

Aus der Abteilung „Biochemie der Mikronährstoffe“ am  
Deutschen Institut für Ernährungsforschung

**Die Hemmung der Bildung des Interleukin-1-Rezeptorkomplexes  
als redoxregulierter antiinflammatorischer Mechanismus**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
in der Wissenschaftsdisziplin „Biochemie der Ernährung“

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von

**Nadine Jurrmann**

Potsdam, im Februar 2006



*„ Wichtig ist, dass man nicht aufhört zu fragen.“*

*Albert Einstein*

Teile der Dissertation sind veröffentlicht in:

Böl, G.-F., Jurrmann, N. and Brigelius-Flohé, R. (2003) Recruitment of the interleukin-1 receptor (IL-1RI)-associated kinase IRAK to the IL-1RI is redox regulated. *Biol. Chem.* 384, 609-617.

Jurrmann, N., Brigelius-Flohé, R. and Böl, G.-F. (2005) Curcumin blocks interleukin-1 (IL-1) signaling by inhibiting the recruitment of the IL-1 receptor-associated kinase IRAK in murine thymoma EL-4 cells. *J. Nutr.* 135, 1859-1864.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Interleukin-1-vermittelte Signaltransduktion	1
1.1.1	Interleukin-1	1
1.1.2	IL-1-Rezeptor Typ I -Komplex	2
1.1.2.1	IL-1-Rezeptoren und IL-1R-akzessorisches Protein	2
1.1.2.2	Adapterproteine MyD88 und Tollip	3
1.1.2.3	IL-1RI-assoziierte Kinasen und TRAF6	4
1.1.3	Signaltransduktion zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B	6
1.1.4	NF- $\kappa$ B-aktivierte Genexpression	7
1.1.5	Homologe Signaltransduktionen zum IL-1RI-System	8
1.2	Mechanismen der Redoxregulation	9
1.2.1	Generierung und Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies	9
1.2.2	Modifikation von Proteinthiolen	10
1.2.3	Wirkungen von thiolmodifizierenden Substanzen	11
1.2.3.1	Menadion, Phenylarsinoxid, Diamid und Pyrrolidindithiocarbamat	12
1.2.3.2	Curcumin	13
1.2.3.3	Sulforaphan	14
1.2.4	Modulation proinflammatorischer Signalkaskaden	14
1.3	Fragestellung	15
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	Zellkultur	16
2.1.1	Kultivierung von Zellen	16
2.1.1.1	EL-4- und EL-4 <sup>IRAK</sup> -Zellen	16
2.1.1.2	CaCo-2-, ECV- und HepG2-Zellen	16
2.1.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	17
2.1.2	Zellzahlbestimmung und Vitalitätstests	17
2.1.2.1	Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau	17
2.1.2.2	Neutralrot-Test	18
2.1.2.3	MTT-Test	18
2.1.3	Vorinkubation der Zellen mit thiolmodifizierenden Agenzien und IL-1-Stimulation	18
2.1.3.1	Vorinkubation der Zellen mit MD, PAO, DA, PDTTC, Curcumin	18
2.1.3.2	Vorbehandlung der Zellen mit Sulforaphan	19
2.1.3.3	Stimulation der Zellen mit IL-1	19
2.2	Präparation von Cytosol- und Kernfraktionen	19
2.2.1	Herstellung von Lysaten	19
2.2.1.1	EL-4- und EL-4 <sup>IRAK</sup> -Zellen	19
2.2.1.2	CaCo-2-Zellen	20
2.2.2	Präparation von Kernextrakten	20
2.2.2.1	EL-4 <sup>IRAK</sup> -Zellen	20
2.2.2.2	CaCo-2-Zellen	20

2.2.3	Proteinbestimmung.....	21
2.3	Immunpräzipitation .....	21
2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	22
2.4.1	Eindimensionale Gelelektrophorese.....	22
2.4.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese .....	22
2.4.3	Coomassie- und Colloidal-Coomassie-Färbung von Proteinen .....	23
2.4.4	Trocknen des SDS-Geles.....	23
2.5	Western Blot .....	24
2.5.1	Elektrotransfer .....	24
2.5.2	Chemilumineszenz-Detektion.....	24
2.6	<i>in vitro</i> Kinase Test.....	25
2.7	Markierung von Proteinthiolen.....	25
2.7.1	Synthese von Iodoacetyl-[ <sup>125</sup> I]-Iodotyrosin ([ <sup>125</sup> I]-IAIT) .....	26
2.7.2	Markierung von Proteinthiolen mit [ <sup>125</sup> I]-IAIT .....	27
2.8	Quantifizierung der [ <sup>125</sup> I]-IL-1 Bindung an den IL-1RI .....	27
2.8.1	Iodierung von IL-1 $\alpha$ mit Na-[ <sup>125</sup> I]-Iodid.....	27
2.8.2	[ <sup>125</sup> I]-IL-1 $\alpha$ -Bindungstest.....	28
2.9	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen .....	28
2.10	Fluoreszenz-Mikroskopie .....	29
2.11	Bestimmung des zellulären Glutathions.....	30
2.12	RNA-Isolierung und Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR).....	31
2.13	PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) .....	31
2.13.1	Standard-PCR .....	31
2.13.2	Realttime-PCR.....	32
2.14	EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) .....	32
2.15	Klonierung von synthetischen Oligonukleotiden .....	33
2.15.1	Ligation .....	33
2.15.2	Transformation .....	34
2.15.3	Plasmidisolierung und Sequenzierung.....	34
2.16	Reportergenanalysen .....	35
2.16.1	Transiente Transfektion von HepG2-Zellen .....	35
2.16.2	Bestimmung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität .....	35
2.16.3	Messung der Luciferase-Aktivität .....	36
2.17	Statistik .....	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1	Charakterisierung von EL-4- und EL-4 <sup>IRAK</sup> -Zellen .....	37
3.1.1	IL-1-vermittelte Phosphorylierung der IRAK ist in EL-4 <sup>IRAK</sup> -Zellen erhöht.....	37
3.1.2	Die Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI ist in IRAK-Überexprimierern verstärkt.....	39
3.1.3	Aktivierte IRAK transloziert in den Zellkern.....	40
3.2	Identifizierung von möglichen redoxsensitiven Proteinen am IL-1RI .....	42

3.2.1	IL-1 ändert das [ <sup>125</sup> I]-IAIT-Muster von Proteinen am IL-1RI .....	42
3.2.2	Identifizierung des [ <sup>125</sup> I]-IAIT-markierbaren p80 als IRAK.....	43
3.2.3	MyD88 ist vermutlich das [ <sup>125</sup> I]-IAIT-markierbare p32.....	44
3.2.4	Identifizierung weiterer Proteine des IL-1RI-Komplexes.....	46
3.2.4.1	Actin ändert seine Konformation am IL-1RI.....	48
3.2.4.2	Tropomyosin assoziiert IL-1-abhängig an den IL-1RI.....	50
3.3	Thiolmodifizierende Substanzen interferieren mit Signalen am IL-1RI .....	51
3.3.1	Wirkungen von MD, PAO, DA und PDTC auf Ereignisse am IL-1RI-Komplex .....	51
3.3.1.1	MD führt zum Anstieg des intrazellulären GSSG-Gehalts .....	51
3.3.1.2	MD, PAO, DA und PDTC inhibieren die IL-1-induzierte Phosphorylierung der IRAK .....	52
3.3.1.3	MD, PAO, DA und PDTC blockieren die IL-1-vermittelte Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI.....	53
3.3.1.4	MD, PAO, DA und PDTC führen zur Modifikation von Thiolen der IRAK .....	54
3.3.2	Einfluss von Curcumin auf Ereignisse am IL-1RI.....	55
3.3.2.1	Curcumin hemmt die IL-1-induzierte Phosphorylierung der IRAK ohne wesentliche Beeinträchtigung ihrer Kinase-Aktivität.....	55
3.3.2.2	Curcumin blockiert die IL-1-vermittelte Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI.....	57
3.3.2.3	Modifikation von Thiolen der IRAK durch Curcumin .....	59
3.3.2.4	Der inhibitorische Effekt von Curcumin auf die Phosphorylierung der IRAK ist durch reduzierende Agenzien nicht reversibel .....	59
3.3.2.5	Die Interaktion von IL-1 mit dem Rezeptor wird von Curcumin nicht beeinträchtigt.....	60
3.3.3	Wirkung von Sulforaphan auf Ereignisse am IL-1RI-Komplex.....	61
3.3.3.1	Die IL-1-abhängige Rekrutierung und Phosphorylierung der IRAK sind durch Sulforaphan blockiert.....	62
3.3.3.2	Sulforaphan induziert die Expression von Tollip in zwei verschiedenen Zelllinien.....	63
3.3.3.3	Sulforaphan bewirkt eine Translokation von Nrf2 in den Zellkern.....	66
3.3.3.4	Die ARE des humanen und murinen Tollip-Promotors sind nicht beteiligt an der Sulforaphan-induzierten Tollip-Expression .....	67
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>70</b>
4.1	Proteine des IL-1RI-Komplexes .....	70
4.1.1	IL-1RI-assoziierte Proteine.....	70
4.1.2	Funktionen der IRAK im IL-1-Signaltransfer .....	73
4.2	Mechanismen der Modulation der IL-1-Signalkaskade durch redoxaktive Substanzen ..	75
4.2.1	MD-, PAO-, DA- und PDTC-verursachte Thiolmodifikationen.....	75
4.2.2	Die Hemmung der Bildung des IL-1RI-Komplexes durch antiinflammatorische Nahrungsinhaltsstoffe.....	79
4.2.3	Veränderung des zellulären Redoxstatus als Möglichkeit einer überschießenden Entzündungsreaktion vorzubeugen.....	83
4.3	Ausblick .....	86
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>102</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Interleukin-1-vermittelte Signaltransduktion

Interleukin-1 (IL-1) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das eine entscheidende Rolle in der Generierung der systemischen und lokalen Antwort von Infektionen, Verletzungen und Immunerkrankungen spielt. Die pleiotropischen biologischen Aktivitäten von IL-1 werden über den IL-1-Rezeptor Typ I (IL-1RI) vermittelt und komplexe Signalwege aktiviert, wobei die Aktivierung von NF- $\kappa$ B schließlich zur Induktion proinflammatorischer Proteine führt. In dieser Kaskade sind Kinasen involviert, die durch verschiedene Adaptermoleküle in Komplexen organisiert sind [1].

Im Folgenden werden beteiligte Proteine aufgeführt und ihre Funktion in der Signalkaskade erläutert. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Beschreibung und Untersuchung früher Schritte in der IL-1-Signaltransduktion und somit werden nachfolgend Proteine des IL-1RI-Komplexes ausführlich behandelt.

### 1.1.1 Interleukin-1

Die IL-1-Familie besteht aus drei Mitgliedern: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-1-Rezeptor Antagonist (IL-1Ra) [2]. IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  werden zuerst als Vorläufer (31 kD) synthetisiert [3]. Die optimale biologische Aktivität des IL-1 $\beta$  wird durch Spaltung in ein 17 kD großes Protein erreicht, wohingegen beide Formen von IL-1 $\alpha$  biologisch aktiv sind [4]. IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  werden von aktivierten Macrophagen, Keratinozyten, stimulierten B-Lymphozyten und Fibroblasten gebildet. IL-1 $\alpha$  verbleibt intrazellulär oder wird an die Zelloberfläche transportiert und fungiert so als autokriner Botenstoff. Im Gegensatz dazu wird die voll entwickelte Form von IL-1 $\beta$  sezerniert und entfaltet seine biologischen Wirkungen auf andere Zellen (= parakrin) [5].

IL-1Ra wurde als erstes natürlich vorkommendes Zytokin, das als spezifischer Rezeptor-Antagonist wirkt, beschrieben [6]. Es wird von fast allen Zellen, die IL-1 exprimieren, gebildet [7]. IL-1Ra bindet an den IL-1R und inhibiert die Bindung von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Somit wird die biologische Aktivität der beiden Agonisten in physiologischen und pathophysiologischen Immun- und Entzündungsantworten neutralisiert. Die Aktivität des Agonisten zeichnet sich durch die Präsenz von zwei Rezeptorbindungsstellen im Protein aus, wohingegen IL-1Ra nur eine besitzt [8].

## 1.1.2 IL-1-Rezeptor Typ I -Komplex

### 1.1.2.1 IL-1-Rezeptoren und IL-1R-akzessorisches Protein

Der erste Rezeptor für IL-1 wurde 1985 beschrieben, wobei Dower et al. zeigten, dass die Rezeptoren für IL-1  $\alpha$  und  $\beta$  identisch sind [9]. Die zelluläre IL-1-Antwort wird nur über den IL-1-Rezeptor Typ I (IL-1RI) vermittelt [10], der insbesondere auf T-Zellen und Fibroblasten [11] und in geringer Zahl auf fast allen Zellen vorkommt [12]. Daneben gibt es den IL-1-Rezeptor Typ II (IL-1RII) [13], der vor allem auf B-lymphoiden und myeloischen Zellen exprimiert ist [14], aber auch mit dem IL-1R Typ I auf der gleichen Zelle co-exprimiert sein kann [15,16]. Beide Rezeptoren sind aus einer extrazellulären IL-1-Bindungsdomäne aufgebaut, die aus drei Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen besteht, einer einzelnen Transmembranregion und einer cytoplasmatischen Domäne. Im Gegensatz zu den 215 Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne des IL-1RI (80 kD) besitzt der IL-1RII (60 kD) eine verkürzte Domäne aus 29 Aminosäuren. Trotz Bindung von IL-1 an den IL-1RII ist dieser nicht in der Lage, das Signal bis zum NF- $\kappa$ B weiterzuleiten [17]. Somit agiert der IL-1RII als „decoy“-Rezeptor für IL-1 einerseits durch Abfangen von Liganden [18] oder andererseits durch Konkurrenz um den Co-rezeptor, das IL-1R-akzessorische Protein (IL-1RAcP) [19]. Die Affinität von IL-1 $\alpha$  ist für den IL-1RI höher als für den IL-1RII, wohingegen sich die Affinität für IL-1 $\beta$  umgekehrt verhält [20].

Die IL-1R Typ I und II gehören zur Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Superfamilie, die durch eine intrazelluläre TIR-Domäne gekennzeichnet ist. Basierend auf den extrazellulären Domänen ist diese TIR-Superfamilie in zwei Untergruppen eingeteilt: solche mit Ig-Domänen- und solche mit Leucin-reichen Wiederholungssequenzen (LRR) (Übersicht in: [21]). Die LRR-Untergruppe besteht aus 13 Toll-like Rezeptoren (TLR), die durch spezifische pathogene Produkte (PAMP - pathogen-associated molecular pattern) aktiviert werden [22].

Neben den transmembranen gibt es auch zwei lösliche Formen der IL-1-Rezeptoren, die beide die Signaltransduktion nicht initiieren [23].

Nach Bindung von IL-1 an den IL-RI dimerisiert dieser mit dem transmembranen IL-1RAcP [24], ein Ereignis das essentiell für die Generierung des IL-1-Signals ist [25,26]. Diese Heterodimerisierung erfolgt vermutlich durch laterale Diffusion des IL-1RAcP an den IL-1RI, der bereits das IL-1 gebunden hat [27]. Das IL-1RAcP (68 kD) besitzt ebenfalls drei extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen und eine intrazelluläre TIR-Domäne und gehört somit zur Ig-Domänen-Untergruppe der TIR-Superfamilie. Es ist selbst nicht in der Lage, IL-1 alleine zu binden [24]. An die cytoplasmatische Seite des Heterodimers binden danach die Adapterproteine MyD88 und Tollip.

### 1.1.2.2 Adapterproteine MyD88 und Tollip

Das cytosolische Protein MyD88 (33 kD) wurde ursprünglich als myeloider Differenzierungs (MyD)-Marker in murinen myeloiden Zellen entdeckt [28]. Der Anstieg der MyD88-mRNA-Expression wurde als Marker für die Enddifferenzierung myeloider Zellen verwendet [29]. Nachfolgende Studien zeigten eine weit verbreitete Expression von MyD88 in vielen Mausgeweben und somit keine beschränkte Expression nur in myeloiden Zellen wie ursprünglich geglaubt [30]. Die C-terminale Region ist homolog zu der intrazellulären Domäne des IL-1RI [31]. Somit bildet MyD88 über Bindung der gemeinsamen TIR-Domänen mit dem IL-1RI und IL-1RAcP einen immunpräzipitierbaren Komplex [32]. Die N-terminale Region von ca. 90 Aminosäuren des MyD88 enthält eine so genannte Death-Domäne (DD), welche ursprünglich in Proteinen des Apoptose-Weges identifiziert wurde [33]. Verschiedene DD-enhaltende Proteine haben jedoch keine offensichtlichen apoptotischen Funktionen, so dass die DD eher ein Protein-Protein-Interaktionsmotiv ist [33]. MyD88 fungiert als Adapter durch die homophilen Interaktionen der TIR- und der DD-Domäne mit Mitgliedern der TIR-Superfamilie [34] und ist auch in der Lage, mittels seiner TIR-TIR- und DD-DD-Interaktionen MyD88-Homodimere zu bilden [35].

Mit Hilfe des Yeast-two-hybrid Screenings unter Verwendung des cytoplasmatischen Teils des IL-1RAcP als Sonde wurde Tollip (Toll-interacting protein) als ein weiteres Adapterprotein identifiziert [36]. Tollip (31 kD) ist im unstimulierten Zustand im Cytosol in einem Komplex mit der IL-1RI-assoziierten Kinase (IRAK) präsent und für deren Rekrutierung an den IL-1RI notwendig [36]. Die Interaktion erfolgt wahrscheinlich über die DD der IRAK [36]. Vermutlich durch Blockierung der IRAK-Dimerisierung wirkt Tollip im Ruhezustand als Silencer der IRAK. Tollip wurde als erstes physiologisches Substrat der IRAK charakterisiert [37]. Eine entscheidende Rolle spielt Tollip in der intestinalen epithelialen Toleranz von Kommensalen (Übersicht in: [38]). Eine geringe Expression von TLRs und eine Hochregulierung von Tollip trägt vermutlich zur Hyporesponsivität gegenüber bakteriellen TLR-Liganden bei [39].

Nach IL-1-Behandlung bindet der Tollip/IRAK-Komplex unabhängig von MyD88 über die Assoziation von Tollip mit dem IL-1RAcP an den aktivierten Rezeptorkomplex [36]. Co-rekrutiertes MyD88 interagiert dann mit der IRAK über DD-DD-Interaktion und löst die Phosphorylierung der IRAK aus, was zu einer raschen Dissoziation der IRAK von Tollip führt.

### 1.1.2.3 IL-1RI-assoziierte Kinasen und TRAF6

In den murinen T-Helfer-Zelllinien D10N und EL-4 wurde 1994 eine Serin/Threonin-spezifische Kinase beschrieben, die IL-1-abhängig mit dem IL-1RI co-präzipitiert [40]. Diese Proteinkinase wurde wenig später sequenziert, kloniert und als IRAK (IL-1RI-assoziierte Kinase) bezeichnet [41,42]. IL-1RI-überexprimierende HEK-Zellen, die mit IL-1 stimuliert wurden, zeigten eine rasche Assoziation der IRAK (80 kD) an den IL-1RI, gefolgt von einer Phosphorylierung der IRAK durch eine co-präzipitierende Kinase oder durch Autophosphorylierung [42]. Geringe Mengen der humanen IRAK-mRNA ist in allen Geweben zu detektieren [42], dagegen ist die murine IRAK überwiegend in Leber, Nieren und Testis exprimiert [43].

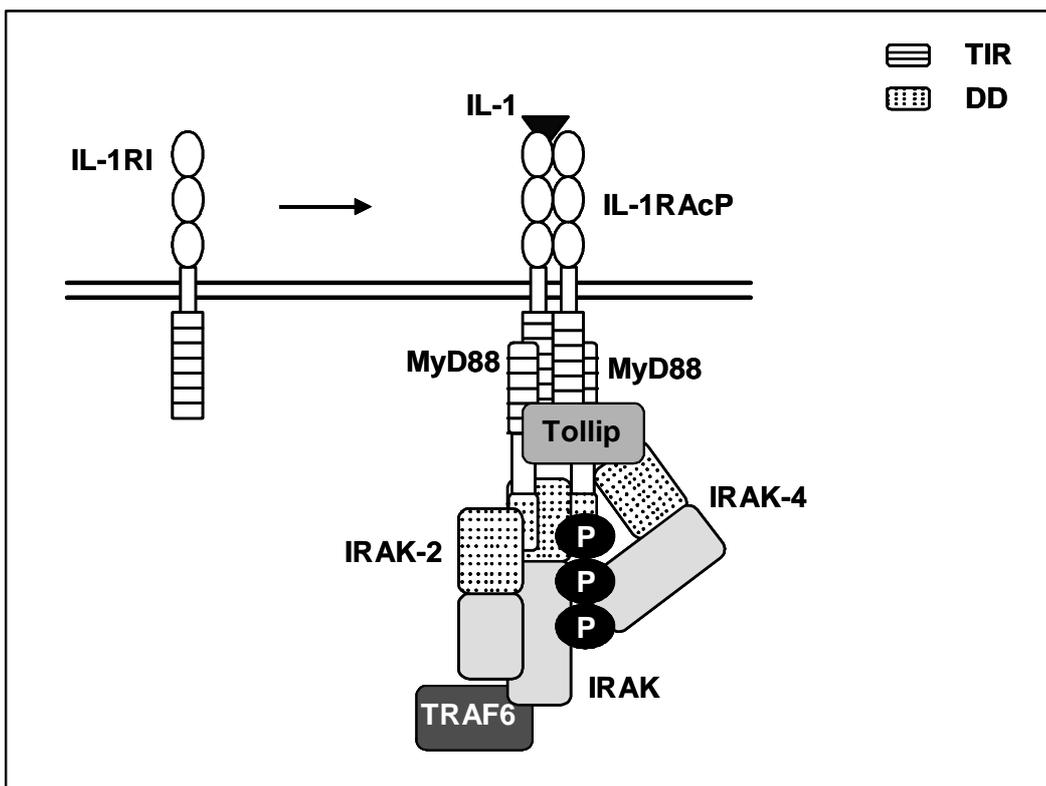
Inzwischen sind drei weitere Kinasen identifiziert, die neben der IRAK eine entscheidende Rolle in TLR/IL-1RI-vermittelten Signalwegen spielen: IRAK-2 (65 kD), IRAK-M (68 kD), und IRAK-4 (52 kD) [44]. Alle IRAK-Proteine bestehen aus einer N-terminalen DD, einer Prolin/Serin/Threonin-reichen Region, einer zentralen Kinase-Domäne und einer C-terminalen Region (außer IRAK-4) [44]. Sowohl der IRAK-2 als auch der IRAK-M fehlen die Kinase-Aktivität, wohingegen die IRAK-4 wie die IRAK Kinase-Aktivität besitzt. Die humane IRAK-M kommt nur in monozytischen Zellen vor [45], dagegen zeigt die murine IRAK-M ein breites Expressionsmuster und ist am höchsten in der Leber und im Thymus verbreitet [46]. Die IRAK-4 [47] wird wie die IRAK-2 [48] ubiquitär exprimiert.

Kinase-defekte IRAK-Mutanten mit einer Punktmutation in der ATP-Bindungstasche oder in der katalytischen Domäne sind in der Lage, die IL-1-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die Produktion von IL-2 in T-Zellen zu erzeugen [49-51]. Auch die vollständige Deletion der Kinase-Domäne und die Identifizierung einer kinase-inaktiven Spleißform (IRAK1b) zeigten, dass die Kinase-Aktivität der IRAK für die IL-1-vermittelte Aktivierung der c-jun N-terminalen Kinase (JNK) oder NF- $\kappa$ B entbehrlich ist [52,53]. Somit wird der IRAK eher eine Adapterfunktion zugeschrieben. IRAK<sup>-/-</sup>-Mäuse haben schwere, dennoch keine vollständigen Beeinträchtigungen, in ihrer Zytokin-Antwort auf verschiedene TLR/IL-1RI-Liganden und zeigen Aktivierungen von NF- $\kappa$ B, JNK und p38 [54,55].

Untersuchungen an IRAK-4-defizienten Zellen und Mäusen deuteten an, dass IRAK-4 im Vergleich zur IRAK eine wichtigere Rolle in inflammatorischen Prozessen spielt. IRAK-4<sup>-/-</sup>-Mäuse waren vollständig in allen untersuchten TLR/IL-1RI-vermittelten Antworten beeinträchtigt [56]. Ebenfalls zeigte eine IRAK-4-Mutante, der die Kinase-Domäne fehlt, eine stark verringerte IL-1-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B und Phosphorylierung der IRAK [47]. Somit könnte für therapeutische Interventionen die IRAK-4 eher ein potentielles Ziel sein. Im IL-1-Signalweg führt die IRAK-2 wahrscheinlich nur eine Adapterfunktion aus und ist teilweise redundant für IRAK [57]. Die IRAK-M

fungiert als negativer Regulator, indem sie die Dissoziation der IRAK/IRAK-4 von MyD88 unterbindet und somit die Interaktion der IRAK mit dem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) verhindert [58].

Die an den IL-1RI rekrutierte IRAK-4 bindet an die Intermediär-Domäne des MyD88, die sich zwischen TIR- und DD-Domäne befindet. Somit kommt die IRAK-4 in unmittelbare Nähe zur IRAK, woraufhin IRAK-4 die IRAK phosphoryliert [47]. Diese Aktivierung löst eine Autophosphorylierung der IRAK aus, was zu einer ausgeprägten Verschiebung des apparenten Molekulargewichtes der IRAK bis auf 100 kD führt [42,59]. IRAK-Hyperphosphorylierung führt zur Dissoziation von Tollip [36] und zur erhöhten Affinität des ebenfalls IL-1-abhängig IL-1RI-assoziierten TRAF6 [60]. TRAF6 (60 kD) ist ein Mitglied der TRAF-Familie, die Zytokin-Signalwege vermittelt [61]. IRAK-2 bindet über MyD88 an den IL-1RI [48]. Der Aufbau des IL-1RI-Komplexes ist in Abb. 1 dargestellt.



**Abb. 1: Aufbau des IL-1RI-Komplexes**

IL-1 bindet an den IL-1RI, der darauf mit dem IL-1RAcP dimerisiert. MyD88 assoziiert über die Toll/Interleukin-1 Rezeptor (TIR) -Domäne an das Heterodimer. Der Tollip/IRAK-Komplex und IRAK-2 werden an den Rezeptor rekrutiert, wobei IRAK und MyD88 über deren Death-Domänen (DD) interagieren. Rekrutierte IRAK-4 bindet an die Intermediär-Domäne des MyD88 und initiiert die Phosphorylierung der IRAK. An den IL-1RI rekrutiertes TRAF6 assoziiert dann mit der aktivierten IRAK.

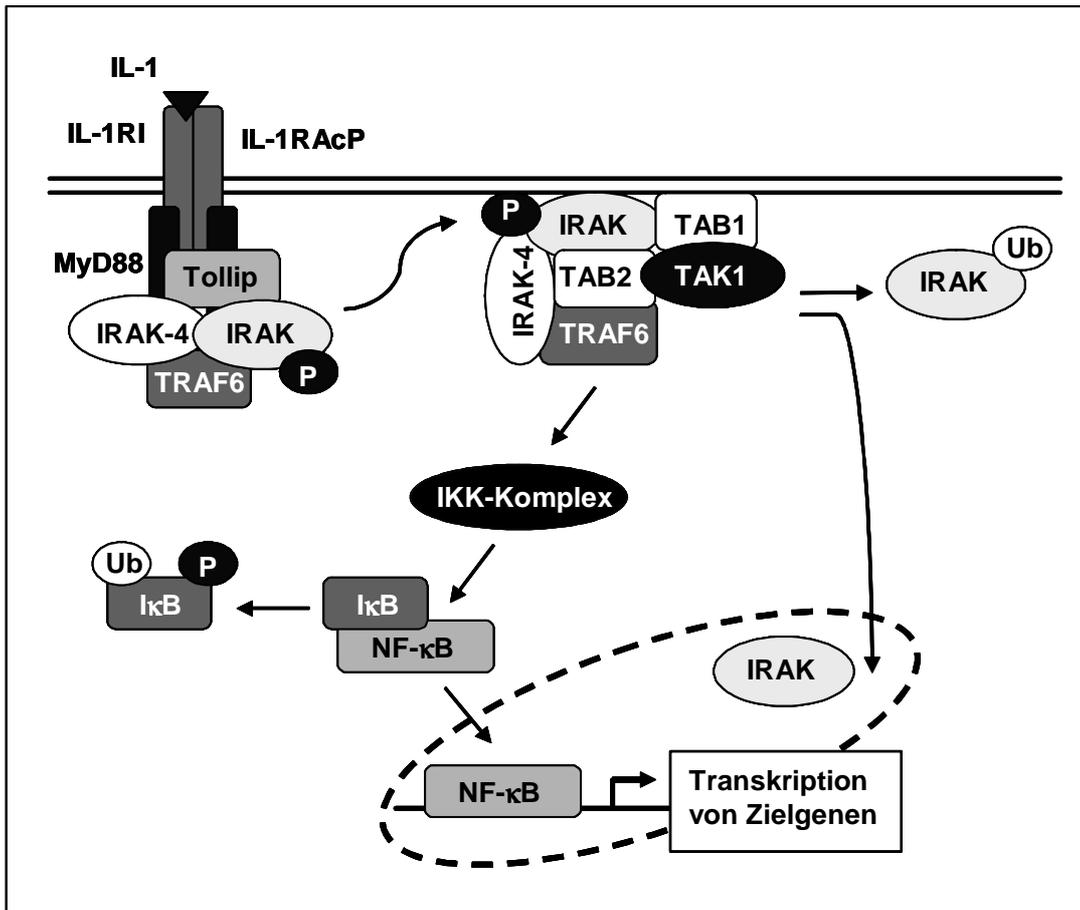
### 1.1.3 Signaltransduktion zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B

Pellino1, 2 und 3 (46 - 51 kD) interagieren nach IL-1-Stimulation mit dem dissoziierten IRAK/IRAK-4/TRAF6-Komplex [62-64]. Pellino1 und 2 sind für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung im TLR4- und IL-1-Signalweg notwendig [62,63]. Pellino3 hingegen aktiviert c-Jun und Elk-1, nicht jedoch NF- $\kappa$ B [64]. Pellino2 wirkt als physiologisches Substrat der IRAK und IRAK-4 [65]. Da alle drei Proteine keine enzymatische Funktion aufweisen, agieren sie vermutlich als Hilfsprotein und erleichtern die Freisetzung der phosphorylierten IRAK vom Rezeptor.

Der freigesetzte IRAK/IRAK-4/TRAF6-Komplex trifft auf dem prä-assozierten, membran-gebundenen Komplex aus TGF- $\beta$ -aktivierter Kinase 1 (TAK1) und den zwei Bindeproteinen TAB1 und TAB2 [66]. TAK1 gehört zur Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Kinase Kinase Familie [67]. Als Adapter verbindet TAB2 TAK1 mit TRAF6 und erleichtert somit die Aktivierung von TAK1 [68]. TAB1 verstärkt ebenfalls die Kinase-Aktivität von TAK1 [69]. Nach Autophosphorylierung von TAK1 [70] folgt die Dissoziation des TRAF6/TAK1/TAB1/TAB2-Komplexes von der Membran. Transloziertes TRAF6 wirkt durch Interaktion mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym 13 (Ubc13) als eine E3 Ubiquitinligase [71]. Der TAK1-Komplex wird durch Assoziation mit dem Ubc13/TRAF6 Komplex aktiviert [72], was zur Aktivierung der I $\kappa$ B-Kinasen (IKK) als auch der Kinasen des MAPK-Signalweges führt [73].

Aktivierte TAK1 phosphoryliert die IKK $\alpha$  (IKK1) und IKK $\beta$  (IKK2), die katalytischen Untereinheiten des IKK-Komplexes [74]. Daneben gehört die regulatorische Untereinheit IKK $\gamma$ , auch bekannt als NF- $\kappa$ B-essentieller Modulator (NEMO), zum IKK-Komplex [75]. Die aktivierte IKK phosphoryliert den Inhibitor des NF- $\kappa$ Bs (I $\kappa$ B), was eine Demaskierung der nukleären Lokalisationssequenz im NF- $\kappa$ B verursacht. I $\kappa$ B wird darauf ubiquitinyliert und über das Proteasom degradiert [76,77]. Das freigesetzte NF- $\kappa$ B transloziert in den Zellkern, bindet an seine Konsensussequenz (5'-GGGRNNYYCC-3') und aktiviert die Transkription einer Vielzahl von Genen [78]. NF- $\kappa$ B besteht aus fünf Mitgliedern, p50, p62, p65 (RelA), c-Rel und RelB. Sie bilden Homo- und Heterodimere, wobei das p50/p65-Dimer die verbreitetste Form des NF- $\kappa$ B ist.

Phosphorylierte IRAK an der Membran unterliegt der Ubiquitinierung und anschließender Degradierung durch das Proteasom [79] oder der Translokation in den Zellkern [80]. Im Cytosol interagiert die IRAK IL-1-abhängig mit NEMO, wobei die Funktion dieser Interaktion noch nicht aufgeklärt ist [81]. Die Signaltransduktion nach Bildung des IL-1RI-Komplexes bis zur Induktion von NF- $\kappa$ B-Zielgenen ist in Abb. 2 veranschaulicht.



**Abb. 2: Signaltransduktion vom IL-1RI-Komplex zu NF-κB**

Der IRAK/IRAK-4/TRAF6-Komplex dissoziiert vom IL-1RI-Komplex und bindet den prä-assoziierten Komplex TAK1/TAB1/TAB2 an der Membran. Phosphorylierte TAK1 dissoziiert ins Cytosol und aktiviert den IKK-Komplex. IKK phosphoryliert den Inhibitor IκB, der darauf degradiert wird. NF-κB transloziert in den Zellkern, bindet an sein responsives Element und aktiviert die Transkription seiner Zielgene. IRAK wird über das Proteasom degradiert oder transloziert in den Zellkern.

#### 1.1.4 NF-κB-aktivierte Genexpression

NF-κB wird durch eine Vielfalt von Stimuli aktiviert, wie inflammatorische Zytokine (IL-1, IL-18), Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF), bakterielle (Lipopolysaccharid (LPS)) und virale Komponenten (dsRNA). Aktiviertes NF-κB induziert die Transkription von Genen, die an der Kontrolle der Zellproliferation und Apoptose sowie der Entzündungs- und Immunantwort beteiligt sind. Das können z. B. Zytokine (IL-2, TNF, Interferone), Wachstumsfaktoren (EGF, FGF), Zelladhäsionsmoleküle (ICAM, VCAM) und Akut-Phase-Proteine (Angiotensinogen, Fibrinogen) sein. Weiterhin reguliert NF-κB die Entwicklung des Immunsystems, besonders die Entwicklung und Proliferation von B- und T-Zellen [82-85].

NF- $\kappa$ B ist aber auch in der Pathogenese von Krankheiten involviert wie Atherosklerose, Asthma, AIDS, septischer Schock, rheumatoider Arthritis und entzündlichen Darmerkrankungen [86].

Aktiviertes NF- $\kappa$ B ist ein Marker im humanen rheumatoiden Arthritis-Synovium [87]. Das Synovium, eine dünne Gewebsschicht, die den Gelenkraum auskleidet, erzeugt im aktiven Krankheitsstadium nicht genug Antagonisten, um die Effekte von IL-1 zu inhibieren. Diese gesteigerte IL-1-Produktion führt zur vermehrten Osteoklastenbildung und schließlich zur Knochenresorption [88].

Ulcerative Colitis und Morbus Crohn sind entzündliche Darmerkrankungen, die durch infiltrative Läsionen der Darmwand charakterisiert sind. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in allen Schichten der entzündeten Areale der Crohn's Krankheit und der Einsatz von NF $\kappa$ B-Inhibitoren (Corticosteroide) bei Behandlung von entzündlichen Darmerkrankungen beweisen, dass NF- $\kappa$ B an der Pathogenese dieser Krankheiten beteiligt ist [89,90].

### 1.1.5 Homologe Signaltransduktionen zum IL-1RI-System

Der IL-1-Signalweg in Säugetieren ist ähnlich zu dem Toll-Signalweg in *Drosophila*. Toll zeigt Sequenzhomologie mit der cytoplasmatischen Domäne des IL-1RI [91] und induziert die Aktivierung von Dorsal (homolog zu NF- $\kappa$ B) [92]. Die Aktivierung von Dorsal wird durch den extrazellulären Liganden Spätzle (IL-1-Homolog) initiiert [93], der an den Rezeptor Toll bindet. Über das Adapterprotein Tube (homolog zu MyD88) und der Proteinkinase Pelle (IRAK-Homolog) wird Dorsal aktiviert [94]. Die IRAK zeigt Sequenzhomologie zur Kinase-Domäne von Pelle [42,95]. Pellino wurde ursprünglich als ein mit Pelle-assoziiertes Molekül in *Drosophila* identifiziert [96]. Das dem I $\kappa$ B-entsprechende Inhibitorprotein wird als Cactus bezeichnet. Dorsal reguliert die Genexpression für die Ausbildung der dorsoventralen Polarität des *Drosophila*-Embryos [95]. In adulten Tieren ist der Toll-Signalweg für die Immunantwort auf fungalen Befall hin verantwortlich [97].

Zum Toll-Rezeptor der *Drosophila* sind mittlerweile 13 strukturverwandte humane Toll-like Rezeptoren (TLR) bekannt [22]. Durch Erkennung spezifischer pathogener Produkte (PAMPs) spielen sie eine essentielle Rolle in der Aktivierung der angeborenen Immunität [98]. Die extrazelluläre Domäne der TLRs enthält 19-25 Tandemkopien einer Leucinreichen Wiederholungssequenz (LRR), die direkt in die Erkennung von verschiedenen Pathogenen involviert ist (Übersicht in [22]). TLR1 und TLR6 erfassen mikrobielle Lipopeptide. TLR2 und TLR4 antworten auf Komponenten von Zellwänden Gram-positiver bzw. Gram-negativer Bakterien. TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 erkennen Nukleinsäure-

ähnliche Strukturen, wie dsRNA, ssRNA bzw. bakterielle DNA. TLR5 vermittelt die Induktion der Immunantwort durch bakterielle Flagelline und TLR11 durch Erkennung von uropathogenen Bakterien. Die natürlichen Liganden der TLRs 10, 12 und 13 sind bis jetzt nicht bekannt. Die subzelluläre Lokalisation der TLRs korreliert mit einigen Ausnahmen mit den molekularen Mustern ihrer Liganden. TLR1, TLR2 und TLR4 sind auf der Zelloberfläche lokalisiert, wohingegen TLR7 und TLR9 in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten vorkommen [99,100]. Nach Ligandenbindung interagieren TLRs mit spezifischen TIR-domänen enthaltenden Adapterproteinen und der Kinase IRAK, was letztendlich zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B oder dem IFN-regulatorischen Faktor 3 (IRF-3) führt [22].

Das zum IL-1 verwandte proinflammatorische Zytokin IL-18 ist auch als IFN- $\gamma$ -induzierender Faktor bekannt. IL-18 vermittelt seine Immunantwort über den IL-18-Rezeptor [101], der aufgrund seiner Homologie zum IL-1R zunächst als IL-1Rrp (IL-1R related protein) bezeichnet wurde [102]. In Analogie zum IL-1RI-System formt bei der IL-18-Signaltransduktion der ligandengebundene IL-18R mit dem Co-rezeptor IL-18RAcP ein Heterodimer. An diesen Komplex bindet die IRAK und schließlich wird NF- $\kappa$ B aktiviert (Übersicht in [103]). Ein lösliches IL-18-Bindungsprotein unterdrückt die Signaltransduktion durch Abfangen des Liganden [104].

## 1.2 Mechanismen der Redoxregulation

Der Redoxstatus ist ein wichtiger Regulator der Signaltransduktion und Genexpression der Zelle. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden transient auf Wachstumsfaktoren- oder Zytokin-Stimulus hin produziert. Sie agieren in geringen, physiologischen Konzentrationen als Mediatoren in Prozessen der Immunantwort, Zellproliferation, Entzündung, Metabolismus, Alterung und Zelltod. Dagegen führt eine übermäßige ROS-Produktion zum oxidativen Stress, der durch Schädigung von Membranen, Proteinen, Lipiden und DNA charakterisiert ist [105].

### 1.2.1 Generierung und Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies

Zu den ROS zählen Hydroperoxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , ROOH) und freie Sauerstoffradikale wie das Superoxidanion ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). Die Hauptquelle für  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ist die NADPH-Oxidase [106,107]. Sie liefert auch indirekt Hydroperoxid, da  $\text{O}_2^{\bullet-}$  durch die Superoxiddismutase (SOD) zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Sauerstoff dismutiert wird:  $2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ . Der membranassoziierte Enzymkomplex der NADPH-Oxidase katalysiert die 1-Elektronen-Reduktion von  $\text{O}_2$  mit NADPH

als Elektronendonator:  $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2\text{O}_2^{\bullet-}$ . In Phagozyten formiert sich der NADPH-Oxidase-Komplex erst nach Stimulus und die gebildeten ROS werden in den Extrazellularraum abgegeben. Die endotheliale NADPH-Oxidase ist hingegen konstitutiv aktiv und ROS werden in den intrazellulären Raum freigesetzt [106]. Die phagozytäre NADPH-Oxidase besteht aus dem membranständigen Cytochrom  $\text{b}_{558}$ , einem Heterodimer aus den Glycoproteinen  $\text{gp91}^{\text{phox}}$  (Nox-2) und  $\text{p22}^{\text{phox}}$  und den Elektronenüberträgern Flavin und Häm. Nach Stimulation u. a. mit Zytokinen wird  $\text{p47}^{\text{phox}}$  von der Proteinkinase C phosphoryliert und formt mit  $\text{p67}^{\text{phox}}$  einen Komplex. Beide Untereinheiten werden mit  $\text{p40}^{\text{phox}}$  und dem kleinen GTP-bindenden Protein Rac an die Membran rekrutiert und bilden den aktiven Enzymkomplex [108]. Die NADPH-Oxidase von nicht-phagozytären Zellen hat den gleichen Aufbau mit entsprechenden  $\text{gp91}^{\text{phox}}$ -Homologen Nox 1, 3, 4 oder 5 und Doux 1 oder 2 [109].

Neben NADPH-Oxidasen sind Lipoxygenasen (LOX) und Cyclooxygenasen (COX) Hydroperoxid-produzierende Enzyme. LOX generieren Hydroperoxide durch Einbau von  $\text{O}_2$  in z. B. Arachidonsäure oder Linolensäure [110]. COX synthetisieren das Hydroperoxid Prostaglandin  $\text{G}_2$ , das nachfolgend zu weiteren Prostaglandinen, Prostacyclinen und Thromboxanen umgewandelt wird [111].

Zellen haben unterschiedliche Möglichkeiten mit ROS zu reagieren. Die SOD dismutiert  $\text{O}_2^{\bullet-}$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$ , welches peroxisomal durch die Katalase zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  umgesetzt wird. Cytosolische Hydroperoxide werden durch Peroxiredoxine (Prx) und Glutathionperoxidasen (GPx) reduziert. Prx, die ein oder zwei Cysteine im aktiven Zentrum besitzen, werden durch Thioredoxin (Trx) regeneriert [112]. Die Funktion von GPx ist die Reduktion von Hydroperoxiden unter Oxidation von Glutathion (GSH) zu Glutathiondisulfid (GSSG) [113]. GSH wird durch die Glutathion-Reduktase (GR) erneuert.

### 1.2.2 Modifikation von Proteinthiolen

ROS beeinflussen Signalkaskaden durch Oxidation von reaktiven Cysteinresten in Proteinen. Unter physiologischen Bedingungen sind die meisten Cysteine in der protonierten Form (SH) vorhanden. Der pK-Wert des freien Cysteins liegt bei 8,3, wohingegen der pK-Wert auf 8,8 - 9,1 erhöht ist, wenn Cysteine Bestandteile von Proteinen sind. Durch benachbarte basische Aminosäuren wie Lysin, Arginin und Histidin verringert sich der pK-Wert des Cysteins und es liegt dann als reaktives Thiolat ( $\text{S}^-$ ) vor. Cysteine im reduzierten Status (SH und  $\text{S}^-$ ) sind leichte Ziele von Modifikationen durch ROS oder elektrophile Substanzen. ROS mit hoher Reaktivität wie  $\text{OH}^\bullet$  oder  $\text{RO}^\bullet$  verursachen irreversible Modifikationen von Proteinen. Hydroperoxide wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder

ROOH modifizieren hingegen Proteinthiole reversibel. Eine direkte Oxidation von reaktiven Thiolgruppen durch ROOH bildet Sulfensäuren (1), was am Beispiel von Proteintyrosin-Phosphatasen gezeigt ist [114]. In Abwesenheit von GSH führt eine anschließende Oxidation irreversibel zur Sulfinssäure (2) oder Sulfonsäure (3) [115]. Durch reversible S-Glutathionylierung der Sulfensäure durch GSH (4) oder Thiolen mittels GSSG werden Proteine hingegen vor irreversibler Oxidation geschützt (5) [116].



