 Reaktionen (Physikalische Interaktionen: 363, Enzymatische Katalyse: 202, Transport: 40). Diese Abbildung ist eine Vergrößerung der IL-1-Signaltransduktionskarte von Abbildung 4A. Die Legende mit den Elementen der Signaltransduktionskarte folgt in Abbildung A2 auf der nächsten Seite.

8.2 Abbildung A2

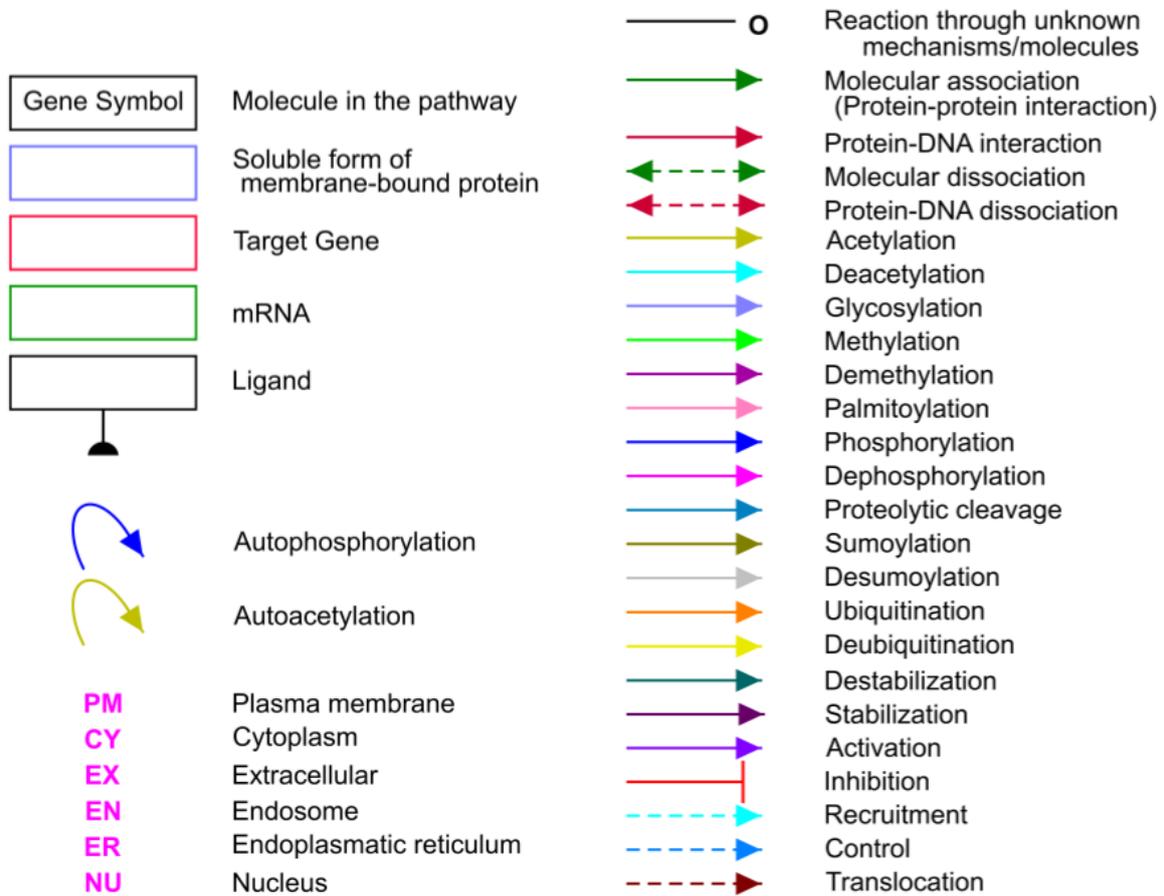


Abbildung A2: Die IL-1-Signaltransduktionskarte – Teil 2.

Diese Abbildung ist eine Vergrößerung der Legende zur IL-1-Signaltransduktionskarte von Abbildung 4A.

