

**Untersuchungen zu
Regulation und Funktion von NOD2
in intestinalen Epithelzellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Karen Bräutigam
(Dipl.-Biol.)

Kiel
März 2005

Diese Arbeit wurde in der Gruppe Zellbiologie des Instituts für Klinische Molekularbiologie (Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. S. Schreiber) an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Zeit von September 2001 bis März 2005 angefertigt.

Referent/in:

Koreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

Gewidmet

KAI

*Danke für den unentbehrlichen
„Rückenwind“*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis und englische Fachtermini	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	1
1.1.1 Pathophysiologie und Genetik des Morbus Crohn	1
1.2 Die Familie der NOD-Proteine und ihre Rolle bei der Vermittlung angeborener Immunität	3
1.2.1 NOD2/CARD15	8
1.2.2 Variabilität in anderen NOD-Familienmitgliedern verursacht Erkrankungen des Immunsystems	11
1.2.2.1 CIITA (<i>major histocompatibility complex (MHC) class II transactivator</i>)	11
1.2.2.2 CIAS1/Cryopyrin/NALP3	12
1.2.2.3 NAIP (neuronales Apoptose-inhibierendes Protein)	13
1.2.2.4 CARD7/NALP1/DEFCAP	14
1.3 Der NF- κ B-Signalweg	16
1.4 Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAP-Kinase)-Signalwege	20
1.4.1 p38 MAP-Kinasen	23
1.4.2 c-Jun N-terminale Kinasen (JNKs)	24
1.4.3 Extrazellulär Signal-regulierte Kinasen (ERKs)	25
1.5 Zielsetzungen dieser Arbeit	26
2 Methoden	
2.1 Zellkultur	28
2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden	29
2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen	29
2.2.2 Reverse Transkription	30
2.2.3 RT-PCR	31
2.2.4 Herstellung von Konstrukten für das Two-Hybrid-Screening, zur Überexpression und für Reporter-gen-Assays	33
2.2.4.1 Amplifikation der Zielsequenzen	33

2.2.4.1.1	<i>Nested- und Two-Step-PCR zur Amplifizierung des NOD2-Gens</i>	33
2.2.4.1.2	<i>Amplifikation der übrigen Zielkonstrukte</i>	36
2.2.4.2	Gelelektrophorese der Genfragmente	37
2.2.4.2.1	<i>Agarosegel-Elektrophorese</i>	37
2.2.4.3	Aufreinigung der DNA	37
2.2.4.4	Enzymatischer Verdau der DNA mit Restriktionsendonukleasen	38
2.2.4.5	Ligation	38
2.2.4.6	TA-Klonierung in einen TOPO-Vektor	39
2.2.4.7	Transformation von Bakterien	40
2.2.4.8	Identifizierung von positiven Klonen	40
2.2.4.9	Präparative Aufreinigung der Plasmid-DNA (Maxiprep)	41
2.2.4.10	Sequenzierungsreaktion	42
2.2.4.11	Ortsgerichtete Mutagenese	42
2.2.4.12	Übersicht über die hergestellten Konstrukte	44
2.3	Transfektion von Zellen	49
2.3.1	Transfektion von Zellen mit DNA	49
2.3.2	Transfektion von Zellen mit siRNA	50
2.4	Das Two-Hybrid-System in <i>E. coli</i> zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen	51
2.4.1	Allgemein	51
2.4.2	Prinzip des BacterioMatch-Two-Hybrid-Systems	52
2.4.3	Präparation des Köderproteins	55
2.4.4	Test auf Eignung des rekombinanten Köderproteins	55
2.4.5	Amplifizierung und Aufreinigung der cDNA-Genbank	56
2.4.6	Bestimmung der Kotransformations-Effizienz	57
2.4.7	Abschätzung der Anzahl der Kotransformationen zum <i>Screening</i> der gesamten Genbank	57
2.4.8	Genbank- <i>Screening</i>	58
2.4.9	Validierung der detektierten Protein-Protein-Interaktionen	59
2.4.9.1	Methode I: Transformation des isolierten Zielplasmids mit dem Ködervektor	59
2.4.9.1.1	<i>Aufreinigung der Plasmid-DNA isolierter Carbenicillin-resistenter Kolonien</i>	59
2.4.9.1.2	<i>Retransformation des Reporterstammes mit isoliertem Zielplasmid in Kombination mit pBT-NOD2</i>	59