Thiolreduktasen wie Trx und Glutaredoxin (Grx) reduzieren Protein-Disulfide [117]. Grx katalysiert Reaktionen nicht nur über einen Dithiol-Mechanismus, wie es Trx macht, sondern auch über einen Monothiol-Mechanismus. Dieser findet bei der Reduktion von glutathionylierten Proteinen statt (= Deglutathionylierung). Oxidiertes Trx benötigt zur Regeneration die Thioredoxin-Reduktase (TrxR) und NADPH. Oxidiertes Grx wird durch GSH reduziert, wobei entstehendes GSSG durch die NADPH-abhängige GR regeneriert wird.

Eine Modifizierung von Proteinthiolen findet ebenfalls durch Prx und GPx statt. Prx reagieren mit Proteinen des CXXC-Motivs [112]. Die Phospholipid-Hydroperoxid-GPx (PHGPx) agiert als Thioloxidase durch Vernetzung mit sich selbst oder mit anderen Proteinen unter Verwendung von Hydroperoxiden [118].

Eine Vielzahl von Proteinen wird durch Redoxprozesse reguliert. Eine Modifikation der Thiole der p50-Untereinheit von NF-κB durch Glutathionylierung [119], Oxidation oder Alkylierung [120] beeinträchtigt die DNA-Bindefähigkeit. Durch Oxidation von Cysteinresten im katalytischen Zentrum werden Tyrosin-Phosphatasen gehemmt [121,122]. Nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- oder Menadion-Behandlung wurden u. a. Cytoskelett-Proteine wie Actin glutathionyliert und somit vor irreversibler Oxidation geschützt [123,124].

### 1.2.3 Wirkungen von thiolmodifizierenden Substanzen

Cysteine reagieren mit ROS, ebenso wie mit Metallen und thiol-spezifischen Agenzien. Die in dieser Arbeit verwendeten thiolmodifizierenden Substanzen werden hinsichtlich der Mechanismen ihrer Reaktion mit Thiolen vorgestellt.

## 1.2.3.1 Menadion, Phenylarsinoxid, Diamid und Pyrrolidindithiocarbamat

Menadion (MD), Phenylarsinoxid (PAO), Diamid (DA) und Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) sind synthetische Substanzen (Abb. 3), die auf verschiedenen Wegen den Redoxstatus der Zelle beeinflussen.

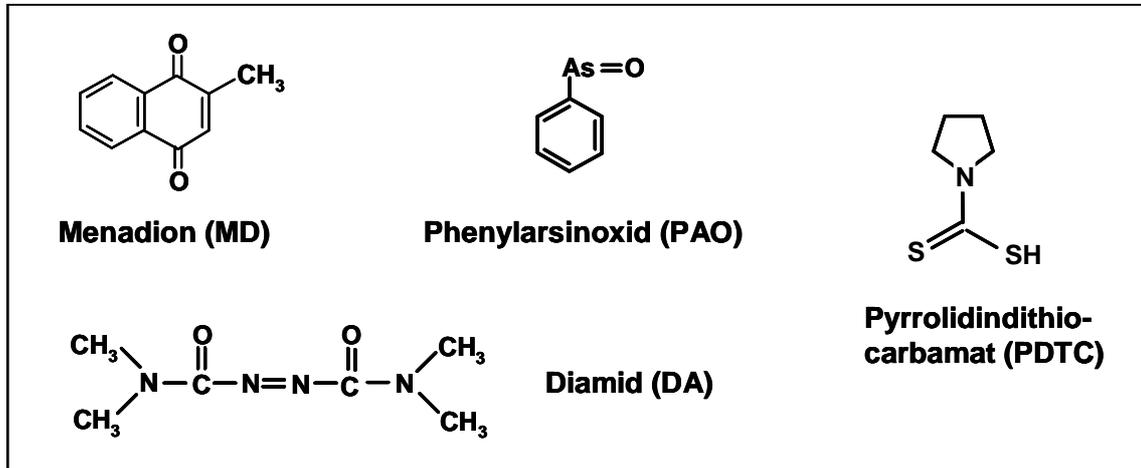


Abb. 3: Strukturformeln von Menadion, Phenylarsinoxid, Diamid und Pyrrolidindithiocarbamat

Menadion (MD, Vitamin K<sub>3</sub>) ist ein Chinon und agiert intrazellulär sowohl durch direkte Proteinmodifikation als auch durch Redoxcycling. Die direkte Reaktion von MD mit Proteinen erfolgt durch Arylierung reaktiver Thiole [125]. Beim Redoxcycling sind zwei Wege bekannt. Durch einen 1-Elektronen-Transfer mittels Cytochrom P450 Enzyme wird MD zum Semichinonradikal reduziert. Das Semichinonradikal transferiert anschließend Elektronen auf O<sub>2</sub>, wobei O<sub>2</sub><sup>•-</sup> und reoxidiertes Chinon entstehen [126]. Die 2-Elektronen-Reduktion, die durch die NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase (NQO1) katalysiert wird, führt zur Bildung des Hydrochinons. Durch extrazelluläre Autoxidation des Hydrochinons zum Chinon generiert MD ROS [127].

Phenylarsinoxid (PAO) ist eine dreiwertige Arsen-Verbindung, die speziell mit vicinalen Thiolen Dithioarsinderivate bildet und eine geringere Affinität zu Monothiolen hat [128]. PAO ist ein spezifischer Inhibitor von Protein-Tyrosin-Phosphatasen, der essentielle vicinale SH-Gruppen im katalytischen Zentrum der betreffenden Enzyme blockiert [129]. Der inhibitorische Effekt von PAO ist nur durch starke Reduktionsmittel reversibel, die vicinale Thiole wie Dithiothreitol (DTT) oder Dimercaptopropanol (DMP) enthalten [130,131].

Diamid (DA) ist eine Diazocarbonylverbindung und reagiert mit Thiolatanionen. Es formiert je nach Reaktionspartner oxidiertes Glutathion (GSSG), gemischte Disulfide zwischen GSH und Proteinen oder Disulfide mit niedermolekularen Thiolen, wobei DA vorrangig mit GSH reagiert und nur langsam mit Proteinthiolen [132].

Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) ist ein starker Metallchelator [133] und hemmt einerseits metallabhängige Enzyme und andererseits Enzyme mit essentiellen SH-Gruppen. Dies geschieht durch kovalente Interaktion von PDTC mit freien Thiolen unter Ausbildung gemischter Disulfide [134]. Früher wurde PDTC als Antioxidans betrachtet, da es die TNF- oder IL-1-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B inhibierte [135]. PDTC übt aber vielmehr prooxidative Effekte aus. Es depletiert den GSH-Gehalt durch Oxidation des GSH zu GSSG und erhöht somit den zellulären GSSG-Gehalt [133,136].

### 1.2.3.2 Curcumin

Im Gegensatz zu den bereits vorgestellten synthetischen Agenzien ist Curcumin (Diferuloylmethan) (Abb. 4) eine Substanz pflanzlichen Ursprungs. Die Gelbwurz (*Curcuma longa*) enthält neben Turmerin (wasserlösliches Peptid), ätherische Öle (Turmerone, Atlantone, Zingiberene) auch Curcuminoide (gelbe Pigmente). Curcuminoide sind aus der Wurzel gewonnene polyphenolische Verbindungen, von denen Curcumin die aktivste Komponente darstellt. Vor allem ist Curcumin für seine antikanzerogenen Wirkungen bekannt, indem es in verschiedenen Krebszelllinien die Proliferation inhibiert und Apoptose induziert [137]. Durch die  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigte Carbonylgruppe ist Curcumin elektrophil und somit in der Lage, Thiole zu modifizieren [138]. Über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 induziert es die Expression von antioxidativen und/oder detoxifizierenden Phase-II-Enzymen wie z. B. der Hämoxxygenase-1 (HO-1) [139].

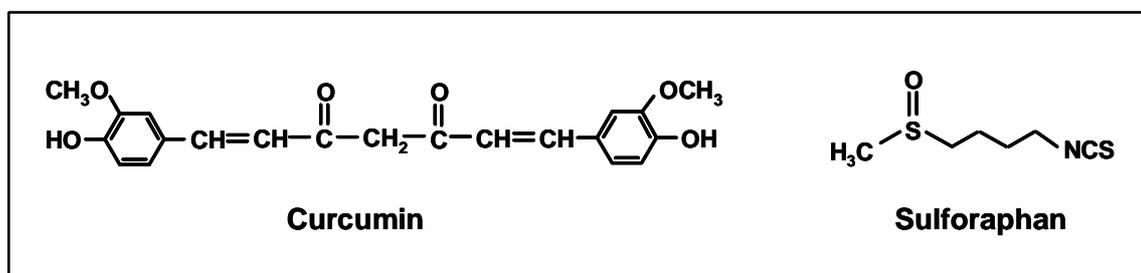


Abb. 4: Strukturformeln von Curcumin und Sulforaphan

### 1.2.3.3 Sulforaphan

Sulforaphan (Abb. 4) ist ein Isothiocyanat (ITC) und als Glucosinolat (Glucoraphanin) Bestandteil des Broccolis. Durch eine enzymatische Reaktion der pflanzenspezifischen Myrosinase oder der Darmflora wird die Glucose abgespalten und Sulforaphan freigesetzt. Sulforaphan kann durch das elektrophile C-Atom der  $-N=C=S$ -Gruppe mit verschiedenen Thiolen konjugieren, vorwiegend mit zellulärem GSH, das zur Bildung von Dithiocarbamaten führt. Chemopräventive Wirkungen von ITC sind (i) die Inhibition der metabolischen Aktivierung von Karzinogenen durch Cytochrom P450s (Phase-I) und (ii) die Induktion von Phase-II-Enzymen (Übersicht in [140]). Die Induktion von Phase-II-Enzymen wird durch das ARE (antioxidant response element) vermittelt, welches durch Nrf2 reguliert wird. Sulforaphan modifiziert Thiole des Nrf2-inhibitorischen Proteins Keap1, was zur Inhibition der Keap1-abhängigen Degradierung von Nrf2, somit zu dessen Stabilisierung und zur nukleären Translokation führt [141,142].

### 1.2.4 Modulation proinflammatorischer Signalkaskaden

Die Art von ROS, die durch IL-1-Stimulation produziert werden, hängt vom Zelltyp ab. IL-1 generiert in Neutrophilen durch Aktivierung der phagozytären NADPH-Oxidase  $O_2^{\bullet-}$  und dadurch eine oxidative Explosion (oxidative burst) [143]. Stimulationen von lymphoiden oder Astrogliazellen mit IL-1 führen durch die 5-Lipoxygenase zur  $O_2^{\bullet-}$ -Produktion [144,145]. Eine kontinuierliche Produktion von geringen  $O_2^{\bullet-}$ -Mengen werden in IL-1-stimulierten Endothel- [146], Fibroblast- [147] und glatten Muskel-Zellen [148] detektiert. Die Notwendigkeit der ROS für die Signaltransduktion wurde durch Inhibition der ROS-Generierung ermittelt. Die Folge war eine vollständige Blockade von stimulations-abhängigen Signalen [149].

Die Beteiligung von reduzierten Thiolen an intermediären Ereignissen der IL-1-Signalkaskade wie die Aktivierung der IKK und späten Prozessen wie die Expression von NF- $\kappa$ B-Zielgenen wurde durch thiolmodifizierende Substanzen gezeigt. Die IL-1- oder TNF- $\alpha$ -induzierte Aktivierung der IKK wird durch direkte Oxidation von Cysteinresten im IKK-Komplex durch  $H_2O_2$  gehemmt [150]. Thiolreduzierende Agenzien (NAC, DTT,  $\beta$ -ME) steigern die IL-1- und TNF- $\alpha$ -abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B, wohingegen thiol-oxidierende oder alkylierende Substanzen (DA, NEM, DEM, CDNB) einen inhibitorischen Effekt zeigen [151]. MD oder PAO inhibieren ebenfalls die IL-1-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B [152]. Die IL-1- und TNF- $\alpha$ -vermittelte Expression von E-Selektin wird durch

Vorbehandlung von HUVEC-Zellen mit thiolmodifizierenden/thioloxidierenden Agenzien wie DA, PAO, NEM oder Diethylmaleat inhibiert [131].

Die nahrungsrelevanten Substanzen Curcumin und Sulforaphan sind bekannt für ihre entzündungshemmenden Effekte, die auf der Ebene von intermediären und späten Ereignissen proinflammatorischer Signalkaskaden untersucht worden sind. Der antiinflammatorische Effekt von Curcumin zeigt sich in der Inhibition der Aktivierung der IKK, damit der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und letztendlich der Expression von interzellulärem Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) oder COX-2 [153-156]. Sulforaphan hemmt die LPS-vermittelte Phosphorylierung von I $\kappa$ B und Aktivierung von NF- $\kappa$ B [157]. Die LPS-induzierte Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS)- und COX-2 [158] und die LPS-abhängige Produktion und Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und NO [159] sind ebenfalls in Sulforaphan-behandelten Macrophagen oder Gliazellen blockiert. Bis heute liegen keine Daten vor, die sich mit dem Einfluss von Curcumin oder Sulforaphan auf frühe Ereignisse proinflammatorischer Signalkaskaden beschäftigen.

### 1.3 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollten mögliche redoxensitive Proteine am IL-1RI ermittelt und redoxaktive Substanzen auf ihre Wirksamkeit getestet werden, Ereignisse am IL-1RI durch Änderung des zellulären Redoxstatus oder durch direkte Proteinmodifikation zu beeinflussen. Vorausgehende Untersuchungen zeigten, dass durch thiomodifizierende Agenzien intermediäre und späte Ereignisse der IL-1-Signalkaskade inhibiert sind. Somit wurde eine Blockierung der Signaltransduktion oberhalb von IKK vermutet. Der Ansatzpunkt hierfür war eine frühere Arbeit, in der Aktivierungen IL-1RI-assoziiierter Kinasen durch MD, PAO, DA oder PDTTC in EL-4- [152] und ECV-Zellen [160] gehemmt wurden. Eine transiente Kinase des IL-1RI-Komplexes ist die IRAK, die insofern als mögliches Ziel von Interesse war. Als Zellmodell standen EL-4-Zellen mit stabil überexprimierter IRAK (EL-4<sup>IRAK</sup>) zur Verfügung. Folgende Aufgaben sollten bearbeitet werden:

- (i) Die Identifikation von Proteinen mit freien Thiolen am IL-1RI und die Ermittlung von weiteren rezeptorgebundenen Proteinen.
- (ii) Die Ursache der Hemmung der Aktivierung IL-1RI-assoziiierter Kinasen durch MD, PAO, DA und PDTTC.
- (iii) Die Wirkung nahrungsrelevanter und redoxaktiver Substanzen auf die Bildung des IL-1RI-Komplexes als ein frühes Ereignis. Die daraus erzielten Ergebnisse sollten so ihre beobachteten antiinflammatorischen Effekte erklären.

## 2 Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Kultivierung von Zellen

Folgende Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet:

- CaCo-2: humane epitheliale Colonkarzinomzelllinie
- EL-4 6.1: murine Thymomzelllinie
- EL-4<sup>IRAK</sup>: EL-4 6.1 stabil transfizierte Einzellklone, welche die humane IRAK überexprimieren (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. M. U. Martin, Universität Gießen)
- EVC 304: humane epitheliale Harnblasenkarzinomzelllinie
- HepG2: humane epitheliale Leberkarzinomzelllinie.

Die Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C in 95 % gesättigter Wasserdampf-Atmosphäre und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

##### 2.1.1.1 EL-4- und EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen

Die Suspensionszelllinien EL-4 und EL-4<sup>IRAK</sup> wurden alle zwei bis drei Tage in T75-Zellkulturflaschen (Nunc) passagiert, um eine Zelldichte von 0,5 bis 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml zu erhalten. Die Aussaat erfolgte in T175-Zellkulturflaschen für zwei bis drei Tage. Zur Selektion der stabil transfizierten Klone der EL-4<sup>IRAK</sup>-Zelllinie wurde dem Medium 400 µg/ml G418 (Calbiochem) hinzugefügt.

- Kultivierungsmedium: RPMI 1640 (Invitrogen), 5% FCS (Biochrom), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,5 x nichtessentielle Aminosäuren, 0,5 mM Pyruvat (alles von Invitrogen) und 50 µM β-Mercaptoethanol (Roth), pH 7,1, steril filtriert

##### 2.1.1.2 CaCo-2-, ECV- und HepG2-Zellen

Diese adhärenenten Zelllinien wurden alle drei bis vier Tage zur Erhaltung in T175-Zellkulturflaschen passagiert. Zum Umsetzen der Zellen wurde das Medium abgegossen, der Zellrasen mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung im Brutschrank 5 min inkubiert. Der Prozess wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt. Die trypsinierten Zellen wurden zentrifugiert (200 g, 8 min, RT) und mit Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät.

- Kultivierungsmedium CaCo-2-Zellen: DMEM high glucose, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1 x nichtessentielle Aminosäuren (alles von Invitrogen), pH 7,3, steril filtriert
- Kultivierungsmedium ECV-Zellen: M199 (Biochrom), 5% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (alles von Invitrogen) und 5 mM HEPES, pH 7,4, steril filtriert
- Kultivierungsmedium HepG2-Zellen: RPMI 1640, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin (alles von Invitrogen), pH 7,1, steril filtriert
- Trypsin-EDTA-Lösung: 0,05% Trypsin (Biochrom) und 0,02% EDTA (Sigma) in PBS, pH 7,4, steril filtriert
- PBS: 14 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, autoklaviert

#### 2.1.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden  $1 \times 10^7$  Zellen in 1 ml Einfriermedium (Kultivierungsmedium mit 20% FCS und 10% DMSO (Sigma)) resuspendiert, in Cryoröhrchen (Roth) überführt und in einem Behälter, der Isopropanol enthielt, bei -80°C über Nacht eingefroren (Einfriergeschwindigkeit: 1°C/min). Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigen Stickstoff. Die Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in erwärmtes Kultivierungsmedium überführt und zentrifugiert (200 g, 8 min, RT). Das Zellpellet wurde in Kultivierungsmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt.

### 2.1.2 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstests

#### 2.1.2.1 Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde 1:2 mit Trypanblau-Lösung verdünnt und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Vitale Zellen nehmen den Farbstoff Trypanblau nicht auf, für den die intakte Plasmamembran eine undurchdringliche Barriere darstellt. Tote Zelle hingegen weisen Löcher in der Plasmamembran auf, der blaue Farbstoff diffundiert in das Innere der Zelle und färbt sie blau.

- Trypanblau-Lösung: Trypanblau (0,4%, Sigma) 1:3 mit PBS verdünnt

### 2.1.2.2 Neutralrot-Test

Neutralrot ist ein wasserlöslicher, basischer Farbstoff, der über Diffusion in die Lysosomen intakter Zellen aufgenommen wird. Schädigungen der Zellmembran und der lysosomalen Membran verursachen eine verringerte Farbstofffixierung. Die vorbehandelten Zellen wurden mit der Neutralrot-Lösung resuspendiert und in eine 96-well Platte (200 µl/well) für 3 h ausgesät. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Lysepuffer (100 µl/well) 30 min schüttelnd lysiert und die Extinktion bei 550 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) ermittelt.

- Neutralrot-Lösung: Neutralrot (0,4%, Sigma) 1:50 mit RPMI 1640 Medium verdünnt
- Lysepuffer: 50% Ethanol, 1% Essigsäure

### 2.1.2.3 MTT-Test

Der Einfluss von Substanzen auf die Proliferationsrate von Zellen wurde durch Messung der Aktivitäten mitochondrialer Dehydrogenasen bestimmt. Diese Methode beruht auf der enzymatischen Reduktion des löslichen, gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) zu einem blauen, unlöslichen Formazan, die nur in lebenden Zellen abläuft. Die EL-4-Zellsuspension wurde mit Sulforaphan vorinkubiert und anschließend in eine 96-well Platte (200 µl/well) pipettiert. Nach Aussaat in einer 96-well Platte für 24 h wurden CaCo-2-Zellen mit Sulforaphan behandelt. MTT-Lösung (20 µl/well) wurde hinzugegeben und 40 min bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde entfernt, die Zellen 10 min schüttelnd mit Lysepuffer (100 µl/well) lysiert und die Extinktion bei 550 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) gemessen.

- MTT-Lösung: 5 mg/ml MTT (Sigma) in PBS gelöst
- Lysepuffer: 95% Isopropanol, 5% Ameisensäure

## 2.1.3 Vorinkubation der Zellen mit thiolmodifizierenden Agenzien und IL-1-Stimulation

### 2.1.3.1 Vorinkubation der Zellen mit MD, PAO, DA, PDTTC, Curcumin

$2 \times 10^7$  EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden in 25 ml (10 ml bei Curcumin) serumfreien Kultivierungsmedium aufgenommen und mit der jeweiligen Substanz (alle von Sigma) oder dem entsprechenden Lösungsmittel bei 37°C für die angegebene Zeit im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das überschüssige Agens durch Zentrifugieren (200 g, 8 min, RT) entfernt

und das Zellpellet für eine anschließende IL-1-Stimulation in serumfreien Medium aufgenommen.

- MD (15 min): 125 mM Stammlösung in DMF (Sigma), final 50  $\mu$ M
- PAO (30 min): 12,5 mM Stammlösung in DMSO, final 1  $\mu$ M
- DA (45 min): 500 mM Stammlösung in H<sub>2</sub>O, final 500  $\mu$ M
- PDTC (30 min): 100 mM Stammlösung in H<sub>2</sub>O, final 100  $\mu$ M
- Curcumin (15 min): 20 mM Stammlösung in Ethanol, final 1 - 50  $\mu$ M

### 2.1.3.2 Vorbehandlung der Zellen mit Sulforaphan

0,8x10<sup>6</sup> EL-4- oder EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen/ml wurden in serumfreien Medium aufgenommen und mit Sulforaphan (Alexis) im Brutschrank inkubiert (4 - 24 h). Anschließend wurde das überschüssige Sulforaphan durch Zentrifugation (200g, 8 min, 4°C) der Zellen entfernt, die Zellen lysiert (Proteinnachweis) oder die RNA isoliert.

- Aussaat RNA-Isolierung: 12-well Platten mit 3 ml Medium
- Aussaat Proteinnachweis: 6-well Platten mit 10 ml Medium

1x10<sup>6</sup> CaCo-2-Zellen wurden in 6-well Platten für 3 d ausgesät und anschließend mit 5  $\mu$ M Sulforaphan (4 - 48 h) im Brutschrank inkubiert. Die mit PBS-gewaschenen und trypsinisierten Zellen wurden für den Proteinnachweis lysiert oder die RNA isoliert.

- Sulforaphan: 5 bzw. 15 mM Stammlösung in DMSO, final 1 - 50  $\mu$ M

### 2.1.3.3 Stimulation der Zellen mit IL-1

2x10<sup>7</sup> EL-4- oder EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden in 4 ml serumfreien Kultivierungsmedium mit 5 ng/ml rekombinantem humanem (rh)IL-1 $\beta$  (GBF, Braunschweig) für 5 - 120 min bei 37°C stimuliert. Die Reaktion wurde auf Eis gestoppt und überschüssiges IL-1 $\beta$  wurde durch zweimaliges Waschen (200 g, 8 min, 4°C) mit eiskaltem PBS entfernt.

## 2.2 Präparation von Cytosol- und Kernfraktionen

### 2.2.1 Herstellung von Lysaten

#### 2.2.1.1 EL-4- und EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen

Eine Lyse mit milden nicht ionischen Detergenzien ermöglicht ein schonendes Solubilisieren von Membranproteinen. Die geringe NaCl-Konzentration gewährleistet den Zusammenhalt des IL-1RI-Komplexes und erlaubt somit eine Untersuchung von IL-1RI-assoziierten Proteinen. Vorbehandelte und IL-1-stimulierte Zellen wurden im eiskalten

Lysepuffer ( $2 \times 10^7$  Zellen/ml) für 30 min bei 4°C rotierend lysiert und anschließend zentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4°C). Der Überstand (Lysat) wurde für Immunpräzitationen weiterverwendet und das nichtsolubilierte Kernpellet verworfen.

- Lysepuffer: 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,4, frisch zugeben: 1% Brij 97 (Sigma), 5 mM EDTA, Protease-Inhibitoren Pepstatin (1 µg/ml, Calbiochem) und Pefabloc® (1 mM, Roth)

#### 2.2.1.2 CaCo-2-Zellen

Im Gegensatz zu den EL-4- und EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden zelluläre Proteine aus CaCo-2-Zellen mit dem Detergens Nonidet-P40 isoliert. Die behandelten Zellen wurden mit 500 µl/well RIPA-Puffer für 15 min auf Eis lysiert. Nach der Zentrifugation (20.800 g, 15 min, 4°C) enthielt der Überstand die löslichen Proteine.

- RIPA-Puffer: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 0,1% SDS (Serva), 0,5% Natrium-Desoxycholat (Sigma), 1% Nonidet-P40 (Sigma), pH 7,8

### 2.2.2 Präparation von Kernextrakten

#### 2.2.2.1 EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen

Zur Isolierung von Kernproteinen wurden die Zellen in Cytosol- und Kernfraktion getrennt.  $2 \times 10^7$  Zellen wurden nach Vorbehandlung und IL-1-Stimulation in 1,2 ml Lysepuffer (0,1% Brij) für 15 min bei 4°C rotierend lysiert. Die cytosolischen Proteine wurden abgetrennt (6.800 g, 30 sec, 4°C) und das Pellet einmal mit 500 µl Lysepuffer gewaschen. Die Kernproteine wurden mit 75 µl Kernextraktionspuffer durch kräftiges Resuspendieren des Pellets von der DNA extrahiert. Nach 15 min Schütteln im Eppendorfmixer bei 4°C und Zentrifugieren (15.000 g, 5 min, 4°C) enthielt der Überstand die Kernproteine.

- Kernextraktionspuffer: 20 mM HEPES, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7,9, frisch zugeben: 1 mM DTT (Roth) und 1 mM PMSF (Sigma)

#### 2.2.2.2 CaCo-2-Zellen

Die durch Trypsinieren geernteten  $1 \times 10^7$  CaCo-2-Zellen wurden in 1,2 ml Homogenisationspuffer für 7 min bei 4°C rotierend lysiert. Der Überstand enthielt nach dem Zentrifugieren (6.800 g, 1 min, 4°C) die cytosolischen Proteine. Das Pellet wurde in 100 µl Kernlysepuffer resuspendiert und nach Zugabe von 6,25 µl 5 M NaCl für 30 min auf Eis lysiert. Das Kernlysate wurde durch Zentrifugieren (20.800 g, 30 min, 4°C) gewonnen.

- Homogenisationspuffer: 10 mM Hepes, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, pH 7,9, frisch zugegeben: 0,1 % Nonidet-P40, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF
- Kernlysepuffer: 40 mM Hepes, 400 mM KCl, 10% Glycerol, pH 7,9, frisch zugegeben: 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF

### 2.2.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts von Zelllysaten und Kernextrakten erfolgte mit einer modifizierten Methode nach Bradford [161]. 10 µl jeder Probe wurden in eine 96-well Platte pipettiert und mit 200 µl 1:5 verdünnter Coomassie-Brilliant-Blau G-250-Farblösung (BioRad) gemischt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 630 nm gemessen. Als Standardprotein zur Ermittlung der Eichgeraden wurde bovines Serumalbumin (BSA) (BioRad) in bekannter Konzentration verwendet. Zur Bestimmung des Proteingehalts in Zellkernen wurden Kernextrakte und BSA-Standards in 0,1 N NaOH verdünnt.

## 2.3 Immunpräzipitation

Zur Anreicherung von Proteinen aus Zelllysaten oder zur Untersuchung von Interaktionspartnern im IL-1RI-Komplex wurden entsprechende Proteine immunpräzipitiert. Das Lysat aus  $2 \times 10^7$  Zellen oder 150 µg Kernextraktprotein wurden mit dem jeweiligen Antikörper (Tabelle 1) 1 h rotierend bei 4°C inkubiert und der Immunkomplex mit 30 µl ProteinG-Sepharose-Suspension (Amersham Biosciences) über Nacht bei 4°C präzipitiert. Die ProteinG-Sepharose wurde zuvor mit 0,5% BSA (Sigma) in Lysepuffer gewaschen (960 g, 5 min, 4°C), um unspezifische Bindungstellen zu blockieren, und anschließend 1:2 mit Lysepuffer verdünnt (= ProteinG-Sepharose-Suspension).

- Lysepuffer: 50 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,4

Antikörper (AK)	Spezies	Firma	Menge an AK [µg]
IL-1RI	Ratte	BD Pharmingen	1,00
IRAK	Kaninchen	Biomol (Upstate)	0,35
MyD88 (H-296)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	1,00
Tollip	Ratte	Alexis	0,25
Tropomyosin (E-17)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	1,00

**Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Immunpräzipitation**

## 2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

### 2.4.1 Eindimensionale Gelelektrophorese

Proteine aus Lysaten oder Immunpräzipitaten wurden mit der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli aufgetrennt [162]. Zur Auftrennung wurde zuerst in die Minigelkammer (Biometra) ein 1 mm 7,5 - 12,5%iges Trenngel und anschließend ein 5%iges Sammelgel gegossen. Die in 30 µl reduzierenden Lämmli-puffer denaturierten (5 min, 95°C) Proteine wurden in je eine Probentasche aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer Stromstärke von 15 mA. Zur Ermittlung der Molekulargewichte von Proteinen liefen Proteinstandards in bekannter Größe mit.

- Trenngel: 7,5 – 12,5% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1, Roth), 0,375 M Tris, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% Ammoniumpersulfat (Merck), 0,1% TEMED (Serva)
- Sammelgel: 5% Acrylamid/Bisacrylamid, 0,125 M Tris, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% Ammoniumpersulfat, 0,1% TEMED
- reduzierender Lämmli-puffer: 62,5 mM Tris, pH 6,8, 10% Glycerin (Roth), 2% SDS, 2,5% β-Mercaptoethanol, 0,05% Bromphenolblau (Roth)
- Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris, 200 mM Glycin (AppliChem), 0,1% SDS
- [<sup>14</sup>C]-methylierter Proteinstandard (Amersham Biosciences): 1:8 verdünnt mit reduzierendem Lämmli-puffer, 30µl/Gel
- Kaleidoskop vorgefärbter Standard (BioRad): 10 µl/Gel
- Präzision Plus Proteinstandard, zweifarbig (BioRad): 5 µl/Gel

### 2.4.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) verwendet, um IL-1RI-assoziierte Proteine nach isoelektrischem Punkt (1. Dimension) und Molekulargewicht (2. Dimension) aufzutrennen. Das IL-1RI-Immunpräzipitat wurde viermal mit je 125 µl Elutionspuffer bei 25°C im Thermomixer für 10 min schüttelnd und anschließender Zentrifugation (1.000 g, 2 min, 25°C) eluiert. Das Eluat wurde über ein Microcon-Filter (Millipore, Durchfluss 10 kD) konzentriert und in Rehydratisierungslösung im Verhältnis 1:2 aufgenommen, wobei das Gesamtvolumen maximal 250 µl betrug. Ein 13 cm langer IPG-Streifen (Amersham Biosciences) wurde mit der Probe über Nacht in einer Rehydratisierungsschale inkubiert. Die isoelektrische Fokussierung (IEF) erfolgte mit dem Multiphor II (Amersham Biosciences) über Nacht durch stufenweise Erhöhung der angelegten Spannung. Der IPG-Streifen wurde durch Versetzen mit Äquilibriumspuffer I und II für jeweils 15 min auf die zweite Dimension vorbereitet. Zur Auftrennung der Proben

wurde in die PROTEAN®II xi-Kammer (BioRAD) ein 1 mm 12,5%iges Trenngel ohne Sammelgel gegossen und der aufgelegte IPG-Streifen mit 0,5% Agarose (in Elektrophoresepuffer, Bromphenolblau) fixiert. Die Trennung erfolgte bei einer Stromstärke von 30 mA und kontinuierlicher Kühlung bei 20°C.

- Elutionspuffer: 9 M Harnstoff (Merck), 2% DTT
- Rehydratisierungslösung: 8 M Harnstoff, 2% CHAPS (Sigma), 0,5% Ampholyte pH-Bereich 3 - 10 (BioRad), 0,3% DTT, Bromphenolblau
- IEF-Bedingungen: 100 V (2 h), 300 V (11,5 h), 500 V (10 min), 1000 V (10 min), 1500 V (10 min), 2000 V (10 min), 2500 V (10 min), 3000 V (10 min), 3500 V (3,5 h)
- 10 ml Äquilibriumspuffer I: 6 M Harnstoff, 50 mM Tris, pH 8,8, 30% Glycerin, 2% SDS, 100 mg DTT, Bromphenolblau
- 10 ml Äquilibriumspuffer II: 6 M Harnstoff, 50 mM Tris, pH 8,8, 30% Glycerin, 2% SDS, 125 mg Iodacetamid (Sigma), Bromphenolblau

#### **2.4.3 Coomassie- und Colloidal-Coomassie-Färbung von Proteinen**

Proteine können in SDS-Gelele mittels Coomassie- oder Colloidal-Coomassie-Färbung nachgewiesen werden. Für die Coomassie-Färbung wurden SDS-Gele für 10 min in Coomassie-Färbelösung gelegt und mit Fixierlösung über Nacht entfärbt. Für die sensitivere Colloidal-Coomassie-Färbung wurden SDS-Gele in der genannten Färbelösung für mindestens 3 h inkubiert und über Nacht mit H<sub>2</sub>O entfärbt.

- Coomassie-Färbelösung: 0,1% Coomassie-Brilliant-Blau R-250 (Roth), 10% Essigsäure, 42,5% Ethanol, 5% Methanol
- Fixierlösung: 7% Essigsäure, 10% Methanol
- Colloidal-Coomassie-Färbelösung (Invitrogen): 20% Färber A, 5% Färber B, 20% Methanol

#### **2.4.4 Trocknen des SDS-Geles**

Nach der Färbung oder Fixierung der Proteine wurden SDS-Gele auf Filterpapier (Schleicher&Schuell) mittels Vakuumtrockner (Biometra) getrocknet. 2DE-SDS-Gele wurden vorher 30 min in Schrumpfpuffer inkubiert, um mögliches Einreißen während des Trocknens zu vermeiden. Proteingele für Massenspektrometrie-Analysen wurden zwischen zwei Lagen Cellophan (Roth) getrocknet.

- Schrumpfpuffer: 20% Methanol, 2% Glycerin

## 2.5 Western Blot

### 2.5.1 Elektrotransfer

Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine aus Lysaten oder Immunpräzipitaten wurden mit Hilfe des Semidry-Verfahrens auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Das SDS-Gel wurde 5 min in Blotpuffer B schwenkend inkubiert und der Blot wie folgt in die Hoefer®SemiPhor™ Blotapparatur (Pharmacia Biosciences) von Anode zu Kathode aufgebaut:

- zwei Lagen Filterpapier (Schleicher&Schuell) in Blotpuffer A äquilibriert
- eine Lage Filterpapier in Blotpuffer B äquilibriert
- Nitrocellulosemembran (Schleicher&Schuell) in Blotpuffer B äquilibriert
- SDS-Gel
- drei Lagen Filterpapier in Blotpuffer C äquilibriert

Der Elektrotransfer der Proteine erfolgte bei 4°C für 2 h bei einer Stromstärke von 1,2 mA/cm<sup>2</sup>. Die Transfer-Effizienz konnte durch reversibles Anfärben der Blotmembran mit einer PonceauS-Lösung überprüft werden.

- Blotpuffer A: 0,3 M Tris, 20% Methanol, pH 10,4
- Blotpuffer B: 0,025 M Tris, 20% Methanol, pH 10,4
- Blotpuffer C: 0,025 M Tris, 0,04 M Aminocaprinsäure (Sigma), pH 9,4
- PonceauS-Lösung: 0,1% PonceauS (Sigma), 5% Essigsäure

### 2.5.2 Chemilumineszenz-Detektion

Die unspezifischen Bindestellen auf der Nitrocellulosemembran wurden mit Hilfe einer Trockenmilch-Lösung für 1 h bei RT blockiert. Anschließend wurde der Blot mehrmals mit TTBS gewaschen und über Nacht mit dem Erstantikörper (Tabelle 2) in TTBS bei 4°C schwenkend inkubiert. Nach dem erneuten Waschen mit TTBS erfolgte die Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Zweitantikörper in TTBS für 1 h bei RT und einem erneuten Waschvorgang. Der Blot wurde mit dem Chemilumineszenz-Substrat SuperSignal West Dura (Perbio) überschichtet und Proteine mit dem Fuji LAS1000- bzw. 3000-CCD-Kamera System detektiert. Die Expression wurde mit Hilfe des Programms AIDA 4.1 (Fuji) quantitativ ausgewertet. Für einen dauerhaften Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen wurde der Blot in Fast-green-Färbelösung getaucht und überschüssige Farbe mit H<sub>2</sub>O abgespült.

- Trockenmilch-Lösung: 5% Magermilch-Trockenpulver in TTBS
- TTBS: 0,1% Tween20 (Sigma), 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5
- Fast-green-Färbelösung: 0,1% Fast green (Sigma), 10% Essigsäure, 30% Ethanol

- Kaninchen anti-Ziege HRP-gekoppelter Zweitantikörper (Chemicon): 1:50.000
- Schaf anti-Ratte-HRP-gekoppelter Zweitantikörper (Boehringer Mannheim): 1:5.000

Antikörper	Spezies	Firma	eingesetzte Verdünnung
Actin-Antiserum	Kaninchen	Sigma	1:100
IRAK-1 (H-273)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	1:200
MyD88 (H-296)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	1:200
Nrf2 (C-20)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	1:500
Tollip	Ratte	Alexis	1:500
Tropomyosin (E-17)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	1:200

**Tabelle 2: Verwendete Erstantikörper für den Western Blot**

## 2.6 *in vitro* Kinase Test

Im *in vitro* Kinase Test wurden präzipitierte endogene Substrate durch co-präzipitierte Kinasen phosphoryliert. Hierfür wurde das Immunpräzipitat pelletiert (960 g, 5 min, 4°C) und mit 500 µl Lysepuffer (ohne Proteaseinhibitoren) dreimal gewaschen (960 g, 2 min, 4°C). Mit einer Hamiltonspritze wurde der Lysepuffer vollständig entfernt und das Pellet dreimal mit 500 µl Kinasepuffer gewaschen. Das trockengezogene Pellet wurde in 45 µl Kinasepuffer resuspendiert und die *in vitro* Phosphorylierungsreaktion mit 1 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (Hartmann Analytic, Hannover) 10 min bei RT durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 500 µl Kinase-Stoppuffer beendet und nicht gebundenes [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP durch zweimaliges Waschen mit Kinase-Stoppuffer entfernt. Das trockengezogene Pellet wurde in 30 µl reduzierendem Lämmli-puffer denaturiert (5 min, 95°C) und der Überstand für die SDS-PAGE verwendet. Nach Auftrennung der Probe wurde das Proteingel 10 min fixiert und anschließend getrocknet. Phosphorylierte Proteine wurden durch Autoradiographie auf Kodak X-Omat Filme (Sigma) oder Phosphoimaging mittels Molecular Imager<sup>®</sup> FX (BioRad) ermittelt.

- Kinasepuffer: 20 mM Hepes, 100 mM NaCl, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,5
- Kinase-Stoppuffer: 20 mM Hepes, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 6,5
- Fixierlösung: 7% Essigsäure, 10% Methanol

## 2.7 Markierung von Proteinthiolen

Thiole von Cysteinresten in Proteinen können mit Hilfe von Iodoacetyl-[<sup>125</sup>I]-Iodotyrosin ([<sup>125</sup>I]-IAIT) markiert werden. Aus N-Chloracetyltyrosin und Natriumiodid wird durch Substitution des Chloratoms durch ein Iodatomb N-Iodoacetyltyrosin synthetisiert. In der

anschließenden Iodierung erfolgt der Einbau des radioaktiven Na- $^{125}\text{I}$ -Iodids in den Phenolring des N-Iodoacetyltyrosins. Durch Benzen wird das entstehende  $^{125}\text{I}$ -IAIT extrahiert.

### 2.7.1 Synthese von Iodoacetyl- $^{125}\text{I}$ -Iodotyrosin ( $^{125}\text{I}$ -IAIT)

$^{125}\text{I}$ -IAIT wurde nach der Methode von Gitler [128] mit folgenden Modifikationen synthetisiert. 25,7 mg N-Chloracetyltyrosin (Acros) und 30 mg über Nacht bei 110°C getrocknetes Natriumiodid (Sigma) wurden jeweils in 1 ml 2-Butanon (wasserfrei) gelöst. Je 200  $\mu\text{l}$  der Lösungen wurden gemischt, 10 min bei 86°C erhitzt und das präzipitierte NaCl abzentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde einmal mit kaltem 2-Butanon gewaschen, die jeweiligen Überstände vereinigt und auf 2 ml mit 2-Butanon aufgefüllt. 10  $\mu\text{l}$  des im Überstand befindlichen N-Iodoacetyltyrosins (= 0,1  $\mu\text{M}$ ) wurden unter Stickstoff eingedampft, mit 2 mCi Na- $^{125}\text{I}$ -Iodid (PerkinElmer) und 10  $\mu\text{l}$  ChloraminT-Lösung gemischt. Die Reaktion wurde nach 2 min durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Natrium-Metabisulfit-Lösung, 10  $\mu\text{l}$  Natriumiodid-Lösung und 10  $\mu\text{l}$  8 M HCl gestoppt. Synthetisiertes  $^{125}\text{I}$ -IAIT wurde mit 400  $\mu\text{l}$  Benzen/0,25% DMF (Sigma), durch 15 sec Vortexen und Zentrifugieren (350 g, 1 min, RT) extrahiert. 200  $\mu\text{l}$  des Benzenextraktes (obere organische Phase) wurden auf ca. 20 mg wasserfreiem Natriumsulfat (Fluka) gesammelt. Dieser Prozess wurde sechsmal mit jeweils 200  $\mu\text{l}$  Benzen/DMF wiederholt und die Überstände vereinigt. Der Gesamtextrakt wurde bei -20°C gelagert.

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Kieselgel beschichtete Aluminiumfolie; Laufmittel: Ethylacetat/DMF/Essigsäure im Verhältnis 6:4:0,1; Detektion durch Autoradiographie) wurde die Synthese von  $^{125}\text{I}$ -IAIT (Referenzwert: 0,92) überprüft. Die Aktivität (cpm) des  $^{125}\text{I}$ -IAITs wurde mittels Scintillationszähler (Beckmann) bestimmt.

- ChloraminT-Lösung: 5 mg/ml Chloramin T (Acros) in 0,5 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,5
- Natrium-Metabisulfit-Lösung: 12 mg/ml  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (Merck) in 0,05 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,5
- Natriumiodid-Lösung: 20 mg/ml über Nacht bei 110°C getrocknet in 0,05 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,5
- 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,5: 16 ml  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (27,6 g/l) und 84 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (53,65 g/l)

### 2.7.2 Markierung von Proteinthiolen mit [<sup>125</sup>I]-IAIT

Für die Markierung von Proteinthiolen wurden pro Ansatz  $1 \times 10^8$  Zellen verwendet. Eine Vorreinigung vor der Immunpräzipitation (IP) wurde durchgeführt, um an der ProteinG-Sepharose unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Hierfür wurden zu jedem Ansatz 25 µl ProteinG-Sepharose-Suspension gegeben. Nach 1 h Inkubation (4°C, rotierend) wurde mit dem Überstand (960 g, 5 min, 4°C,) die IP durchgeführt. Das Immunpräzipitat wurde pelletiert (960 g, 5 min, 4°C) und mit 500 µl Lysepuffer (ohne Proteaseinhibitoren) dreimal gewaschen. Mit einer Hamiltonspritze wurde der Lysepuffer vollständig entfernt und das Pellet dreimal mit 500 µl Hepes-Waschpuffer gewaschen. Zum trocken gezogenen Pellet wurde 40 µl [<sup>125</sup>I]-IAIT-Lösung gegeben und 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 500 µl Hepespuffer gestoppt und nicht gebundenes [<sup>125</sup>I]-IAIT durch zweimaliges Waschen mit Hepespuffer entfernt. Das trocken gezogene Pellet wurde in 30 µl reduzierendem Lämmli-puffer denaturiert (5 min, 95°C) und der Überstand für die SDS-PAGE verwendet. Nach Auftrennung der Proteine wurde das Gel fixiert, getrocknet und [<sup>125</sup>I]-IAIT-markierte Proteine durch Autoradiographie auf Kodak BioMax MS Filme (Sigma) detektiert.