8.3 Abbildung A3

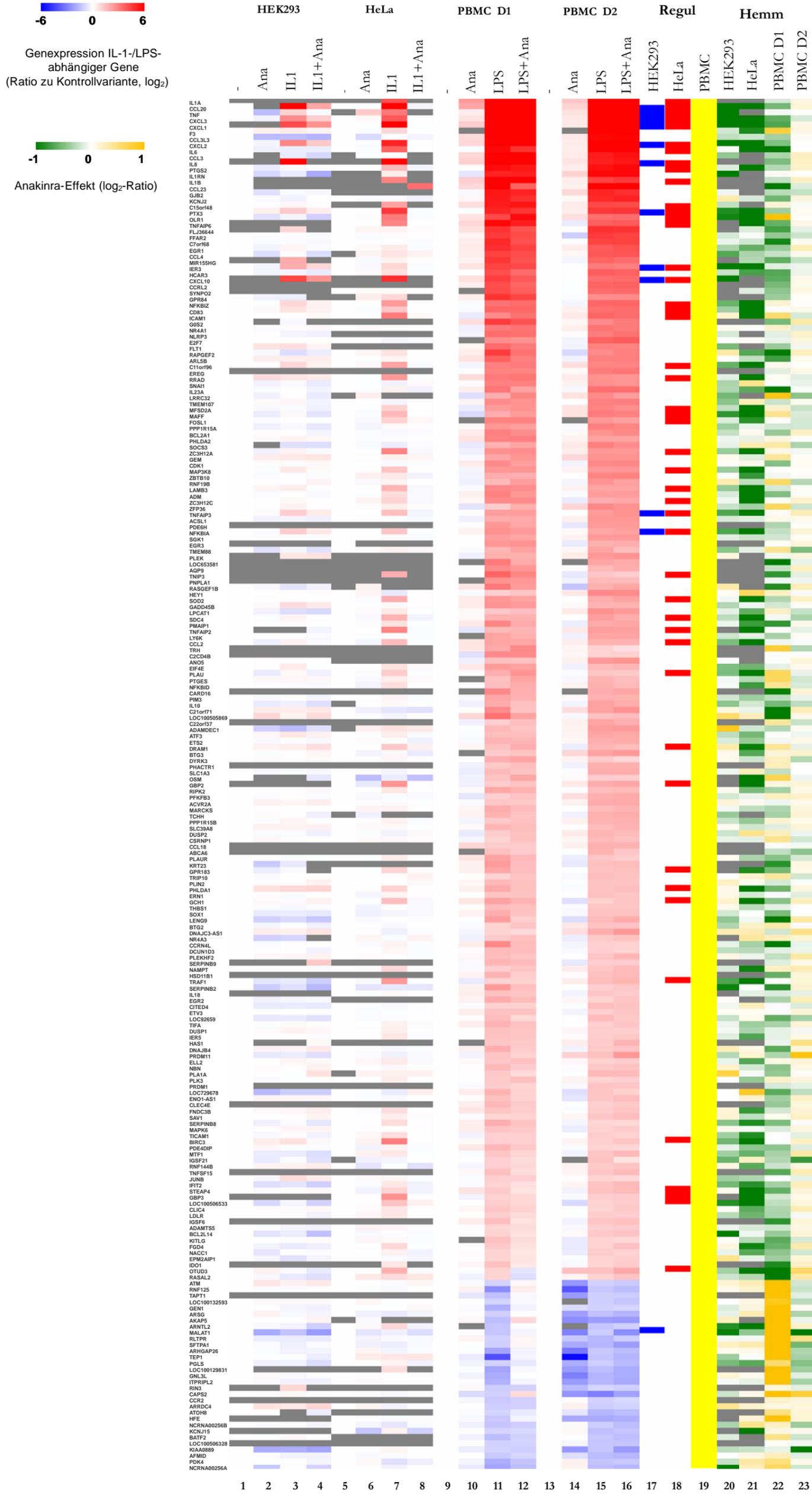
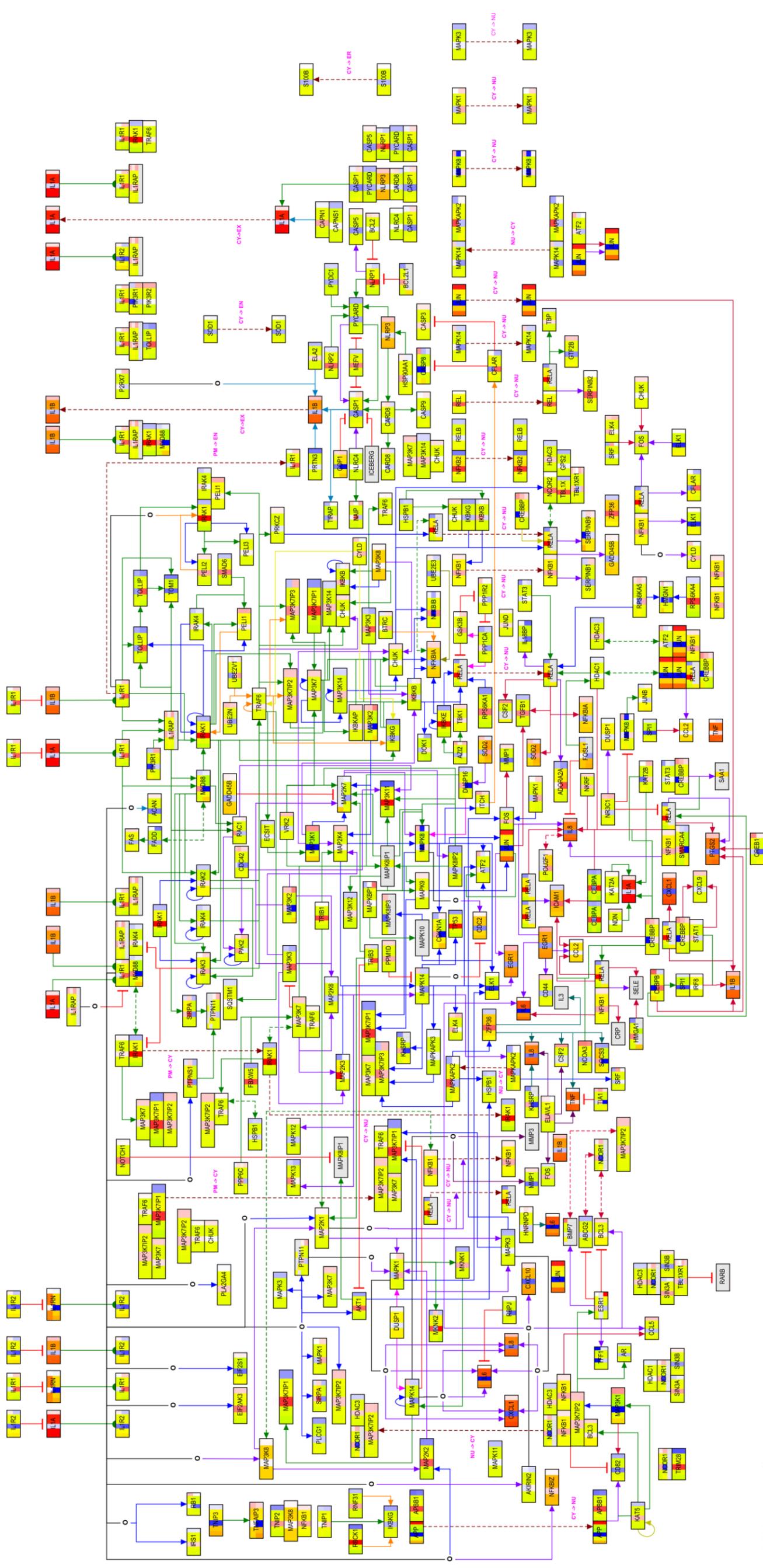