2.4.9.1.3	<i>Retransformation des Reporterstammes mit aufgereinigtem Zielplasmid in Kombination mit dem pBT-Plasmid</i>	59
2.4.9.2	Methode II: Verifizierung der Protein-Protein-Interaktion über den β -Galaktosidase-Reporter	60
2.5	Biochemische Methoden	62
2.5.1	Herstellung von Gesamtproteinlysate aus Zellen	62
2.5.2	Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	62
2.5.3	Immobilisierung von Proteinen durch Elektrotransfer (Western Blot)	63
2.5.4	Immundetektion von Proteinen	64
2.5.5	Immunpräzipitation	65
2.5.6	Detektion von löslichen Proteinen – ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	66
2.5.6.1	ELISA zur Detektion von sezerniertem IL-8	66
2.6	Reportergen-Assay	67
2.7	Statistische Auswertung	68
3	Ergebnisse	
3.1	Detektion der NOD2-Expression	70
3.1.1	Detektion der NOD2 mRNA-Expression	70
3.1.1.1	NOD2 mRNA-Expression wird in intestinalen Zelllinien durch TNF- α -Stimulation verstärkt	70
3.1.1.2	NOD2 mRNA-Expression wird in intestinalen Zelllinien durch kombinierte TNF- α - und IFN- γ -Stimulation positiv reguliert	71
3.1.2	Detektion der NOD2-Proteinexpression	72
3.1.2.1	Gesteigerte NOD2-Proteinexpression in intestinalen Zelllinien durch TNF- α -Stimulation	72
3.2	Regulation der NOD2-Expression	73
3.2.1	Analyse potentieller κ B- und γ -Interferon-Aktivierungs- (GAS-) Bindestellen im NOD2-Promotor	73
3.3	Analyse der Rolle von NOD2 in intestinalen epithelialen Zellen	76
3.3.1	NOD2-Expression steigert MDP-induzierte IL-8-Sekretion in SW620-Zellen	76
3.4	Untersuchungen zu potentiellen Interaktionspartnern von NOD2	77
3.4.1	Two-Hybrid-Screening	77

3.4.1.1	Klonierung von NOD2wt in das Köderplasmid pBT	77
3.4.1.2	Vorversuche zur Verwendbarkeit der hergestellten pBT-Konstrukte und Transformationsmethodik	79
3.4.1.3	Genbank- <i>Screening</i>	80
3.4.2	Immunpräzipitations-Analysen von NOD2 und Emmprin	82
3.4.2.1	Emmprin interagiert mit NOD2 und SNP13	82
3.4.2.2	Emmprin interagiert mit den CARDS	83
3.4.2.3	Emmprin interagiert mit endogenem NOD2	84
3.4.2.4	Die CARD-Domänen binden an Emmprin	85
3.4.2.5	Die CARD-Domänen binden an den intrazellulären Teil von Emmprin	86
3.5	Untersuchungen der funktionellen Bedeutung der NOD2-Emmprin-Interaktion	88
3.5.1	Einfluss von Emmprin auf die NOD2-induzierte NF- κ B-Aktivierung	89
3.5.1.1	Dosis-Abhängigkeit des inhibierenden Effekts von Emmprin auf die NOD2-induzierte NF- κ B-Aktivierung	89
3.5.1.2	Inhibierender Effekt von Emmprin auf die NOD2-induzierte NF- κ B-Aktivierung in CHO-Zellen	91
3.5.1.3	Einfluss von Emmprin auf die NOD2-vermittelte NF- κ B-Aktivierung: Phosphorylierung von I κ B- α	92
3.6	Untersuchungen zur potentiellen Beteiligung von NOD2 und Emmprin an Mitogen-aktivierten Protein-Kinase-Signalwegen	93
3.6.1	Einfluss von NOD2 und Emmprin auf den Extrazellulär Signal-regulierten Kinase- (ERK-) Signalweg	94
3.6.1.1	Dosis-Abhängigkeit des inhibierenden Effekts von Emmprin auf die NOD2-vermittelte Elk-1-Aktivierung nach MDP-Stimulation	94
3.6.1.2	Inhibierender Effekt von Emmprin auf die NOD2-induzierte Elk-1-Aktivierung in CHO-Zellen	95
3.6.1.3	Einfluss von Emmprin auf die NOD2-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung	96
3.6.1.4	Hemmung der NOD2-vermittelten Elk-1-Aktivierung durch den MAP-Kinase-Inhibitor PD98059	97
3.6.2	Untersuchung der Beteiligung von NOD2 und Emmprin am c-Jun N-terminalen Kinase- (JNK1/2-) Signalweg	99
3.6.2.1	Emmprin hemmt die NOD2-vermittelte c-Jun-Aktivierung nach MDP-Stimulation	99