- [<sup>125</sup>I]-IAIT-Lösung: 10 µCi [<sup>125</sup>I]-IAIT wurden unter N<sub>2</sub> eingedampft und in 40 µl Hepespuffer aufgenommen
- Hepespuffer: 50 mM Hepes, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4
- Hepes-Waschpuffer: 50 mM Hepes, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4

## 2.8 Quantifizierung der [<sup>125</sup>I]-IL-1 Bindung an den IL-1RI

Nach Vorinkubation der Zellen mit Curcumin wurde die Bindung von IL-1 an den IL-1RI der Zellen mit Hilfe von ChloraminT [<sup>125</sup>I]-markiertem IL-1α bestimmt.

### 2.8.1 Iodierung von IL-1α mit Na-[<sup>125</sup>I]-Iodid

IL-1α wurde mit Na-[<sup>125</sup>I]-Iodid nach der Methode von Greenwood [163] synthetisiert. 25 µl IL-1α-Lösung wurde mit 40 µl ChloraminT-Lösung gemischt und 2 min bei RT inkubiert. 1 mCi Na-[<sup>125</sup>I]-Iodid (Hartmann Analytic, Hannover) wurde dazu pipettiert und die Reaktion nach 20 sec durch Zugabe von 30 µl Natrium-Metabisulfid-Lösung und 50 µl Kaliumiodid-Lösung gestoppt. Der Ansatz wurde mit 300 µl PBS/0,2% Gelatine verdünnt und auf eine mit PBS/0,2% Gelatine äquilibrierte Sephadex G-25 Säule aufgetragen, um das freie Na-[<sup>125</sup>I]-Iodid vom [<sup>125</sup>I]-markierten IL-1α zu trennen. Das Reaktionsgefäß wurde einmal mit 300 µl PBS/0,2% Gelatine gespült und die Fraktionen à 1 ml gesammelt. 20 µl

jeder Probe wurden im Szintillationszähler gemessen und anschließend je 10 µl über ein 15%iges SDS-Gel aufgetrennt, um zu ermitteln, in welcher Fraktion sich das [<sup>125</sup>I]-markierte IL-1α befindet.

- IL-1α-Lösung: 1 µg IL-1α (GBF, Braunschweig) in 25 µl 0,5 M Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,5
- ChloraminT-Lösung: 1 mg/ml ChloraminT in 0,5 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,5
- Natrium-Metabisulfid-Lösung: 1 mg/ml Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in H<sub>2</sub>O
- Kaliumiodid-Lösung: 10 mg/ml in H<sub>2</sub>O

### 2.8.2 [<sup>125</sup>I]-IL-1α-Bindungstest

Die vorbehandelten Zellen wurden pelletiert (200 g, 5 min, 4°C) und in 1 ml kaltem Bindemedium resuspendiert. 0,2 µCi [<sup>125</sup>I]-IL-1α (106 fmol) wurden zu jedem Ansatz hinzugefügt und 3 h bei 4°C rotiert. Zur Konkurrenz wurde 30 min vorher ein 300-facher molarer Überschuss an kaltem IL-1α oder IL-1β zugegeben. Nachfolgend wurden die Zellpellets (200 g, 5 min, 4°C) zweimal mit 1 ml Bindemedium gewaschen, in 500 µl Bindemedium aufgenommen und auf ein 350 µl Phtalsäureestergemisch pipettiert. Durch Zentrifugation (8.800 g, 2 min, 4°C) wurde nicht gebundenes [<sup>125</sup>I]-IL-1α von den Zellen getrennt und das Zellpellet anschließend im Szintillationszähler gemessen.

- Bindemedium: RPMI 1640, 5% FCS, 1% BSA, 0,1% NaN<sub>3</sub> (Merck), 20 mM Hepes, pH 7,4
- Phtalsäureestergemisch: Phtalsäure-bis-2-ethylhexylester : Phtalsäuredibutylester im Verhältnis 1:1,5 (Fluka)

## 2.9 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

Die mit dem IL-1RI präzipitierten Proteine wurden durch Matrix-unterstützte Laser-desorption-Ionisation (MALDI)- oder Elektronenspray-Ionisation-Quadropol-Time-of-Flight (ESI-Q-TOF)-Massenspektrometrie identifiziert. Für die MALDI-Analyse wurden Protein-spots aus zweidimensional aufgetrennten SDS-Gelen ausgeschnitten und bei TopLab (Martinsried) analysiert.

Die ESI-Q-TOF-Analyse wurde von Herrn Dr. W. Engst (DIfE, Abteilung Ernährungstoxikologie) durchgeführt. Hierfür wurden Proteine für die Analyse tryptisch verdaut. Entsprechende Proteinspots wurden aus einem getrockneten SDS-Gel ausgeschnitten, in 500 µl H<sub>2</sub>O rehydriert und die Cellulosestückchen entfernt. Das Gelstück wurde für 5 min

in 500 µl 100% Methanol, weitere 5 min in 30% Methanol, zweimal für 10 min in 30% Methanol und zweimal in H<sub>2</sub>O entfärbt. Nach dem Waschen in 500 µl 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> für 5 min wurde das Gelstück in 150 µl 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> mit 10 µl 45 mM DTT 30 min bei 60°C inkubiert. Zu dem abgekühlten Ansatz wurden 10 µl 100 mM Iodacetamid pipettiert und die Probe 30 min im Dunkeln aufbewahrt. Der Überstand wurde verworfen und das Gelstück in 500 µl 50% Acetonitril in 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> bei 37°C für 60 min unter ständigem Schwenken gewaschen. Das Gelstück wurde minimal zerkleinert, in 100 µl Rotilabo-Einsätze (Roth) überführt und mit 50 µl Acetonitril überschichtet. In einem Vakuum-Trockner (Jouan) wurde das Gelstück bis zur Trockne geschrumpft und mit 75 µl Trypsin-Lösung rehydriert. Der tryptische Verdau erfolgte bei 37°C über Nacht. Der Überstand enthielt die tryptisch gespaltenen Peptidstücke. Zur weiteren Proteinextraktion aus dem Gel wurden Gelstücke mit 50 µl 60% Acetonitril und 0,1% Tetra-Fluoressigsäure für 20 min inkubiert. Die Überstände wurden vereinigt, im Vakuum-Trockner eingeeengt und bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt.

- Trypsin-Lösung: 10 ng/µl Trypsin (Promega) in 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

## 2.10 Fluoreszenz-Mikroskopie

Der immuncytochemische Nachweis von Actin erfolgte in ECV-Zellen. ECV-Zellen wurden drei Tage auf Objektträgern bis zu einer 80%igen Konfluenz ausgesät. Anschließend wurden sie für 5 - 30 min mit IL-1 im serumfreien Medium stimuliert, kurz mit PBS abgespült und 5 min in eiskaltem Methanol fixiert. Die getrockneten Objektträger wurden bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt. Nach der Rehydrierung in H<sub>2</sub>O für 5 min wurden die Objektträger in PBS äquilibriert. Die Inkubation des Erstantikörpers auf dem Objektträger erfolgte über Nacht im Kühlschrank in H<sub>2</sub>O-gesättigter Atmosphäre. Anschließend wurde der Objektträger dreimal 3 min mit PBS/0,2% Tween20 gewaschen, in PBS äquilibriert und der Zweitantikörper für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS/0,2% Tween20 wurde der Objektträger in Fluoreszenz-Eindeckmedium mit DAPI (Linaris) eingebettet und mit dem Microscope-digital imaging system E1000 (Nikon) ausgewertet.

- Kaninchen anti-Actin-Antiserum (Sigma): 1:60 in Antikörperverdünner (DAKOCytomation)
- Schwein anti-Kaninchen TRITC-gekoppelter Zweitantikörper (Sigma): 1:100

## 2.11 Bestimmung des zellulären Glutathions

Die Bestimmung des intrazellulären Gesamtglutathions, bestehend aus reduziertem Glutathion (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG), wurde mittels eines kinetischen Glutathionreduktase (GR)-gekoppelten Ellmann-Test nach der Methode von Akerboom und Sies bestimmt [164]. GSH reduziert 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) zu dem gelben Farbstoff Thionitrobenzoat. Das dabei entstehende GSSG wird von der GR in Gegenwart von NADPH reduziert, so dass eine ständige Reduktion von DNTB aufrechterhalten wird, die photometrisch durch einen Anstieg der Extinktion bei 412 nm über die Zeit zu beobachten ist. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist bei konstanter GR-Aktivität nur von der Konzentration an GSH und GSSG abhängig.



Vorbehandelte und mit PBS-gewaschene Zellen wurden in zwei Fraktionen geteilt (90% für die Bestimmung von Gesamtglutathion, später ohne NEM und 10% für die Bestimmung von GSSG, später mit NEM). Die Zellen wurden in je 500 µl eiskaltem Homogenisationspuffer resuspendiert und mit Ultraschallbehandlung (Zyklus: 0,75, Amplitude: 75%, 10 Stöße) homogenisiert. Aus dem Überstand (10.000 g, 2 min, 4°C) wurde ein Aliquot für die Proteinbestimmung abgenommen und die Proteine mit 4 M HClO<sub>4</sub> im Verhältnis 1:4 30 min auf Eis gefällt. Nach dem Zentrifugieren (10.000 g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand mit 0,6 M MOPS, 4 M KOH neutralisiert und ausgefallenes KClO<sub>4</sub> entfernt (10.000 g, 10 min, 4°C). Überschüssiges NEM wurde durch 4-malige Extraktion mit 400 µl H<sub>2</sub>O-gesättigtem Ethylacetat entfernt, die Proben mit Stickstoff begast und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

Für die Messung wurden in eine Küvette 200 µl Probe, 100 µl DNTB-Lösung (1 mM DTNB (Serva) in 0,5% NaCO<sub>3</sub>), 15 µl NADPH-Lösung (10,2 mM NADPH (Roth) in 0,5% NaCO<sub>3</sub>) und 685 µl Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,0) gegeben und die Reaktion durch Zugabe von 8 µl GR-Lösung gestartet. Zur Quantifizierung des GSSG wurde nach 4 min 10 µl einer 50 µM GSSG-Lösung als internen Standard zugegeben und die Reaktion für weitere 2 min verfolgt. Die Konzentration des GSH wurde durch Subtraktion der zweifachen Konzentration des GSSG vom Gesamtglutathion ermittelt.

- Homogenisationspuffer: 50 mM Tris, pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,5% Triton-X100 (Sigma), +/- 25 mM NEM (Sigma)
- GR-Lösung: 19,4 U/ml in 0,5% NaCO<sub>3</sub>



Primer	Sequenz 5' – 3'	Hybridisierung-T [°C]	Genbank-nummer
mTollipfor	aga acc ctc gct gga aca aag t	62	NM023764
mTolliprev	gat agc ttt gag gtc ctc ttc at	62	NM023764
mHPRTfor	gca gtc cca gcg tcg tg	62	NM013556
mHPRTrev	ggc ctc cca tct cct tca t	62	NM013556
hTollipfor	caa gaa tcc ccg ctg gaa taa g	60	NM019009
hTolliprev	atg gct ttc agg tcc tcc tcg	60	NM019009
hβ-Actinfor	caa gag atg gcc acg gct gct	60	X00351
hβ-Actinrev	tcc ttc tgc atc ctg tcg gca	60	X00351

Tabelle 3: PCR-Primer

### 2.13.2 Realtime-PCR

Eine genaue Quantifizierung der Tollip-Expression wurde mit der Realtime-PCR ermittelt. Zuerst wurden Tollip- und HPRT- bzw. β-Actin-Standardreihe hergestellt. Hierfür wurden jeweils ca. 100 µl PCR-Produkt elektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mittels Invisorb-Gelextraktionskit (Invitex) aufgereinigt. Nach Ermittlung der DNA-Konzentration im Photometer wurde die Molekülzahl der jeweiligen Fragmente nach folgender Formel berechnet:

$$1 \mu\text{g von } 1.000 \text{ bp DNA} = 1,52 \text{ pmol} = 9,1 \times 10^{11} \text{ Moleküle}$$

Anschließend wurde je eine Reihe aus sieben Standards beginnend mit  $1 \times 10^8$  bis  $5 \times 10^2$  Molekülen ( $1 \times 10^9$  bis  $1 \times 10^3$  bei β-Actin) hergestellt. Die Realtime-PCR wurde in einer 96-well Platte mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green (Invitrogen) im iCycler (BioRad) durchgeführt. Der Pipettieransatz und das Programm waren analog dem der Standard-PCR (2.13.1) mit zusätzlich 0,1x SYBR®Green, 0,5 µM Fluorescein (BioRad) und 40 Zyklen. Die Quantifizierung der erhaltenen PCR-Produkte erfolgte nach der Standardkurvenmethode. Anhand der Gleichung der jeweiligen Standardreihe wurde die Molekülzahl des entsprechenden PCR-Produkts errechnet. Die Expression wurde aus dem Quotienten des Tollip-Wertes durch den korrespondierenden Wert des Standards ermittelt.

### 2.14 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)

Eine direkte Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit ihren responsiven Elementen sollte mit EMSAs nachgewiesen werden. Zuerst wurden die komplementären einzelsträngigen synthetischen Oligonukleotide (Tabelle 4) durch Erhitzen auf 98°C für 5 min und anschließender Abkühlung auf 4°C (0,01°C/min) hybridisiert. Das doppelsträngige Oligonukleotid (2,5 pmol) wurde mit 1,25 mM DTT, T4-Kinasepuffer, 10 U T4-Polynukleotid-

kinase (beides NEB) und 30  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]-ATP für 45 min bei 37°C radioaktiv markiert. Die Reaktion wurde durch 12,5 mM EDTA, pH 8,0 gestoppt. Überschüssiges [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]-ATP wurde mittels Gelfiltration mit einer Probe Quant G50 Micro-Säule (Amersham Biosciences) entfernt. Die Bindereaktion fand mit je 10  $\mu\text{g}$  Kernprotein, 4  $\mu\text{g}$  Poly(dI-dC) (Amersham Biosciences) als unspezifischer Kompetitor und 50 fmol des markierten Oligonukleotids in Bindepuffer mit einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  30 min bei RT statt. Durch Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  Stopp-Puffer wurde die Reaktion beendet und die Proben auf ein 4%iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Auftrennung bei 200 V mit 0,25x TBE wurde das Gel getrocknet und mittels Phosphoimaging die radioaktiven Signale detektiert. Die Spezifität der Bindung wurde mit einem Zusatz an 100-fachen Überschuss entsprechenden unmarkierten oder NF- $\kappa$ B-Oligonukleotids überprüft. Supershiftreaktionen erfolgten mit 1  $\mu\text{g}$  eines spezifischen Antikörpers gegen Nrf2 (2.5.2), der 15 min vor der Bindereaktion mit den Kernproteinen inkubiert wurde.

- 5x Bindepuffer: 75 mM Hepes, pH 7,9, 5 mM EDTA, pH 8,0, 50% Glycerol, 5 mM DTT
- Stopp-Puffer: 50% Glycerin, 0,5% Bromphenolblau

Oligonukleotid	Sequenz 5' – 3'
mTollip-AREfor	ctg cgg gca gaa gcc tgc tca ccc agt cgc
mTollip-ARErev	gcg act ggg tga gca ggc ttc tgc ccg cag
hTollip-AREfor	caa ccg tca tga ctg ggc atg cgc aaa cgg
hTollip-ARErev	ccg ttt gcg cat gcc cag tca tga cgg ttg
HO-AREfor	gga att ctg ttt tcg ctg agt cat ggt c
HO-ARErev	gaa cca tga ctc agc gaa aac aga atc c
NF- $\kappa$ Bfor	aat tca caa aga ggg act ttc ccc tac atc cat tg
NF- $\kappa$ Brev	caa tgg atg tag gga aag tcc ctc ttt gtg aat t

**Tabelle 4: EMSA-Oligonukleotide**

## 2.15 Klonierung von synthetischen Oligonukleotiden

Die für den EMSA verwendeten synthetischen Oligonukleotide der entsprechenden ARE-Elemente (Tabelle 4) wurden in *E. coli* transformiert.

### 2.15.1 Ligation

Das doppelsträngige Oligonukleotid (500 pmol) wurde mit 30 U T4-Polynukleotidkinase (NEB) und T4-Ligasepuffer (NEB, enthält 1 mM ATP) für 1 h bei 37°C phosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 65°C für 20 min gestoppt. Der pGL3-promoter-Vektor wurde mit *Sma* I (NEB) geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Agarosegel

ausgeschnitten und mittels Invisorb-Gelextraktionskit (Invitex) aufgereinigt. Die Dephosphorylierung der kompatiblen Enden des Vektors (2,5 µg Plasmid-DNA) wurde mit 1 U CIAP (Promega) im 25 µl Ansatz für 15 min bei 37°C und anschließender Inkubation bei 56°C für 15 min durchgeführt. Dieser Vorgang wurde mit einer weiteren Zugabe an 1 U CIAP wiederholt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 300 µl Stopp-Puffer beendet. Anschließend wurde die Vektor-DNA mittels Phenol/Chloroform (Roth) im Verhältnis 1:2 gereinigt und mit 5 µl 3 M Natrium-Acetat, pH 4,5 und 125 µl Ethanol für 15 min bei -80°C gefällt. Das Pellet (20.800 g, 30 min, 4°C) wurde mit 70%igen Ethanol gewaschen und in 25 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Ligation erfolgte mit T4-Ligase (NEB) für 2 h bei RT. Durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 20 min wurde die Reaktion gestoppt.

- Stopp-Puffer: 10 mM Tris, pH 7,5, 1 mM EDTA, pH 7,5, 200 mM NaCl, 0,5% SDS

### 2.15.2 Transformation

Die Herstellung der kompetenten *E. coli* Top10 erfolgte durch Inkubation des Bakterienpellets einer 250 ml Kultur (OD<sub>600</sub> = 0,5) mit 30 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> für 30 min auf Eis. Nach Zentrifugation (5.000 g, 7 min, 4°C) wurde das Pellet in 5 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Der Ligationsansatz (10 µl) wurde mit 50 µl Bakteriensuspension für 15 min auf Eis inkubiert. Nach 30-sekündigem Hitzeschock bei 42°C wurde der Reaktionsansatz auf Eis gestellt, mit 250 µl SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Transformationsansätze wurden auf S1-Agarplatten (Standard I-Nähragar; Merck, autoklaviert), die 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Entstandene Klone wurden gepickt und über Nacht in 5 ml S1-Medium (Standard I-Nährbouillon; Merck, autoklaviert) mit 100 µg/ml Ampicillin herangezogen. Nach Plasmidisolierung und Überprüfung der Richtigkeit der Klone durch Restriktionsanalyse wurden diese in S1-Medium mit 5% DMSO bei -80°C gelagert.

- SOC-Medium: 2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose, autoklaviert

### 2.15.3 Plasmidisolierung und Sequenzierung

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli*-Übernachtskulturen erfolgte mit Plasmid Mini- bzw. Midi-Kits (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers. Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde durch die Firma SEQLAB (Göttingen) durchgeführt.

## 2.16 Reporteranalysen

Reporteranalysen wurden durch transiente Transfektion von HepG2-Zellen mit den entsprechenden ARE-Elementen durchgeführt.

### 2.16.1 Transiente Transfektion von HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden mittels Reagenz Tfx™-20 (Promega) nach Protokoll des Herstellers transient transfiziert. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in 24-well Platten (250.000 Zellen/well) ausgesät, mit 0,15 µg Reporterplasmid, je nach Fragestellung zusätzlich mit 0,15 µg Expressionsplasmid und 0,5 µg pSV-β-Gal zur Normierung der Transfektionseffizienz für 48 h transfiziert (Tabelle 5). Für Stimulationsexperimente wurden nach 24 h Zellen mit Sulforaphan oder dem Lösungsmittel in serumfreiem Medium für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden nach dem Waschen mit PBS mit Reporter-Lysepuffer (150 µl/well, Promega) für 15 min bei RT lysiert und über Nacht bei -80°C gelagert. Die aufgetauten Proben wurden zentrifugiert (11.900 g, 2 min, 4°C) und der Überstand zur Messung der β-Galactosidase- bzw. Luciferase-Aktivität verwendet.

Plasmid	Beschreibung
pGL3-promoter	leerer Luciferase-Reportervektor (Promega)
HO-ARE	pGL3-promoter mit HO-ARE-Element (zur Verfügung gestellt von Dr. A. Banning, DfE [165])
mTollip-ARE	pGL3-promoter mit murinen Tollip-ARE-Element (hergestellt wie unter 2.15 beschrieben)
hTollip-ARE	pGL3-promoter mit humanen Tollip-ARE-Element (hergestellt wie unter 2.15 beschrieben)
pcDNA3	leeres Expressionsplasmid (Invitrogen)
Nrf2	pcDNA3 mit cDNA des murinen Nrf2 (zur Verfügung gestellt von Dr. M. Yamamoto, Universität Tsukuba, Japan)
pSV-β-Gal	β-Galactosidase-Kontrollplasmid (Promega)

**Tabelle 5: Plasmide**

### 2.16.2 Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivität

Die Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivität beruht auf der Umsetzung von *o*-Nitrophenyl-β-D-galactosid (ONPG) zu *o*-Nitrophenol. Je 50 µl Lysat oder Reporter-Lysepuffer (Blindwert) wurden in eine 96-well Platte pipettiert und mit 70 µl β-Galactosidasepuffer

und 30  $\mu$ l ONPG-Lösung gemischt. Die Platte wurde bei 37°C bis zum Erreichen einer deutlichen Gelbfärbung inkubiert und die Extinktion bei 405 nm gemessen.

- $\beta$ -Galactosidasepuffer: 120 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 80 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7,3
- ONPG-Lösung: 4 mg/ml ONPG (Sigma) in 60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,5

### 2.16.3 Messung der Luciferase-Aktivität

Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte mit einem Luminoskan Ascent (Labsystems). Hierfür wurden 10  $\mu$ l Lysat in eine lichtundurchlässige 96-well Platte pipettiert, pro Probe 100  $\mu$ l Luciferingemisch injiziert und das entstehende Lichtsignal erfasst.

- Luciferingemisch: 3 ml Reaktionspuffer und 500  $\mu$ l gefriergetrocknetes Luciferinreagenz
- Reaktionspuffer: 20 mM Tricin, 1,07 mM  $\text{MgCO}_3$ , 0,1 mM EDTA, 2,67 mM  $\text{MgSO}_4$ , 33,3 mM DTT, pH 7,8 – 8,0
- Luciferinreagenz: zu 5 ml 100 mM Tris, pH 7,8 wurden 6,2 mg Coenzym A (Sigma), 4,3 mg Luciferin (P.J.K., Kleinblittersdorf) und 8,84 mg ATP (Sigma) gegeben, in 500  $\mu$ l Aliquots aufgeteilt, bei -80°C tief gefroren und über Nacht gefriergetrocknet

Der Quotient aus Luciferase-Lumineszenzeinheit und  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität ergab die relative Reporterogenaktivität. Um eine eventuelle Beeinflussung des leeren Reportergenvektors (pGL3-promoter) auszuschließen, wurde die relative Reporterogenaktivität mitbestimmt und bei der Auswertung einbezogen.

### 2.17 Statistik

Die Abbildungen von Western Blots, Autoradiographien, etc. sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente. Graphische Darstellungen setzen sich aus mindestens drei Einzelwerten zusammen, aus denen ein Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt wurden. Signifikanzen wurden mittels ungepaarten, zweiseitigen *t*-Tests erstellt (Microsoft Excel). Die Daten aus Abb. 5, 6 und 26 wurden durch 1-Weg ANOVA mit Dunnett's post-hoc Test analysiert. Unterschiede von  $p \leq 0,05$  und Werte, die sich mindestens um Faktor 1,5 unterscheiden, wurden als signifikant angesehen.

## 3 Ergebnisse

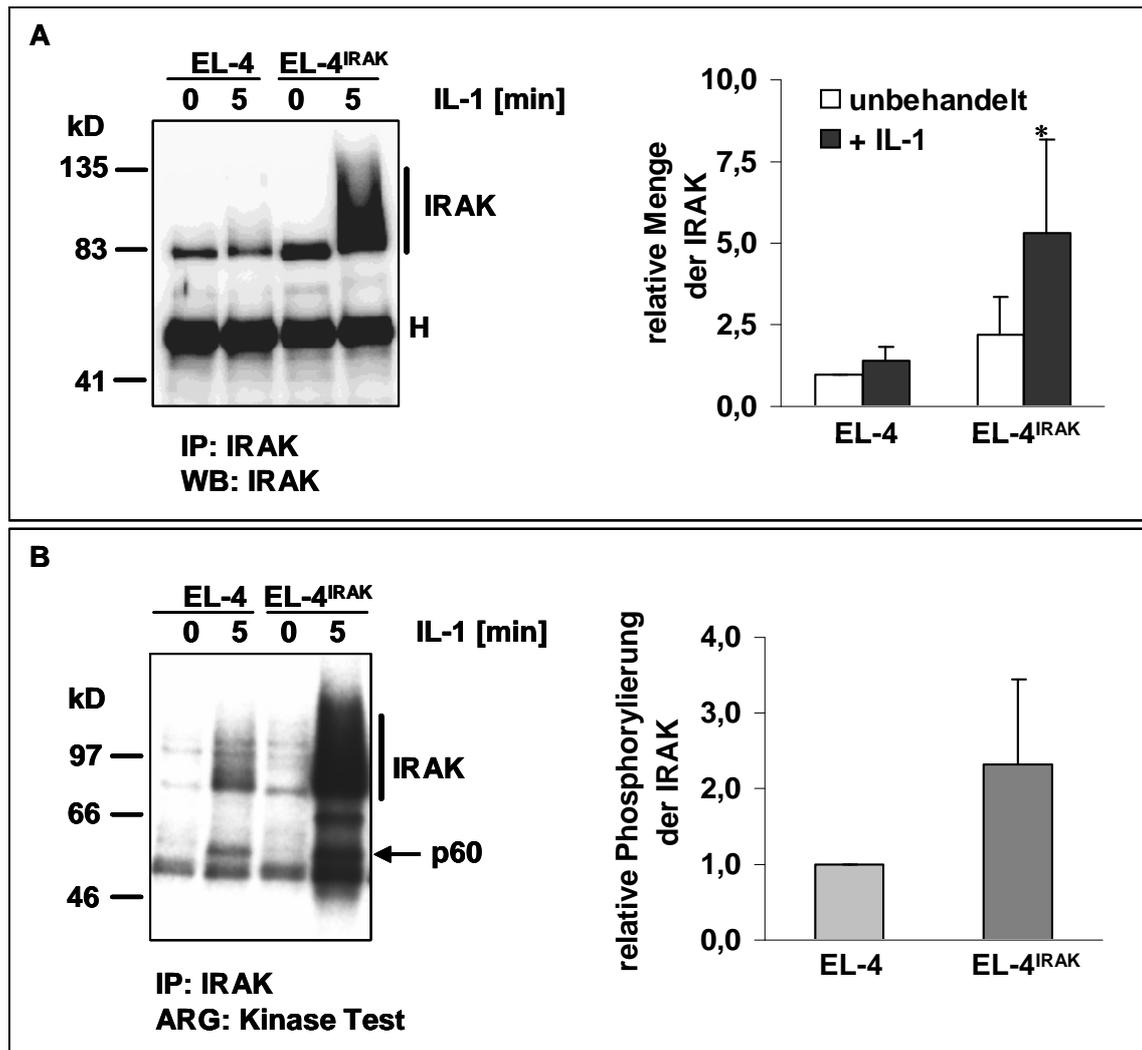
### 3.1 Charakterisierung von EL-4- und EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen

Die Modulation des IL-1-Signalweges wurde auf der Ebene der IL-1RI-Komplexbildung untersucht. Als Zellkulturmodelle standen EL-4- und EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen, welche die humane IRAK stabil überexprimieren, zur Verfügung. Eine stabile Überexpression der humanen IRAK in EL-4 6.1 Zellen führt zu einer gesteigerten konstitutiven und IL-1-stimulierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung sowie einer erhöhten IL-1-induzierten IL-2-Produktion [166]. Beide Zelllinien wurden hinsichtlich der Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI und Phosphorylierungsereignisse verglichen und somit das geeignetere Zellmodell für weitere Untersuchungen ermittelt.

#### 3.1.1 IL-1-vermittelte Phosphorylierung der IRAK ist in EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen erhöht

Die basale Expression und eine eventuelle Erhöhung aktivierter IRAK in IRAK-überexprimierenden Zellen wurden mittels IRAK-Western Blot und *in vitro* Kinase Test ermittelt (Abb. 5). Hierfür wurden EL-4- und EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen mit IL-1 stimuliert oder unbehandelt gelassen und humane und endogene murine IRAK mit einem anti-IRAK-Antikörper aus dem Cytosol präzipitiert.

In unbehandelten Proben beider Zelllinien wurde die unphosphorylierte Form der IRAK als Bande mit ca. 80 kD im Western Blot (WB) detektiert (Abb. 5A). In den IRAK-überexprimierenden Zellen war die basale Menge der IRAK im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen nur leicht erhöht ( $2,18 \pm 1,16$ , Spur 1 vs. 3). Nach IL-1-Stimulation war jedoch die IRAK-Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 80 bis 100 kD in EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen deutlich verstärkt (Spur 4). Die Bandenverbreiterung wird durch multiple Phosphatreste in der IRAK verursacht [42,59] und ist auch in der Autoradiographie (ARG) des *in vitro* Kinase Tests erkennbar (Abb. 5B). Die IL-1-induzierte Phosphorylierung der IRAK in EL-4-Zellen war im Western Blot kaum, in der ARG dagegen gut detektierbar (Spuren 2). Die Menge an phosphorylierter IRAK war in den EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen mit beiden Nachweismethoden zur jeweiligen Kontrolle erhöht (WB =  $5,32 \pm 2,84$  bzw. ARG =  $2,31 \pm 1,15$ ). Die IRAK-Überexpression macht sich insbesondere in IL-1-stimulierten Zellen bemerkbar.



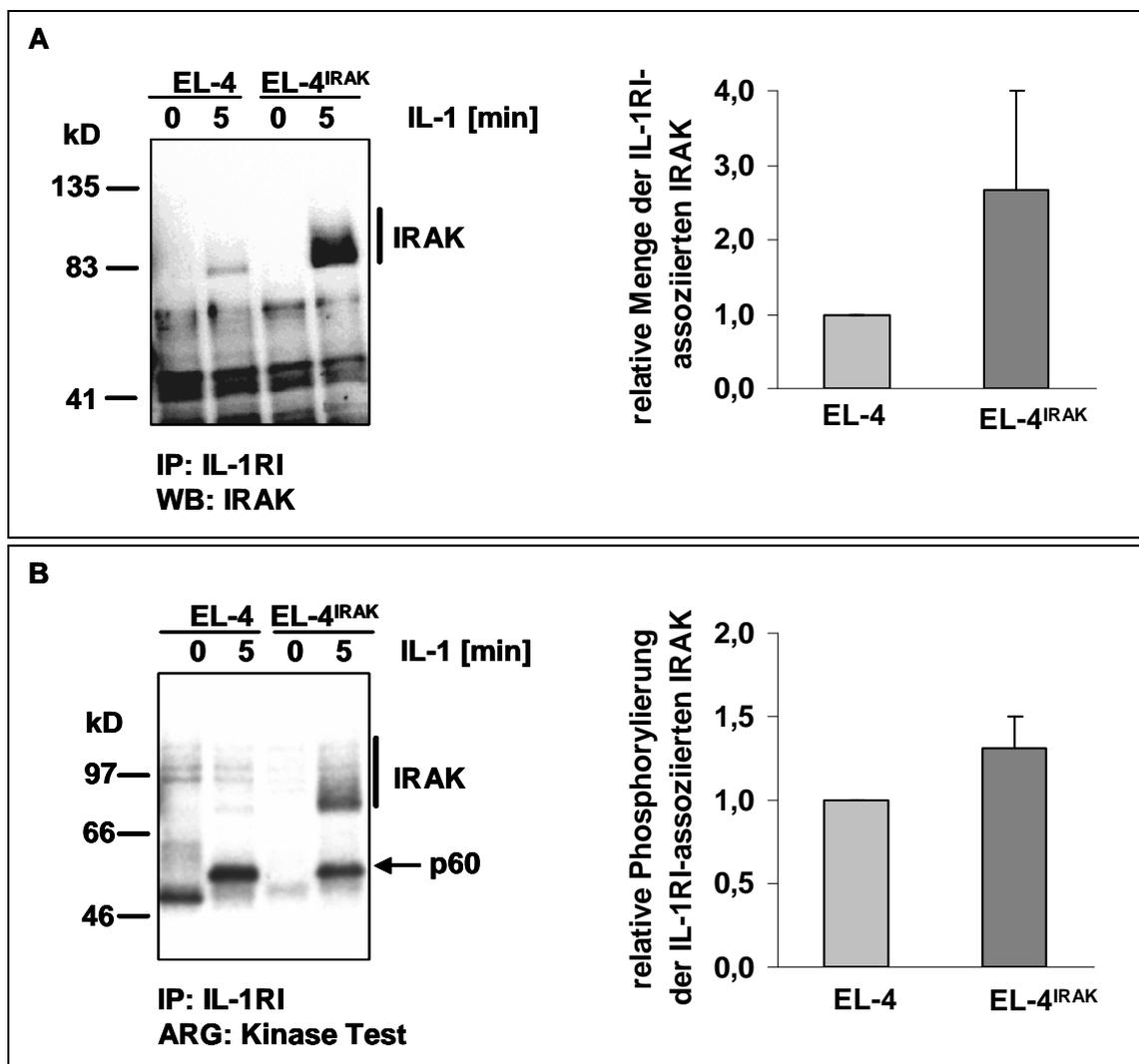
**Abb. 5: Basale und phosphorylierte IRAK in EL-4- und EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen**

EL-4 und EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden 5 min mit IL-1 (5 ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Aus Lysaten wurde die IRAK immunpräzipitiert (IP), **(A)** mittels 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt, geblotet und mit einem anti-IRAK Antikörper nachgewiesen (WB). **(B)** IRAK-IPs wurden im *in vitro* Kinase Test phosphoryliert, elektrophoretisch getrennt (7,5% SDS-Gel) und durch Autoradiographie (ARG) detektiert. Die Graphiken stellen die densitometrische Auswertung von drei Experimenten dar. Die jeweiligen Kontrollen (A = unbehandelte EL-4- und B = EL-4-Zellen) wurden auf 1 gesetzt. \*  $p < 0,05$  vs. unbehandelte EL-4-Zellen. ‚H‘ = schwere Kette des Antikörpers.

Die Phosphorylierung der IRAK wurde im *in vitro* Kinase Test vermutlich durch eine IL-1-abhängige co-präzipitierte Kinase oder durch Autophosphorylierung hervorgerufen. Ein 50 kD Protein wurde IL-1-unabhängig phosphoryliert, wohingegen die Bande bei ca. 60 kD (p60) ein co-präzipitiertes endogenes Substrat der IRAK oder einer IL-1-abhängigen co-präzipitierten Kinase zu sein scheint [40].

### 3.1.2 Die Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI ist in IRAK-Überexprimierern verstärkt

Zur Untersuchung, ob die IRAK-Überexpression einen Einfluss auf die Menge assoziierter IRAK an den IL-1RI hat, wurden der IL-1RI und IL-1RI-assoziierte Proteine aus Lysaten mit Hilfe eines anti-IL-1RI-Antikörpers (co-)präzipitiert. Die Assoziation der IRAK wurde im Western Blot und Aktivitäten IL-1RI-co-präzipitierter Kinasen mittels *in vitro* Kinase Test nachgewiesen. In unbehandelten Proben beider Zelllinien war keine IRAK am IL-1RI nachzuweisen (Abb. 6A, Spuren 1 und 3). Nach IL-1-Stimulation wiesen beide Zellen eine IRAK-Bande bei 80 kD auf, die in EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen deutlich verbreitert war (2,65 ± 1,34, Spur 2 vs. 4), was phosphorylierter IRAK (80 - 100 kD) am IL-1RI entspricht.



**Abb. 6:** IL-1-abhängige Assoziation der IRAK an den IL-1RI in EL-4- und EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen

EL-4 und EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden wie in Abb. 5 beschrieben behandelt und der IL-1RI aus Lysaten immunpräzipitiert (IP). **(A)** IPs wurden elektrophoretisch getrennt (7,5% SDS-Gel) und IRAK mittels Western Blot (WB) ermittelt. **(B)** IL-1RI-co-präzipitierte Proteine wurden im *in vitro* Kinase Test phosphoryliert, durch 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie (ARG) identifiziert. Die Graphiken stellen die densitometrische Auswertung von drei Experimenten dar. Die Kontrollen (EL-4-Zellen) wurden jeweils auf 1 gesetzt.

In der ARG waren in unbehandelten Proben keine phosphorylierte IRAK oder p60 detektierbar (Abb. 6B, Spuren 1 und 3). In IL-1-stimulierten Ansätzen wurden IL-1RI-co-präzipitierte IRAK und p60 phosphoryliert (Spuren 2 und 4). Die Menge an phosphorylierter IRAK am IL-1RI ist in EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen im Gegensatz zu EL-4-Zellen erhöht ( $1,31 \pm 0,19$ ).

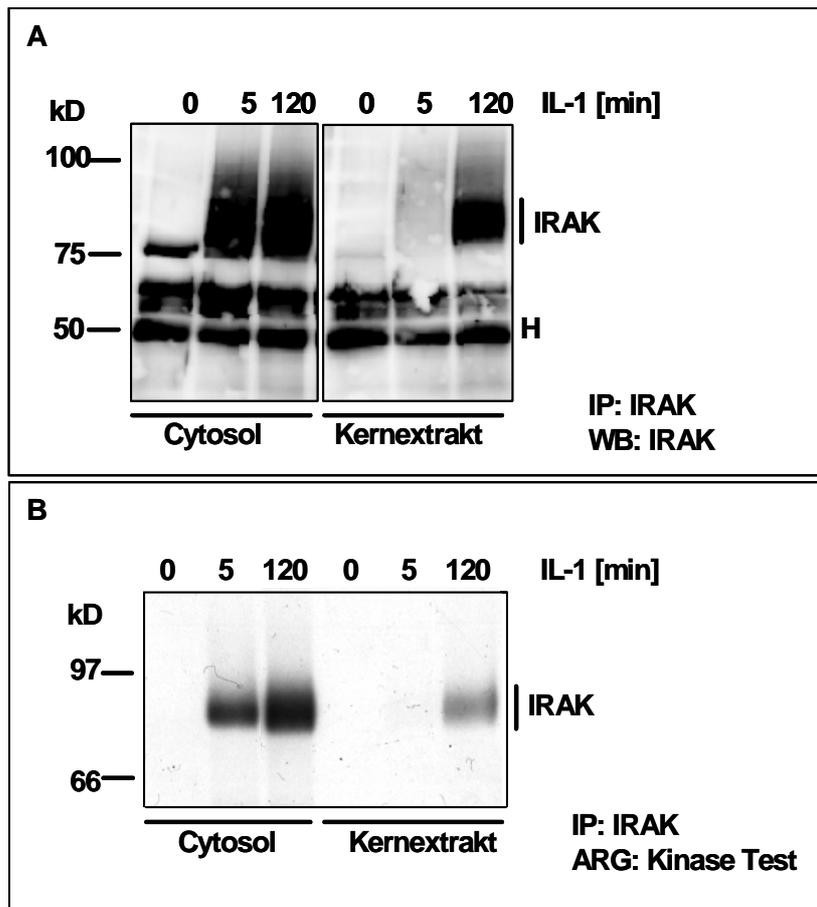
Eine Überexpression an IRAK in EL-4-Zellen macht sich demnach durch Zunahme assoziierter IRAK an den IL-1RI bemerkbar, die sowohl auf basaler Ebene als auch durch verstärkte phosphorylierte IRAK nachzuweisen war. Die Phosphorylierung der IRAK wurde entweder durch Autophosphorylierung oder durch eine IRAK- und/oder IL-1RI-co-präzipitierte Kinase hervorgerufen. Im Vergleich zur Abb. 5, welche die cytosolische präzipitierbare IRAK nach IRAK-Immünpräzipitation darstellt, wird nur ein Teil der überexprimierten IRAK an den Rezeptor rekrutiert. Die Phosphorylierung des p60 wurde durch einen Anstieg der IRAK-Menge in den Zellen nicht deutlich beeinflusst. Da die Aktivierung der IRAK in den IRAK-überexprimierenden Zellen besser nachweisbar war als in Wildtyp-Zellen, wurden in weiteren Experimenten EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen als Zellmodell eingesetzt.

### 3.1.3 Aktivierte IRAK transloziert in den Zellkern

Nach Dissoziation vom IL-1RI-Komplex wird IRAK entweder ubiquitinyliert und vom Proteasom degradiert [79] oder transloziert in den Zellkern [80]. Die Translokation der IRAK in den Zellkern wurde im Zeitbereich von 60 - 120 min nach IL-1-Stimulation an EL-4- bzw. ECV-Zellen gezeigt [80]. Die Menge und Aktivität an cytosolischer und nukleärer IRAK in Abhängigkeit von IL-1 wurde in EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen mittels IRAK-Western Blot und *in vitro* Kinase Test verglichen (Abb. 7).

Im unstimulierten Zustand war die IRAK als Bande bei 80 kD im Cytosol zu sehen (Abb. 7A, Spur 1). Sowohl 5 als auch 120 min IL-1-stimulierte Ansätze zeigten eine identische Menge an cytosolischer phosphorylierter IRAK, dagegen ließ sich die IRAK nach 120 min IL-1-Stimulation im Kern nachweisen (Spuren 2 und 3 vs. 4, 5 und 6).

Da die nukleäre Form der IRAK phosphoryliert auftrat, was an der Bandenverbreiterung zu erkennen war, transloziert die IL-1RI-rekrutierte und phosphorylierte IRAK vermutlich nach Dissoziation vom IL-1RI-Komplex in den Zellkern.



**Abb. 7: IL-1-vermittelte nukleäre Translokation der IRAK in EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen**

EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden 5 oder 120 min mit IL-1 (5 ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. IRAK wurde aus 150 µg Cytosol- oder Kernextrakt immunpräzipitiert (IP), **(A)** elektrophoretisch getrennt (7,5% SDS-Gel) und IRAK im Western Blot (WB) nachgewiesen. **(B)** IRAK-IPs wurden im *in vitro* Kinase Test phosphoryliert, mittels 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie (ARG) detektiert. ‚H‘ = schwere Kette des Antikörpers.

Die unstimulierten Ansätze der jeweiligen Fraktionen zeigten keine Kinase-Aktivitäten in der ARG (Abb. 7B, Spuren 1 und 4). Wie zu erwarten, wurde die cytosolische IRAK nach 5 und 120 min IL-1-Stimulation phosphoryliert (Spuren 2 und 3). Im Gegensatz dazu lag die nukleäre IRAK erst nach 120 min phosphoryliert vor (Spur 5 vs. 6), wobei die phosphorylierte IRAK im Cytosol stets höher konzentriert war als in der nukleären Fraktion.

Die Phosphorylierung der nukleären IRAK wurde vermutlich durch Autophosphorylierung oder durch Phosphorylierung einer Kinase verursacht, die mit der IRAK in den Zellkern co-transloziert oder bereits dort anwesend ist.

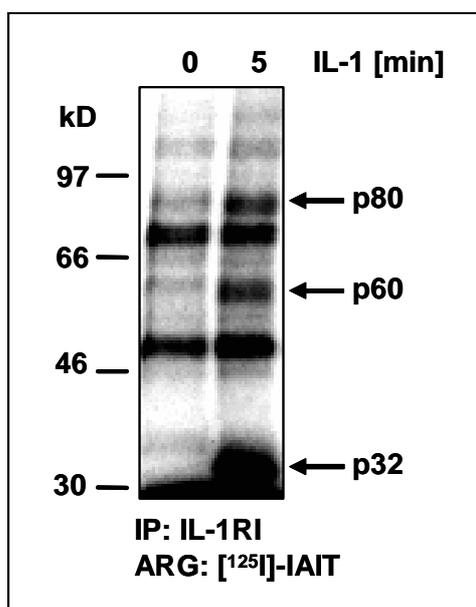
### 3.2 Identifizierung von möglichen redoxsensitiven Proteinen am IL-1RI

Die Bildung des IL-1RI-Komplexes benötigt eine geregelte Rekrutierung von Proteinen und eine geeignete Konformation dieser Proteine. Prozesse, die auch durch IL-1 induziert werden, können durch Redox-Ereignisse beeinflusst werden. Cysteine im reduzierten Status sind leichte Ziele von Modifikationen durch ROS oder elektrophile Substanzen. Deshalb war es von Interesse, den Thiolstatus IL-1RI-assoziiierter Proteine nach IL-1-Behandlung zu bestimmen und unbekannte Proteine am Rezeptor zu identifizieren. Zur Markierung freier Proteinthiole wurde das thiol-spezifische Reagenz Iodoacetyl-[<sup>125</sup>I]-Iodotyrosin ([<sup>125</sup>I]-IAIT) eingesetzt [128].