Abbildung A3: Farbcodierte Darstellung der mRNA-Expressionswerte in einer „Heatmap“.

HEK293IL-1R-Zellen (HEK293) wurden bei 37 °C mit 10 µg/ml Anakinra (Ana) oder unbehandelt (-) für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 10 ng/ml IL-1α (IL1) stimuliert oder unstimuliert für 3 h inkubiert (Spalten 1-4). HeLa-tA-Zellen (HeLa) wurden bei 37 °C mit 10 µg/ml Anakinra (Ana) oder unbehandelt (-) für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 20 ng/ml IL-1α (IL1) stimuliert oder unstimuliert für 4 h inkubiert (Spalten 5-8). PBMC von D1 und D2 wurden bei 37 °C entweder mit 10 µg/ml Anakinra (Ana) oder unbehandelt (-) für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 1 ng/ml LPS stimuliert oder unstimuliert für 1 h inkubiert (Spalten 9-16). mRNA-Expressionswerte von 223 in den PBMC regulierten Genen sind für die verschiedenen Zelltypen als log₂-transformiertes Verhältnis „Stimulus vs. Kontrolle“ mit einem Farbwert innerhalb einer Skala von blau (-6) über weiß (0) bis rot (6) dargestellt. Unter „Regul“ (Spalten 17-19) sind die in den HEK293IL-1R-Zellen (blau) und den HeLa-tA-Zellen (rot) neben den in den PBMC beider Spender (gelb) regulierten Gene farblich markiert. Unter „Hemm“ (Spalten 20-23) sind die Hemmeffekte durch Anakinra als log₂-transformiertes Verhältnis („LPS/IL-1+Anakinra vs. LPS/IL-1“) mit einem Farbwert innerhalb einer Skala von grün (-1) über weiß (0) bis gelb (1) dargestellt. Graue Felder kennzeichnen nicht messbare Gene.