#### 3.2.1 IL-1 ändert das [<sup>125</sup>I]-IAIT-Muster von Proteinen am IL-1RI

Zum Nachweis von Proteinen des IL-1RI-Komplexes mit [<sup>125</sup>I]-IAIT-zugänglichen Thiolen wurden IL-1RI-Immunpräzipitate mit [<sup>125</sup>I]-IAIT inkubiert und mittels ARG detektiert (Abb. 8).

IL-1RI-co-präzipitierte Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 30, 50 und 70 kD waren mit [<sup>125</sup>I]-IAIT in unbehandelten und IL-1-stimulierten Proben markiert. Nach IL-1-Stimulation traten drei zusätzliche [<sup>125</sup>I]-IAIT-markierte Proteine auf. Diese Proteine wurden anhand ihrer Molekulargewichte wie folgt benannt: p32, p60 und p80. Für die Zugänglichkeit von Proteinthiolen für [<sup>125</sup>I]-IAIT nach IL-1-Stimulation gibt es zwei Möglichkeiten: 1.) Proteine mit freien SH-Gruppen werden an den IL-1RI nach Ligandenbindung rekrutiert oder 2.) Proteine, die bereits assoziiert sind, ändern ihre Konformation nach IL-1-Stimulus, wodurch Thiole exponiert werden.



**Abb. 8: [<sup>125</sup>I]-IAIT-Markierung von drei zusätzlichen Proteinen am IL-1RI nach IL-1-Stimulation**

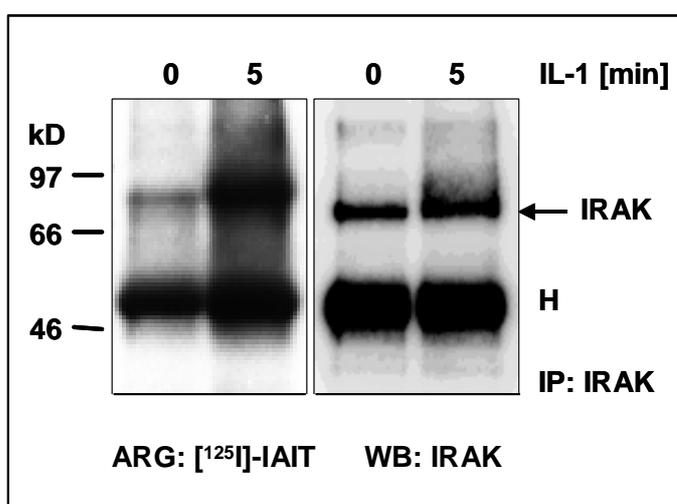
EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden mit IL-1 (5 ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Der IL-1RI wurde aus Lysaten präzipitiert (IP) und zugängliche Thiole präzipitierter Proteine mit [<sup>125</sup>I]-IAIT markiert. Die Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt (7,5% SDS-Gel) und durch Autoradiographie (ARG) ermittelt. Proteine sind nach ihren Molekulargewichten benannt und mit einem Pfeil markiert.

Zur Identifizierung der [ $^{125}$ I]-IAIT-markierten Proteine wurden Western Blots mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen bekannte Proteine des IL-1RI-Komplexes durchgeführt. So wurden p32 und p80 speziell untersucht. Unbekannte IL-1RI-assoziierte Proteine hingegen wurden mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2DE) aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und durch massenspektrometrische Methoden (MALDI oder ESI-Q-TOF) analysiert.

### 3.2.2 Identifizierung des [ $^{125}$ I]-IAIT-markierbaren p80 als IRAK

Bei dem als p80 benannten Protein könnte es sich um IRAK handeln. Sowohl humane als auch murine IRAK haben ein Molekulargewicht von ca. 80 kD, assoziieren IL-1-abhängig an den IL-1RI und können mit diesem co-präzipitiert werden [42]. Des Weiteren enthalten humane und murine IRAK 17 bzw. 15 Cysteine, die möglicherweise für die [ $^{125}$ I]-IAIT-Markierung zugänglich sind.

Der Thiolstatus der IRAK wurde mit [ $^{125}$ I]-IAIT-markierten IRAK-Immünpräzipitaten untersucht (Abb. 9). Ein co-präzipitiertes 50 kD Protein wurde IL-1-unabhängig [ $^{125}$ I]-IAIT-markiert (ARG). Im unstimulierten Zustand waren Thiole der IRAK mit [ $^{125}$ I]-IAIT nachzuweisen (Spur 1). Nach IL-1-Stimulation waren die markierten Thiole der IRAK deutlich höher (Spur 2). Zum Beweis, dass es sich bei der Bande um [ $^{125}$ I]-IAIT-markierte IRAK handeln könnte, wurde ein IRAK-Western Blot (WB) durchgeführt. Die IRAK-Banden (Spuren 3 und 4) lagen auf gleicher Höhe wie die [ $^{125}$ I]-IAIT-Banden, was dafür spricht, dass es tatsächlich [ $^{125}$ I]-IAIT-markierte IRAK ist. Da in der [ $^{125}$ I]-IAIT-ARG keine Bandenverbreiterung der IRAK sichtbar war, ist vermutlich die phosphorylierte IRAK schlechter mit [ $^{125}$ I]-IAIT markierbar.

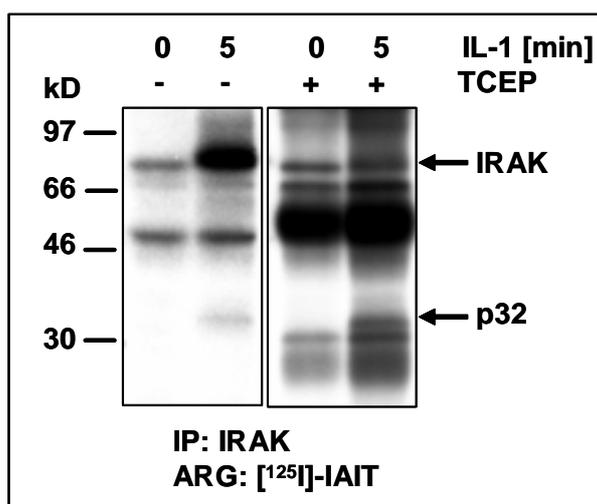


**Abb. 9: [ $^{125}$ I]-IAIT-markierte Thiole der IRAK**

EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden wie in Abb. 8 beschrieben behandelt. An IRAK-Immünpräzipitaten (IP) wurden zugängliche Thiole mit [ $^{125}$ I]-IAIT markiert, IPs über ein 7,5% SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und mittels Autoradiographie (ARG) oder IRAK-spezifischem Antikörper im Western Blot (WB) nachgewiesen. ‚H‘ = schwere Kette des Antikörpers.

Zum Nachweis einer eventuellen reversiblen Thiolmodifizierung der IRAK wurden IRAK-Immunpräzipitate vor der [<sup>125</sup>I]-IAIT-Markierung mit Tris(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) behandelt (Abb. 10). TCEP reduziert Disulfidverbindungen und besitzt selbst keine [<sup>125</sup>I]-IAIT-markierbaren Thiole.

P32 wurde ebenfalls im IRAK-Immunpräzipitat IL-1-abhängig [<sup>125</sup>I]-IAIT markiert. Nach IL-1-Stimulation war ein Anstieg der markierten Thiole der IRAK deutlich zu sehen (jeweils Spur 2). Die radioaktive Markierung der Thiole der IRAK war in beiden TCEP-behandelten Proben identisch und hatte die gleiche Intensität wie der unbehandelte IL-1-stimulierte Ansatz (Spur 2 vs. 3 und 4, unterschiedliche Expositionen dargestellt). Somit verursacht IL-1 die Freisetzung von Thiolen der IRAK. Proteine von ca. 30, 50 und 70 kD wurden IL-1-unabhängig [<sup>125</sup>I]-IAIT-markiert und bilden anscheinend mit der IRAK auch im unstimuliertem Zustand einen Komplex (Spuren 3 und 4). P32 hingegen war nur nach IL-1-Stimulation detektierbar (Spur 4). Vermutlich assoziieren p32 und IRAK erst nach IL-1-Behandlung, wobei p32 mit der IRAK co-präzipitiert wird.



**Abb. 10: [<sup>125</sup>I]-IAIT-Markierung TCEP-reduzierter Thiole an IRAK-Immunpräzipitaten**

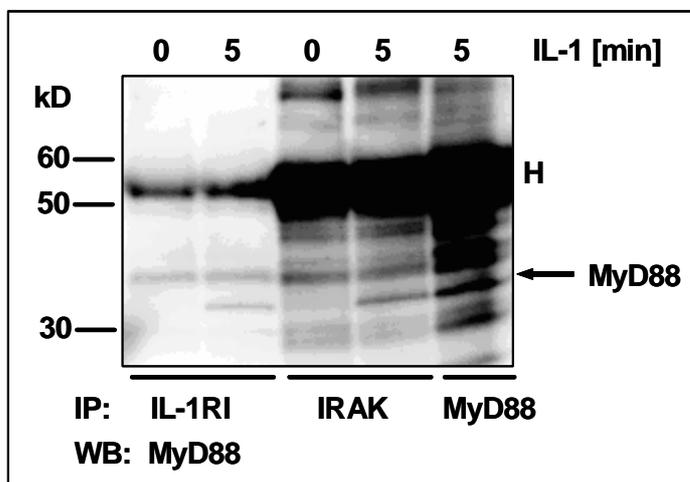
EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden wie in Abb. 8 beschrieben behandelt. Lysate wurden mit IRAK-Antikörpern inkubiert (IP) und Präzipitate mit 5 mM TCEP 5 min inkubiert (+) oder unbehandelt gelassen (-). Zugängliche Thiole wurden mit [<sup>125</sup>I]-IAIT markiert, IPs über ein 10% SDS-Gel aufgetrennt und Proteine durch Autoradiographie (ARG) identifiziert. Dargestellt sind Expositionen der unbehandelten Ansätze (24h) und der TCEP-behandelten Ansätze (4 h).

### 3.2.3 MyD88 ist vermutlich das [<sup>125</sup>I]-IAIT-markierbare p32

Zur Analyse von p32, welches IL-1-abhängig an den IL-1RI und an die IRAK assoziiert, wurden bekannte Proteine des IL-1RI-Komplexes untersucht. Tollip (31 kD) kann nicht p32 sein, da p32 erst nach IL-1-Stimulation mit der IRAK interagiert (Abb. 10). Im unstimulierten Zustand sind IRAK und Tollip im Cytosol jedoch bereits assoziiert [36]. Auch Co-präzipitations-Experimente mit einem Tollip-spezifischen Antikörper deuteten keine Übereinstimmung von Tollip mit der [<sup>125</sup>I]-IAIT-markierbaren p32-Bande in IL-1RI-Immunpräzipitaten an (Daten nicht gezeigt).

Ein weiteres Protein wäre MyD88 (33 kD), welches erst nach IL-1-Stimulation mit dem IL-1RI und der IRAK assoziiert [32,35]. Das murine Protein besitzt 9 Cysteine, die möglicherweise für die [<sup>125</sup>I]-IAIT-Markierung zugänglich sind. Um herauszufinden, ob es sich bei MyD88 um p32 handelt, wurden IL-1RI-, IRAK- und MyD88-Immunpräzipitate mit [<sup>125</sup>I]-IAIT inkubiert und MyD88 im Western Blot detektiert (Abb. 11).

Präzipitiertes MyD88 war im Vergleich zur IL-1-stimulierten Probe (Spur 5) aus unbehandelten Zellen (keine Abbildung) im Western Blot nicht nachweisbar. Ebenfalls wurde in unstimulierten Ansätzen in IL-1RI- und IRAK-Immunpräzipitaten kein MyD88 detektiert (Spuren 1 und 3). Dagegen wurde nach IL-1-Stimulation MyD88 mit dem IL-1RI und der IRAK co-präzipitiert (Spur 2 vs. 4), was somit die IL-1-abhängige Assoziation von MyD88 an den IL-1RI beweist.



**Abb. 11: IL-1-abhängige Co-präzipitation von MyD88 mit dem IL-1RI und der IRAK**

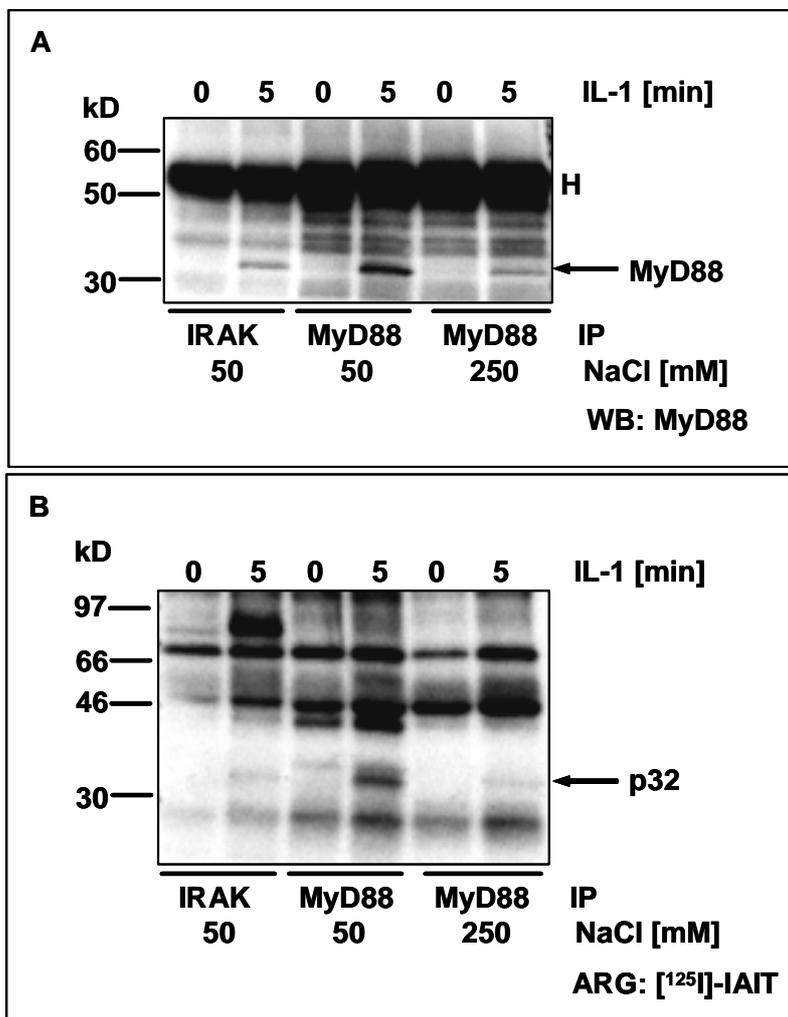
EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden wie in Abb. 8 beschrieben behandelt. Der IL-1RI, IRAK oder MyD88 wurden aus Lysaten präzipitiert (IP), über ein 10% SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und MyD88 im Western Blot (WB) detektiert. ‚H‘ = schwere Kette des Antikörpers.

Für Immunpräzipitationen und anschließende Experimente wurden bisher 50 mM NaCl in Lyse- und Hapes-Waschpuffer verwendet, um co-präzipitierte Proteine nachzuweisen. Die NaCl-Konzentration wurde auf 250 mM im jeweiligen Puffer erhöht, um mögliche ionische Wechselwirkungen von MyD88 und assoziierten Proteinen in MyD88-Immunpräzipitaten zu entfernen und MyD88 somit direkt ohne Interaktionspartner nachzuweisen (Abb. 12).

MyD88 war nach IL-1-Stimulation mit IRAK co-präzipitierbar und ebenfalls nur IL-1-abhängig im MyD88-Immunpräzipitat mit 50 mM NaCl detektierbar (Abb. 12A, Spuren 2 und 4). Unter stringenteren Bedingungen (250 mM NaCl) war MyD88 in unstimulierten Proben wiederum nicht nachweisbar (Spur 5 vs. 6). Es ist denkbar, dass MyD88 sich in Komplexen befindet, somit maskiert wird und für den Antikörper während der MyD88-IP unzugänglich ist. Auch die Inkubation von Zellen mit DTT (bis 250  $\mu$ M, für 3 h) zur Reduktion von Disulfiden und somit möglicher Freisetzung von MyD88 aus Komplexen,

zeigte kein präzipitierbares MyD88 aus unstimulierten Zelllysaten (Daten nicht abgebildet).

Die ARG der [ $^{125}$ I]-IAIT-markierten Proteinthiole zeigte mehrere MyD88-co-präzipitierte Proteine in unbehandelten und IL-1-stimulierten Ansätzen (Abb. 12B, Spuren 3 bis 6). In allen MyD88-Immunpräzipitaten traten [ $^{125}$ I]-IAIT-markierte p32-Banden nur nach IL-1-Stimulation auf, wobei die Intensität der p32-Bande mit 250 mM NaCl in Puffern geringer war als in der Probe mit 50 mM NaCl (Spur 4 vs. 6). Die Banden von MyD88 im Western Blot deckten sich mit den IL-1-abhängigen [ $^{125}$ I]-IAIT-markierten p32-Banden in IRAK- und MyD88-Immunpräzipitaten, woraus man schließen kann, dass p32 MyD88 ist.



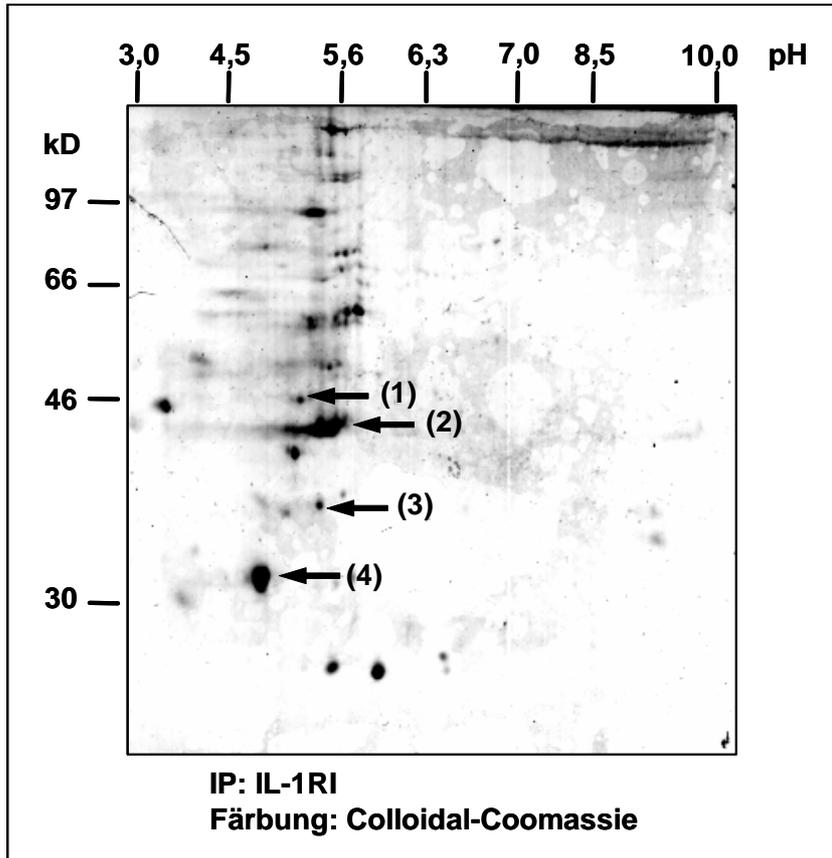
**Abb. 12: Detektion von MyD88 und p32**

EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden wie in Abb. 8 beschrieben behandelt. IRAK oder MyD88 wurden aus Lysaten mit 50 oder 250 mM NaCl in Lyse- und Waschpuffern präzipitiert (IP), **(A)** mittels 10%-SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und MyD88 im Western Blot (WB) nachgewiesen. **(B)** Zugängliche Thiole in IPs wurden mit [ $^{125}$ I]-IAIT markiert, elektrophoretisch aufgetrennt (10% SDS-Gel) und mittels Autoradiographie (ARG) detektiert. ‚H‘ = schwere Kette des Antikörpers.

### 3.2.4 Identifizierung weiterer Proteine des IL-1RI-Komplexes

Zur Analyse unbekannter IL-1RI-assoziiierter Proteine wurde der IL-1RI aus IL-1-stimulierten EL-4<sup>IRAK</sup>-Zelllysaten präzipitiert, assoziierte Proteine mittels 2DE aufgetrennt

und mit Colloidal-Coomassie gefärbt (Abb. 13). Um eine ausreichende Menge an Proteinen für die Massenspektrometrie bereitzustellen, wurde eine 100-fach größere Zellmenge als für die [ $^{125}$ I]-IAIT-Markierung präpariert. Aus dem Gel wurden Proteinspots, die prägnant oder im Bereich von 32 kD waren, ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels MALDI oder ESI-Q-TOF analysiert.



**Abb. 13: 2DE von IL-1RI-co-präzipitierten Proteinen aus IL-1-stimulierten EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen**

$1 \times 10^{10}$  EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden 5 min mit IL-1 (5 ng/ml) stimuliert, der IL-1RI aus dem Lysat präzipitiert, mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2DE) aufgetrennt (12,5% SDS-Gel) und Proteine durch Colloidal-Coomassie gefärbt. Proteinspots wurden aus dem Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels Massenspektrometrie analysiert. Identifizierte Proteine sind mit einem Pfeil markiert.

Folgende Proteine wurden aus drei unabhängigen Versuchen analysiert (Tabelle 6):

Spot-Nr.	Protein	MW [kD]	iP
(1)	Tubulin	50,1	4,8
(2)	$\beta$ -Actin	41,7	5,6
(3)	F-Actin Capping Protein $\alpha$ -UE	32,9	5,5
(4)	Tropomyosin $\alpha$	29,2	4,7

**Tabelle 6: Identifizierte IL-1RI-assoziierte Proteine**

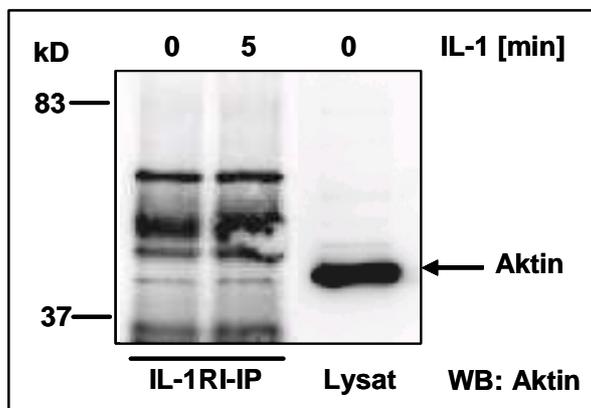
MW = Molekulargewicht, iP = isoelektrischer Punkt

Die Analyse des endogenen IL-1RI-assoziierten und [ $^{125}$ I]-IAIT-markierbaren p60 lieferte kein eindeutiges Ergebnis, da offenbar die Menge an Protein für die Massenspektrometrie zu gering war.

Tubulin mit einem Molekulargewicht von 50 kD könnte vermutlich in Co-präzipitations-Experimenten auf gleicher Höhe mit der schweren Kette des Antikörpers laufen. Das F-Actin Capping Protein wurde mitpräzipitiert, da auch eine große Menge Actin am IL-1RI assoziiert war. So wurden Actin und Tropomyosin speziell untersucht.

#### 3.2.4.1 Actin ändert seine Konformation am IL-1RI

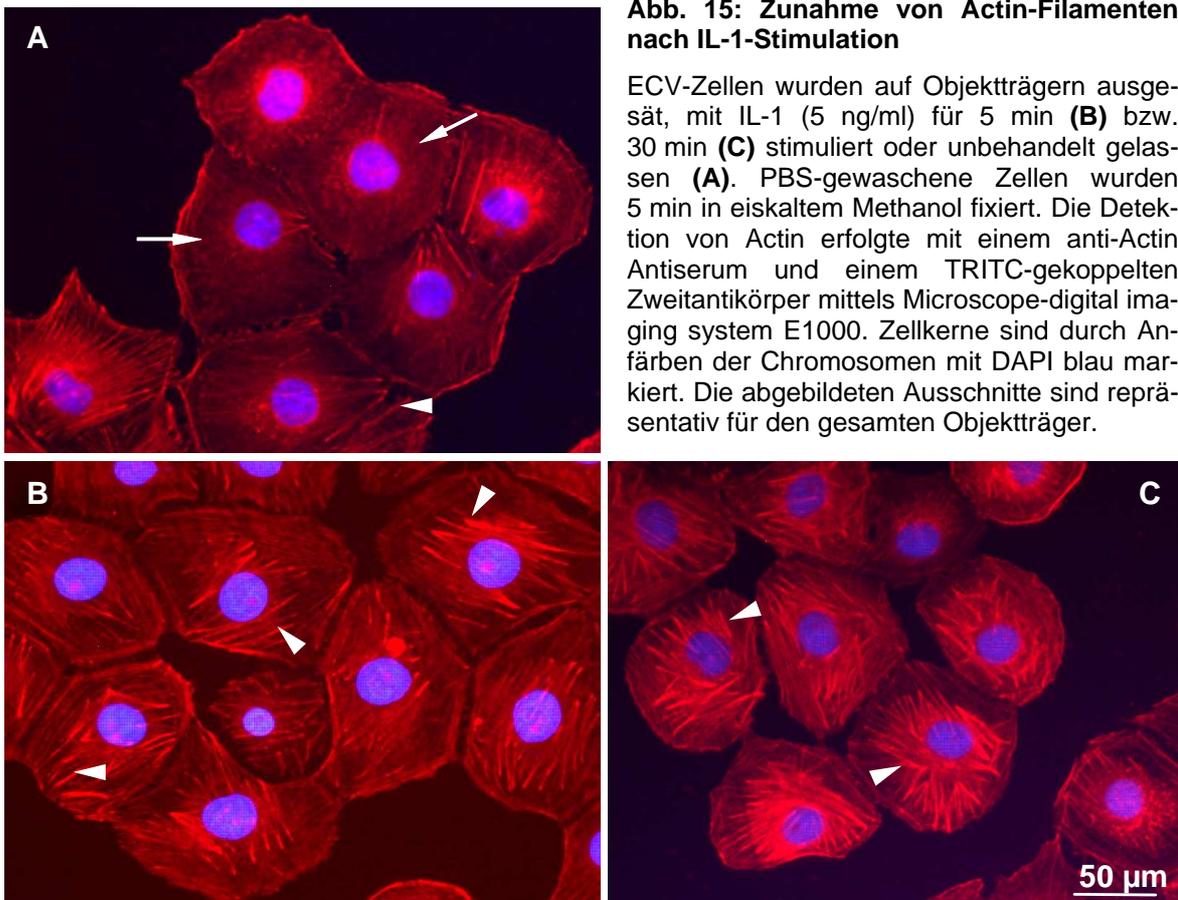
Actin ist eines der am häufigsten exprimierten intrazellulären Proteine und existiert in Nichtmuskelzellen mit den Isoformen  $\beta$  und  $\gamma$ . Es dient zur Stabilisierung, zur Formgebung und Bewegung der Zelle. Zum Nachweis einer Funktion von Actin in EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurde der IL-1RI immunpräzipitiert und assoziiertes Actin im Western Blot detektiert (Abb. 14). Zur Lokalisation an intrazellulärem Actin wurde 1  $\mu$ l Lysat aufgetragen. Actin war in unbehandelten und IL-1-stimulierten Ansätzen am IL-1RI assoziiert. Nur eine geringe Menge des zellulären Actins co-präzipitierte mit dem IL-1RI (Spuren 1 und 2 vs. 3). IL-1 hatte keinen Einfluss auf die Bindung von Actin mit dem IL-1RI.



**Abb. 14: Actin co-präzipitiert IL-1-unabhängig mit dem IL-1RI**

EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden wie in Abb. 8 beschrieben behandelt. IL-1RI-Immunpräzipitate (IP) und 1  $\mu$ l Lysat wurden über ein 10% SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und Actin mittels Antiserum im Western Blot (WB) detektiert.

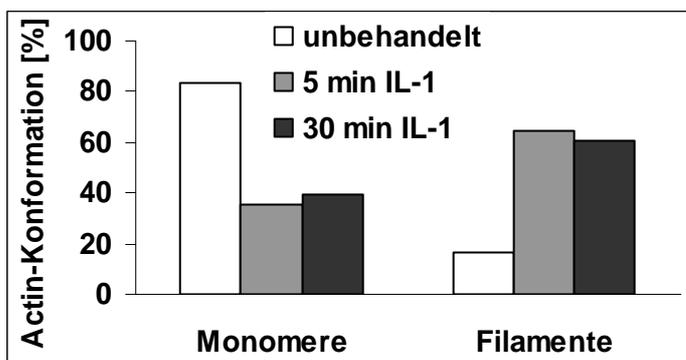
Actin-Filamente setzen sich aus Actin-Monomeren zusammen. Bekannt ist, dass Behandlungen von Fibroblasten mit Wachstumsfaktoren wie EGF oder FGF zu einem Anstieg der Actin-Polymerisierung führen [167,168]. Die Wirkung einer IL-1-Stimulation auf Actin wurde an ECV-Zellen mittels Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht (Abb. 15). ECV-Zellen eignen sich durch eine günstigere Verteilung von Zellkern und Cytosol besser zum mikroskopischen Nachweis von Actin als EL-4-Zellen. Des Weiteren zeigen ECV-Zellen ein analoges Verhalten wie EL-4-Zellen auf IL-1-Stimulation [80].



**Abb. 15: Zunahme von Actin-Filamenten nach IL-1-Stimulation**

ECV-Zellen wurden auf Objektträgern ausgesät, mit IL-1 (5 ng/ml) für 5 min **(B)** bzw. 30 min **(C)** stimuliert oder unbehandelt gelassen **(A)**. PBS-gewaschene Zellen wurden 5 min in eiskaltem Methanol fixiert. Die Detektion von Actin erfolgte mit einem anti-Actin Antiserum und einem TRITC-gekoppelten Zweitantikörper mittels Microscope-digital imaging system E1000. Zellkerne sind durch Anfärben der Chromosomen mit DAPI blau markiert. Die abgebildeten Ausschnitte sind repräsentativ für den gesamten Objektträger.

In unbehandelten Zellen waren vereinzelte intrazelluläre Actin-Filamente (Pfeilköpfe) oder Actin-Monomere (Pfeile) sichtbar (Abb. 15A). Nach 5 min IL-1-Stimulation war ein Anstieg an Zellen, die Actin-Filamente (Pfeilköpfe) aufwiesen, zu beobachten (Abb. 15B). Diese Stressfasern waren ebenfalls nach 30 min IL-1-Behandlung in den Zellen zu sehen (Abb. 15C). IL-1 führt offenbar zur Polymerisierung von Actin-Monomeren zu Actin-Filamenten. Die Charakteristik der Konformation des Actins von sechs repräsentativen Sichtfeldern von jeweils drei Objektträgern wurde in Abb. 16 graphisch dargestellt.

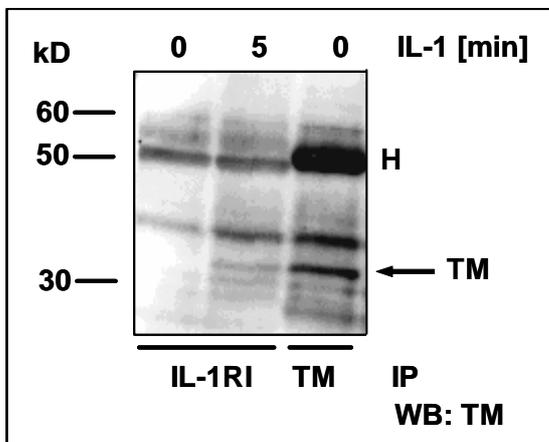


**Abb. 16: Verteilung der zellulären Actin-Konformation**

ECV-Zellen wurden wie in Abb. 15 behandelt. Der Graph gibt die prozentuale Charakteristik der Actin-Konformation von sechs repräsentativen Sichtfeldern der jeweiligen Objektträger wieder. Die Summe der Strukturen wurde auf 100% gesetzt und die einzelnen Konformationen des Actins dazu ins Verhältnis.

## 3.2.4.2 Tropomyosin assoziiert IL-1-abhängig an den IL-1RI

Tropomyosin ist ein Actin-assoziiertes Protein und hat je nach Isoform ein Molekulargewicht zwischen 28 - 32 kD. Zur Ermittlung, ob IL-1 einen Einfluss auf die Bindung von Tropomyosin an den IL-1RI hat, wurden aus EL-4<sup>IRAK</sup>-Zelllysaten der IL-1RI oder Tropomyosin immunpräzipitiert und Tropomyosin (TM) im Western Blot nachgewiesen (Abb. 17). Neben einer IL-1-unabhängigen Proteinbande bei 40 kD wurde Tropomyosin nur nach IL-1-Stimulation mit dem IL-1RI co-präzipitiert (Spur 1 vs. 2). Eine Stimulation mit IL-1 führt demnach zur Assoziation von Tropomyosin an den IL-1RI. Tropomyosin ist auch nicht p32, da die Tropomyosin-Bande in Western Blots sich nicht mit der [<sup>125</sup>I]-IAIT-markierbaren p32-Bande in der ARG deckte (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 17: IL-1-abhängige Co-präzipitation von Tropomyosin mit dem IL-1RI**

EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden wie in Abb. 8 beschrieben behandelt und der IL-1RI oder Tropomyosin (TM) aus Lysaten präzipitiert (IP). Die über ein 10% SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden geblottet und TM im Western Blot (WB) ermittelt. ‚H‘ = schwere Kette des Antikörpers.

### 3.3 Thiolmodifizierende Substanzen interferieren mit Signalen am IL-1RI

Die IL-1-Signaltransduktion in EL-4-Zellen wird redoxabhängig reguliert [152]. Ausgehend von bereits bestehenden experimentellen Untersuchungen wurden Wirkungen von redoxaktiven Substanzen auf eines der frühesten Ereignisse in der IL-1-Signalkaskade, die Bildung des IL-1RI-Komplexes und Aktivierungen IL-1RI-assoziiierter Kinasen, überprüft. IL-1 bewirkt eine Änderung des Thiolstatus der IRAK (3.2.2). Nachfolgende Experimente erfolgten an EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen zur Aufklärung des Einflusses von sowohl synthetischen als auch nahrungsrelevanten thiolmodifizierenden Substanzen auf die Rekrutierung und Phosphorylierung der IRAK als dem wichtigsten Ereignis in der IL-1-Signalkaskade für nachfolgende Prozesse.

#### 3.3.1 Wirkungen von MD, PAO, DA und PDTC auf Ereignisse am IL-1RI-Komplex

Die synthetischen redoxaktiven Agenzien Menadion (MD), Phenylarsinoxid (PAO), Diamid (DA) und Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) wurden als Modellsubstanzen verwendet, um ihre Wirksamkeit zu testen, Ereignisse am IL-1RI durch Änderung des zellulären Redoxstatus und/oder Proteinmodifikation zu beeinflussen.

##### 3.3.1.1 MD führt zum Anstieg des intrazellulären GSSG-Gehalts

Die Detektion der Wirkung von MD auf den intrazellulären Glutathionspiegel wurde mittels Ellmann-Test bestimmt (Tabelle 7). Eine Vorbehandlung der Zellen mit MD verursachte eine Reduktion des Gesamtglutathiongehalts (GSH + 2xGSSG). Die Menge an GSSG war in MD-behandelten Zellen höher als in unbehandelten Zellen. Somit sank signifikant das Verhältnis von GSH zu GSSG (GSH/GSSG).

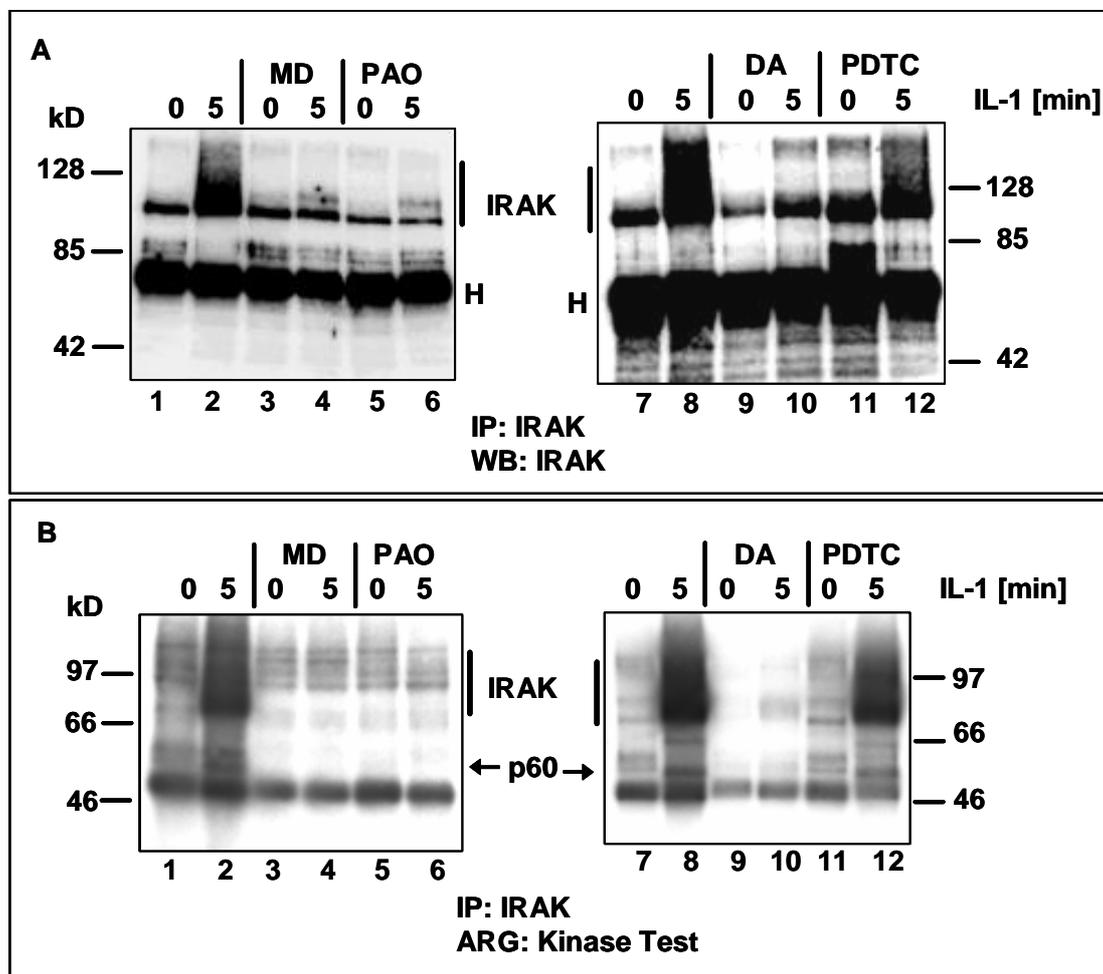
	<b>GSH + 2xGSSG (nmol/mg Protein)</b>	<b>GSSG (nmol/mg Protein)</b>	<b>GSH/GSSG</b>
<b>Kontrolle</b>	25,2 ± 1,76	0,08 ± 0,05	445,09
<b>Menadion</b>	15,92 ± 1,58	4,4 ± 0,73	1,70 *

**Tabelle 7: MD verändert den intrazellulären Glutathiongehalt**

EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden mit MD (50 µM, 15 min) oder DMF als Lösungsmittel vorbehandelt. Aus homogenisierten Zellen wurde das Protein gefällt und im Überstand der Gehalt an Gesamtglutathion (GSH + 2xGSSG) bzw. GSSG photometrisch mittels Ellmann-Test bestimmt. \* p < 0,01 vs. Kontrolle.

### 3.3.1.2 MD, PAO, DA und PDTC inhibieren die IL-1-induzierte Phosphorylierung der IRAK

Tewes et al. zeigten mittels *in vitro* Kinase Tests an IL-1RI-Immunpräzipitaten, dass eine IL-1-abhängige Kinase durch Vorbehandlung von EL-4-Zellen mit den thiolmodifizierenden Agenzien MD, PAO, DA oder PDTC inhibiert ist [152]. Diese Kinase könnte die IRAK sein. Der Einfluss der genannten redoxaktiven Substanzen auf die IL-1-induzierte IRAK-Aktivierung wurde mittels IRAK-Western Blot und *in vitro* Kinase Test untersucht (Abb. 18). In unbehandelten Ansätzen wurde die phosphorylierte IRAK nach IL-1-Stimulation nachgewiesen (Abb. 18A, Spuren 2 und 8). MD-, PAO- und DA- inhibierten vollständig, dagegen PDTC-Behandlung der Zellen nur gering, die IL-1-induzierte Phosphorylierung der IRAK (Spuren 4, 6, 10 vs. 12).



**Abb. 18:** Die IL-1-abhängige Phosphorylierung der IRAK wird durch MD, PAO, DA und PDTC inhibiert

EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden mit MD (50  $\mu$ M, 15 min), PAO (1  $\mu$ M, 30 min), DA (500  $\mu$ M, 45 min), PDTC (100  $\mu$ M, 30 min) oder den entsprechenden Lösungsmitteln vorbehandelt und für 5 min mit IL-1 (5 ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. IRAK wurde aus Lysaten immunpräzipitiert (IP), **(A)** mittels 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt und im IRAK-Western Blot (WB) nachgewiesen. **(B)** IRAK-IPs wurden im *in vitro* Kinase Test phosphoryliert, elektrophoretisch getrennt (7,5% SDS-Gel) und mittels Autoradiographie (ARG) detektiert. ‚H‘ = schwere Kette des Antikörpers.

Die ARG zeigte einen substanzabhängigen Einfluss der IRAK- und p60-Phosphorylierung (Abb. 18B). Die IL-1-induzierte Aktivierung der IRAK wurde vollständig durch MD, PAO und DA gehemmt. Hingegen hatte PDTC nur einen geringen Effekt auf die Phosphorylierungen der IRAK und des p60 (Spuren 4, 6, 10 vs. 12).

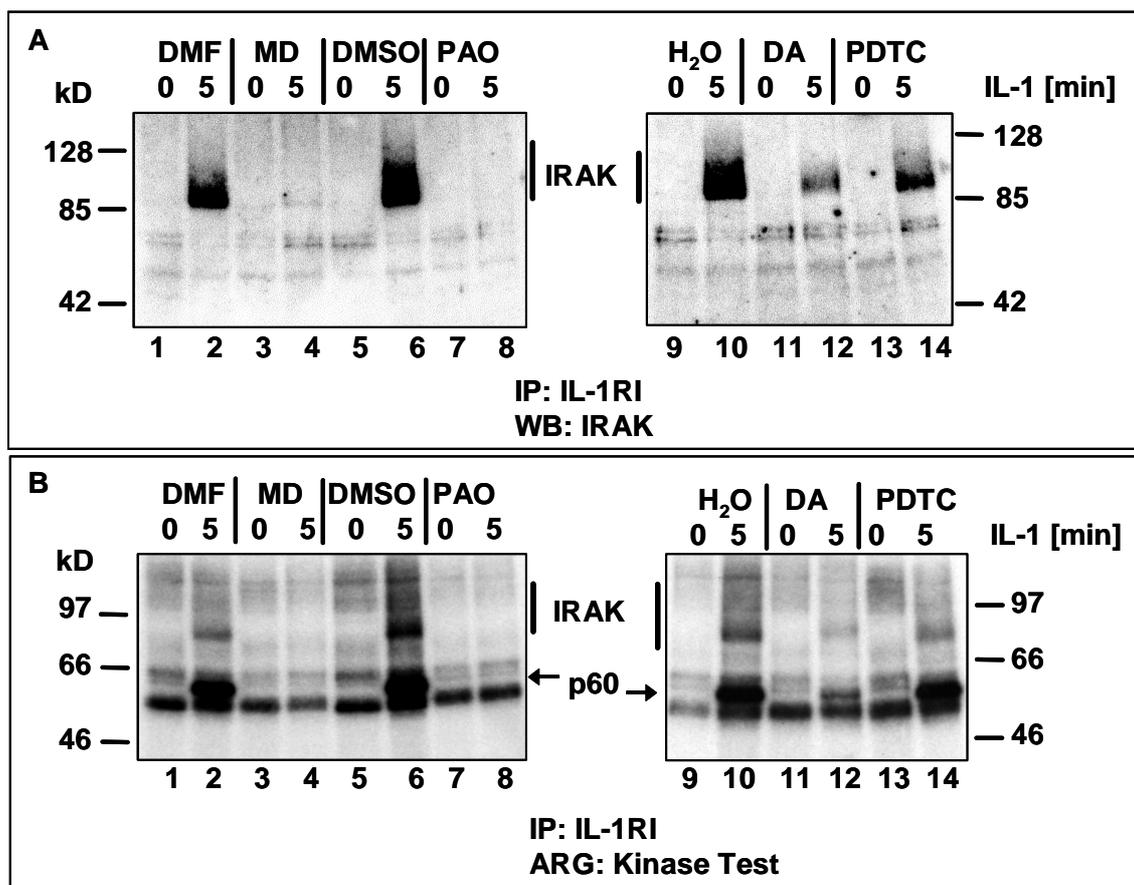
MD, PAO, DA und PDTC blockierten vermutlich die IL-1-abhängige Aktivität der IRAK, einer co-präzipitierten Kinase oder die Assoziation einer co-präzipitierten Kinase.

### 3.3.1.3 MD, PAO, DA und PDTC blockieren die IL-1-vermittelte Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI

Die Vorinkubation der Zellen mit MD, PAO, DA oder PDTC in den verwendeten Konzentrationen hatte keinen Einfluss auf (i) die Vitalität von EL-4-Zellen, (ii) die Ligandenbindung an den Rezeptor und (iii) Kinase-Aktivitäten der IRAK oder einer assoziierten Kinase [160]. Somit wurden die Wirkungen von MD, PAO, DA und PDTC auf die IL-1-abhängige Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI untersucht.

Aus vorbehandelten EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden der IL-1RI und IL-1RI-assoziierte Proteine präzipitiert und co-präzipitierte IRAK im Western Blot nachgewiesen (Abb. 19A). MD und PAO inhibierten die IL-1-induzierte Assoziation der IRAK an den Rezeptor vollständig, während DA und PDTC sie nur verminderten (Spuren 4 und 8 vs. 12 und 14).

Die Phosphorylierungen IL-1RI-assoziiierter Proteine wurden mittels *in vitro* Kinase Test untersucht (Abb. 19B). MD und PAO hemmten die Phosphorylierungen von IRAK und p60 (Spuren 4 und 8). Die Phosphorylierungen der IRAK und p60 wurden durch DA- gering und durch PDTC-Behandlung der Zellen nicht beeinflusst (Spur 12 vs. 14). Weder eine IL-1-abhängige Co-präzipitation der IRAK mit dem IL-1RI noch Phosphorylierungen der IRAK oder p60 wurden durch die verwendeten Lösungsmittel (DMF, DMSO) beeinflusst (Spuren 2 und 6).



**Abb. 19: Die Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI wird durch MD, PAO, DA und PDTC beeinflusst**

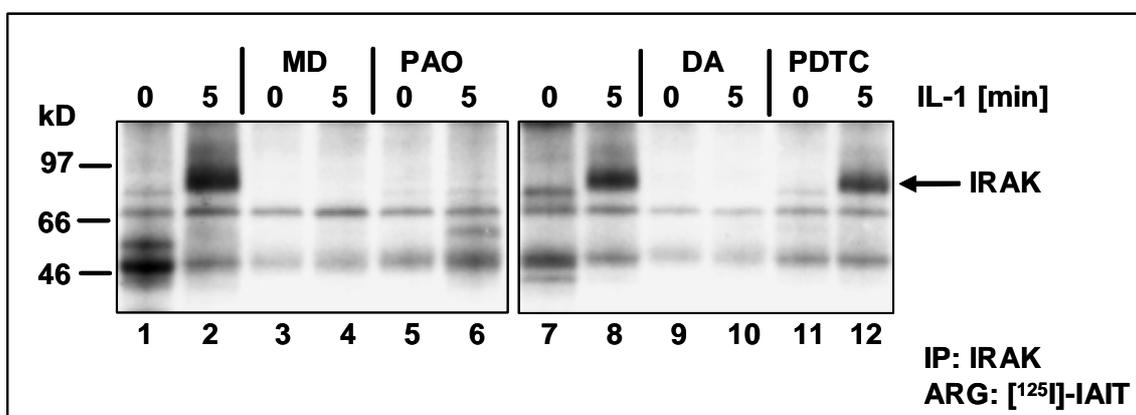
EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden wie in Abb. 18 beschrieben behandelt und der IL-1RI aus Lysaten immunpräzipitiert (IP). **(A)** IPs wurden mittels 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt und IRAK im Western Blot (WB) ermittelt. **(B)** Co-präzipitierte Proteine wurden im *in vitro* Kinase Test phosphoryliert, elektrophoretisch aufgetrennt (7,5% SDS-Gel) und durch Autoradiographie (ARG) identifiziert.

Die IRAK und p60 wurden aus vorbehandelten Proben mit dem IL-1RI nicht oder vermindert co-präzipitiert und möglicherweise somit in der ARG nicht detektiert. Der Umfang der Inhibitionen der IL-1-induzierten Assoziation der IRAK an den IL-1RI und Phosphorylierungsereignisse durch die verschiedenen thiolmodifizierenden Agenzien verringerte sich in der Reihenfolge: PAO = MD > DA > PDTC.

#### 3.3.1.4 MD, PAO, DA und PDTC führen zur Modifikation von Thiolen der IRAK

Um zu testen, ob Thiole der IRAK durch MD, PAO, DA oder PDTC modifiziert werden, wurde die IRAK aus dem Cytosol präzipitiert und Thiole mit [<sup>125</sup>I]-IAIT markiert (Abb. 20). Nach IL-1-Stimulation wurde eine erhöhte Thiolmarkierung der IRAK in unbehandelten

Ansätzen detektiert (Spur 1 vs. 2). MD- und DA-behandelte Proben zeigten keine  $[^{125}\text{I}]$ -IAIT-markierbaren Thiole der IRAK weder in unstimulierten noch in IL-1-stimulierten EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen (Spuren 3, 4 und 9, 10). PAO-behandelte Proben wiesen ein geringes Restsignal auf, das vermutlich durch  $[^{125}\text{I}]$ -IAIT-markierte Monothiole hervorgerufen wurde (Spuren 5 und 6). Die Vorinkubation der Zellen mit PDTC führte zu einer geringeren Inhibierung der IL-1-abhängigen  $[^{125}\text{I}]$ -IAIT-Markierung der IRAK-Thiole (Spuren 11 und 12). MD, PAO, DA oder PDTC modifizieren vermutlich direkt Thiole der IRAK oder unterbinden die Verfügbarkeit von  $[^{125}\text{I}]$ -IAIT-markierbaren Thiolen. Der Umfang der Modifikation von Thiolen der IRAK durch die verschiedenen Agenzien verringerte sich in der Reihenfolge: MD = DA > PAO > PDTC.



**Abb. 20: Nachweis von Thiolmodifikationen der IRAK durch MD, PAO, DA und PDTC**

EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden wie in Abb. 18 beschrieben behandelt. IRAK wurde aus Lysaten immunpräzipitiert (IP), zugängliche Thiole mit  $[^{125}\text{I}]$ -IAIT markiert, über ein 10% SDS-Gel aufgetrennt und mittels Autoradiographie (ARG) nachgewiesen.

### 3.3.2 Einfluss von Curcumin auf Ereignisse am IL-1RI

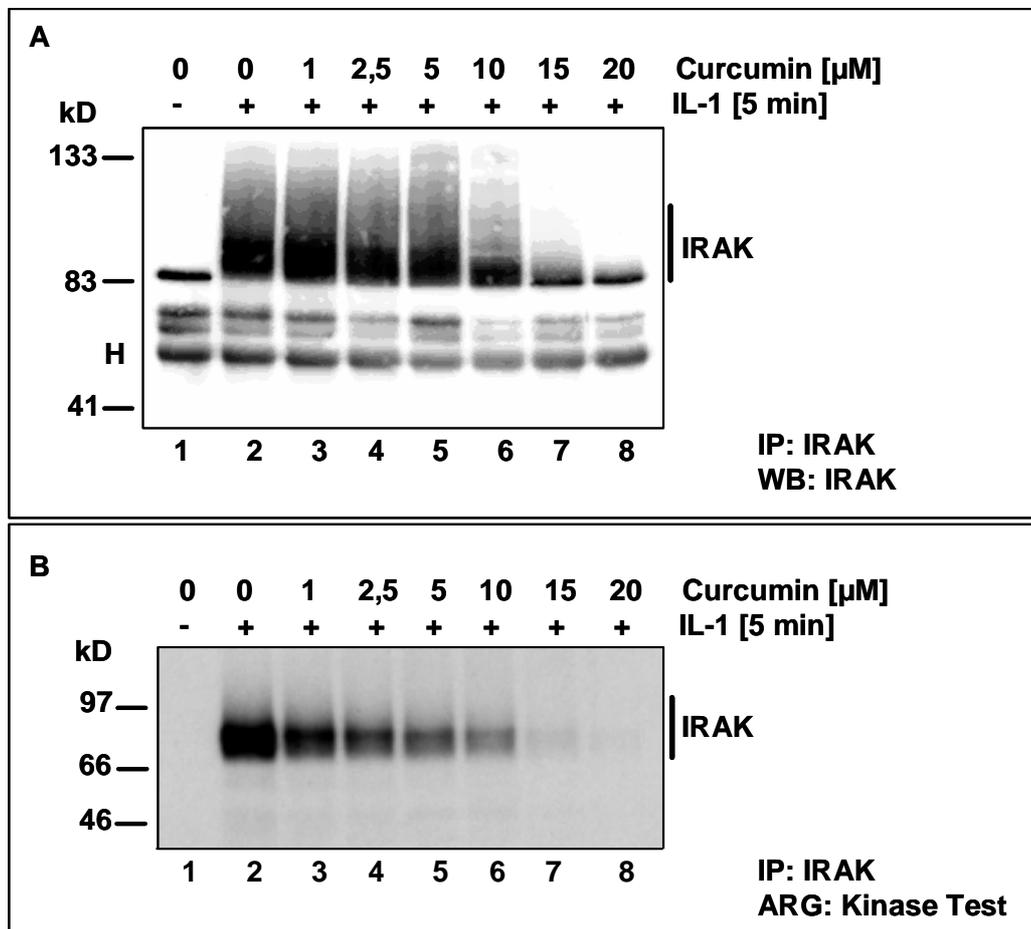
Curcumin ist eine nahrungsrelevante Substanz, die durch Inhibition der Zytokin-vermittelten Aktivierung von NF- $\kappa$ B [154] antiinflammatorisch wirkt. In Analogie zu den synthetischen Substanzen MD, PAO, DA und PDTC wurde Curcumin verwendet, um zu untersuchen ob es als redoxaktives Agens bereits einen Einfluss auf frühe Ereignisse in der IL-1 Signalkaskade hat.

#### 3.3.2.1 Curcumin hemmt die IL-1-induzierte Phosphorylierung der IRAK ohne wesentliche Beeinträchtigung ihrer Kinase-Aktivität

Die Wirkung von Curcumin auf die Aktivierung der IRAK wurde mit IRAK-Immünpräzipitaten im IRAK-Western Blot detektiert (Abb. 21A). Die Vorbehandlung der Zellen

mit 2,5  $\mu\text{M}$  Curcumin reduzierte die Phosphorylierung der IRAK, was aus der Abnahme der Bandenverbreiterung ersichtlich war (Spuren 2 und 3 vs. 4). Eine vollständige Hemmung der IRAK-Aktivierung war ab 15  $\mu\text{M}$  Curcumin zu beobachten (Spuren 7 und 8). In diesen Ansätzen war die IRAK nur als Bande bei 80 kD zu erkennen.

Aktivitäten von Kinasen wurden mittels *in vitro* Kinase Test überprüft (Abb. 21B). Die Kontrolle zeigte eine IL-1-induzierte Phosphorylierung der IRAK (Spur 1 vs. 2). Eine Vorbehandlung der Zellen mit Curcumin hemmte konzentrationsabhängig die Phosphorylierung der IRAK (Spuren 3 bis 8). Ein Einfluss war bereits ab 1  $\mu\text{M}$  Curcumin zu beobachten. Eine Aktivierung der IRAK war in mit 15 und 20  $\mu\text{M}$  Curcumin-vorbehandelten Zellen nicht nachweisbar. Ethanol als Lösungsmittel hatte jeweils keinen Einfluss auf die IL-1-induzierte Phosphorylierung der IRAK (Spuren 2).

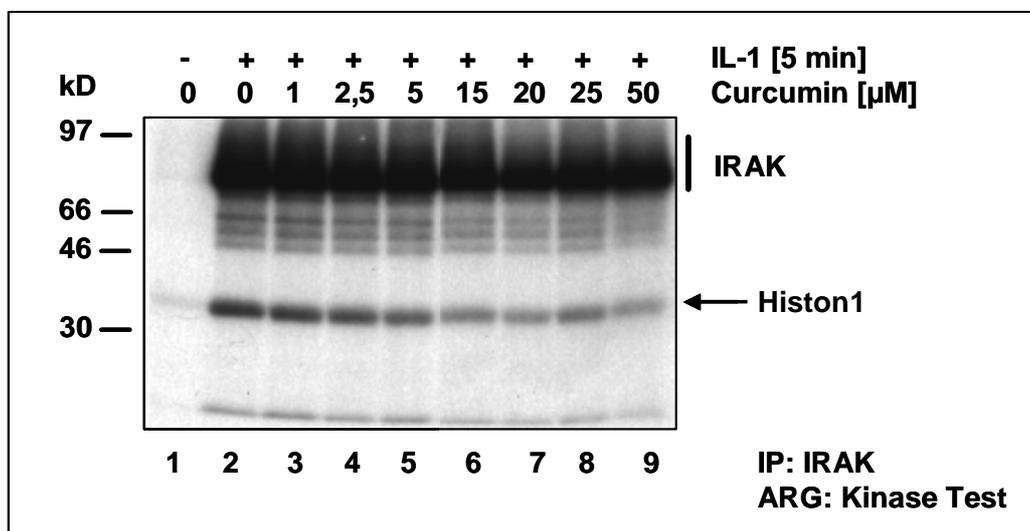


**Abb. 21: Curcumin beeinflusst konzentrationsabhängig die IL-1-vermittelte Phosphorylierung der IRAK**

EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden mit Curcumin für 15 min in den angegebenen Konzentrationen oder Ethanol als Lösungsmittel vorinkubiert, für 5 min mit IL-1 (5 ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. IRAK wurde aus Lysaten immunpräzipitiert (IP), **(A)** im IRAK-Western Blot (WB) nachgewiesen oder **(B)** im *in vitro* Kinase Test phosphoryliert und mittels Autoradiographie (ARG) ermittelt. ‚H‘ = schwere Kette des Antikörpers.

Zum Nachweis, ob Kinase-Aktivitäten der IRAK oder einer co-präzipitierten Kinase durch Curcumin direkt beeinflusst sind, wurden Histon 1 als exogenes Substrat und Curcumin in verschiedenen Konzentrationen während des *in vitro* Kinase Tests unmittelbar zum IRAK-Immunpräzipitat gegeben (Abb. 22). Kinase-Aktivitäten wurden durch Phosphorylierungen von IRAK und Histon 1 in unbehandelten IL-1-stimulierten Proben nachgewiesen (Spur 2). Eine Abnahme der Phosphorylierung des exogenen Substrats und eine geringfügige Verminderung der Phosphorylierung der IRAK waren ab 15  $\mu$ M Curcumin zu detektieren (Spuren 6 bis 9).

Die geringe Abnahme dieser Phosphorylierung der IRAK erklärt nicht die vollständige Hemmung der IRAK-Phosphorylierung in Abb. 21B, da Letzteres am ehesten durch Blockierung der Assoziation einer anderen Kinase zu erklären ist.



**Abb. 22: Einfluss von Curcumin auf die Phosphorylierungen von Histon 1 und IRAK**

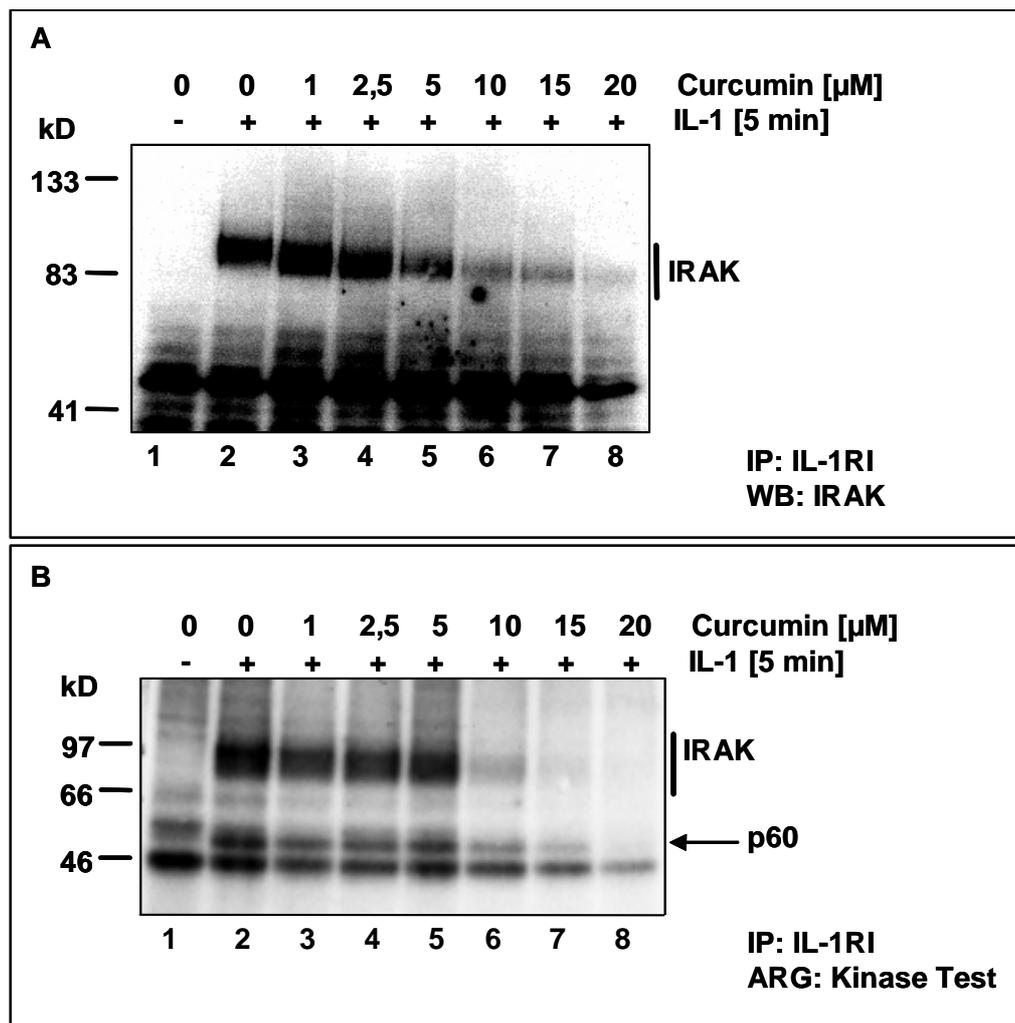
EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden 5 min mit IL-1 (5 ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen und IRAK aus Lysaten immunpräzipitiert (IP). Im *in vitro* Kinase Test wurden 5  $\mu$ g Histon 1 als exogenes Substrat, Ethanol als Lösungsmittel oder Curcumin in den angegebenen Konzentrationen mit dem IRAK-Immunpräzipitat inkubiert. Der Ansatz wurde mittels 10% SDS-PAGE aufgetrennt und phosphorylierte Proteine durch Autoradiographie (ARG) identifiziert.

### 3.3.2.2 Curcumin blockiert die IL-1-vermittelte Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI

Der Effekt von Curcumin auf die Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI wurde mittels IRAK-Western Blot von IL-1RI-Immunpräzipitaten untersucht (Abb. 23A). Curcumin blockierte dosisabhängig die IL-1-induzierte Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI (Spur 2 vs. Spuren 3 bis 8). Eine Reduktion war ab 5  $\mu$ M Curcumin zu beobachten. Die Vorinkubation der Zellen mit 20  $\mu$ M Curcumin inhibierte die Co-präzipitation vollständig.

Aktivitäten IL-1RI-assoziiierter Kinasen wurden durch *in vitro* Kinase Tests ermittelt (Abb. 23B). Erst IL-1 führte zu einer Phosphorylierung der IL-1RI-co-präzipitierten IRAK

und p60 in den Lösungsmittelansätzen (Spur 2). Curcumin bewirkte eine konzentrationsabhängige Reduktion der Phosphorylierung von IRAK und p60 (Spuren 3 bis 8). Eine Beeinträchtigung der Phosphorylierung war ab 10  $\mu\text{M}$  und eine vollständige Inhibition ab 15  $\mu\text{M}$  Curcumin nachzuweisen. Somit blockiert Curcumin, wie die schon zuvor beschriebenen thiolmodifizierenden Substanzen, die Rekrutierung der IRAK an den Rezeptor. Ethanol hatte jeweils keinen stimulatorischen oder inhibitorischen Einfluss auf die IL-1-abhängige Co-präzipitation der IRAK mit dem Rezeptor (Spuren 1 und 2).

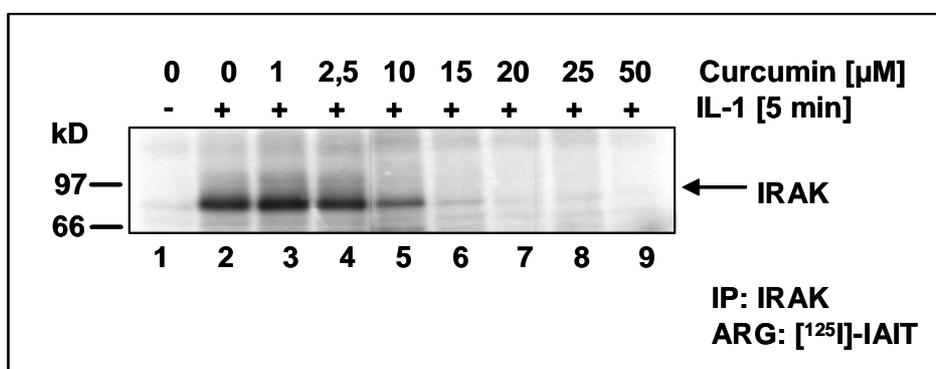


**Abb. 23: Curcumin inhibiert konzentrationsabhängig die Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI**

EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden wie in Abb. 21 beschrieben behandelt. Der IL-1RI wurde aus Lysaten immunpräzipitiert (IP), **(A)** IPs mittels 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt und IRAK im Western Blot (WB) nachgewiesen. **(B)** IL-1RI-co-präzipitierte Proteine wurden im *in vitro* Kinase Test phosphoryliert, elektrophoretisch aufgetrennt (7,5% SDS-Gel) und mittels Autoradiographie (ARG) detektiert.

## 3.3.2.3 Modifikation von Thiolen der IRAK durch Curcumin

Curcumin ist eine elektrophile Substanz und somit in der Lage, Proteinthiole zu beeinflussen [138]. Zum Nachweis, ob Curcumin auch Thiole der IRAK modifiziert, wurden nach Vorbehandlung mit Curcumin freie SH-Gruppen an IRAK-Immünpräzipitaten mit [<sup>125</sup>I]-IAIT markiert (Abb. 24). In unbehandelten Ansätzen war nach IL-1-Stimulation eine erhöhte Verfügbarkeit der [<sup>125</sup>I]-IAIT-markierbaren Thiolen der IRAK sichtbar (Spur 1 vs. 2). Zunehmende Konzentrationen an Curcumin verhinderten eine IL-1-abhängige Markierung der IRAK mit [<sup>125</sup>I]-IAIT (Spuren 3 bis 9). Konzentrationen von 15 bis 50 µM Curcumin führten zur vollständigen Blockierung von freien Thiolen der IRAK. Curcumin modifiziert vermutlich direkt Thiole der IRAK und unterbindet so die Zugänglichkeit für die [<sup>125</sup>I]-IAIT-Markierung.



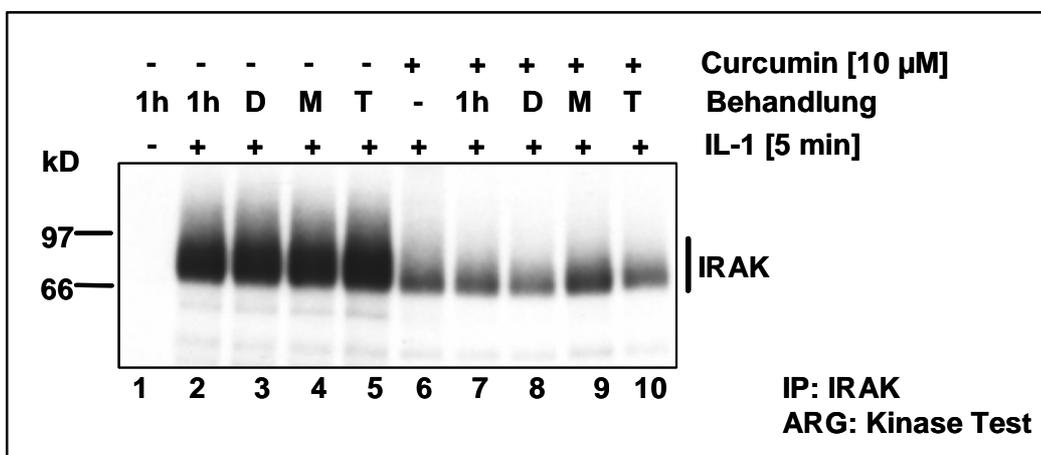
**Abb. 24: Curcumin modifiziert konzentrationsabhängig Thiole der IRAK**

EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden wie in Abb. 21 beschrieben behandelt. IRAK wurde aus Lysaten immunpräzipitiert (IP), zugängliche Thiole mit [<sup>125</sup>I]-IAIT markiert, mit Hilfe eines 10% SDS-Geles aufgetrennt und durch Autoradiographie (ARG) identifiziert.

## 3.3.2.4 Der inhibitorische Effekt von Curcumin auf die Phosphorylierung der IRAK ist durch reduzierende Agenzien nicht reversibel

Ein inhibitorischer Effekt von PAO auf die NF-κB-Aktivierung ist mit starken Reduktionsmitteln wie DTT oder DMP reversibel [131,153]. Eine mögliche Reversibilität der hemmenden Wirkung von Curcumin auf die Phosphorylierung der IRAK wurde durch Verwendung von DTT, β-ME und TCEP mittels *in vitro* Kinase Test ermittelt (Abb. 25). Die IL-1-abhängige Phosphorylierung der IRAK wurde durch Inkubation der Zellen mit DTT, β-ME oder TCEP nicht beeinflusst (Spuren 3, 4 und 5). 10 µM Curcumin führten zur verringerten Phosphorylierung der IRAK (Spur 6). Der inhibitorische Effekt von Curcumin war weder durch 1 h Erholung der Zellen im Medium noch durch DTT-, β-ME- oder TCEP-

Behandlung reversibel zu machen (Spur 7 vs. 8 bis 10). Dieses weist auf unterschiedliche Mechanismen der Thiolmodifikation durch PAO und Curcumin hin.



**Abb. 25: Die Inhibition der IL-1-abhängigen Phosphorylierung der IRAK durch Curcumin ist durch reduzierende Agenzien nicht reversibel zu machen**

EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden mit 10 µM Curcumin für 15 min oder Ethanol als Lösungsmittel vorbehandelt. Zellen wurden entweder mit IL-1 stimuliert und direkt geerntet (-) oder sie wurden für 1 h in Medium allein (1h), mit 100 µM DTT (D), 50 µM β-ME (M) oder 100 µM TCEP (T) inkubiert. Diese Zellen wurden mit IL-1 stimuliert oder unbehandelt gelassen. IRAK wurde aus Lysaten immunpräzipitiert (IP), im *in vitro* Kinase Test phosphoryliert, mittels 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie (ARG) detektiert.

### 3.3.2.5 Die Interaktion von IL-1 mit dem Rezeptor wird von Curcumin nicht beeinträchtigt

Um auszuschließen, dass Curcumin die Vitalität der EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen beeinflusst und somit die Inhibition des IL-1-Signalweges verursacht, wurde ein Neutralrot-Test durchgeführt (Tabelle 8).

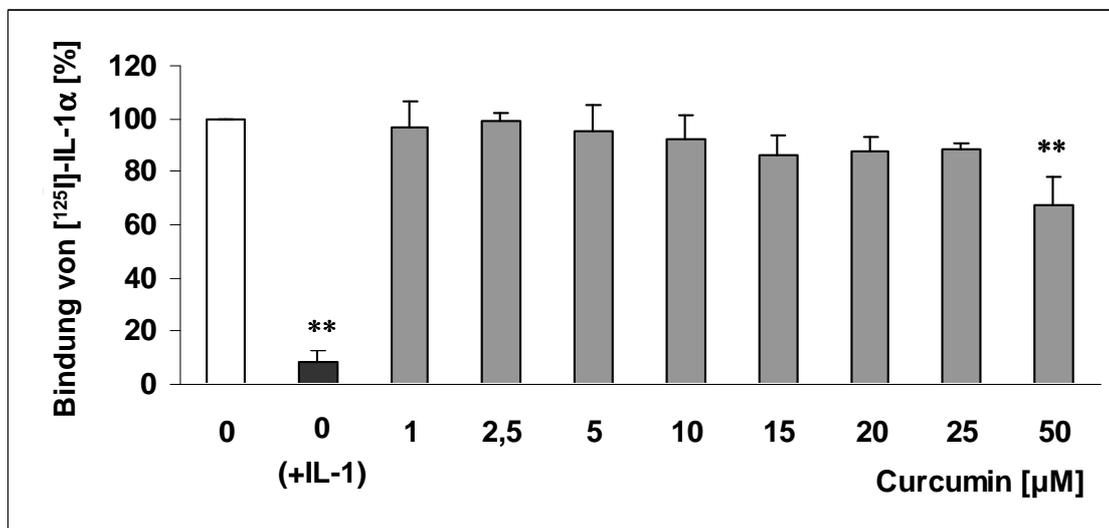
Curcumin [µM]	0	5	10	20	50
Vitalität [%]	100,0 ± 0,0	105,5 ± 9,0	97,5 ± 15,6	79,5 ± 11,2	68,5 ± 11,7

**Tabelle 8: Curcumin beeinflusst die Vitalität von EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen erst in hohen Konzentrationen**

EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Curcumin für 15 min oder Ethanol als Lösungsmittel vorinkubiert und die Vitalität mittels Neutralrot-Test bestimmt. Die Lösungsmittelkontrolle wurde auf 100% gesetzt und die Curcumin-behandelten Ansätze dazu ins Verhältnis.

Ab einer Konzentration von 20 µM beeinflusst Curcumin die Vitalität der Zellen. Diese Beeinträchtigung ist aber nicht der Grund für die bereits dargestellten Inhibitionen der IL-1-abhängigen Ereignisse, da für den Vitalitätsverlust eine mindestens doppelt so hohe Konzentration nötig war als für die beschriebenen Effekte.

Um eine mögliche extrazelluläre Beeinträchtigung der Interaktion von IL-1 mit dem IL-1RI durch Curcumin auszuschließen, wurde die Bindung von IL-1 an den Rezeptor in einem Bindungstest quantifiziert (Abb. 26). Die Inkubation der Zellen mit einem 300-fachen Überschuss an unmarkiertem IL-1 reduzierte signifikant die Bindung des radioaktiv markierten Liganden auf  $8,4\% \pm 4,7\%$  (schwarzer Balken). Konzentrationen bis zu  $25\ \mu\text{M}$  Curcumin verringerten die Bindung von  $[^{125}\text{I}]\text{-IL-1}\alpha$  an den Rezeptor um ca. 10% (weißer vs. graue Balken). Diese leicht reduzierte Rezeptorbelegung erklärt nicht die Inhibitionen der IRAK-Rekrutierung an den IL-1RI und Phosphorylierungen durch Curcumin, welche bereits bei  $10\ \mu\text{M}$  Curcumin zu sehen waren. Erst  $50\ \mu\text{M}$  Curcumin verdrängte zum Teil den radioaktiv markierten Liganden ( $67,2\% \pm 10,6\%$ ).



**Abb. 26: Curcumin hat nur einen geringfügigen Einfluss auf die Interaktion von IL-1 mit dem IL-1RI**

EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Curcumin für 15 min oder Ethanol als Lösungsmittel vorinkubiert und anschließend die Bindung des  $[^{125}\text{I}]\text{-IL-1}\alpha$  an den Rezeptor bestimmt. Die Lösungsmittelkontrolle wurde auf 100% gesetzt und die behandelten Ansätze dazu ins Verhältnis. Zur Kompetitionsanalyse wurde unmarkiertes IL-1 $\alpha$  (+IL-1) eingesetzt. \*\*  $p < 0,01$  vs. Lösungsmittelansatz.

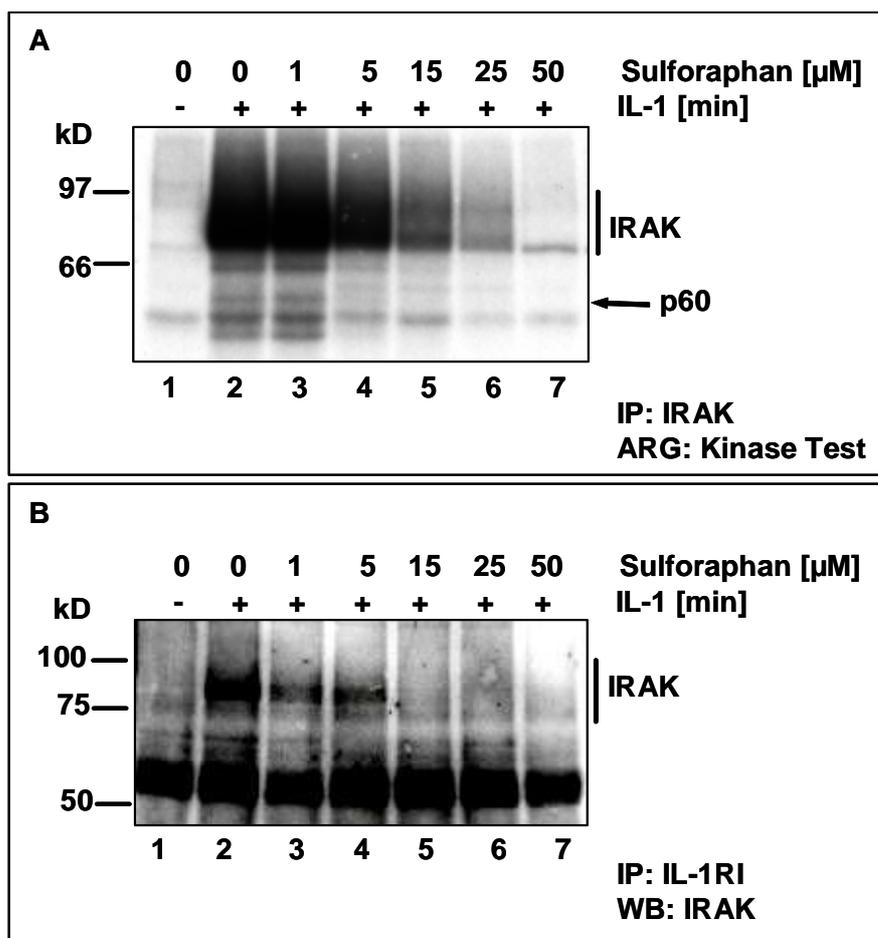
### 3.3.3 Wirkung von Sulforaphan auf Ereignisse am IL-1RI-Komplex

Sulforaphan ist ebenfalls natürlichen Ursprungs und wirkt antiinflammatorisch durch Inhibition der LPS-induzierten Aktivierung von NF- $\kappa\text{B}$ , Expression der iNOS bzw. COX-2 und Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und NO [157-159]. Des Weiteren kann Sulforaphan als elektrophile Substanz Thiole modifizieren, z. B. von Keap1 [141,142]. In

Analogie zu Curcumin wurde die Wirkung von Sulforaphan auf die IL-1-abhängige Aktivierung der IRAK untersucht.

### 3.3.3.1 Die IL-1-abhängige Rekrutierung und Phosphorylierung der IRAK sind durch Sulforaphan blockiert

Der Einfluss von Sulforaphan auf die Phosphorylierung der IRAK wurde mittels *in vitro* Kinase Test an IRAK-Immünpräzipitaten untersucht (Abb. 27A). In der Kontrolle wurden die IRAK und p60 IL-1-abhängig phosphoryliert (Spur 2). Diese Phosphorylierungen waren dosisabhängig durch Sulforaphan gehemmt (Spuren 3 bis 7). Phosphorylierungen der IRAK und p60 waren ab 15  $\mu\text{M}$  Sulforaphan zum Teil und mit 50  $\mu\text{M}$  vollständig inhibiert. Im Vergleich zu den kurzen Vorinkubationzeiten der bereits untersuchten Substanzen wurde eine konzentrationsabhängige Inhibition erst nach 16 h Sulforaphan-Behandlung beobachtet.



**Abb. 27: Sulforaphan hemmt dosisabhängig die Assoziation der IRAK an den IL-1RI und deren Phosphorylierung**

EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden mit Sulforaphan für 16 h in den angegebenen Konzentrationen oder DMSO inkubiert, für 5 min mit IL-1 (5 ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. **(A)** IRAK wurde präzipitiert (IP), im *in vitro* Kinase Test phosphoryliert, elektrophoretisch aufgetrennt (7,5% SDS-Gel) und in der Autoradiographie (ARG) ermittelt. **(B)** IL-1RI-IPs wurden durch 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt und IRAK im Western Blot (WB) nachgewiesen.

Die Wirkung von Sulforaphan auf die Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI wurde durch Präzipitation des IL-1RI im IRAK-Western Blot nachgewiesen (Abb. 27B). 1 und 5  $\mu\text{M}$  Sulforaphan waren ausreichend, die Co-präzipitation der IRAK mit dem Rezeptor zu beeinträchtigen (Spuren 3 und 4). Höhere Konzentrationen an Sulforaphan führten zu einer vollständigen Hemmung der Assoziation der IRAK an den IL-1RI (Spuren 5 bis 7). Das Lösungsmittel DMSO hatte keinen inhibitorischen Effekt auf die IL-1-induzierte Co-präzipitation der IRAK mit dem IL-1RI (Spur 1 vs. 2).

Die Inkubationszeit von 16 h lässt andere Mechanismen als lediglich die Hemmung der Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI vermuten.

Um auszuschließen, dass Sulforaphan die Vitalität der Zellen beeinflusst, wurde die Proliferation mittels MTT-Test untersucht (Tabelle 9). Erst 25  $\mu\text{M}$  Sulforaphan führten zu einer geringfügig verringerten Proliferationsrate der Zellen. Die Beeinträchtigung der Vitalität durch Sulforaphan ist nicht der Grund für die bereits dargestellten Inhibitionen der IRAK-Aktivierung, die bereits ab 15  $\mu\text{M}$  Sulforaphan deutlich waren.

Sulforaphan [ $\mu\text{M}$ ]	0	5	15	25
Vitalität [%]	100,0 $\pm$ 0,0	103,0 $\pm$ 10,5	86,5 $\pm$ 8,5	82,9 $\pm$ 5,8

**Tabelle 9: Sulforaphan wirkt auf EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen nicht cytotoxisch**

EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Sulforaphan oder DMSO als Lösungsmittel für 16 h vorinkubiert und die Proliferation mittels MTT-Test bestimmt. Die Lösungsmittelkontrolle wurde auf 100% gesetzt und die Sulforaphan-behandelten Ansätze dazu ins Verhältnis.

### 3.3.3.2 Sulforaphan induziert die Expression von Tollip in zwei verschiedenen Zelllinien

Wie bereits erwähnt, benötigt Sulforaphan 16 h für inhibitorische Effekte auf den IL-1-Signalweg. Sulforaphan ist ein Aktivator des Transkriptionsfaktors Nrf2. Nukleär transloziertes Nrf2 bindet an das ARE (antioxidant response element) und induziert die Expression von Phase-II-Enzymen [140]. Gesucht wurde somit ein Protein, das (i) ein potientes ARE im Promotor enthält und (ii) für seine inhibitorische Wirkung auf den IL-1RI-Komplex bekannt ist. Das Adapterprotein Tollip im IL-1RI-Komplex hat einen hemmenden Einfluss auf die IRAK-Aktivierung. Eine Überexpression von Tollip blockiert die LPS-induzierte Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI, deren Phosphorylierung [37,39] und die LPS- und IL-1-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B [36,169].

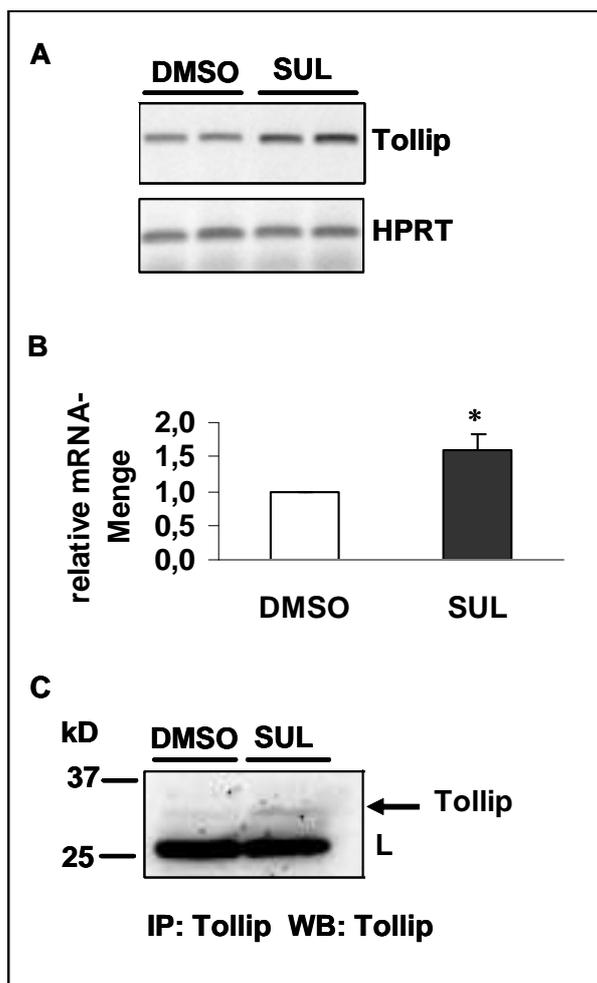
Die Überprüfung der genomischen Sequenz von ca. 2000 bp vor dem Startcodon des murinen Tollips (Genbank Nr. AL772165) mit Hilfe des Computerprogramms „MatInspector“ [170] ergab nur ein potentielles ARE. Dieses ARE befindet sich in Position -367 bis -347 (= mTollip-ARE). Die Sequenz des mTollip-ARE weicht jedoch in sechs Basen von der ARE-Konsensussequenz ab [171] (Abb. 28). In den 2000 bp vor dem Startcodon des humanen Tollips (Genbank Nr. AC136297) befindet sich ebenfalls nur ein ARE (= hTollip-ARE), das an Position -335 bis -315 ist. Dieses ARE stimmt in 10 von 15 Nukleotiden mit der ARE-Konsensussequenz überein. Der Vergleich der murinen und der humanen ARE-Sequenz von 20 bp zeigte keine signifikante Homologie, nur 9 bp sind identisch (= 45%). Eine speziesübergreifende Regulierung der Expression von Tollip scheint nicht gegeben.

<b>mTollip-ARE</b>	A	<b>C</b>	T	g	g	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	A	G	c	a	g	<b>G</b>	<b>C</b>	T	T	C	T	G
<b>hTollip-ARE</b>	C	<b>C</b>	G	t	c	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	A	<b>C</b>	t	g	g	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	G	C	G
<b>ARE-Konsensussequenz</b>	T	<sup>A</sup> / <sub>C</sub>	A	n	n	<sup>A</sup> / <sub>G</sub>	T	G	A	<sup>C</sup> / <sub>T</sub>	n	n	n	G	C	<sup>A</sup> / <sub>G</sub>	<sup>A</sup> / <sub>T</sub>	<sup>A</sup> / <sub>T</sub>	<sup>A</sup> / <sub>T</sub>	<sup>A</sup> / <sub>T</sub>

**Abb. 28: ARE-Sequenzen des murinen und humanen Tollip-Gens und der Konsensussequenz**

Übereinstimmende Nukleotide der jeweiligen Tollip-ARE mit der publizierten Konsensussequenz sind fett markiert.

Die Induktion der Expression von Tollip auf mRNA- und Proteinebene wurde in Sulforaphan-behandelten EL-4-Zellen überprüft (Abb. 29). Sulforaphan steigerte signifikant die endogene Expression von Tollip auf mRNA-Ebene um Faktor  $1,60 \pm 0,23$  (Abb. 29A und B). Zum Nachweis der Expression auf Proteinebene zeigte der verwendete Tollip-Antikörper keine spezifischen Banden in aufgetrennten Lysaten im Western Blot (nicht abgebildet). Deshalb erfolgte die Detektion von Tollip durch Immunpräzipitation aus Zelllysaten. Die Inkubation der Zellen mit Sulforaphan führte zu einer Zunahme der Proteinexpression von Tollip (Abb. 29C).