Diese Abbildung ist eine Vergrößerung im Querformat von Abbildung 24. (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Axel Weber, AG Kracht)

8.4 Abbildung A4



8.5 Abbildung A5

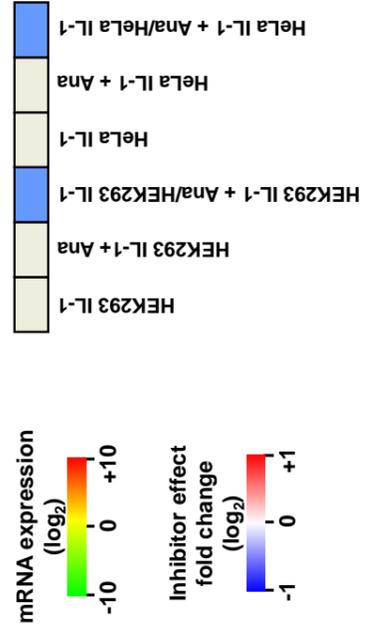
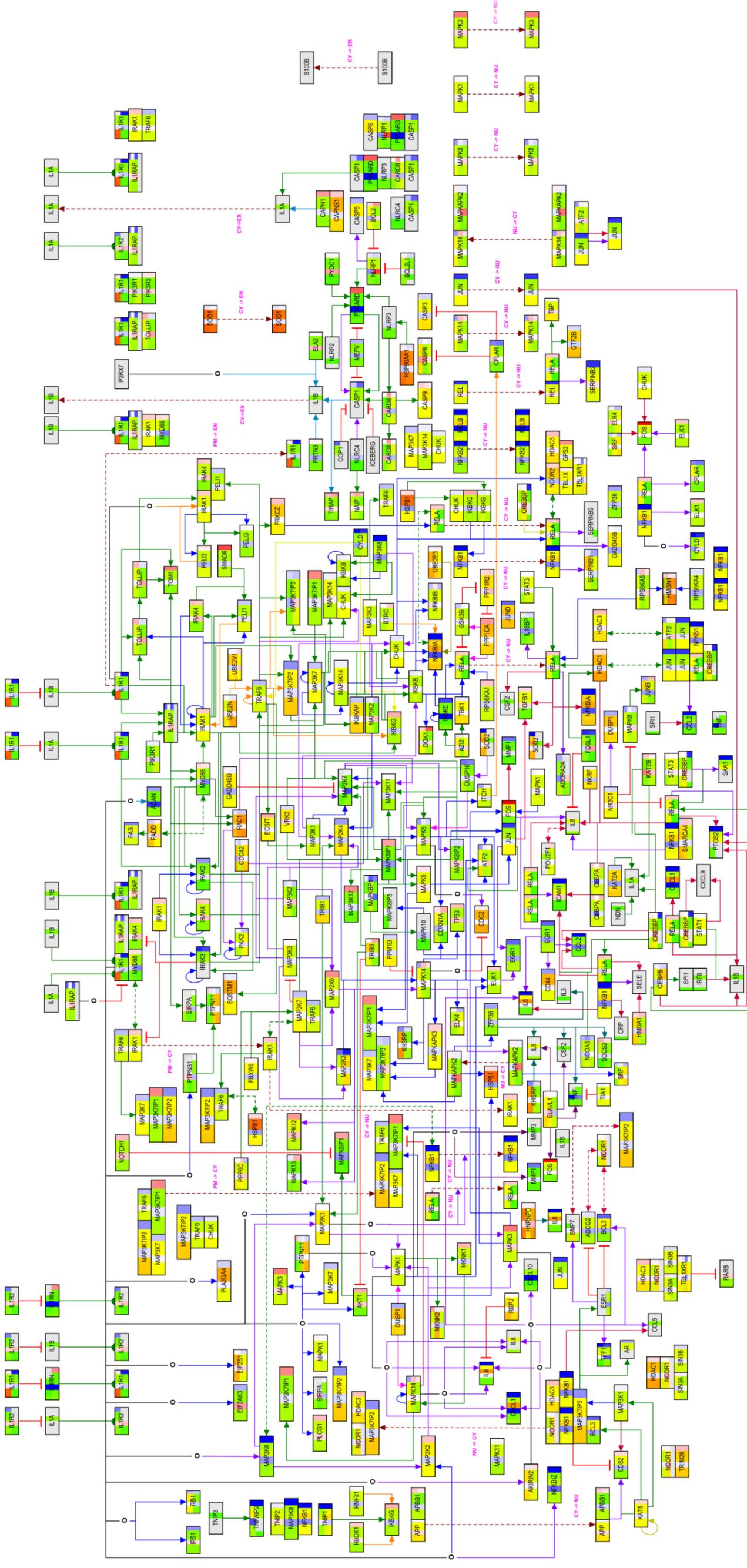


Abbildung A5: Farbcodierte Darstellung der mRNA-Expressionswerte und Effekte von Anakinra auf den molekularen Elementen in der IL-1-Signaltransduktionskarte – Teil 2.