**Abb. 29: Induktion der Tollip-Expression durch Sulforaphan in EL-4-Zellen**

EL-4-Zellen wurden für 12 h (RNA) oder 24 h (Protein) mit 15  $\mu$ M Sulforaphan (SUL) oder DMSO als Lösungsmittel inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und die cDNA **(A)** mittels PCR mit Tollip-spezifischen Primern amplifiziert oder **(B)** eine Realtime-PCR mit Tollip-spezifischen Primern durchgeführt. Als Referenzen diente jeweils Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT). Die Kontroll-Probe (DMSO) wurde auf 1 gesetzt. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle. **(C)** Tollip wurde aus Lysaten immunpräzipitiert (IP) und im Western Blot (WB) detektiert. ‚L‘ = leichte Kette des Antikörpers.

Zur Begrenzung der TLR2-Ligandenantwort haben intestinale epitheliale Zellen (IEC) endogen eine hohe Tollip-Expression [172]. Zur Analyse, ob Sulforaphan auch in IEC die Tollip-Expression induziert, wurden CaCo-2-Zellen als Zellmodell verwendet.

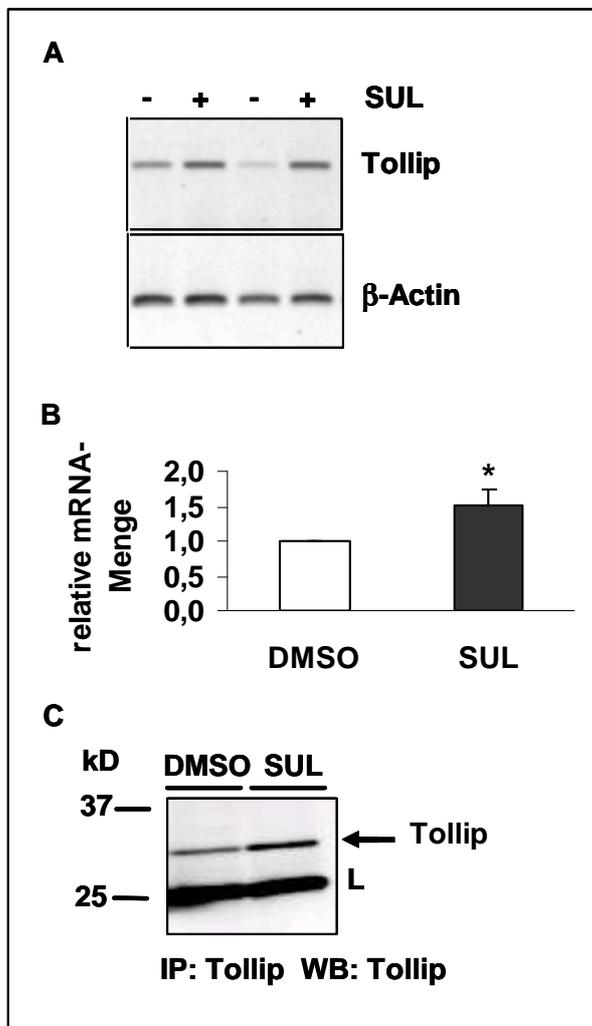
Um auszuschließen, dass Sulforaphan die Vitalität der Zellen beeinflusst, wurde ein MTT-Test an vorbehandelten Zellen durchgeführt (Tabelle 10). Sulforaphan hatte konzentrationsabhängig einen Einfluss auf die Proliferationsrate der Zellen. Für weitere Experimente wurden infolgedessen 5  $\mu$ M Sulforaphan eingesetzt.

Sulforaphan [ $\mu$ M]	0	1	5	10	15
Vitalität [%]	100,0 $\pm$ 0,0	93,1 $\pm$ 7,1	84,7 $\pm$ 3,4	81,3 $\pm$ 6,0	77,3 $\pm$ 3,0

**Tabelle 10: Sulforaphan beeinflusst in geringen Konzentrationen die Proliferation von CaCo-2-Zellen nicht**

CaCo-2-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Sulforaphan oder DMSO als Lösungsmittel für 48 h inkubiert und anschließend die Proliferationsrate mittels MTT-Tests bestimmt. Die Lösungsmittelkontrolle wurde auf 100% gesetzt und die Sulforaphan-behandelten Ansätze dazu ins Verhältnis.

Eine Behandlung von CaCo-2-Zellen mit Sulforaphan steigerte signifikant die endogene mRNA-Menge an Tollip um Faktor  $1,52 \pm 0,24$  (Abb. 30A und B). Eine erhöhte Proteinexpression von Tollip war in Sulforaphan-behandelten Zellen ebenfalls zu beobachten (Abb. 30C).



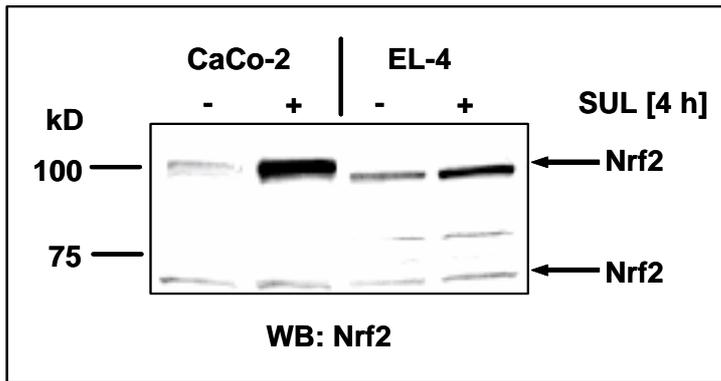
**Abb. 30: Sulforaphan induziert die Tollip-Expression in CaCo-2-Zellen**

CaCo-2-Zellen wurden für 8 h (RNA) oder 48 h (Protein) mit 5  $\mu$ M Sulforaphan (SUL) (+) oder DMSO als Lösungsmittel inkubiert (-). Anschließend wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und die cDNA (**A**) mittels PCR mit Tollip-spezifischen Primern amplifiziert. Dargestellt ist eine Doppelbestimmung. (**B**) Eine Realtime-PCR wurde mit der cDNA und Tollip-spezifischen Primern durchgeführt. Als Referenzgen diente jeweils  $\beta$ -Actin. Die Kontrollprobe (DMSO) wurde auf 1 gesetzt. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle. (**C**) Tollip wurde aus Lysaten immunpräzipitiert (IP) und mittels Western Blot (WB) identifiziert. ‚L‘ = leichte Kette des Antikörpers.

Eine Induktion von Tollip konnte in zwei verschiedenen Zelltypen, die sich ebenfalls in der Spezies unterscheiden, gezeigt werden.

### 3.3.3.3 Sulforaphan bewirkt eine Translokation von Nrf2 in den Zellkern

Der Nachweis der Translokation des Nrf2 durch Sulforaphan in EL-4- und CaCo2-Zellen erfolgte mittels Nrf2-Western Blot (Abb. 31). In unbehandelten Zellen ist eine nukleäre Lokalisation von Nrf2 zu detektieren (Spuren 1 und 3). Die Inkubation der Zellen mit Sulforaphan bewirkte eine verstärkte Akkumulation von Nrf2 im Zellkern sowohl in EL-4- als auch in CaCo-2-Zellen (Spuren 2 vs. 4). Der Nrf2-Antikörper erkannte zwei unterschiedlich große Proteinbanden von 70 bzw. 100 kD, wobei nur die größere durch Sulforaphan-Behandlung zunahm. Durch Komplexbildung mit Actin zeigt Nrf2 (70 kD) in Kernextrakten ein verändertes Laufverhalten, das im Cytosol nicht beobachtet wird [173].

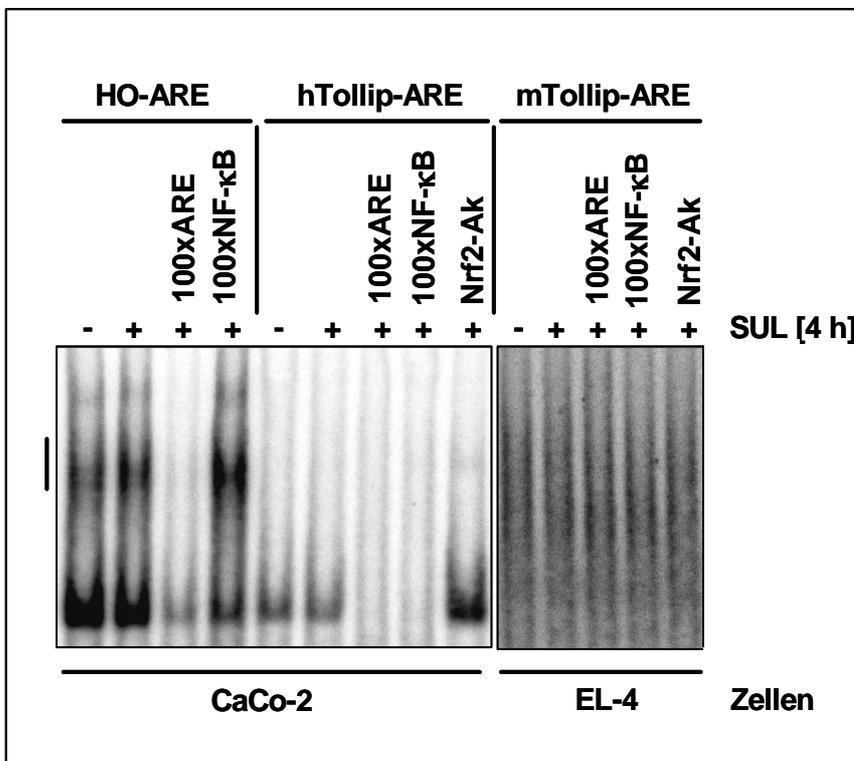


**Abb. 31: Sulforaphan führt zur nukleären Akkumulation von Nrf2**

CaCo2- und EL-4-Zellen wurden für 4 h mit 5 bzw. 15  $\mu$ M Sulforaphan (+) oder DMSO als Lösungsmittel inkubiert (-). Je 50  $\mu$ g Kernextrakt wurden über ein 7,5% SDS-Gel aufgetrennt und Nrf2 im Western Blot (WB) ermittelt.

### 3.3.3.4 Die ARE des humanen und murinen Tollip-Promotors sind nicht beteiligt an der Sulforaphan-induzierten Tollip-Expression

Um zu ermitteln, ob die benannten Tollip-ARE funktionale responsive Elemente sind, wurde die direkte Interaktion von Nrf2 mit den entsprechenden ARE mittels EMSA (electrophoretic mobility shift assays) untersucht (Abb. 32). Als Positivkontrolle diente das ARE der murinen Hämoxigenase (HO-1), deren Gen durch Nrf2 reguliert wird [174].

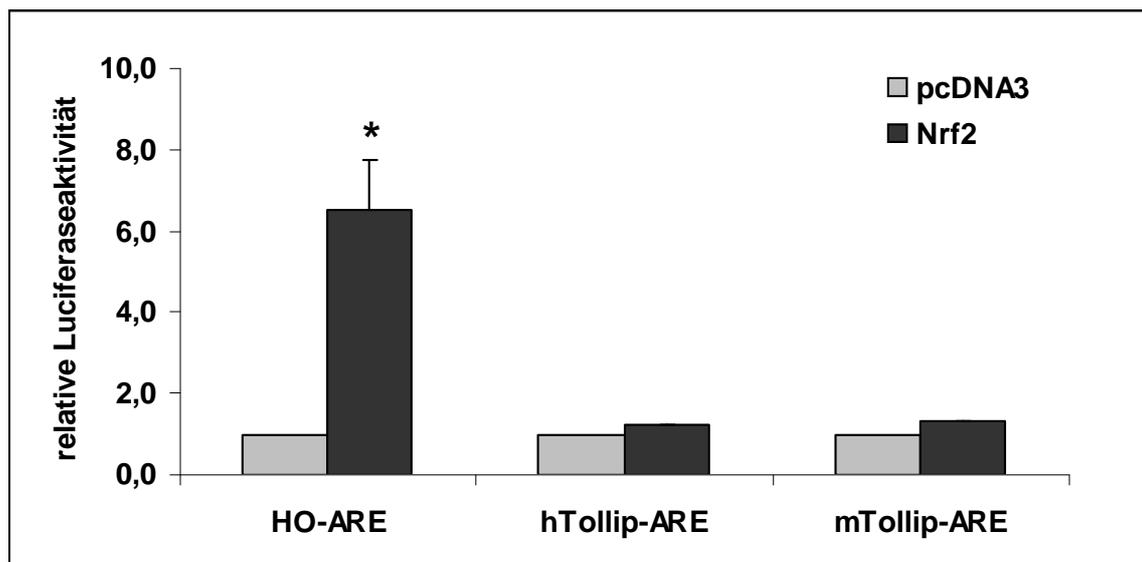


**Abb. 32: Sulforaphan führt nicht zur Bindung von Nrf2 an die Tollip-ARE**

CaCo2- und EL-4-Zellen wurden wie in Abb. 31 behandelt. Mit je 10  $\mu$ g Kernextrakt und den radioaktiven Oligonukleotiden HO-ARE, mTollip-ARE bzw. hTollip-ARE wurden EMSAs durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein 100x Überschuss des jeweiligen nicht-radioaktiv markierten oder des unspezifischen NF $\kappa$ B-Oligonukleotids hinzugegeben. Supershiftreaktionen sollten mit einem Nrf2-Antikörper nachgewiesen werden. Der spezifische Shift ist markiert.

Die Kontrolle wies eine spezifische Bindung an das HO-ARE auf, die durch Sulforaphan-Behandlung der Zellen verstärkt wurde (Spuren 1 vs. 2). Dies war nicht bei den entsprechenden Tollip-ARE zu beobachten (Spuren 5, 6 und 10, 11). An das hTollip-ARE wurde ein unspezifisches Protein gebunden, das nicht Nrf2 war. Die ARE des humanen und murinen Tollip-Promotors sind vermutlich nicht an der Sulforaphan-vermittelten Induktion des Tollips beteiligt.

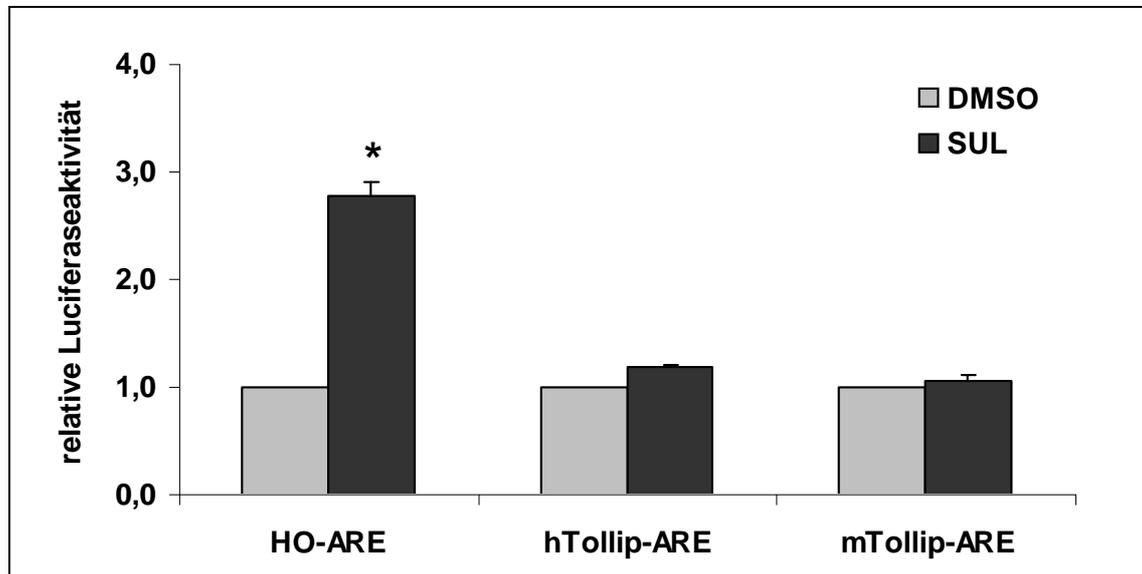
Eine weitere Methode zur Überprüfung der Funktionalität der ARE-Oligonukleotide ist die Reporteranalyse. Hierfür wurden die Tollip-ARE und das HO-ARE als Positivkontrolle in den Reportervektor pGL3-promoter kloniert und zusammen mit einem Nrf2-Expressionsplasmid oder leerem Vektor (pcDNA3) als Kontrolle in HepG2-Zellen transient transfiziert (Abb. 33). Das ARE des HO-Promotors wurde durch Nrf2 signifikant aktiviert ( $6,53 \pm 1,19$ ). Hingegen zeigten weder humanes noch murines Tollip-ARE nach Co-transfektion mit einem Nrf2-Expressionsplasmid eine Aktivierung des Reportergens.



**Abb. 33: Die Tollip-ARE-Reportergene werden durch Nrf2 nicht aktiviert**

HepG2-Zellen wurden transient mit den Reporterplasmiden HO-ARE, hTollip-ARE, mTollip-ARE bzw. mit leerem pGL3-promoter, zusätzlich mit einem Nrf2-Expressionsplasmid oder leerem Vektor (pcDNA3) als Kontrolle transfiziert. Die Zellen wurden nach 48 h geerntet und die Luciferase-Aktivität ermittelt. Die relativen Luciferase-Aktivitäten wurden auf die Reporteraktivität des leeren Plasmides pGL3-promoter bezogen und die Aktivität der jeweiligen mit pcDNA3-co-transfizierten Ansätze auf 1 gesetzt. \*  $p < 0,05$  vs. pcDNA3.

Die Behandlung der HepG2-Zellen mit Sulforaphan für 24 h aktivierte ebenfalls signifikant das HO-ARE-Reportergen ( $2,8 \pm 0,12$ ) (Abb. 34). Wiederum wiesen beide Tollip-AREs keine Reporterogenaktivität nach Sulforaphan-Behandlung auf.



**Abb. 34: Sulforaphan führt nicht zur Aktivierung der im humanen und murinen Tollip-Promotor vorhandenen ARE**

HepG2-Zellen wurden transient mit den Reporterplasmiden HO-ARE, hTollip-ARE, mTollip-ARE bzw. mit leerem pGL3-promoter transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 5  $\mu$ M Sulforaphan oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 24 h behandelt. In den geernteten Zellen wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die relativen Luciferase-Aktivitäten wurden auf die Reporteraktivität des leeren Plasmides pGL3-promoter bezogen und die Aktivität der jeweiligen mit DMSO-behandelten Ansätze auf 1 gesetzt. \*  $p < 0,01$  vs. DMSO.

Der Promotor des humanen und murinen Tollips enthält jeweils ein ARE, (i) an das Nrf2 nicht bindet und (ii) die weder durch Nrf2 selber oder durch Sulforaphan als Nrf2-Induktor aktiviert werden können. An der Sulforaphan-induzierten Expression des Tollips sind die untersuchten ARE-Elemente nicht beteiligt, die Aktivierung erfolgt nicht über den Nrf2/ARE-Mechanismus oder es fehlen zusätzliche Co-faktoren.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden der Einfluss von IL-1 auf die Assoziation und Aktivierung von Proteinen am IL-1RI und die Wirkungen von redoxaktiven Substanzen auf die genannten Prozesse untersucht. Als Ausgangspunkt diente eine frühere Arbeit, die eine Hemmung der Aktivierung IL-1RI-assoziiierter Kinasen durch thiolmodifizierende Substanzen in murinen EL-4-Zellen zeigte [152]. Eine Kinase im IL-1RI-Komplex ist die IRAK [42].

EL-4-Zellen mit stabil überexprimierter IRAK (EL-4<sup>IRAK</sup>) standen für alle weiteren Experimente zur Verfügung, da sie hinsichtlich der Untersuchung der Aktivierung der IRAK das geeignetere Zellmodell waren (Abb. 5 und Abb. 6). Sowohl humaner und muriner Rezeptor zeigen eine hohe Sequenzhomologie [11] wie auch humane IL-1 $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Sequenzen zu den jeweiligen murinen Sequenzen [175]. Somit war es möglich, Stimulationsexperimente mit humanem rekombinantem IL-1 $\beta$  an murinen Zellen durchzuführen. Die Rekrutierung von IRAK an den IL-1RI ist ein transienter Schritt [42]. Nach 30 sec war bereits eine Co-präzipitation der IRAK mit dem IL-1RI in ECV-Zellen nachweisbar, die sich nach 15 min IL-1-Behandlung verringerte [80]. Hier wurde für alle Untersuchungen ein Zeitpunkt von 5 min IL-1-Stimulation gewählt, um die Assoziation der IRAK an den IL-1RI und anschließende Phosphorylierungen und folglich Aktivitäten assoziierter Kinasen wie der IRAK zu zeigen.

Membranproteine wie der IL-1RI wurden während der Lyse unter Verwendung eines milden nicht ionischen Detergens (Brij97) schonend solubilisiert. Die geringen NaCl-Konzentrationen in den Lyse- und Waschpuffern gewährleisteten den Zusammenhalt IL-1RI- oder auch IRAK-assoziiierter Proteine z. B. innerhalb der Immunpräzipitation. Somit wurden Nachweise einzelner Komponenten des Rezeptorkomplexes durch Co-präzipitationen im Western Blot möglich. Aktivitäten IL-1RI-assoziiierter Kinasen und auch der IRAK wurden mittels *in vitro* Kinase Test untersucht. Freie SH-Gruppen in Proteinen wurden mit dem thiol-spezifischen Reagenz [<sup>125</sup>I]-IAIT markiert.

### 4.1 Proteine des IL-1RI-Komplexes

#### 4.1.1 IL-1RI-assoziierte Proteine

##### p30, p50 und p70

Die ARG der [<sup>125</sup>I]-IAIT-Markierung von Thiolen an IL-1RI-Immunpräzipitaten (Abb. 8) zeigte, dass ohne IL-1-Behandlung Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 30, 50

und 70 kD mit dem IL-1RI co-präzipitierten. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proben enthielten denaturierte Proteine des Immunkomplexes. Folglich kann die markierte p50-Bande vom verwendeten Antikörper stammen. Proteine des IL-1RI-Komplexes wie MyD88 (33 kD), Tollip (31 kD), IRAK-4 (52 kD) oder IL-1RAcP (68 kD) assoziieren IL-1-abhängig an den Rezeptor und können somit nicht aus unstimulierten Lysaten mit einem IL-1RI-Antikörper co-präzipitiert werden. Die Hilfsproteine Pellino1 - 3 (46 - 51 kD) interagieren erst im Cytosol mit dem vom IL-1RI-dissoziierten IRAK/IRAK-4/TRAF6-Komplex [62-64] und sollten infolgedessen nicht mit den jeweiligen Antikörpern aus unstimulierten Lysaten co-präzipitiert werden. Vermutlich sind diese drei [<sup>125</sup>I]-IAIT-markierten Proteine immer am Rezeptor gebunden, wobei bis jetzt noch keine permanent IL-1RI-assoziierten Proteine beschrieben wurden. Die p30-, p50- und p70-Banden tauchten je nach Expositionsdauer der ARG in IRAK- und MyD88-Immunpräzipitaten auch auf (Abb. 12). Somit kann eine unspezifische Co-präzipitation ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

### **p32, p60, p80**

Nach IL-1-Stimulation waren drei zusätzliche Proteine mit einem Molekulargewicht von 32, 60 und 80 kD am IL-1-RI-Immunpräzipitat mit [<sup>125</sup>I]-IAIT markierbar (Abb. 8). Hierfür gibt es zwei vorstellbare Mechanismen:

- (i) Proteine mit freien SH-Gruppen assoziieren nach IL-1-Behandlung an den IL-1RI und deren Thiole werden dann mit [<sup>125</sup>I]-IAIT markiert.
- (ii) bereits IL-1RI-assoziierte Proteine ändern auf IL-1-Stimulation ihre Konformation, wobei Thiole für die [<sup>125</sup>I]-IAIT-Markierung zugänglich werden.

Es wurden im Folgenden p32 und p80 speziell untersucht. Durch IRAK-Immunpräzipitationen und [<sup>125</sup>I]-IAIT-Markierungen wurde gezeigt, dass IRAK [<sup>125</sup>I]-IAIT-markierbare Thiole besitzt. Der anschließende IRAK-Western Blot identifizierte p80 als IRAK (siehe 3.2.2), da die IRAK-Banden im Western Blot auf gleicher Höhe wie die [<sup>125</sup>I]-IAIT-Banden lagen.

Das p32 wurde sowohl im IL-1RI-Immunpräzipitat als auch im IRAK-Immunpräzipitat IL-1-abhängig [<sup>125</sup>I]-IAIT-markiert (Abb. 8 und Abb. 10). Die Reduktion mit TCEP ergab eine IL-1-abhängige Assoziation der IRAK mit dem p32 (Abb. 10). Infolgedessen kann p32 nicht Tollip (31 kD) sein, da der cytosolische Tollip/IRAK-Komplex konstitutiv existiert [36]. Trotz dieser Erkenntnis wurden Co-präzipitation-Experimente mit einem Tollip-spezifischen Antikörper durchgeführt. Sie deuteten keine Übereinstimmung von Tollip mit der p32-Bande in IL-1RI-Immunpräzipitaten an (Daten nicht gezeigt). MyD88 (33 kD) ist nach IL-1-Stimulation mit dem IL-1RI co-präzipitierbar (Abb. 11). Es wurde jedoch kein IL-1RI-assoziiertes MyD88 mittels massenspektrometrischer Methoden nachgewiesen. Vermut-

lich war die co-präzipitierte Menge hierfür zu gering. Wahrscheinlich ist p32 MyD88, dennoch konnte kein direkter Beweis der Existenz von p32 als MyD88 geliefert werden. Durch Generierung MyD88-defizienter Mäuse wurde die universelle Rolle des MyD88 in TLR/IL-1RI-vermittelten Signalwegen identifiziert. MyD88<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten eine vollständige Beeinträchtigung der Immunantwort nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IL-18 [176] oder CpG-DNA (Ligand für TLR9) [177]. Dagegen waren nicht alle Antworten auf den TLR4-Liganden LPS unterbrochen. MyD88<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen keinen Anstieg der LPS-induzierten Zytokin-Produktion auf, jedoch waren NF- $\kappa$ B und JNK in MyD88<sup>-/-</sup>-Zellen aktiviert [178]. Diese Beobachtungen schlossen auf einen MyD88-unabhängigen Weg, wobei TRIF [179] und TRAM [180] die Adapterfunktionen in TLR3- oder TLR4-vermittelten Antworten übernehmen.

Trotz Anreicherung IL-1RI-co-präzipitierter Proteine für die Massenspektrometrie wurde p60 nicht identifiziert. Das p60 könnte ebenfalls das endogene Substrat sein, welches im *in vitro* Kinase Test phosphoryliert wird. Sowohl in IRAK- als auch IL-1RI-Immupräzipitaten von EL-4- und EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurde IL-1-abhängig ein Protein mit einem Molekulargewicht von 60 kD phosphoryliert (Abb. 5 und Abb. 6). Vermutlich assoziiert p60 erst nach IL-1-Stimulation sowohl mit dem IL-1RI als auch mit der IRAK und wird somit co-präzipitiert und im *in vitro* Kinase Test durch eine co-präzipitierte Kinase phosphoryliert. Diese Vermutung wird bestätigt: (i) da die Phosphorylierung von p60 nach Dissoziation der IRAK vom Rezeptor erhalten blieb [80] und (ii) die Überexpression von IRAK keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad des p60 hatte. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass p60 selbst eine Kinase ist. P60 könnte sowohl IL-1-abhängig autophosphorylieren als auch die IRAK als Substrat verwenden. Bislang ist nur bekannt, dass IRAK-4 (52 kD) die IRAK phosphoryliert [47]. TRAF6 könnte p60 sein, da es ein Molekulargewicht von 60 kD hat und nach IL-1-Stimulation mit der IRAK und dem IL-1RI assoziiert [60]. Bis jetzt wurde aber eine IL-1-abhängige Phosphorylierung von TRAF6 noch nicht beschrieben.

### **Cytoskelett-Proteine**

Durch zweidimensionale Auftrennung von IL-1RI-Immupräzipitaten wurden Colloidal-Coomassie gefärbte Proteinspots im Bereich von 32 kD und höheren Molekulargewichten ausgeschnitten und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Die Analyse identifizierte Proteine des Cytoskeletts (Abb. 13 und Tabelle 6). Actin, Actin-assoziierte Proteine und Tubulin (Bestandteil von Mikrotubuli) spielen eine Rolle u. a. in der Formgebung der Zelle, Phagozytose, Bewegung und Transport von Organellen sowie Signaltransduktion. Durch Co-präzipitations-Experimente wurde gezeigt, dass Actin stimula-

tionsunabhängig am IL-1RI assoziiert ist (Abb. 14). In Fibroblasten befindet sich der IL-1RI in Membran-assoziierten und Actin-reichen Strukturen. Dagegen ist die IRAK nur als phosphorylierte Form mit diesen Strukturen in IL-1-stimulierten Zellen transient assoziiert [181]. In MyD88-transfizierten HeLa-Zellen wurde eine Co-lokalisierung von MyD88 mit Actin dargestellt [182].

Nach Stimulation der Zellen mit IL-1 veränderte sich die Konformation des Actins. Es bildeten sich so genannte Stressfasern (Abb. 15 und Abb. 16). Unter oxidativem Stress, verursacht durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Menadion, wird Actin in Hepatozyten und Lymphozyten glutathionyliert [123,124]. Dieser Schutzmechanismus gegen irreversible Schädigung führt gleichzeitig zur Hemmung der Polymerisierung der Actin-Monomere zu Actin-Filamenten. Dagegen stimulieren Wachstumsfaktoren wie EGF oder FGF eine Deglutathionylierung von Actin, das wiederum zu einem Anstieg der Actin-Polymerisierung führt [167,168]. IL-1 bewirkte die Änderung der Konformation von Actin, das zu einer Polymerisierung und Ausbildung von Stressfasern führte. Vielleicht verursachte IL-1 ebenfalls eine Deglutathionylierung von Actin. Voraussetzung hierfür wäre, dass Actin im unstimulierten Zustand bereits glutathionyliert vorliegt.

Durch die IL-1-verursachte Bildung von Actin-Filamenten kommt es vermutlich auch zur Wechselwirkung von Actin mit Tropomyosin. Somit ist die Co-präzipitation von Tropomyosin mit dem IL-1RI zu erklären (Abb. 17). P32 ist aber nicht mit Tropomyosin identisch, da die Tropomyosin-Bande sich nicht mit der p32-Bande der [<sup>125</sup>I]-IAIT-Markierung deckte (Daten nicht gezeigt). F-Actin Capping Proteine bestehen aus Heterodimeren, welche die wachsenden Enden der Actinfilamente bedecken. Sie sind bei der Anordnung von verschiedenen Actinstrukturen beteiligt [183]. Daher wurden sie in massenspektrometrischen Analysen ebenfalls nachgewiesen.

Intrazelluläre Prozesse wie z. B. die Translokation der IRAK in den Zellkern oder die Vereinigung des IRAK/IRAK-4/TRAF6-Komplexes mit dem prä-assoziierten Komplex aus TAK1/TAB1/TAB2 werden wahrscheinlich entlang von Cytoskelett-Filamenten vollzogen. Die IL-1-verursachte Bildung von Actin-Filamenten kann deshalb eine Voraussetzung für die Assoziation der IRAK an den IL-1RI bzw. aller weiteren Proteine sein.

#### **4.1.2 Funktionen der IRAK im IL-1-Signaltransfer**

##### **inaktive IRAK**

Für Experimente wurden EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen mit überexprimierter IRAK als Zellmodell verwendet, die einen einfachen Nachweis der Aktivierung der IRAK ermöglichten (siehe 3.1). Eine stabile Überexpression der humanen IRAK in EL-4 6.1-Zellen machte sich hier durch Zunahme assoziierter IRAK an den IL-1RI, sowohl auf basaler Ebene als

auch durch verstärkte phosphorylierte IRAK, bemerkbar. Eine stabile Überexpression der IRAK hatte in den gleichen Zellen eine gesteigerte konstitutive und IL-1-stimulierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung zur Folge [166]. Die Expression hoher Mengen an mit Fluoreszenzproteinen-markierter IRAK in COS-1-Zellen äußerte sich in einer Akkumulation der IRAK in großen Flecken im Cytoplasma, was auf hochmolekulargewichtige Komplexe hindeutet [184]. Voraussetzungen für die Bildung dieser IRAK-Komplexe sind die Präsenz des Threonin-66 in der DD und die katalytische Aktivität der IRAK. Im unstimulierten Zustand wird IRAK als inaktives Protein derartig vermutlich gespeichert.

### **aktivierte IRAK**

IL-1 hatte einen Einfluss auf den Zustand der Thiole der IRAK (Abb. 9). Nach IL-1-Stimulation waren vermehrt Thiole mit [ $^{125}$ I]-IAIT-markierbar. Da IRAK, wie oben erwähnt im unstimulierten Zustand in Komplexen sitzt, wird nach Stimulus IRAK aus diesen multimerischen Komplexen freigesetzt. Thiole der IRAK werden vermutlich zugänglich und erklären somit die Zunahme der [ $^{125}$ I]-IAIT-markierten Thiole der IRAK. Die Behandlung der IRAK-Immünpräzipitate mit TCEP führte zu einer Reduktion von Proteindisulfiden (Abb. 10), wobei die Intensität der radioaktiven Markierung der IRAK in den unstimulierten und IL-1-stimulierten Ansätzen gleich war. Die Vernetzung der IRAK mit weiteren Komponenten in hochmolekulargewichtigen Komplexen scheint deshalb über reversible Disulfidverbindungen zu geschehen.

Nach IL-1-Stimulation wird die freigesetzte IRAK an den IL-1RI rekrutiert und phosphoryliert. Die Phosphorylierung der IRAK während des *in vitro* Kinase Tests könnte durch die IRAK selbst erfolgen (Autophosphorylierung) oder durch eine weitere Kinase, die ebenfalls mit dem IL-1RI oder der IRAK assoziiert ist und deshalb auch mit beiden Proteinen co-präzipitiert wird. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass sich in EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen die IRAK im Cytosol IL-1-abhängig autophosphoryliert.

Die phosphorylierte IRAK dissoziiert vom IL-1RI-Komplex und überträgt das IL-1-vermittelte Signal auf TAK1. Anschließend durchläuft die aktivierte IRAK einen von zwei bisher beschriebenen Wegen: (i) Ubiquitinierung und Degradierung oder (ii) Translokation in den Zellkern.

Yamin et al. zeigten, dass spezifische phosphorylierte Aminosäuren der IRAK durch Ubiquitinligasen erkannt werden und somit die IRAK nach Dissoziation vom IL-1RI ubiquitinyliert und vom Proteasom degradiert wird [79]. Dies würde zu einem Stillstand der IL-1-Antwort führen und somit eine negative Rückkopplungsschleife darstellen. Sowohl Tollip [37] als auch TRAF6 [185] werden ubiquitinyliert und können daher die Ubiquitin-Maschinerie in die Nähe der IRAK bringen.

## **nukleäre IRAK**

Andererseits transloziert IRAK nach Dissoziation vom IL-1RI-Komplex in den Zellkern [80]. Da nur phosphorylierte IRAK im Kern nach 120 min IL-1-Stimulation auftrat (Abb. 7), scheint ein phosphorylierter Zustand und somit Kinase-Aktivität die Voraussetzung für die Translokation zu sein. Dies beweisen Experimente mit Kinase-inaktiven EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen, die eine Punktmutation in der ATP-Bindungsstasche (K239S) der überexprimierten IRAK aufweisen. Diese Kinase-inaktive überexprimierte IRAK war nach 120 min IL-1-Stimulation im Zellkern nicht nachzuweisen [186]. Die Rekrutierung der IRAK an den Rezeptor und anschließende Dissoziation erfolgen innerhalb einer Zeitspanne von 15 min [80]. Aber erst nach 120 min ist die IRAK in Kernextrakten nachzuweisen. Somit stellt sich die Frage: Welche Aufgaben erfüllt die IRAK im Cytosol nachdem sie vom IL-1RI dissoziiert ist? Eine IL-1-abhängige Interaktion der IRAK mit NEMO im Cytosol ist bekannt, wobei die Funktion dieses Prozesses noch nicht aufgeklärt ist [81]. Bis dato sind nur Tollip [36] und Pellino2 [65] als mögliche physiologische Substrate der IRAK im Cytosol angegeben.

Stat3 wurde bisher als ein nukleäres Substrat der IRAK beschrieben [187]. Außer der IRAK wurde im *in vitro* Kinase Test ein endogenes Protein mit einem Molekulargewicht von 24 kD in Kernextrakten aus IL-1-stimulierten EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen phosphoryliert [186]. Die Phosphorylierung dieses p24 ist nicht in Kinase-inaktiven Mutanten nachweisbar, so dass es sich um ein spezifisches Substrat der IRAK handeln kann. Es wird mit der IRAK in den Kern transportiert oder ist bereits nukleär präsent. Vom Molekulargewicht her könnte es sich um TIFA handeln, das TRAF6 mit der IRAK verbindet [188]. Eine nukleäre Translokation von weiteren IL-1RI-assoziierten Proteinen wird nicht erwähnt. Dagegen werden der Ligand IL-1 und der IL-1RI internalisiert und sind im Kern lokalisierbar [189].

## **4.2 Mechanismen der Modulation der IL-1-Signalkaskade durch redox-aktive Substanzen**

### **4.2.1 MD-, PAO-, DA- und PDTC-verursachte Thiolmodifikationen**

Die IL-1-abhängige Rekrutierung der IRAK und anschließende Ereignisse wie Phosphorylierungen in EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen wurden durch MD, PAO, DA oder PDTC gehemmt (Abb. 19 und Abb. 18) [190]. Die inhibitorischen Effekte dieser redoxaktiven Substanzen auf die IL-1-abhängige Rekrutierung der IRAK und Phosphorylierungsereignisse wurden ebenfalls an ECV-Zellen beobachtet [190].

Die Inhibierung des bereits aktivierten IL-1RI-Komplexes ist nicht möglich, da Inkubationen der assoziierten und aktivierten Proteine im Signalkomplex mit thiolmodifizierenden

Substanzen keine Hemmung der Kinase-Aktivitäten bewirkten. Dieses zeigte sich durch direkte Zugabe von MD, PAO, DA oder PDTC zu Immunpräzipitaten während des *in vitro* Kinase Tests [152,160]. Die Vorinkubation der Zellen mit MD, PAO, DA oder PDTC in den verwendeten Konzentrationen hatte weder einen Einfluss auf die Vitalität von EL-4-Zellen noch auf die Ligandenbindung an den Rezeptor [160]. Die beobachteten Effekte dieser thiolmodifizierenden Agenzien werden vermutlich deshalb durch deren Wirkung innerhalb der Zellen verursacht. MD, PAO, DA oder PDTC veränderten direkt Thiole der IRAK, so dass keine Assoziation der IRAK an den IL-1RI mehr möglich war. Die humane IRAK enthält 17 Cysteine und die murine IRAK 15 Cysteine, wovon zwei vicinale Cysteine des Typs CxxxC und CxxxxxC sind, die konserviert in dem humanen und murinen Protein sind [42,43]. Die murine IRAK enthält vier Cysteine, die nah bei Arginin und Histidin lokalisiert sind. Somit ist sie ein Kandidat für Modifikationen durch ROS oder elektrophile Substanzen.

MD, PAO, DA oder PDTC modifizieren entweder direkt Thiole der IRAK (Abb. 20) [190] oder wirken indirekt durch Oxidation von kleinen Proteinthiolen (Trx, Grx) und GSH. Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Substanzen beeinflussen den Redoxstatus der Zelle auf verschiedenen Wegen.

### **Menadion**

MD-behandelte Zellen zeigten keine [<sup>125</sup>I]-IAIT-markierbaren Thiole der IRAK, weder in unstimulierten noch in IL-1-stimulierten Ansätzen. MD bildet durch Redoxcycling oder Autoxidation O<sub>2</sub><sup>•-</sup> und ist ebenfalls in der Lage, Proteinthiole direkt zu modifizieren [125-127]. Die Inhibition der IL-1-induzierten Aktivierung der IRAK durch MD war in EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen durch eine einstündige Erholung der Zellen im Medium in Anwesenheit von GSH reversibel [190]. Eine direkte Arylierung von Proteinthiolen durch MD scheint hier nicht der Fall zu sein, da diese kovalente Proteinmodifikation nicht durch GSH rückgängig gemacht werden kann. Dies weist eher auf eine Generierung von O<sub>2</sub><sup>•-</sup> hin, welches GSH indirekt oxidiert. Eine Verschiebung des intrazellulären GSH/GSSG-Verhältnisses zugunsten des GSSG-Spiegels wurde mittels Ellmann-Test gezeigt (Tabelle 7). Die beobachtete Inhibition des IL-1-Signals durch MD kann somit vermutlich durch Oxidation oder Glutathionierung von essentiellen Proteinthiolen stattgefunden haben.

### **Phenylarsinoxid**

PAO-behandelte Zellen wiesen ein geringes Restsignal von [<sup>125</sup>I]-IAIT-markierten Thiolen der IRAK auf, das vermutlich durch [<sup>125</sup>I]-IAIT-markierte Monothiole hervorgerufen wurde. PAO hingegen modifiziert vorwiegend vicinale Thiole anstelle von Monothiolen wie GSH [128]. Somit kann hier die direkte Modifikation von Proteinthiolen, speziell der IRAK, die

Ursache für die Hemmung der IRAK-Aktivierung sein. Wie bereits erwähnt, enthalten die murine und humane IRAK konservierte vicinale Cysteine [42,43], die leichte Ziele für Modifikationen durch ROS oder elektrophile Substanzen sind. Dithioarsinderivate können nur durch starke Reduktionsmittel, die wie DTT oder DMP vicinale Thiole enthalten, beseitigt werden [130,131], nicht hingegen durch  $\beta$ -ME oder GSH. Die Reversibilität ist auch nicht durch das Trx- und Grx-System gegeben, da diese endogenen Thiolreduktasen selbst von PAO modifiziert und somit inhibiert werden.

### **Diamid**

Die Vorbehandlung der Zellen mit DA verursachten keine vollständige Hemmung der IL-1-abhängigen Rekrutierung der IRAK und Phosphorylierungen. Allerdings wies die ARG der [<sup>125</sup>I]-IAIT-Markierung von Thiolen der IRAK kein Signal, weder in unstimulierten noch in IL-1-stimulierten Ansätzen, auf. DA reagiert mit Thiolaten und bildet je nach Reaktionspartner GSSG, gemischte Disulfide zwischen GSH und Proteinen oder Disulfide mit niedermolekularen Thiolen. DA präferiert jedoch die Reaktion mit GSH gegenüber Proteinthiolen [132]. Dies wird auch in der Messung des intrazellulären Redoxstatus sichtbar. Nach DA-Behandlung von HUVECs wurde eine Reduktion des intrazellulären Gehalts an Thiolen und ein Anstieg des GSSG beobachtet, welches eine deutliche Verschiebung des GSH/GSSG-Quotienten im Gegensatz zur Kontrolle zur Folge hatte [131]. Der inhibitorische Effekt des DA kann durch Anreicherung des GSH-Pools reversibel gemacht werden, wobei die Oxidation des GSH schneller umkehrbar ist, während die Reduktion von Proteinthiolen längere Zeit in Anspruch nimmt [131].

### **Pyrrolidindithiocarbamat**

PDTC führte zu einer geringeren Inhibierung der IL-1-abhängigen [<sup>125</sup>I]-IAIT-Markierung der IRAK-Thiole und hatte nur wenig Einfluss auf die Aktivierung der IRAK. Dieses Dithiocarbamat oxidiert zelluläres GSH und erhöht somit den GSSG-Gehalt [133]. Der inhibitorische Effekt von PDTC auf die IL-1-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist in EL-4-Zellen in Anwesenheit von GSH reversibel [152]. Vermutlich ist die Menge an PDTC in EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen nicht ausreichend, um einen deutlichen hemmenden Effekt auf frühe Signale des IL-1-Signals nachzuweisen. Nicht-modifizierte IRAK-Moleküle können somit ihre Funktion ausüben und die Signalkaskade aktivieren.

### **weitere mögliche Mechanismen**

NAC mit thiolreduzierender Wirkung hatte weder einen Einfluss auf die IL-1-abhängigen Aktivierungen von NF- $\kappa$ B noch auf die von IL-1RI-assoziierten Kinasen [152]. Ebenfalls

hatten DTT,  $\beta$ -ME oder TCEP die IL-1-abhängige Phosphorylierung der IRAK nicht beeinflusst (Abb. 25). Folglich wird eine Hemmung nicht durch Reduktion sondern durch eine Oxidation oder eine Modifikation von Proteinthiolen verursacht.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch Modifikationen von Thiolen weiterer Adapterproteine (MyD88) oder Kinasen (IRAK-4) des IL-1-RI-Komplexes die IRAK nicht mehr an den Rezeptor rekrutiert wird. Eine IRAK-Aktivierung ist in MyD88-defizienten Macrophagen vollständig blockiert [191]. Untersuchungen an IRAK-4-defizienten Zellen und Mäusen deuteten an, dass IRAK-4 im Vergleich zur IRAK eine wichtigere Rolle in inflammatorischen Prozessen spielt. IRAK-4<sup>-/-</sup>-Mäuse waren vollständig in allen untersuchten TLR/IL-1RI-Antworten beeinträchtigt [56]. Ebenfalls zeigte eine IRAK-4-Mutante, der die Kinase-Domäne fehlt, eine stark verringerte IL-1-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B und Phosphorylierung der IRAK [47]. Sowohl MyD88 als auch IRAK-4 sind somit kritische Proteine für die Aktivierung der IRAK.

Redoxaktive Substanzen inhibieren die Phosphorylierung der IRAK (siehe 3.3) [190]. Da nur phosphorylierte IRAK im Kern nachweisbar war, hemmen diese Substanzen ebenfalls die Translokation der IRAK in den Zellkern, was für MD gezeigt wurde [186].

IRAK ist nicht nur auf den IL-1-Signalweg beschränkt. Sie ist ebenfalls eine konservierte Komponente in IL-18- [192], TNF- $\alpha$ - [193] und p75-Neutrophin [194] -vermittelten Signalkaskaden. TLRs verwenden auch die IRAK für die NF- $\kappa$ B- und IRF-3-abhängigen transkriptionellen Antworten [195]. Somit beeinflusst die Modifikation der IRAK auch alle weiteren Signalwege, in der die IRAK beteiligt ist.

Neben der IRAK ist NF- $\kappa$ B ebenfalls ein redoxsensitives Protein in TLR/IL-1RI-vermittelten Signalwegen. Die Transaktivierungs-Aktivität von NF- $\kappa$ B wird durch Alkylierung von Cys26 in c-Rel durch NEM oder CDNB gehemmt [196]. Infolgedessen findet keine Phosphorylierung von p65 an Ser-536 durch IKK im Cytosol statt [197]. Nach Aktivierung transloziert NF- $\kappa$ B in den Zellkern, wo es zur Induktion der Transkription in einem reduzierten Zustand vorliegen muss. Sind konservierte Thiole in der p50-Untereinheit durch Glutathionylierung modifiziert, kommt es zu keiner Bindung an die DNA [119]. Eine Überexpression der PHGPx in ECV- und SMC-Zellen verminderte die IL-1-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B und unterdrückte die basale und IL-1-induzierbare Expression von VCAM-1 [198-200]. Dieses spricht für eine direkte Modifikation von Proteinthiolen des NF- $\kappa$ Bs durch die PHGPx. Die PHGPx ist in der Lage, Proteinthiole durch Vernetzung mit sich selbst oder mit anderen Proteinen unter Verwendung von Hydroperoxiden zu modifizieren [118].

Aus den erzielten Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass freie und vermutlich vicinale Proteinthiole, speziell der IRAK, essentiell für die IL-1-abhängige Ausbildung des IL-1RI-Komplexes sind. Die verwendeten Agenzien verhindern die Assoziation von Proteinen mit freien SH-Gruppen an den IL-1RI. Das ist auch gleichzeitig die Ursache der beobachteten Hemmung der Aktivierung IL-1RI-assoziierter Kinasen in EL-4-Zellen [152]. Wird die Bildung des IL-1RI-Komplexes unterbunden, finden nachfolgende Signalschritte wie Phosphorylierungen der IRAK oder Aktivierung von NF- $\kappa$ B nicht statt.

Die verwendeten thiolmodifizierenden Substanzen können ebenso direkt intermediäre und späte Prozesse in Signalkaskaden wie z. B. die Aktivierung von NF- $\kappa$ B beeinflussen. MD, PAO, DA und PDTC blockieren die IL-1-induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B in EL-4-Zellen [152], PAO und DA die IL-1-abhängige Expression von E-Selektin in HUVEC-Zellen [131].

#### **4.2.2 Die Hemmung der Bildung des IL-1RI-Komplexes durch antiinflammatorische Nahrungsinhaltsstoffe**

Auch Nahrungsinhaltsstoffe wirken durch Inhibition später Prozesse in Signalkaskaden antiinflammatorisch. Da sie auch redoxaktive Eigenschaften haben, wurde untersucht, ob sie den IL-1-Signalweg bereits an einem frühen Punkt beeinflussen können. Sowohl Curcumin als auch Sulforaphan hemmten die IL-1-Signaltransduktion durch Blockierung des frühesten Schrittes, der Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI. Jedoch scheinen beide Substanzen auf unterschiedliche Art und Weise zu funktionieren. Curcumin modifiziert direkt Thiole der IRAK, wohingegen Sulforaphan die Expression von Tollip induziert. Beide Ereignisse haben zur Folge, dass die IRAK nicht mehr an den IL-1RI assoziiert und nachfolgende Signale nicht aktiviert werden.

##### **Curcumin**

Zellkulturstudien zeigten, dass Curcumin späte Schritte in der TNF- $\alpha$ - und IL-1-vermittelten Signalkaskade, wie z. B. die Aktivierung von NF- $\kappa$ B [153,154] und letztendlich die Expression von ICAM-1 blockiert [154,155]. Des Weiteren unterbindet Curcumin die Zytokin-vermittelte Phosphorylierung von I $\kappa$ B durch Inhibierung der Aktivierung der IKK und somit die Induktion der COX-2-Expression [156]. Diese Effekte deuten darauf hin, dass ein Signal oberhalb von IKK betroffen ist. Curcumin bewirkte hier die Hemmung der Assoziation der IRAK an den IL-1RI (Abb. 23A) und die Phosphorylierung der IRAK und des p60 (Abb. 23B und Abb. 21) [201]. Der Mechanismus der Inhibition des IL-1-Signalweges erfolgte nicht durch Interferenz mit der Bindung von IL-1 an den Rezeptor

(Abb. 26). Dies wurde ebenfalls an primären Ratten-Mikrogliazellen gezeigt, in denen Curcumin die Interaktion von IFN- $\gamma$  mit seinem Rezeptor nicht beeinflusste [202]. Ebenso war die Zellvitalität durch Curcumin nicht gestört, da erst hohe Konzentrationen an Curcumin cytotoxisch wirkten (Tabelle 8).

Curcumin wirkt eher intrazellulär, vermutlich durch direkte Modifikation von Thiolen der IRAK. Eine [ $^{125}$ I]-IAIT-Markierung der IRAK-Thiole war in Curcumin-behandelten EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen nicht nachweisbar (Abb. 24). Die IRAK besitzt vicinale Thiole, die sensitiv mit Michael-Azeptoren wie Curcumin reagieren. Curcumin beeinflusste die IRAK-Aktivierung ähnlich wie die thiolmodifizierenden Substanzen MD, PAO und DA [190]. Im Gegensatz zu den inhibitorischen Effekten war die Curcumin-verursachte Inhibition der IRAK-Aktivierung weder durch DTT,  $\beta$ -ME noch durch TCEP umkehrbar (Abb. 25). Somit verursacht Curcumin eine irreversible Modifizierung von Proteinthiolen. Es oxidiert nicht Thiole der IRAK sondern alkyliert Proteinthiole mittels Michael-Addition [203]. Das Curcumin-Molekül hat das strukturelle Merkmal eines Michael-Akzeptors, eine  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigte Carbonylgruppe [138]. Als solcher ist Curcumin in der Lage, die Expression von Phase-II-Enzymen wie  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase, Glutathion-S-Transferase und NQO1 zu induzieren [203]. An dem rekombinanten reduzierten Enzym TrxR konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Curcumin direkt Thiole modifiziert [204]. Die MALDI-Analyse identifizierte ein neues Fragment mit einer Massendifferenz, die zwei Molekülen Curcumin entsprach.

Ein direkter Einfluss von Curcumin auf Kinase-Aktivitäten der IRAK oder einer co-präzipitierten Kinase zeigte sich nicht (Abb. 22). Auch war die enzymatische Aktivität der COX-2 nur schwach vermindert [205], wohingegen die katalytische Aktivität der LOX inhibiert und die Synthese von 5-HETE reduziert wird [206]. Curcumin blockiert die IL-1-abhängige Degradierung von I $\kappa$ B durch Inhibition der Phosphorylierung durch IKK. Jedoch erfolgt dieser Prozess ebenfalls nicht durch direkte Hemmung der IKK-Aktivität, sondern stattdessen durch Blockierung eines aufwärts liegenden Signals zur Aktivierung der IKK [154].

Hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der Angriffspunkt von Curcumin der IL-1RI-Komplex ist. Die Hemmung der Bildung des Rezeptorkomplexes ist die Ursache für die beschriebenen antiinflammatorischen Wirkungen von Curcumin.

### **Sulforaphan**

Im Gegensatz zur direkten Wirkung von Curcumin auf die IRAK-Aktivierung wurden die beobachteten Sulforaphan-vermittelten Effekte durch die transkriptionelle Aktivierung von Tollip ausgeübt. In EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen führte Sulforaphan zur konzentrationsabhängigen

Hemmung der Assoziation der IRAK an den IL-1RI (Abb. 27A) und zur Inhibition der Phosphorylierungen von IRAK und p60 (Abb. 27B). Die Proliferation der Zellen war durch Sulforaphan nicht beeinflusst (Tabelle 9). Die lange Inkubationsdauer ließ den Schluss zu, dass zuerst Sulforaphan die Expression eines Proteins induziert, welches dann einen inhibitorischen Einfluss auf die Aktivierung der IRAK hat.

Es ist bekannt, dass Sulforaphan eine Vielzahl von antioxidativen und detoxifizierenden Enzymen über das Nrf2/Keap1-System induziert. Keap1 vermittelt die Degradierung von Nrf2 über einen gebundenen Cullin3-abhängigen Ubiquitin-Ligase-Komplex E3. Elektrophile Substanzen oder Oxidanzien modifizieren Thiole des Keap1 und verhindern somit die Assoziation von Keap1 mit Cullin3. Infolgedessen erfolgt keine Konjugation von Ubiquitin an Nrf2 und stabilisiertes Nrf2 akkumuliert im Zellkern [141,207]. Diese Translokation konnte an EL-4- und CaCo-2-Zellen ebenfalls gezeigt werden (Abb. 31). Hingegen erfolgte vermutlich keine direkte Modifikation von Thiolen der IRAK, so dass die Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI schon nach kurzer Inkubationszeit blockiert wäre.

Tollip schien ein mögliches Zielgen für die Sulforaphan-abhängige Aktivierung von Nrf2 zu sein, da es (i) ein potentielles ARE im Promotor enthält (Abb. 28) und (ii) als negativer Regulator in TLR/IL-1RI-vermittelten Signalkaskaden agiert. Sulforaphan induzierte sowohl in murinen EL-4- als auch humanen CaCo-2-Zellen die endogene Expression von Tollip auf mRNA- und Proteinebene (Abb. 29 und Abb. 30).

Toleranzen von TLR-Liganden wurden häufig an monozytischen Zellen beschrieben. Intestinale epitheliale Zellen (IEC) treffen kontinuierlich auf spezifische bakterielle Komponenten. Als Liganden fungieren Produkte von Zellwänden Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien (LTA oder LPS), die an TLR2 bzw. TLR4 binden [208]. IEC sind so in einem Status der Hyporesponsivität, der mit einer verminderten Expression von TLR und einer erhöhten Expression von Tollip einhergeht [39]. Da verschiedene IEC-Zelllinien konstitutiv oder induzierbar größere Mengen an Tollip *in vitro* und *in vivo* exprimieren [39,172] als die monozytischen THP-1-Zellen [172], wurde CaCo-2 als eine weitere Zelllinie verwendet.

Die Konsequenz einer erhöhten Tollip-Expression ist eine Inhibition des TLR/IL-1R-vermittelten Signalweges. Eine Überexpression von Tollip verursacht eine Unterdrückung der LPS- und IL-1-induzierten Aktivierung von NF- $\kappa$ B [36,169]. Transfiziertes Tollip inhibiert die Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI und deren Phosphorylierung [37]. Die Interaktion erfolgt wahrscheinlich über die DD der IRAK [36]. Im Ruhezustand wirkt Tollip somit als ein Silencer der IRAK, vermutlich durch Blockierung der IRAK-Dimerisierung.

Neben Tollip wurden weitere Proteine entdeckt, die TLR/IL-1R-Signalwege negativ regulieren und durch LPS- oder Zytokin-Stimulation induziert werden: IRAK-M [45], die

murine Isoform IRAK2c [209], eine alternativ gespleißte Variante von MyD88 (MyD88s) [210] und SOCS1 [211]. Es kann vermutlich eine vergleichbare Induktion dieser ähnlich-regulierten Inhibitorproteine durch Sulforaphan erfolgen.

Die ARE im murinen und humanen Tollip-Promotor waren allerdings nicht funktionell. Der EMSA zeigte keine Sulforaphan-abhängige Bindung des Nrf2 an die Tollip-ARE (Abb. 32). Auch in Reporteranalysen wurde keines der beiden ARE durch Sulforaphan oder Nrf2 aktiviert (Abb. 33 und Abb. 34). Nicht funktionelle potentielle ARE sind nicht ungewöhnlich. Auch ein identifiziertes potentielles ARE im Promotor der GI-GPx wurde durch Nrf2 ebenfalls nicht aktiviert und erwies sich somit als nicht funktionell [165]. Für die Sulforaphan-induzierte Expression von Tollip gibt es anhand der Ergebnisse drei Möglichkeiten:

- (i) die untersuchten ARE des humanen und murinen Tollip-Promotors sind nicht beteiligt,
- (ii) die Aktivierung läuft nicht über das Nrf2/ARE-System oder
- (iii) es fehlen zur Aktivierung zusätzliche Co-faktoren.

Die zentralen Nukleotide der ARE-Konsensussequenz wurden durch Mutationsanalysen wie folgt definiert: 5'-TGACnnnGC-3', wobei „n“ jedes Nukleotid sein kann [212]. Weitere Analysen deuteten an, dass die 5'- und 3'-flankierenden Regionen ebenfalls einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung haben. Somit wurde die ARE-Konsensussequenz erweitert: T<sup>A</sup>/CAnn<sup>A</sup>/G TGA<sup>C</sup>/TnnnGC<sup>A</sup>/G<sup>A</sup>/T<sup>A</sup>/T<sup>A</sup>/T<sup>A</sup>/T [171]. Jedoch zeigten Identifizierungen von neuen Nrf2-regulierten Genen, dass die Spezies ebenso eine Rolle spielt wie auch die zuvor als redundant angenommenen Nukleotide in der ARE-Sequenz [213]. Dies deutet an, dass verschiedene ARE-Elemente unterschiedliche Sequenz-Anforderungen haben und eine allgemein anwendbare Konsensussequenz nicht abgeleitet werden kann. Wenn Tollip nicht über die Aktivierung von Nrf2 induziert wird, muss ein anderer Mechanismus, vielleicht auch ein indirekter, beteiligt sein. Nach Akkumulation in Zellen reagiert Sulforaphan mit zellulären SH-Gruppen, hauptsächlich mit GSH, und formt Dithiocarbamate [214]. Dieser Prozess führt zur raschen Depletion von GSH. Ebenfalls ist ein Anstieg der ROS-Produktion durch Sulforaphan zu beobachten [215]. Bis heute ist nur bekannt, dass LTA und LPS die endogene Expression von Tollip hochregulieren [39]. LTA und LPS verursachen die Aktivierung von NF-κB und AP-1, wobei LPS über den MyD88-unabhängigen Weg auch IRF-3 aktiviert [195]. Entsprechende DNA-Bindestellen dieser Transkriptionsfaktoren befinden sich auch innerhalb der 2000 bp vor dem Transkriptionsstart von Tollip. Von Sulforaphan hingegen ist bekannt, dass es folgende LPS-induzierte Prozesse hemmt: (i) die Phosphorylierung von IκB und Aktivierung von NF-κB [157], (ii) die LPS-vermittelte Expression von iNOS- und COX-2 [158] und (iii) die Produktion und

Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und NO [159]. Ein transienter oxidativer Stress, der durch Sulforaphan verursacht wird, kann Auslöser für die Induktion verschiedener Signalkaskaden sein. Möglicherweise muss einerseits die verabreichte Menge und andererseits die Inkubationszeit für die entsprechende chemopräventive Wirkung von Sulforaphan berücksichtigt werden.

#### **weitere inhibitorische Möglichkeiten**

Curcumin und Sulforaphan wirken antiinflammatorisch wegen der Hemmung der Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI. Ebenfalls könnte der antiinflammatorische Mechanismus der verwendeten Nahrungsinhaltsstoffe durch die Zerstörung des Cytoskeletts hervorgerufen werden. Wenn die IL-1-abhängige Bildung von Actin-Filamenten eine Voraussetzung für die Assoziation der IRAK an den IL-1RI ist, können sowohl Curcumin als auch Sulforaphan durch Blockierung der Actin-Polymerisierung die IL-1-Signalkaskade hemmen. Beide Substanzen modifizieren Thiole direkt und/oder verursachen kurzfristig einen oxidativen Stimulus, der wiederum zur Oxidation von Proteinthiolen führen kann. Wie bereits erwähnt, können diese Prozesse zu einem Stopp der Actin-Polymerisierung führen. Curcumin beeinflusste die Bildung von Actin-Stressfasern und verhinderte somit die Invasion von Tumorzellen [216]. Hingegen wurden Wirkungen von Sulforaphan nur an Mikrotubulis untersucht. Sulforaphan inhibierte die Polymerisierung sowohl von aufgereinigtem Tubulin als auch von mitotischen Mikrotubulis *in vivo* [217] und wirkt infolgedessen durch Hemmung der Proliferation antikanzerogen.

Die Blockierung der Polymerisierung von Actin und Zerstörung von bereits vorhandenen Actin-Filamenten durch Cytochalasin B verursacht eine nukleäre Translokation des Nrf2 in den Zellkern und die Induktion der Glutathion-S-Transferase [173]. Die NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65/RelA ist mit Actinstrukturen co-lokalisiert [218]. Eine Veränderung des Cytoskeletts könnte ebenfalls eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B bedeuten. Die Behandlung von verschiedenen myelomonocytyischen Zellen und Monozyten mit Actin-modulierenden Substanzen (Cytochalasin D, Jasplakinolid) induzierte durch eine vorausgegangene Aktivierung des IKK-Komplexes die Translokation des NF- $\kappa$ Bs in den Zellkern [219]. Ähnliche reorganisierende Wirkungen auf das Actin-Cytoskelett verursachen vermutlich auch Curcumin und Sulforaphan, wobei Sulforaphan so Tollip induzieren könnte.

#### **4.2.3 Veränderung des zellulären Redoxstatus als Möglichkeit einer überschießenden Entzündungsreaktion vorzubeugen**

Die Bildung des IL-1RI-Komplexes ist das erste und entscheidende Ereignis in der IL-1-Signalkaskade. Die Formation wird gestört wenn Proteine nicht zusammen interagieren

können, wenn z. B. Proteinthiole vor der Bindung von IL-1 an den Rezeptor modifiziert worden sind. Der zelluläre Redoxstatus wird sowohl durch redoxaktive Substanzen als auch durch ROS beeinflusst. Zelluläre Proteine werden daraufhin glutathionyliert oder direkt modifiziert. Glutathionylierung dient einerseits als Schutz von Proteinen gegen irreversible Oxidation und andererseits zur reversiblen Regulation von Enzymaktivitäten [220]. Die Veränderung im Redoxstatus reguliert die Initiation von Signaltransduktionen und die Induktion von Genexpressionen. Die Transduktion des IL-1-vermittelten Signals erfolgt in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von freien Proteinthiolen im IL-1RI-Komplex. Die IRAK wurde hier als ein redoxsensitives Protein identifiziert [190]. Durch Thiolmodifikationen der IRAK werden alle nachfolgenden Ereignisse nicht aktiviert, wie z. B. die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern.

Die Entzündung ist eine normale physiologische und hilfreiche Antwort, die vor Invasionen von Mikroorganismen und infektiösen Agenzien schützt. Die TLRs erkennen PAMPs und kontrollieren verschiedene Aspekte der Immunität und Entzündung, wie angeborene und erworbene Immunantworten, Antikörper- und Zytokin-Produktionen. Zytokine werden transient nur nach einem induzierenden Stimulus produziert und anschließend wieder rasch depletiert. Sie spielen ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese von chronischen Entzündungskrankheiten. Während dieses Prozesses ist die Zytokin-Produktion hochreguliert. Immunmodulatorische oder antiinflammatorische Zytokine (z. B. IL-10) modulieren oder inhibieren die proinflammatorische Zytokin-Produktion. Zahlreiche natürliche Agenzien sind ebenfalls fähig, inflammatorische Antworten zu beeinflussen. Es wurden viele Studien durchgeführt, die nach Verabreichung die Absorption, den Metabolismus und somit die Bioverfügbarkeit ermittelten und pharmakologische Effekte der Substanzen in Geweben untersuchten. Im Folgenden werden einige Beispiele aufgeführt.

Die orale Gabe von Curcumin an Ratten zeigte, dass 60% absorbiert wurden, und konjugierte Glucuronide und Sulfate im Urin [221] und im Plasma [222] auftraten. Die metabolische Reduktion erfolgte sehr schnell, da bei einer Verabreichung von hohen Dosen Curcumin (2% in der Nahrung) an Ratten nur geringe nanomolare Mengen im Plasma, in Leber- und Darmmucosa-Geweben zu detektieren waren [223]. Gleiche Effekte waren in klinischen Studien zu beobachten. Es wurden dennoch auch verminderte prä-kanzerogene Läsionen in 7 von 25 Patienten nachgewiesen, die bis zu 8 g/Tag aufnahmen [224]. In Patienten mit fortgeschrittenem colorektalem Krebs inhibierte Curcumin die Expression der COX-2 und die Produktion von PGE<sub>2</sub> [225]. Ratten mit Darmkrebs zeigten nach Fütterung mit Curcumin eine Abnahme von PGE<sub>2</sub> um 40 % in der Darmmucosa und im Tumor [226]. Eine COX-2-Überexpression ist in der Krebsentstehung mehrerer Gewebe beteiligt. Im Gegensatz zu COX-2-Inhibitoren, welche die katalytische

Aktivität der COX-Enzyme inhibieren, vermindert Curcumin die COX-2-Expression auf transkriptioneller Ebene [156].

Eine epidemiologische Studie berichtete, dass der Verzehr von Gemüse der Familie der Cruciferen, die reich an ITC sind, umgekehrt mit dem Risiko der Darmkrebsentwicklung korreliert [227]. ITC inhibieren die Bildung von Krebszellen und eliminieren bereits bestehende durch Inhibition von karzinogen-aktivierenden Phase-I-Enzymen, der Induktion von detoxifizierenden Phase-II-Enzymen, der Induktion von Apoptose und der Inhibition der Zellzyklus-Progression (Übersicht in [228]). Nach einer schnellen Akkumulation von ITC in Zellen erfolgt eine Konjugation mit GSH zu Dithiocarbamaten, die weiter zu Mercaptursäuren metabolisiert und mit dem Urin ausgeschieden werden. Dieser Prozess findet innerhalb von 24 h nach Verzehr von z. B. Brunnenkresse statt [229].

Obwohl natürlich vorkommende Substanzen eine geringe Bioverfügbarkeit haben und somit nicht in ausreichenden Konzentrationen für pharmakologische Effekte in bestimmten Geweben ankommen, konnten im Falle von Curcumin biologisch aktive Mengen im Gastrointestinaltrakt erreicht werden. Chronische Infektionen und Entzündungen wie Ulcerative Colitis und Morbus Crohn können zum Darmkrebs führen. Deshalb wäre es von Vorteil primäre Entzündungen zu unterdrücken. Ein erster Schritt könnte der Eingriff in eine proinflammatorische Signalkaskade wie der von IL-1 sein, wobei sich unterschiedliche Angriffspunkte ergeben. In Abb. 35 sind die hier ermittelten Ergebnisse von Experimenten mit Curcumin und Sulforaphan in bereits bekannte Prozesse eingeordnet und dargestellt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Bildung des IL-1-Rezeptorkomplexes die Ursache für die beschriebenen antiinflammatorischen Effekte der beiden redoxaktiven Nahrungsbestandteile ist. Der Mechanismus von Curcumin ist die direkte Modifikation von Thiolen der IRAK wohingegen Sulforaphan die Expression von Tollip induziert. Prozesse, die abwärts des IL-1RI-Komplexes stattfinden, werden nicht initiiert. Dazu gehören die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die Expressionen von Zytokinen (IL-6), Zelladhäsionsmolekülen (ICAM) oder Enzymen (COX-2). Neben dem Eingreifen in Entzündungsprozesse wirken Curcumin und Sulforaphan antikanzerogen indem sie über die Aktivierung von Nrf2 Phase-II-Enzyme induzieren. Beide Substanzen haben deshalb eine besondere Relevanz hinsichtlich einer chemopräventiven Wirkung gegen Krebs. Aufgrund der ähnlichen beschriebenen Wirkungsweisen von Curcumin und Sulforaphan, kann Curcumin vermutlich auch die Expression von Tollip induzieren.

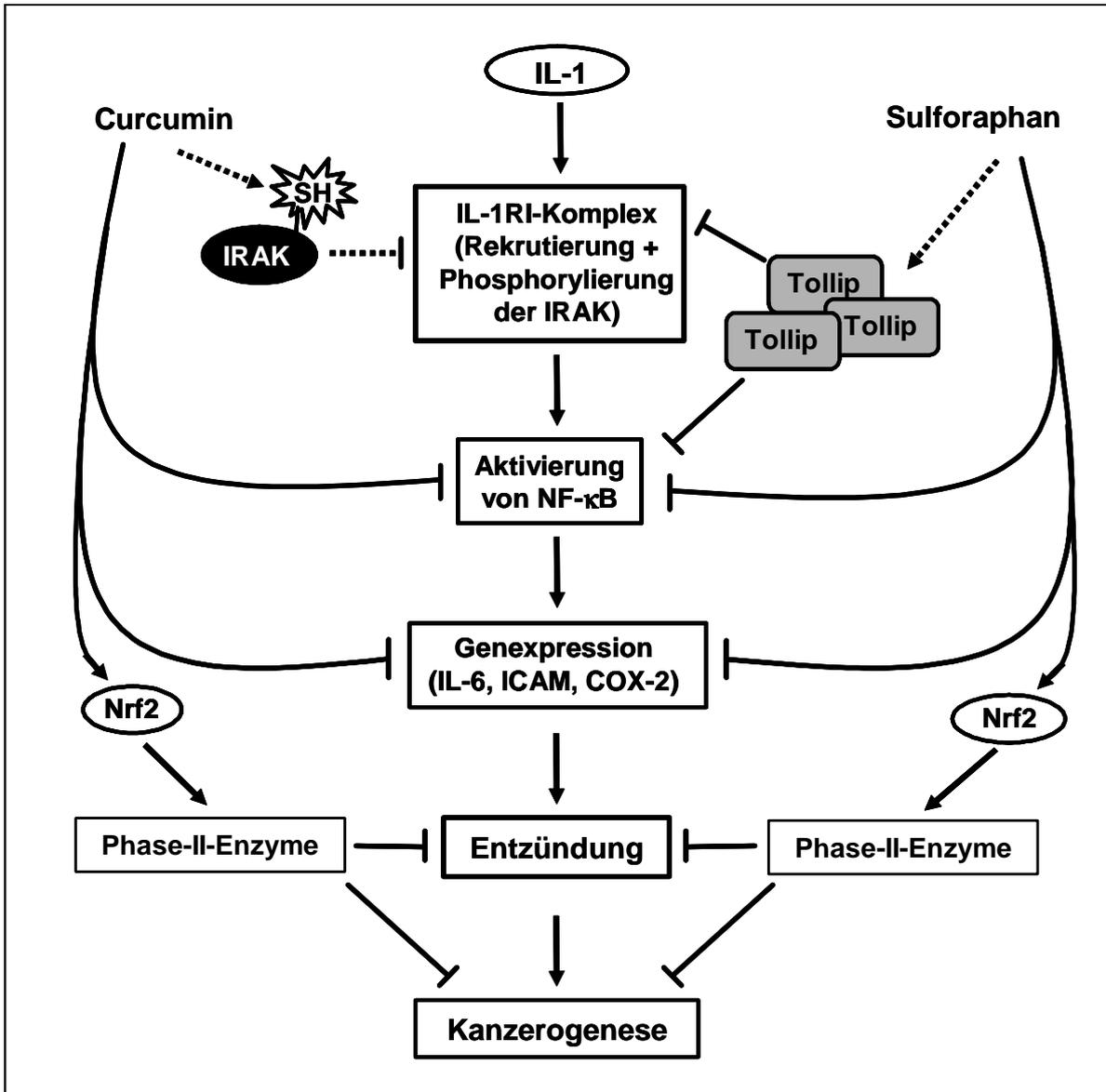


Abb. 35: Interferenzen von Curcumin und Sulforaphan mit Prozessen innerhalb der IL-1-Signalkaskade

— bereits bekannte Prozesse                      → Aktivierung  
 ..... in dieser Arbeit erzielte Ergebnisse                      ⊥ Hemmung

### 4.3 Ausblick

Zur Identifizierung unbekannter Interaktionspartner im IL-1RI-Komplex würden sich Zellen, die den Rezeptor überexprimieren, eignen. Da nur ein Teil der zellulären überexprimierten IRAK an den Rezeptor rekrutiert wurde, kann man annehmen, dass durch eine IL-1RI-Überexpression vermehrt Proteine an den Rezeptor assoziieren. Des Weiteren könnten Co-translokationen des Cytoskeletts mit Proteinen des IL-1RI-Komplexes mittels

Fluoreszenz-Mikroskopie dargestellt werden. Dadurch ermöglichen sich Einblicke in stimulations-abhängige subzelluläre Translokationen wie z. B. von der IRAK.

Nach der Identifizierung der IRAK als ein redoxsensitives Protein, könnte die Curcumin-verursachte Modifikation der Proteinthiole untersucht werden. Wenn Curcumin direkt an der IRAK bindet, ließe sich diese Cysteinmodifikation mittels massenspektrometrischer Methoden nachweisen. Dazu wird das rekombinante Protein direkt mit Curcumin inkubiert oder die nicht mehr radioaktiv markierte IRAK wird aus SDS-Gelen isoliert.

Der Mechanismus der Sulforaphan-induzierten Expression von Tollip müsste durch Promotoranalysen aufgeklärt werden. Bis heute sind keine Promotorsequenzen von Tollip dargestellt worden. Zur Charakterisierung unbekannter Genabschnitte kann die Methode des „Genome Walkings“ verwendet werden. Hierfür werden genomische DNA-Fragmente mit spezifischen Primern amplifiziert und sequenziert. Mit Hilfe des Computerprogramms „MatInspector“ [170] können Bindestellen von Transkriptionsfaktoren analysiert werden. Potentielle regulatorische Elemente werden durch Generierung von Deletionskonstrukten und anschließenden Reporteranalysen identifiziert.

Neben Curcumin und Sulforaphan sind weitere natürliche Substanzen, die antiinflammatorisch wirken, beschrieben worden. EGCG und Resveratrol inhibieren die Expression von COX-2, und Quercetin blockiert die Aktivität der COX-2 [230]. Diese Substanzen können hinsichtlich ihrer Effekte auf die Bildung des IL-1RI-Komplexes und Induktion negativer Regulatoren des TLR/IL-1RI-Signalweges mit Hilfe der hier verwendeten Methoden untersucht werden.

Um die physiologische Relevanz der Curcumin- und Sulforaphan-verursachten Wirkungsmechanismen zu überprüfen, müssen *in vivo* Studien durchgeführt werden. Die Induktion der Genexpression von Tollip kann mit Fütterungsexperimenten an Tieren ermittelt und mit möglichen antikanzerogenen Effekten korreliert werden.

## 5 Zusammenfassung

Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1 (IL-1) vermittelt seine Antwort über den IL-1-Rezeptor Typ I (IL-1R). Nach der Bindung von IL-1 werden Adapterproteine wie MyD88 und Tollip sowie Kinasen, wie die IL-1RI-assoziierten Kinasen IRAK und IRAK-4, an den Rezeptor rekrutiert. Die Bildung des IL-1RI-Komplexes initiiert weitere Kinasen, die zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und schließlich zur Expression von Proteinen, die an der Kontrolle der Entzündung und Immunantwort involviert sind, führen. IL-1 spielt eine wichtige Rolle in der Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose. Eine konstitutive Produktion an IL-1 wird auch in der Pathogenese von chronischen Krankheiten wie z. B. entzündlichen Darmerkrankungen beobachtet.

Das Ziel dieser Arbeit war, die Wirksamkeiten von redoxaktiven Substanzen auf frühe Ereignisse der IL-1-Signaltransduktion aufzuklären. Vorausgegangene Untersuchungen an der murinen Thymomzelllinie EL-4 zeigten, dass die Aktivierungen IL-1RI-assoziiierter Kinasen und NF- $\kappa$ B durch die synthetischen Substanzen Menadion (MD), Phenylarsinoxid (PAO), Diamid (DA) und Pyrrolidindithiocarbamat (PDTTC) inhibiert sind. Diese Agenzien verursachen Änderungen des zellulären Redoxstatus und Proteinmodifikationen. Die erzielten Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass ein reduzierter Status von Proteinthiolen essentiell für die Signalweiterleitung ist.

IRAK, als transiente Komponente des IL-1RI-Komplexes, war als mögliches redoxsensitives Ziel von Interesse. Die Aktivierung der IRAK wurde experimentell an EL-4-Zellen mit stabil überexprimierter IRAK (EL-4<sup>IRAK</sup>) untersucht. Die Bildung des IL-1RI-Komplexes, anschließende Phosphorylierungsereignisse und somit Kinase-Aktivitäten wurden durch Co-präzipitations-Experimente und *in vitro* Kinase Tests ermittelt. Die Markierung von Proteinthiolen erfolgte mit dem thiol-spezifischen Reagenz Iodoacetyl-<sup>[125I]</sup>-Iodotyrosin (<sup>[125I]</sup>-IAIT).

Im ersten Teil der Arbeit wurden <sup>[125I]</sup>-IAIT-markierbare IL-1RI-assoziierte Proteine ermittelt. Nach IL-1-Stimulation wurden an IL-1RI-Immünpräzipitaten u. a. zwei Proteine mit Molekulargewichten von 32 bzw. 80 kD <sup>[125I]</sup>-IAIT-markiert. Bei den 80 kD Protein handelte es sich um IRAK. Dagegen ließ sich das 32 kD Protein nicht eindeutig identifizieren, lässt aber die Vermutung zu, dass es MyD88 ist. Weitere rezeptorgebundene Proteine wie Actin und Tropomyosin wurden durch massenspektrometrische Analysen von zweidimensional aufgetrennten IL-1RI-Immünpräzipitaten identifiziert. Actin wurde

IL-1-unabhängig co-präzipitiert, wohingegen Tropomyosin erst auf IL-1-Stimulus an den Rezeptor bindet.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung der Hemmung der Aktivierung der IRAK durch verschiedene thiolmodifizierende Substanzen. Die Ursache hierfür zeigte sich in der Inhibition der Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI nach Vorbehandlungen der Zellen mit MD, PAO, DA und PDTC.

In Analogie dazu wurden die nahrungsrelevanten und redoxaktiven Substanzen Curcumin (Gelbwurz) und Sulforaphan (Broccoli) eingesetzt, um zu überprüfen, ob sie bereits frühe Signale wie die IL-1RI-Komplexbildung blockieren. Bisher wurden antiinflammatorische Effekte von Curcumin und Sulforaphan nur auf der Ebene der Zytokin-abhängigen Aktivierung von NF- $\kappa$ B beschrieben. Sowohl Curcumin als auch Sulforaphan blockierten konzentrationsabhängig die Assoziation der IRAK an den IL-1RI und Phosphorylierungen, wobei beide Substanzen unterschiedlich wirkten. Curcumin modifizierte kovalent Proteinthiole der IRAK ohne die Interaktion von IL-1 mit dem Rezeptor zu beeinflussen. Sulforaphan hingegen induzierte auf mRNA- und Proteinebene die Expression von Tollip, bekannt als ein negativer Regulator in TLR/IL-1RI-Signalkaskaden. Diese Induktion ereignete sich nicht über die Aktivierung von Nrf2, da eine direkte Beteiligung von Nrf2 weder mit Hilfe von EMSAs noch durch Reporteranalysen festgestellt werden konnte. Der Mechanismus der Aktivierung des Tollip-Promotors durch Sulforaphan bleibt zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse veranschaulichen, dass die IRAK ein redoxsensitives Protein ist. Für eine adäquate IL-1-Immunantwort ist ein intrazellulärer reduzierter Status von Proteinthiolen für die Bildung des IL-1RI-Komplexes und somit für die Initiation nachfolgender Ereignisse erforderlich. Der Angriffspunkt für die antiinflammatorische Wirkung der beiden Nahrungsbestandteile Curcumin und Sulforaphan ist das frühe Ereignis in der IL-1-Signalkaskade – die Assoziation der IRAK an den IL-1RI. Die Hemmung dieses Prozesses erklärt die in der Literatur beschriebenen Inhibitionen der abwärts liegenden Schritte, wie die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und Induktion proinflammatorischer Proteine.

## 6 Literatur

- [1] Martin, M.U. and Wesche, H. (2002) Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim. Biophys. Acta* 1592, 265-280.
- [2] Dinarello, C.A. (1994) The biological properties of interleukin-1. *Eur. Cytokine Netw.* 5, 517-531.
- [3] March, C.J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D.P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C.S., Kronheim, S.R., Grabstein, K. and et al. (1985) Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 315, 641-647.
- [4] Mosley, B., Urdal, D.L., Prickett, K.S., Larsen, A., Cosman, D., Conlon, P.J., Gillis, S. and Dower, S.K. (1987) The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J. Biol. Chem.* 262, 2941-2944.
- [5] Dinarello, C.A. (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095-2147.
- [6] Arend, W.P., Malyak, M., Bigler, C.F., Smith, M.F., Jr. and Janson, R.W. (1991) The biological role of naturally-occurring cytokine inhibitors. *Br. J. Rheumatol.* 30 Suppl 2, 49-52.
- [7] Arend, W.P. (1993) Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv. Immunol.* 54, 167-227.
- [8] Evans, R.J., Bray, J., Childs, J.D., Vigers, G.P., Brandhuber, B.J., Skalicky, J.J., Thompson, R.C. and Eisenberg, S.P. (1995) Mapping receptor binding sites in interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1 beta by site-directed mutagenesis. Identification of a single site in IL-1ra and two sites in IL-1 beta. *J. Biol. Chem.* 270, 11477-11483.
- [9] Dower, S.K., Kronheim, S.R., Hopp, T.P., Cantrell, M., Deeley, M., Gillis, S., Henney, C.S. and Urdal, D.L. (1986) The cell surface receptors for interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta are identical. *Nature* 324, 266-268.
- [10] Sims, J.E., Gayle, M.A., Slack, J.L., Alderson, M.R., Bird, T.A., Giri, J.G., Colotta, F., Re, F., Mantovani, A., Shanebeck, K., Grabstein, K.H. and Dower, S.K. (1993) Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 6155-6159.
- [11] Sims, J.E., Acres, R.B., Grubin, C.E., McMahan, C.J., Wignall, J.M., March, C.J. and Dower, S.K. (1989) Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 8946-8950.
- [12] Sims, J.E., March, C.J., Cosman, D., Widmer, M.B., MacDonald, H.R., McMahan, C.J., Grubin, C.E., Wignall, J.M., Jackson, J.L., Call, S.M. and et al. (1988) cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 241, 585-589.
- [13] McMahan, C.J., Slack, J.L., Mosley, B., Cosman, D., Lupton, S.D., Brunton, L.L., Grubin, C.E., Wignall, J.M., Jenkins, N.A., Brannan, C.I. and et al. (1991) A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J.* 10, 2821-2832.
- [14] Horuk, R. and McCubrey, J.A. (1989) The interleukin-1 receptor in Raji human B-lymphoma cells. Molecular characterization and evidence for receptor-mediated activation of gene expression. *Biochem. J.* 260, 657-663.
- [15] Brigelius-Flohé, R., McCarthy, J.E., Resch, K., Szamel, M. and Martin, M.U. (1993) Coexpression of type I and type II IL-1 receptors in the murine T helper 2 cell line D10N. *FEBS Lett.* 326, 204-208.
- [16] Wesche, H., Neumann, D., Resch, K. and Martin, M.U. (1996) Co-expression of mRNA for type I and type II interleukin-1 receptors and the IL-1 receptor accessory protein correlates to IL-1 responsiveness. *FEBS Lett.* 391, 104-108.
- [17] Stylianou, E., O'Neill, L.A., Rawlinson, L., Edbrooke, M.R., Woo, P. and Saklatvala, J. (1992) Interleukin 1 induces NF-kappa B through its type I but not its type II receptor in lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 267, 15836-15841.
- [18] Colotta, F., Dower, S.K., Sims, J.E. and Mantovani, A. (1994) The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol. Today* 15, 562-566.
- [19] Lang, D., Knop, J., Wesche, H., Raffetseder, U., Kurrle, R., Boraschi, D. and Martin, M.U. (1998) The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. *J. Immunol.* 161, 6871-6877.

- [20] Scapigliati, G., Ghiara, P., Bartalini, M., Tagliabue, A. and Boraschi, D. (1989) Differential binding of IL-1 alpha and IL-1 beta to receptors on B and T cells. *FEBS Lett.* 243, 394-398.
- [21] Li, X. and Qin, J. (2005) Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *J. Mol. Med.* 83, 258-266.
- [22] Akira, S. and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499-511.
- [23] Arend, W.P., Malyak, M., Smith, M.F., Jr., Whisenand, T.D., Slack, J.L., Sims, J.E., Giri, J.G. and Dower, S.K. (1994) 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, 4766-4774.
- [24] Greenfeder, S.A., Nunes, P., Kwee, L., Labow, M., Chizzonite, R.A. and Ju, G. (1995) Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J. Biol. Chem.* 270, 13757-13765.
- [25] Wesche, H., Korherr, C., Kracht, M., Falk, W., Resch, K. and Martin, M.U. (1997) The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases). *J. Biol. Chem.* 272, 7727-7731.
- [26] Cullinan, E.B., Kwee, L., Nunes, P., Shuster, D.J., Ju, G., McIntyre, K.W., Chizzonite, R.A. and Labow, M.A. (1998) IL-1 receptor accessory protein is an essential component of the IL-1 receptor. *J. Immunol.* 161, 5614-5620.
- [27] Casadio, R., Frigimelica, E., Bossu, P., Neumann, D., Martin, M.U., Tagliabue, A. and Boraschi, D. (2001) Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1beta/IL-1R(I) complex. *FEBS Lett.* 499, 65-68.
- [28] Lord, K.A., Hoffman-Liebermann, B. and Liebermann, D.A. (1990) Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene* 5, 1095-1097.
- [29] Lord, K.A., Abdollahi, A., Hoffman-Liebermann, B. and Liebermann, D.A. (1990) Dissection of the immediate early response of myeloid leukemia cells to terminal differentiation and growth inhibitory stimuli. *Cell Growth Differ.* 1, 637-645.
- [30] Bonnert, T.P., Garka, K.E., Parnet, P., Sonoda, G., Testa, J.R. and Sims, J.E. (1997) The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. *FEBS Lett.* 402, 81-84.
- [31] Hultmark, D. (1994) Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 144-146.
- [32] Wesche, H., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Li, S. and Cao, Z. (1997) MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7, 837-847.
- [33] Feinstein, E., Kimchi, A., Wallach, D., Boldin, M. and Varfolomeev, E. (1995) The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends Biochem. Sci.* 20, 342-344.
- [34] Janssens, S. and Beyaert, R. (2002) A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem. Sci.* 27, 474-482.
- [35] Burns, K., Martinon, F., Esslinger, C., Pahl, H., Schneider, P., Bodmer, J.L., Di Marco, F., French, L. and Tschoop, J. (1998) MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 12203-12209.
- [36] Burns, K., Clatworthy, J., Martin, L., Martinon, F., Plumpton, C., Maschera, B., Lewis, A., Ray, K., Tschoop, J. and Volpe, F. (2000) Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat. Cell Biol.* 2, 346-351.
- [37] Zhang, G. and Ghosh, S. (2002) Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J. Biol. Chem.* 277, 7059-7065.
- [38] Cario, E. and Podolsky, D.K. (2005) Intestinal epithelial TOLLerance versus inTOLLerance of commensals. *Mol. Immunol.* 42, 887-893.
- [39] Otte, J.M., Cario, E. and Podolsky, D.K. (2004) Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 126, 1054-1070.
- [40] Martin, M.U., Böhl, G.-F., Eriksson, A., Resch, K. and Brigelius-Flohé, R. (1994) Interleukin-1-induced activation of a protein kinase co-precipitating with the type I interleukin-1 receptor in T cells. *Eur. J. Immunol.* 24, 1566-1571.