HEK293IL-1R-Zellen (HEK293) wurden bei 37 °C mit 10 µg/ml Anakinra (Ana) oder unbehandelt für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 10 ng/ml IL-1α (IL-1) stimuliert oder unstimuliert für 3 h inkubiert. HeLa-TA-Zellen (HeLa) wurden bei 37 °C mit 10 µg/ml Anakinra (Ana) oder unbehandelt für 0,5 h vorinkubiert und danach mit 20 ng/ml IL-1α (IL-1) stimuliert oder unstimuliert für 4 h inkubiert.

Abgebildet ist die IL-1-Signaltransduktionskarte samt Farbskalen-Legende. In dieser ist die Unterteilung eines Rechtecks in 6 gleich große Farbkompartimente zur vergleichenden Abbildung der Effekte in den verschiedenen Zelltypen („HEK293 vs. HeLa“) erörtert:

Das log₂-transformierte Verhältnis „IL-1 vs. Kontrolle“ (Farbkompartiment 1+4 von links) und „IL-1+Anakinra vs. Kontrolle“ (Farbkompartiment 2+5 von links) ist mit einem Farbwert innerhalb einer Skala von grün (-10) über gelb (0) bis rot (10), das log₂-transformierte Verhältnis „IL-1+Anakinra vs. IL-1“ (Farbkompartiment 3+6 von links) mit einem Farbwert innerhalb einer Skala von blau (-1) über weiß (0) bis rot (1) dargestellt.

Diese Abbildung ist eine Vergrößerung von Abbildung 25B. Die Legende mit den Elementen der Signaltransduktionskarte findet sich in Abbildung A2. (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Axel Weber, AG Kracht)

8.6 Publikationsliste

Publikationen

1. Weber A, **Wasiliew P**, Kracht M.
„Interleukin-1 (IL-1) pathway”
Sci Signal. 2010 Jan 19;3(105):cm1.
PubMed [PMID: 20086235]
2. Weber A, **Wasiliew P**, Kracht M.
„Interleukin-1beta (IL-1beta) processing pathway”
Sci Signal. 2010 Jan 19;3(105):cm2.
PubMed [PMID: 20086236]

Posterpräsentationen

Wasiliew P., Weber A., Dittrich-Breiholz O., Schneider H., Kracht M.
„A comprehensive map of the IL-1R signalling network”
Signal Transduction Society (STS) 12th Joint Meeting in Weimar, 2008

Der präsentierende Autor ist durch Unterstreichung gekennzeichnet.

8.7 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt oder indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit einer Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, März 2014

Peter Wasiliew

8.8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Kracht für die Möglichkeit, meine Dissertation am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie anzufertigen, die hervorragende und motivierende Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit, ein interessantes Thema und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Mein großer Dank gilt auch Herrn Dr. Axel Weber für das Einrichten meines PCs, Erklären der Handhabung sämtlicher Software, Auswertung der *Microarray*-Daten, Unterstützung bei der Erzeugung der Grafiken und Zurverfügungstellung diverser Abbildungen in dieser Arbeit, konstruktive Diskussionen, zahlreiche Denkanstöße sowie seine enorme Hilfsbereitschaft.

Ferner danke ich Frau Dr. Daniela Kettner-Buhrow, Frau Petra Kronich, Frau Doris Newel und Herrn Helmut Müller für die grandiose Unterstützung bei technischen Fragestellungen.

Frau Dr. Katharina Porada und Frau Stefanie Vahlsing für praktische Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. Florian Dreyer, Herrn Dr. Holger Repp, Herrn Dr. Knut Beuerlein und Herrn Dr. Alexander Wolf für inspirierende Diskussionen sowie allen weiteren Mitarbeitern des Rudolf-Buchheim-Instituts für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Oliver Dittrich-Breiholz und Frau Heike Schneider aus Hannover für die Durchführung der *Microarray*-Analyse.

Zum Schluss danke ich meiner Familie, meinen Freunden und allen, die immer an mich geglaubt haben.

Peter



édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6261-3



9 783835 196261 3