- [41] Croston, G.E., Cao, Z. and Goeddel, D.V. (1995) NF-kappa B activation by interleukin-1 (IL-1) requires an IL-1 receptor-associated protein kinase activity. *J. Biol. Chem.* 270, 16514-16517.
- [42] Cao, Z., Henzel, W.J. and Gao, X. (1996) IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 271, 1128-1131.
- [43] Trofimova, M., Sprengle, A.B., Green, M., Sturgill, T.W., Goebel, M.G. and Harrington, M.A. (1996) Developmental and tissue-specific expression of mouse pelle-like protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 17609-17612.
- [44] Janssens, S. and Beyaert, R. (2003) Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol. Cell* 11, 293-302.
- [45] Wesche, H., Gao, X., Li, X., Kirschning, C.J., Stark, G.R. and Cao, Z. (1999) IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J. Biol. Chem.* 274, 19403-19410.
- [46] Rosati, O. and Martin, M.U. (2002) Identification and characterization of murine IRAK-M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1472-1477.
- [47] Li, S., Strelow, A., Fontana, E.J. and Wesche, H. (2002) IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5567-5572.
- [48] Muzio, M., Ni, J., Feng, P. and Dixit, V.M. (1997) IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 278, 1612-1615.
- [49] Knop, J. and Martin, M.U. (1999) Effects of IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) expression on IL-1 signaling are independent of its kinase activity. *FEBS Lett.* 448, 81-85.
- [50] Li, X., Commane, M., Burns, C., Vithalani, K., Cao, Z. and Stark, G.R. (1999) Mutant cells that do not respond to interleukin-1 (IL-1) reveal a novel role for IL-1 receptor-associated kinase. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4643-4652.
- [51] Maschera, B., Ray, K., Burns, K. and Volpe, F. (1999) Overexpression of an enzymically inactive interleukin-1-receptor-associated kinase activates nuclear factor-kappaB. *Biochem. J.* 339, 227-231.
- [52] Li, X., Commane, M., Jiang, Z. and Stark, G.R. (2001) IL-1-induced NFkappa B and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation diverge at IL-1 receptor-associated kinase (IRAK). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4461-4465.
- [53] Jensen, L.E. and Whitehead, A.S. (2001) IRAK1b, a novel alternative splice variant of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK), mediates interleukin-1 signaling and has prolonged stability. *J. Biol. Chem.* 276, 29037-29044.
- [54] Kanakaraj, P., Schafer, P.H., Cavender, D.E., Wu, Y., Ngo, K., Grealish, P.F., Wadsworth, S.A., Peterson, P.A., Siekierka, J.J., Harris, C.A. and Fung-Leung, W.P. (1998) Interleukin (IL)-1 receptor-associated kinase (IRAK) requirement for optimal induction of multiple IL-1 signaling pathways and IL-6 production. *J. Exp. Med.* 187, 2073-2079.
- [55] Thomas, J.A., Allen, J.L., Tsen, M., Dubnicoff, T., Danao, J., Liao, X.C., Cao, Z. and Wasserman, S.A. (1999) Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase. *J. Immunol.* 163, 978-984.
- [56] Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G.S., Millar, D.G., Wada, T., Mirsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S., Penninger, J.M., Wesche, H., Ohashi, P.S., Mak, T.W. and Yeh, W.C. (2002) Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416, 750-756.
- [57] Rosati, O. and Martin, M.U. (2002) Identification and characterization of murine IRAK-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 52-58.
- [58] Kobayashi, K., Hernandez, L.D., Galan, J.E., Janeway, C.A., Jr., Medzhitov, R. and Flavell, R.A. (2002) IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 110, 191-202.
- [59] Kollwe, C., Mackensen, A.C., Neumann, D., Knop, J., Cao, P., Li, S., Wesche, H. and Martin, M.U. (2004) 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, 5227-5236.
- [60] Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. and Goeddel, D.V. (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383, 443-446.
- [61] Arch, R.H. and Thompson, C.B. (1998) 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Mol. Cell. Biol.* 18, 558-565.

- [62] Jiang, Z., Johnson, H.J., Nie, H., Qin, J., Bird, T.A. and Li, X. (2003) 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, 10952-10956.
- [63] Yu, K.Y., Kwon, H.J., Norman, D.A., Vig, E., Goebel, M.G. and Harrington, M.A. (2002) Cutting edge: mouse pellino-2 modulates IL-1 and lipopolysaccharide signaling. *J. Immunol.* 169, 4075-4078.
- [64] Jensen, L.E. and Whitehead, A.S. (2003) Pellino3, a novel member of the Pellino protein family, promotes activation of c-Jun and Elk-1 and may act as a scaffolding protein. *J. Immunol.* 171, 1500-1506.
- [65] Strelow, A., Kollwe, C. and Wesche, H. (2003) Characterization of Pellino2, a substrate of IRAK1 and IRAK4. *FEBS Lett.* 547, 157-161.
- [66] Jiang, Z., Ninomiya-Tsuji, J., Qian, Y., Matsumoto, K. and Li, X. (2002) 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, 7158-7167.
- [67] Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E. and Matsumoto, K. (1995) Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270, 2008-2011.
- [68] Takaesu, G., Kishida, S., Hiyama, A., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Ninomiya-Tsuji, J. and Matsumoto, K. (2000) TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol. Cell* 5, 649-658.
- [69] Shibuya, H., Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Tonegawa, A., Gotoh, Y., Ueno, N., Irie, K., Nishida, E. and Matsumoto, K. (1996) TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* 272, 1179-1182.
- [70] Kishimoto, K., Matsumoto, K. and Ninomiya-Tsuji, J. (2000) TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *J. Biol. Chem.* 275, 7359-7364.
- [71] Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C. and Chen, Z.J. (2000) Activation of the I kappa B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103, 351-361.
- [72] Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J. and Chen, Z.J. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346-351.
- [73] Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z. and Matsumoto, K. (1999) The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappa B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398, 252-256.
- [74] Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Li, J., Young, D.B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A. and Rao, A. (1997) IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I kappa B kinases essential for NF-kappa B activation. *Science* 278, 860-866.
- [75] Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J. and Israel, A. (1998) Complementation cloning of NEMO, a component of the I kappa B kinase complex essential for NF-kappa B activation. *Cell* 93, 1231-1240.
- [76] Traenckner, E.B., Pahl, H.L., Henkel, T., Schmidt, K.N., Wilk, S. and Baeuerle, P.A. (1995) Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* 14, 2876-2883.
- [77] Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M. and Karin, M. (1997) The I kappa B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for I kappa B phosphorylation and NF-kappa B activation. *Cell* 91, 243-252.
- [78] Pahl, H.L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.
- [79] Yamin, T.T. and Miller, D.K. (1997) The interleukin-1 receptor-associated kinase is degraded by proteasomes following its phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272, 21540-21547.
- [80] Böl, G.-F., Kreuzer, O.J. and Brigelius-Flohé, R. (2000) Translocation of the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 (IRAK-1) into the nucleus. *FEBS Lett.* 477, 73-78.

- [81] Cooke, E.L., Uings, I.J., Xia, C.L., Woo, P. and Ray, K.P. (2001) Functional analysis of the interleukin-1-receptor-associated kinase (IRAK-1) in interleukin-1 beta-stimulated nuclear factor kappa B (NF- kappa B) pathway activation: IRAK-1 associates with the NF-kappa B essential modulator (NEMO) upon receptor stimulation. *Biochem. J.* 359, 403-410.
- [82] Gugasyan, R., Grumont, R., Grossmann, M., Nakamura, Y., Pohl, T., Nesic, D. and Gerondakis, S. (2000) Rel/NF-kappaB transcription factors: key mediators of B-cell activation. *Immunol. Rev.* 176, 134-140.
- [83] Franzoso, G., Carlson, L., Xing, L., Poljak, L., Shores, E.W., Brown, K.D., Leonardi, A., Tran, T., Boyce, B.F. and Siebenlist, U. (1997) Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev.* 11, 3482-3496.
- [84] Ferreira, V., Sidenius, N., Tarantino, N., Hubert, P., Chatenoud, L., Blasi, F. and Korner, M. (1999) In vivo inhibition of NF-kappa B in T-lineage cells leads to a dramatic decrease in cell proliferation and cytokine production and to increased cell apoptosis in response to mitogenic stimuli, but not to abnormal thymopoiesis. *J. Immunol.* 162, 6442-6450.
- [85] Mora, A., Youn, J., Keegan, A. and Boothby, M. (2001) NF-kappa B/Rel participation in the lymphokine-dependent proliferation of T lymphoid cells. *J. Immunol.* 166, 2218-2227.
- [86] Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A.M. and Aggarwal, B.B. (2004) Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J. Mol. Med.* 82, 434-448.
- [87] Marok, R., Winyard, P.G., Coumbe, A., Kus, M.L., Gaffney, K., Blades, S., Mapp, P.I., Morris, C.J., Blake, D.R., Kaltschmidt, C. and Baeuerle, P.A. (1996) Activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB in human inflamed synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 39, 583-591.
- [88] Abu-Amer, Y. and Tondravi, M.M. (1997) NF-kappaB and bone: the breaking point. *Nat. Med.* 3, 1189-1190.
- [89] Ellis, R.D., Goodlad, J.R., Limb, G.A., Powell, J.J., Thompson, R.P. and Pouchard, N.A. (1998) Activation of nuclear factor kappa B in Crohn's disease. *Inflamm. Res.* 47, 440-445.
- [90] Thiele, K., Bierhaus, A., Autschbach, F., Hofmann, M., Stremmel, W., Thiele, H., Ziegler, R. and Nawroth, P.P. (1999) Cell specific effects of glucocorticoid treatment on the NF-kappaBp65/IkappaBalpha system in patients with Crohn's disease. *Gut* 45, 693-704.
- [91] Gay, N.J. and Keith, F.J. (1991) Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351, 355-356.
- [92] Gillespie, S.K. and Wasserman, S.A. (1994) Dorsal, a Drosophila Rel-like protein, is phosphorylated upon activation of the transmembrane protein Toll. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3559-3568.
- [93] Morisato, D. and Anderson, K.V. (1994) The spätzle gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo. *Cell* 76, 677-688.
- [94] Galindo, R.L., Edwards, D.N., Gillespie, S.K. and Wasserman, S.A. (1995) Interaction of the pelle kinase with the membrane-associated protein tube is required for transduction of the dorsoventral signal in Drosophila embryos. *Development* 121, 2209-2218.
- [95] Shelton, C.A. and Wasserman, S.A. (1993) pelle encodes a protein kinase required to establish dorsoventral polarity in the Drosophila embryo. *Cell* 72, 515-525.
- [96] Grosshans, J., Schnorrer, F. and Nusslein-Volhard, C. (1999) Oligomerisation of Tube and Pelle leads to nuclear localisation of dorsal. *Mech. Dev.* 81, 127-138.
- [97] Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. and Hoffmann, J.A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 86, 973-983.
- [98] Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 135-145.
- [99] Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R.M. and Wagner, H. (2002) Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.* 32, 1958-1968.
- [100] Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., Wagner, H. and Bauer, S. (2003) The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J. Immunol.* 33, 2987-2997.
- [101] Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Kobayashi, S., Tani, M., Kunikata, T., Murakami, T., Sanou, O., Kojima, H., Fujii, M., Ohta, T., Ikeda, M., Ikegami, H. and Kurimoto, M. (1997) Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 25737-25742.

- [102] Parnet, P., Garka, K.E., Bonnert, T.P., Dower, S.K. and Sims, J.E. (1996) IL-1Rrp is a novel receptor-like molecule similar to the type I interleukin-1 receptor and its homologues T1/ST2 and IL-1R AcP. *J. Biol. Chem.* 271, 3967-3970.
- [103] Dinarello, C.A., Novick, D., Puren, A.J., Fantuzzi, G., Shapiro, L., Muhl, H., Yoon, D.Y., Reznikov, L.L., Kim, S.H. and Rubinstein, M. (1998) Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor. *J. Leukoc. Biol.* 63, 658-664.
- [104] Dinarello, C.A. (2000) Targeting interleukin 18 with interleukin 18 binding protein. *Ann. Rheum. Dis.* 59 Suppl 1, 17-20.
- [105] Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47-95.
- [106] Griendling, K.K., Sorescu, D. and Ushio-Fukai, M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* 86, 494-501.
- [107] Van Heerebeek, L., Meischl, C., Stoker, W., Meijer, C.J., Niessen, H.W. and Roos, D. (2002) NADPH oxidase(s): new source(s) of reactive oxygen species in the vascular system? *J. Clin. Pathol.* 55, 561-568.
- [108] Babior, B.M. (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464-1476.
- [109] Rueckschloss, U., Duerrschmidt, N. and Morawietz, H. (2003) NADPH oxidase in endothelial cells: impact on atherosclerosis. *Antioxid. Redox Signal.* 5, 171-180.
- [110] Kühn, H. and Thiele, B.J. (1999) The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett.* 449, 7-11.
- [111] Kuehl, F.A., Jr. and Egan, R.W. (1980) Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. *Science* 210, 978-984.
- [112] Hofmann, B., Hecht, H.J. and Flohé, L. (2002) Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* 383, 347-364.
- [113] Brigelius-Flohé, R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 951-965.
- [114] Denu, J.M. and Tanner, K.G. (2002) Redox regulation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: detecting sulfenic acid intermediates and examining reversible inactivation. *Methods Enzymol.* 348, 297-305.
- [115] Hamann, M., Zhang, T., Hendrich, S. and Thomas, J.A. (2002) Quantitation of protein sulfenic and sulfonic acid, irreversibly oxidized protein cysteine sites in cellular proteins. *Methods Enzymol.* 348, 146-156.
- [116] Mallis, R.J., Hamann, M.J., Zhao, W., Zhang, T., Hendrich, S. and Thomas, J.A. (2002) Irreversible thiol oxidation in carbonic anhydrase III: protection by S- glutathiolation and detection in aging rats. *Biol. Chem.* 383, 649-662.
- [117] Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lonn, M.E., Hudemann, C. and Lillig, C.H. (2005) Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1375-1377.
- [118] Roveri, A., Ursini, F., Flohé, L. and Maiorino, M. (2001) PHGPx and spermatogenesis. *Biofactors* 14, 213-222.
- [119] Pineda-Molina, E., Klatt, P., Vazquez, J., Marina, A., Garcia de Lacoba, M., Perez-Sala, D. and Lamas, S. (2001) Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry* 40, 14134-14142.
- [120] Toledano, M.B. and Leonard, W.J. (1991) Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 4328-4332.
- [121] Barrett, W.C., DeGnore, J.P., Keng, Y.F., Zhang, Z.Y., Yim, M.B. and Chock, P.B. (1999) Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.* 274, 34543-34546.
- [122] Rao, R.K. and Clayton, L.W. (2002) Regulation of protein phosphatase 2A by hydrogen peroxide and glutathionylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 610-616.
- [123] Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Eberini, I., Salmona, M., Bonetto, V., Mengozzi, M., Duffieux, F., Miclet, E., Bachi, A., Vandekerckhove, J., Gianazza, E. and Ghezzi, P. (2002) Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3505-3510.

- [124] Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Villa, P., Eberini, I., Vandekerckhove, J., Gianazza, E. and Ghezzi, P. (2003) Identification of proteins undergoing glutathionylation in oxidatively stressed hepatocytes and hepatoma cells. *Proteomics* 3, 1154-1161.
- [125] Chai, Y.C., Hendrich, S. and Thomas, J.A. (1994) Protein S-thiolation in hepatocytes stimulated by t-butyl hydroperoxide, menadione, and neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* 310, 264-272.
- [126] Brunmark, A. and Cadenas, E. (1989) Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Radic. Biol. Med.* 7, 435-477.
- [127] Watanabe, N. and Forman, H.J. (2003) Autoxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for the cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 411, 145-157.
- [128] Gitler, C., Mogyoros, M. and Kalef, E. (1994) Labeling of protein vicinal dithiols: role of protein-S2 to protein-(SH)<sub>2</sub> conversion in metabolic regulation and oxidative stress. *Methods Enzymol.* 233, 403-415.
- [129] Garcia-Morales, P., Minami, Y., Luong, E., Klausner, R.D. and Samelson, L.E. (1990) Tyrosine phosphorylation in T cells is regulated by phosphatase activity: studies with phenylarsine oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 9255-9259.
- [130] Singh, S. and Aggarwal, B.B. (1995) Protein-tyrosine phosphatase inhibitors block tumor necrosis factor-dependent activation of the nuclear transcription factor NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* 270, 10631-10639.
- [131] Friedrichs, B., Müller, C. and Brigelius-Flohé, R. (1998) Inhibition of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1-induced endothelial E-selectin expression by thiol-modifying agents. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 1829-1837.
- [132] Kosower, N.S. and Kosower, E.M. (1995) Diamide: an oxidant probe for thiols. *Methods Enzymol.* 251, 123-133.
- [133] Nobel, C.I., Kimland, M., Lind, B., Orrenius, S. and Slater, A.F. (1995) Dithiocarbamates induce apoptosis in thymocytes by raising the intracellular level of redox-active copper. *J. Biol. Chem.* 270, 26202-26208.
- [134] Kelner, M.J. and Alexander, N.M. (1986) Inhibition of erythrocyte superoxide dismutase by diethyldithiocarbamate also results in oxyhemoglobin-catalyzed glutathione depletion and methemoglobin production. *J. Biol. Chem.* 261, 1636-1641.
- [135] Schreck, R., Meier, B., Mannel, D.N., Droge, W. and Baeuerle, P.A. (1992) Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J. Exp. Med.* 175, 1181-1194.
- [136] Galter, D., Mihm, S. and Droge, W. (1994) Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factor kappa B and the activator protein-1. *Eur. J. Biochem.* 221, 639-648.
- [137] Sharma, R.A., Gescher, A.J. and Steward, W.P. (2005) Curcumin: the story so far. *Eur. J. Cancer* 41, 1955-1968.
- [138] Dinkova-Kostova, A.T., Massiah, M.A., Bozak, R.E., Hicks, R.J. and Talalay, P. (2001) Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3404-3409.
- [139] Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C.J., Foresti, R., Alam, J. and Motterlini, R. (2003) Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem. J.* 371, 887-895.
- [140] Keum, Y.S., Jeong, W.S. and Kong, A.N. (2004) Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutat. Res.* 555, 191-202.
- [141] Zhang, D.D. and Hannink, M. (2003) Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8137-8151.
- [142] Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D. and Yamamoto, M. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13, 76-86.
- [143] Yagisawa, M., Yuo, A., Kitagawa, S., Yazaki, Y., Togawa, A. and Takaku, F. (1995) Stimulation and priming of human neutrophils by IL-1 alpha and IL-1 beta: complete inhibition by IL-1 receptor antagonist and no interaction with other cytokines. *Exp. Hematol.* 23, 603-608.

- [144] Bonizzi, G., Piette, J., Schoonbroodt, S., Greimers, R., Havard, L., Merville, M.P. and Bours, V. (1999) Reactive oxygen intermediate-dependent NF-kappaB activation by interleukin-1beta requires 5-lipoxygenase or NADPH oxidase activity. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1950-1960.
- [145] Carman-Krzan, M. and Wise, B.C. (1993) Arachidonic acid lipoxygenation may mediate interleukin-1 stimulation of nerve growth factor secretion in astroglial cultures. *J. Neurosci. Res.* 34, 225-232.
- [146] Matsubara, T. and Ziff, M. (1986) Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J. Immunol.* 137, 3295-3298.
- [147] Meier, B., Radeke, H.H., Selle, S., Younes, M., Sies, H., Resch, K. and Habermehl, G.G. (1989) Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *Biochem. J.* 263, 539-545.
- [148] Boota, A., Zar, H., Kim, Y.M., Johnson, B., Pitt, B. and Davies, P. (1996) IL-1 beta stimulates superoxide and delayed peroxynitrite production by pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 271, 932-938.
- [149] Rhee, S.G. (1999) Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp. Mol. Med.* 31, 53-59.
- [150] Korn, S.H., Wouters, E.F., Vos, N. and Janssen-Heininger, Y.M. (2001) Cytokine-induced activation of nuclear factor-kappa B is inhibited by hydrogen peroxide through oxidative inactivation of IkappaB kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 35693-35700.
- [151] Das, K.C., Lewis-Molock, Y. and White, C.W. (1995) Thiol modulation of TNF alpha and IL-1 induced MnSOD gene expression and activation of NF-kappa B. *Mol. Cell. Biochem.* 148, 45-57.
- [152] Tewes, F., Böhl, G.-F. and Brigelius-Flohé, R. (1997) Thiol modulation inhibits the interleukin (IL)-1-mediated activation of an IL-1 receptor-associated protein kinase and NF-kappa B. *Eur. J. Immunol.* 27, 3015-3021.
- [153] Singh, S. and Aggarwal, B.B. (1995) Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *J. Biol. Chem.* 270, 24995-25000.
- [154] Jobin, C., Bradham, C.A., Russo, M.P., Juma, B., Narula, A.S., Brenner, D.A. and Sartor, R.B. (1999) Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J. Immunol.* 163, 3474-3483.
- [155] Kumar, A., Dhawan, S., Hardegen, N.J. and Aggarwal, B.B. (1998) Curcumin (Diferuloylmethane) inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated adhesion of monocytes to endothelial cells by suppression of cell surface expression of adhesion molecules and of nuclear factor-kappaB activation. *Biochem. Pharmacol.* 55, 775-783.
- [156] Plummer, S.M., Holloway, K.A., Manson, M.M., Munks, R.J., Kaptein, A., Farrow, S. and Howells, L. (1999) Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene* 18, 6013-6020.
- [157] Jeong, W.S., Kim, I.W., Hu, R. and Kong, A.N. (2004) Modulatory properties of various natural chemopreventive agents on the activation of NF-kappaB signaling pathway. *Pharm. Res.* 21, 661-670.
- [158] Heiss, E., Herhaus, C., Klimo, K., Bartsch, H. and Gerhauser, C. (2001) Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* 276, 32008-32015.
- [159] Wierinckx, A., Breve, J., Mercier, D., Schultzberg, M., Drukarch, B. and Van Dam, A.M. (2005) Detoxication enzyme inducers modify cytokine production in rat mixed glial cells. *J. Neuroimmunol.* 166, 132-143.
- [160] Böhl, G.-F., Tewes, F. and Brigelius-Flohé, R. (1999) Interleukin-1 signaling is dependent on free thiols. *Biofactors* 10, 175-178.
- [161] Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- [162] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- [163] Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and Glover, J.S. (1963) The Preparation of I-131-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity. *Biochem. J.* 89, 114-123.

- [164] Akerboom, T.P. and Sies, H. (1981) Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77, 373-382.
- [165] Banning, A., Deubel, S., Kluth, D., Zhou, Z. and Brigelius-Flohé, R. (2005) The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol. Cell Biol.* 25, 4914-4923.
- [166] Knop, J., Wesche, H., Lang, D. and Martin, M.U. (1998) Effects of overexpression of IL-1 receptor-associated kinase on NFkappaB activation, IL-2 production and stress-activated protein kinases in the murine T cell line EL4. *Eur. J. Immunol.* 28, 3100-3109.
- [167] Wang, J., Boja, E.S., Tan, W., Tekle, E., Fales, H.M., English, S., Mieyal, J.J. and Chock, P.B. (2001) Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells. *J. Biol. Chem.* 276, 47763-47766.
- [168] Wang, J., Tekle, E., Oubrahim, H., Mieyal, J.J., Stadtman, E.R. and Chock, P.B. (2003) Stable and controllable RNA interference: Investigating the physiological function of glutathionylated actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5103-5106.
- [169] Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Equils, O. and Arditi, M. (2001) Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J. Immunol.* 167, 987-994.
- [170] Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. and Werner, T. (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23, 4878-4884.
- [171] Wasserman, W.W. and Fahl, W.E. (1997) Functional antioxidant responsive elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5361-5366.
- [172] Melmed, G., Thomas, L.S., Lee, N., Tesfay, S.Y., Lukasek, K., Michelsen, K.S., Zhou, Y., Hu, B., Arditi, M. and Abreu, M.T. (2003) Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J. Immunol.* 170, 1406-1415.
- [173] Kang, K.W., Lee, S.J., Park, J.W. and Kim, S.G. (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Mol. Pharmacol.* 62, 1001-1010.
- [174] Alam, J. and Cook, J.L. (2003) Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway. *Curr. Pharm. Des.* 9, 2499-2511.
- [175] Gray, P.W., Glaister, D., Chen, E., Goeddel, D.V. and Pennica, D. (1986) Two interleukin 1 genes in the mouse: cloning and expression of the cDNA for murine interleukin 1 beta. *J. Immunol.* 137, 3644-3648.
- [176] Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K. and Akira, S. (1998) Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9, 143-150.
- [177] Schnare, M., Holt, A.C., Takeda, K., Akira, S. and Medzhitov, R. (2000) Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr. Biol.* 10, 1139-1142.
- [178] Kaisho, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Hoshino, K. and Akira, S. (2001) Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 5688-5694.
- [179] Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. and Akira, S. (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643.
- [180] Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K. and Akira, S. (2003) TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4, 1144-1150.
- [181] MacGillivray, M.K., Cruz, T.F. and McCulloch, C.A. (2000) The recruitment of the interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase (IRAK) into focal adhesion complexes is required for IL-1beta-induced ERK activation. *J. Biol. Chem.* 275, 23509-23515.
- [182] Jaunin, F., Burns, K., Tschopp, J., Martin, T.E. and Fakan, S. (1998) Ultrastructural distribution of the death-domain-containing MyD88 protein in HeLa cells. *Exp. Cell. Res.* 243, 67-75.
- [183] Wear, M.A. and Cooper, J.A. (2004) Capping protein: new insights into mechanism and regulation. *Trends Biochem. Sci.* 29, 418-428.

- [184] Ross, K., Yang, L., Dower, S., Volpe, F. and Guesdon, F. (2002) Identification of threonine 66 as a functionally critical residue of the interleukin-1 receptor-associated kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 37414-37421.
- [185] Jensen, L.E. and Whitehead, A.S. (2003) Ubiquitin activated tumor necrosis factor receptor associated factor-6 (TRAF6) is recycled via deubiquitination. *FEBS Lett.* 553, 190-194.
- [186] Böl, G.-F., Jurrmann, N. and Brigelius-Flohé, R. (2005) Cellular trafficking of the IL-1RI-associated kinase-1 requires intact kinase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 279-287.
- [187] Huang, Y., Li, T., Sane, D.C. and Li, L. (2004) IRAK1 Serves as a Novel Regulator Essential for Lipopolysaccharide-induced Interleukin-10 Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 279, 51697-51703.
- [188] Takatsuna, H., Kato, H., Gohda, J., Akiyama, T., Moriya, A., Okamoto, Y., Yamagata, Y., Otsuka, M., Umezawa, K., Semba, K. and Inoue, J. (2003) Identification of TIFA as an adapter protein that links tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) to interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-1 (IRAK-1) in IL-1 receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 12144-12150.
- [189] Mizel, S.B., Kilian, P.L., Lewis, J.C., Paganelli, K.A. and Chizzonite, R.A. (1987) The interleukin 1 receptor. Dynamics of interleukin 1 binding and internalization in T cells and fibroblasts. *J. Immunol.* 138, 2906-2912.
- [190] Böl, G.-F., Jurrmann, N. and Brigelius-Flohé, R. (2003) Recruitment of the interleukin-1 receptor (IL-1RI)-associated kinase IRAK to the IL-1RI is redox regulated. *Biol. Chem.* 384, 609-617.
- [191] Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11, 115-122.
- [192] Kojima, H., Takeuchi, M., Ohta, T., Nishida, Y., Arai, N., Ikeda, M., Ikegami, H. and Kurimoto, M. (1998) Interleukin-18 activates the IRAK-TRAF6 pathway in mouse EL-4 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 183-186.
- [193] Vig, E., Green, M., Liu, Y., Donner, D.B., Mukaida, N., Goebel, M.G. and Harrington, M.A. (1999) Modulation of tumor necrosis factor and interleukin-1-dependent NF-kappaB activity by mPLK/IRAK. *J. Biol. Chem.* 274, 13077-13084.
- [194] Mamidipudi, V., Li, X. and Wooten, M.W. (2002) Identification of interleukin 1 receptor-associated kinase as a conserved component in the p75-neurotrophin receptor activation of nuclear factor-kappa B. *J. Biol. Chem.* 277, 28010-28018.
- [195] Takeda, K. and Akira, S. (2004) TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 16, 3-9.
- [196] Glineur, C., Davioud-Charvet, E. and Vandenbunder, B. (2000) The conserved redox-sensitive cysteine residue of the DNA-binding region in the c-Rel protein is involved in the regulation of the phosphorylation of the protein. *Biochem. J.* 352 Pt 2, 583-591.
- [197] Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T. and Toriumi, W. (1999) IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J. Biol. Chem.* 274, 30353-30356.
- [198] Brigelius-Flohé, R., Friedrichs, B., Maurer, S., Schultz, M. and Streicher, R. (1997) Interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation is inhibited by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in a human endothelial cell line. *Biochem. J.* 328, 199-203.
- [199] Brigelius-Flohé, R., Maurer, S., Lötzer, K., Böl, G.-F., Kallionpaa, H., Lehtolainen, P., Viita, H. and Yla-Herttuala, S. (2000) Overexpression of PHGPx inhibits hydroperoxide-induced oxidation, NFkappaB activation and apoptosis and affects oxLDL-mediated proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 152, 307-316.
- [200] Banning, A., Schnurr, K., Böl, G.-F., Kupper, D., Muller-Schmehl, K., Viita, H., Yla-Herttuala, S. and Brigelius-Flohé, R. (2004) Inhibition of basal and interleukin-1-induced VCAM-1 expression by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and 15-lipoxygenase in rabbit aortic smooth muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 135-144.
- [201] Jurrmann, N., Brigelius-Flohé, R. and Böl, G.-F. (2005) Curcumin blocks interleukin-1 (IL-1) signaling by inhibiting the recruitment of the IL-1 receptor-associated kinase IRAK in murine thymoma EL-4 cells. *J. Nutr.* 135, 1859-1864.
- [202] Kim, H.Y., Park, E.J., Joe, E.H. and Jou, I. (2003) Curcumin suppresses Janus kinase-STAT inflammatory signaling through activation of Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 in brain microglia. *J. Immunol.* 171, 6072-6079.

- [203] Dinkova-Kostova, A.T. and Talalay, P. (1999) Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis* 20, 911-914.
- [204] Fang, J., Lu, J. and Holmgren, A. (2005) Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: a novel molecular mechanism for its anticancer activity. *J. Biol. Chem.* 280, 25284-25290.
- [205] Hong, J., Bose, M., Ju, J., Ryu, J.H., Chen, X., Sang, S., Lee, M.J. and Yang, C.S. (2004) Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related beta-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A(2), cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. *Carcinogenesis* 25, 1671-1679.
- [206] Huang, M.T., Lysz, T., Ferraro, T., Abidi, T.F., Laskin, J.D. and Conney, A.H. (1991) Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res.* 51, 813-819.
- [207] Kobayashi, A., Kang, M.I., Watai, Y., Tong, K.I., Shibata, T., Uchida, K. and Yamamoto, M. (2006) Oxidative and Electrophilic Stresses Activate Nrf2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1. *Mol. Cell. Biol.* 26, 221-229.
- [208] Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443-451.
- [209] Hardy, M.P. and O'Neill, L.A. (2004) The murine IRAK2 gene encodes four alternatively spliced isoforms, two of which are inhibitory. *J. Biol. Chem.* 279, 27699-27708.
- [210] Burns, K., Janssens, S., Brissoni, B., Olivos, N., Beyaert, R. and Tschopp, J. (2003) 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, 263-268.
- [211] Kubo, M., Hanada, T. and Yoshimura, A. (2003) Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat. Immunol.* 4, 1169-1176.
- [212] Rushmore, T.H., Morton, M.R. and Pickett, C.B. (1991) The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.* 266, 11632-11639.
- [213] Nioi, P., McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D. (2003) Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem. J.* 374, 337-348.
- [214] Zhang, Y. (2000) Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells. *Carcinogenesis* 21, 1175-1182.
- [215] Payen, L., Courtois, A., Loewert, M., Guillouzo, A. and Fardel, O. (2001) Reactive oxygen species-related induction of multidrug resistance-associated protein 2 expression in primary hepatocytes exposed to sulforaphane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 257-263.
- [216] Ohashi, Y., Tsuchiya, Y., Koizumi, K., Sakurai, H. and Saiki, I. (2003) Prevention of intrahepatic metastasis by curcumin in an orthotopic implantation model. *Oncology* 65, 250-258.
- [217] Jackson, S.J. and Singletary, K.W. (2004) Sulforaphane inhibits human MCF-7 mammary cancer cell mitotic progression and tubulin polymerization. *J. Nutr.* 134, 2229-2236.
- [218] Are, A.F., Galkin, V.E., Pospelova, T.V. and Pinaev, G.P. (2000) The p65/RelA subunit of NF-kappaB interacts with actin-containing structures. *Exp. Cell. Res.* 256, 533-544.
- [219] Kustermans, G., El Benna, J., Piette, J. and Legrand-Poels, S. (2005) Perturbation of actin dynamics induces NF-kappaB activation in myelomonocytic cells through an NADPH oxidase-dependent pathway. *Biochem. J.* 387, 531-540.
- [220] Cabisco, E. and Levine, R.L. (1996) The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 4170-4174.
- [221] Ravindranath, V. and Chandrasekhara, N. (1980) Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology* 16, 259-265.
- [222] Ireson, C., Orr, S., Jones, D.J., Verschoyle, R., Lim, C.K., Luo, J.L., Howells, L., Plummer, S., Jukes, R., Williams, M., Steward, W.P. and Gescher, A. (2001) Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Res.* 61, 1058-1064.

- [223] Sharma, R.A., Ireson, C.R., Verschoyle, R.D., Hill, K.A., Williams, M.L., Leuratti, C., Manson, M.M., Marnett, L.J., Steward, W.P. and Gescher, A. (2001) Effects of dietary curcumin on glutathione S-transferase and malondialdehyde-DNA adducts in rat liver and colon mucosa: relationship with drug levels. *Clin. Cancer Res.* 7, 1452-1458.
- [224] Cheng, A.L., Hsu, C.H., Lin, J.K., Hsu, M.M., Ho, Y.F., Shen, T.S., Ko, J.Y., Lin, J.T., Lin, B.R., Ming-Shiang, W., Yu, H.S., Jee, S.H., Chen, G.S., Chen, T.M., Chen, C.A., Lai, M.K., Pu, Y.S., Pan, M.H., Wang, Y.J., Tsai, C.C. and Hsieh, C.Y. (2001) Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res.* 21, 2895-2900.
- [225] Plummer, S.M., Shama, R.A., Hill, K.A., Ireson, C.R., Euden, S., Sheperd, P., Gescher, A. and Steward, W.P. (2001) Curcuminoids Inhibit Cyclooxygenase-Mediated Prostaglandin E2 Production and COX-2 Expression in Human Blood. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 42, 17-18.
- [226] Rao, C.V., Rivenson, A., Simi, B. and Reddy, B.S. (1995) Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Res.* 55, 259-266.
- [227] Seow, A., Yuan, J.M., Sun, C.L., Van Den Berg, D., Lee, H.P. and Yu, M.C. (2002) Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer risk in the Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis* 23, 2055-2061.
- [228] Zhang, Y. (2004) Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutat. Res.* 555, 173-190.
- [229] Chung, F.L., Morse, M.A., Eklind, K.I. and Lewis, J. (1992) Quantitation of human uptake of the anticarcinogen phenethyl isothiocyanate after a watercress meal. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1, 383-388.
- [230] Wallace, J.M. (2002) Nutritional and botanical modulation of the inflammatory cascade--eicosanoids, cyclooxygenases, and lipoxygenases--as an adjunct in cancer therapy. *Integr. Cancer Ther.* 1, 7-37; discussion 37.

## 7 Anhang

### Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Aufbau des IL-1RI-Komplexes .....	5
Abb. 2: Signaltransduktion vom IL-1RI-Komplex zu NF- $\kappa$ B.....	7
Abb. 3: Strukturformeln von Menadion, Phenylarsinoxid, Diamid und Pyrrolidindithiocarbamat.....	12
Abb. 4: Strukturformeln von Curcumin und Sulforaphan .....	13
Abb. 5: Basale und phosphorylierte IRAK in EL-4- und EL-4 <sup>IRAK</sup> -Zellen.....	38
Abb. 6: IL-1-abhängige Assoziation der IRAK an den IL-1RI in EL-4- und EL-4 <sup>IRAK</sup> -Zellen .....	39
Abb. 7: IL-1-vermittelte nukleäre Translokation der IRAK in EL-4 <sup>IRAK</sup> -Zellen.....	41
Abb. 8: [ <sup>125</sup> I]-IAIT-Markierung von drei zusätzlichen Proteinen am IL-1RI nach IL-1- Stimulation .....	42
Abb. 9: [ <sup>125</sup> I]-IAIT-markierte Thiole der IRAK .....	43
Abb. 10: [ <sup>125</sup> I]-IAIT-Markierung TCEP-reduzierter Thiole an IRAK-Immunpräzipitaten.....	44
Abb. 11: IL-1-abhängige Co-präzipitation von MyD88 mit dem IL-1RI und der IRAK.....	45
Abb. 12: Detektion von MyD88 und p32 .....	46
Abb. 13: 2DE von IL-1RI-co-präzipitierten Proteinen aus IL-1-stimulierten EL-4 <sup>IRAK</sup> -Zellen .....	47
Abb. 14: Actin co-präzipitiert IL-1-unabhängig mit dem IL-1RI .....	48
Abb. 15: Zunahme von Actin-Filamenten nach IL-1-Stimulation .....	49
Abb. 16: Verteilung der zellulären Actin-Konformation.....	49
Abb. 17: IL-1-abhängige Co-präzipitation von Tropomyosin mit dem IL-1RI.....	50
Abb. 18: Die IL-1-abhängige Phosphorylierung der IRAK wird durch MD, PAO, DA und PDTC inhibiert.....	52
Abb. 19: Die Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI wird durch MD, PAO, DA und PDTC beeinflusst .....	54
Abb. 20: Nachweis von Thiolmodifikationen der IRAK durch MD, PAO, DA und PDTC ...	55
Abb. 21: Curcumin beeinflusst konzentrationsabhängig die IL-1-vermittelte Phosphorylierung der IRAK.....	56
Abb. 22: Einfluss von Curcumin auf die Phosphorylierungen von Histon 1 und IRAK .....	57
Abb. 23: Curcumin inhibiert konzentrationsabhängig die Rekrutierung der IRAK an den IL-1RI .....	58
Abb. 24: Curcumin modifiziert konzentrationsabhängig Thiole der IRAK .....	59
Abb. 25: Die Inhibition der IL-1-abhängigen Phosphorylierung der IRAK durch Curcumin ist durch reduzierende Agenzien nicht reversibel zu machen .....	60
Abb. 26: Curcumin hat nur einen geringfügigen Einfluss auf die Interaktion von IL-1 mit dem IL-1RI.....	61

Abb. 27: Sulforaphan hemmt dosisabhängig die Assoziation der IRAK an den IL-1RI und deren Phosphorylierung .....	62
Abb. 28: ARE-Sequenzen des murinen und humanen Tollip-Gens und der Konsensussequenz .....	64
Abb. 29: Induktion der Tollip-Expression durch Sulforaphan in EL-4-Zellen .....	65
Abb. 30: Sulforaphan induziert die Tollip-Expression in CaCo-2-Zellen .....	66
Abb. 31: Sulforaphan führt zur nukleären Akkumulation von Nrf2 .....	67
Abb. 32: Sulforaphan führt nicht zur Bindung von Nrf2 an die Tollip-ARE .....	67
Abb. 33: Die Tollip-ARE-Reportergene werden durch Nrf2 nicht aktiviert .....	68
Abb. 34: Sulforaphan führt nicht zur Aktivierung der im humanen und murinen Tollip-Promotor vorhandenen ARE .....	69
Abb. 35: Interferenzen von Curcumin und Sulforaphan mit Prozessen innerhalb der IL-1-Signalkaskade .....	86

### Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Immunpräzipitation .....	21
Tabelle 2: Verwendete Erstantikörper für den Western Blot .....	25
Tabelle 3: PCR-Primer .....	32
Tabelle 4: EMSA-Oligonukleotide .....	33
Tabelle 5: Plasmide .....	35
Tabelle 6: Identifizierte IL-1RI-assozierte Proteine .....	47
Tabelle 7: MD verändert den intrazellulären Glutathiongehalt .....	51
Tabelle 8: Curcumin beeinflusst die Vitalität von EL-4 <sup>IRAK</sup> -Zellen erst in hohen Konzentrationen .....	60
Tabelle 9: Sulforaphan wirkt auf EL-4 <sup>IRAK</sup> -Zellen nicht cytotoxisch .....	63
Tabelle 10: Sulforaphan beeinflusst in geringen Konzentrationen die Proliferation von CaCo-2-Zellen nicht .....	65

## Verzeichnis der Abkürzungen

ARE	antioxidant response element
ARG	Autoradiographie
β-ME	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CHAPS	3-[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CDNB	2-chloro-1,3-dinitrobenzene
COX-2	Cyclooxygenase 2
DA	Diamid
DD	Death-Domäne
DIfE	Deutsches Institut für Ernährungsforschung
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure), Ellmann's Reagenz
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylen-glycol-bis-(2-aminoethylether)-tetraessigsäure
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
ESI-Q-TOF	Elektronenspray-Ionisierung-Quadropol-Time-of-Flight
FCS	fötales Kälberserum
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
[ <sup>125</sup> I]-IAIT	Iodoacetyl-[ <sup>125</sup> I]-Iodotyrosin
IEC	intestinale epitheliale Zellen
IFN	Interferon
IKK	IκB-Kinase
IL-1	Interleukin-1
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-1Ra	IL-1-Rezeptor Antagonist
IL-1RAcP	IL-1R-akzessorisches Protein
IP	Immunpräzipitation
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF-3	IFN-regulatorischen Faktor 3

ITC	Isothiocyanat
JNK	c-jun N-terminalen Kinase
kD	Kilodalton
Keap1	Kelch-like ECH-assoziiertes Protein-1
LPS	Lipopolysaccharid
LOX	Lipoxygenase
LTA	Lipoteichonsäure
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption-Ionisation
MD	Menadion
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
NAC	N-Acetyl-Cystein
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NEM	N-Ethylmaleimid
NEMO	NF- $\kappa$ B-essentieller Modulator
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor- $\kappa$ B
Nrf2	NF-E2 related Factor-2
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PAO	Phenylarsinoxid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDTC	Pyrrolidindithiocarbamat
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RIPA	Radio-Immuno-Präzipitationsassay
ROOH	Hydroperoxid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)-phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TTBS	Tween-Tris-gepufferte Kochsalzlösung
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WB	Western Blot

## Danksagung

### Mein herzlicher Dank gilt ...

an erster Stelle **Frau Prof. Dr. Regina Brigelius-Flohé** für die Möglichkeit das interessante Thema der vorliegenden Arbeit zu bearbeiten sowie für die in zahlreichen Diskussionen vermittelten Hinweise und Anregungen.

**Frau PD Dr. Gaby-Fleur Böi** für die Einführung in die Thematik, ihre Unterstützungen und informativen Gespräche.

**Herrn Prof. Dr. Michael U. Martin** (Universität Gießen) für die Bereitstellung der EL-4<sup>IRAK</sup>-Zellen.

**Herrn Dr. Wolfram Engst** für die ESI-Q-TOF-Analysen.

**Frau Dr. Simone Florian** für die Einweisung in die Fluoreszenz-Mikroskopie.

**allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern unserer Abteilung** für ihre experimentellen Beihilfen, die gute Zusammenarbeit und nette Atmosphäre.

vor allem **Stefanie Deubel, Antje Banning, Sandra Nell** und **Dirk Kluth** für ihre hilfreichen Ideen in vielen Besprechungen.

**Conny, Mandy** und **Melanie**, die immer ein offenes Ohr für berufliche und private Probleme hatten.

**meiner gesamten Familie**, für ihren stetigen Beistand.

**Denis**, für seine Unterstützung jeglicher Art, immenser Geduld und Verständnis.

**Herrn Prof. Dr. Dr. Hansjürgen Frhr. von Villiez** und der **Sonnenfeld-Stiftung** für die finanzielle Unterstützung.