3.6.2.2	Einfluss von NOD2 auf die Phosphorylierung von c-Jun nach MDP-Stimulation	101
3.6.2.3	Emmprin hemmt die NOD2-vermittelte AP-1-Aktivierung nach MDP-Stimulation	102
4	Diskussion	
4.1	Ausgangsfragestellung	104
4.2	Expression und Regulation von NOD2 in intestinalen Epithelzellen	105
4.3	Die Rolle von NOD2 und angeborener Immunität für die Etiopathogenese des Morbus Crohn	107
4.4	Identifizierung neuer Interaktionspartner von NOD2: Emmprin	110
4.5	Beteiligung von NOD2 an MAP-Kinase-Signalwegen	114
4.6	MAP-Kinase-Signalwege in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	118
4.7	Ausblick	119
5	Zusammenfassung	120
6	Summary (engl.)	122
7	Literatur	124
	Anhang – verwendete Materialien	141
	Erklärung	149
	Danksagung	150

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A. bidest.	Aqua (bidestilliert)
Abb.	Abbildung
AC	Apoptose und/oder Caspase-Aktivierung
AD	Aktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APAF-1	apoptotic protease-activating factor-1
APS	Ammoniumpersulfat
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ASK-1	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATF-2	<i>activated transcription factor 2</i>
ATPase	Adenosintriphosphatase
<i>Bam</i> HI	Restriktionsendonuklease von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HI
BLS	<i>bare lymphocyte syndrome type II</i>
bp	Basenpaare
BIR	<i>baculovirusl inhibitory of apoptosis repeat</i>
BMK	<i>ERK5/big MAPK</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	Carboxy-
CTCK	Chloramphenicol-Tetracyclin-Carbenicillin-Kanamycin
ca.	circa
CIITA	<i>MHC class II transcription activator</i>
CARD	<i>Caspase activating and recruitment domain</i>
CATERPILLER	<i>CARD, transcription enhancer, R(purine)-binding , pyrin, lots of leucin rich repeats</i>
CAU	Christian-Albrechts-Universität
cDNA	<i>complementary DNA, "copy DNA"</i>
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CED-4	<i>C. elegans death protease</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cfu	<i>colony forming unit</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CHOP	<i>CREB homology protein</i>
CINCA	<i>chronic infantile neurologic cutaneous articular</i>
CIP	<i>calf intestinal phosphatase, alkalische Phosphatase</i>
CLAN	<i>caspase-associated recruitment domain, leucine-rich repeat, and NAIP CIIA HET-E, and TP1-containing protein</i>
CO ₂	Kohlendioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CREB	<i>cAMP responsive element-binding</i>
CU	Colitis ulcerosa
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
DAP	Diaminopimelinsäure

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	desoxyribonucleic acid
DNA-BD	DNA-Bindedomäne
Dnase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPC4	<i>deleted pancreatic cancer locus4</i>
<i>Dpn</i> I	Restriktionsenzym aus <i>Diplococcus pneumoniae</i> G41
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Glutaminsäure
EBD	<i>Effector-binding domain</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Eco</i> RI	Restriktionsendonuklease von <i>Escherichia coli</i> R1
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immuno-sorbent assay</i>
ELK-1	<i>Ets like gene 1</i>
ERK(s)	<i>extracellular signal-regulated kinase(s)</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
F	Phenylalanin
FCAS	<i>familial cold autoinflammatory syndrome</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FCU	<i>familial cold urticaria</i>
FLICE	<i>FADD-like interleukin-converting enzyme</i>
FLIP	<i>FLICE-like inhibitory protein</i>
fmol	femtomol (10^{-15} mol)
fs	<i>frameshift</i>
g	Gramm
G	Guanin
G, Gly	Glycin
GADD153	<i>growth-arrest DNA damage-inducible 153</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
gt	Ziege (Antikörperherkunft)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEK	<i>human embryo kidney</i>
HEPES	4-(2-Hydroxymethyl)Piperazin-1-Ethansulfonsäure
HET-E	<i>incompatibility locus protein from Podospora anserina</i>
<i>Hind</i> III	Restriktionendonuklease von <i>Haemophilus influenzae</i> III
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
I- κ B	<i>inhibitor of nuclear factor-κB</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
IBD	<i>Inflammatory bowel disease</i>
IFN	Interferon
IFX	Infliximab
IgG	Immunglobulin G
IKK	<i>I-κB kinase</i>

IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthases</i>
IP	Immunpräzipitation
IPAF	<i>ICE-protease activating factor</i>
JAK	<i>Janus-activated kinase</i>
JNK(s)	<i>c-Jun N-terminal kinase(s)</i>
Kana, K	Kanamycin
kb	kilobases (10^3 bp)
kDa	kilodalton (10^3 Da)
Kin.	Kinetik/Titration
<i>Kpn</i> I	Restriktionsendonuklease von <i>Klebsiella pneumoniae</i> I
Kost.	Kostimulation
l	Liter
L, Leu	Leuzin
LB	Luria Broth; Bakterienmedium
LPS	Lipopolysaccharide
LRD	<i>Ligand-recognition domain</i>
LRR	<i>leucin rich repeats</i>
Lsg	Lösung
M	molar (mol/l)
mA	Milliampere
MAPK(s)	<i>mitogen-activated protein kinase(s)</i>
MAP2K(s)	<i>mitogen-activated protein kinase kinase(s)</i>
MAP3K(s)	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase(s)</i>
MAPKAP2	<i>MAP kinase-activated protein kinase 2</i>
MC	Morbus Crohn
M. Crohn	Morbus Crohn
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDa	Megadalton
MDP	Muramyl-Dipeptid
MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i>
MEKK	<i>MAPK/ERK kinase kinase</i>
mg	milligramm (10^{-3} g)
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>multi-histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
MKK	<i>MAPK kinase</i>
ml	Milliliter
MLK	<i>Mixed lineage kinase</i>
<i>Mlu</i> I	Restriktionsendonuklease von <i>Micrococcus luteus</i> I
mM	millimolar (10^{-3} mol/l)
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
MNK-1	<i>MAP kinase-interacting kinase</i>
MnSOD	Mangan-abhängige Superoxiddismutase
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid, messenger-RNA</i>
ms	Maus (Antikörperherkunft)
MWS	Muckle-Wells Syndrom
µg	microgramm (10^{-6} g)

μl	Mikroliter
μM	mikromolar (10 ⁻⁶ mol/l)
N	Asparagin
N-	Amino-
NACHT	<u>N</u> AIP (<i>neuronal apoptosis inhibitory protein</i>), <u>C</u> IITA (<i>MHC class II transcription activator</i>), <u>H</u> ET-E (<i>incompatibility locus protein from Podospora anserina</i>) und <u>T</u> P1 (<i>telomerase-associated protein</i>)
N AIP	<i>neuronal apoptosis inhibitory protein</i>
NALP	<i>NACHT-, LRR-, and PYD-containing proteins</i>
NB-ARC	<i>nucleotide-binding adaptor shared by APAF-1, certain R gene products and CED-4</i>
NBD	<i>nucleotide binding domain</i>
NCBI	Nationales Zentrums für Biotechnologische Informationen
NEMO	<i>NFκB essential modulator</i>
neo	Neomycin-Resistenz
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
ng	nanogramm (10 ⁻⁹ g)
NIK	<i>NFκB-inducing kinase</i>
nm	Nanometer
NOD	<i>Nucleotide-binding and oligomerization domain</i>
NOMID	<i>neonatal-onset multi-system inflammatory disease</i>
<i>Not I</i>	Restriktionsendonuklease von <i>Nocardia otitidis-caviarum</i>
NTPase	Nukleotid-Tri-Phosphatase
o. a.	oben angegeben
OD	Optische Dichte
Oligo-dT	Oligo-desoxythymidin
<i>p</i>	<i>propability</i> (Wahrscheinlichkeit)
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
pBT	<i>pBait</i> , Köderplasmid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatpuffer
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PETG	Phenylethyl-β-D-thio-Galaktosid
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pg	picogramm (10 ⁻¹² g)
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PKC	Proteinkinase C
pmol	picomol (10 ⁻¹² mol)
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
PRR	<i>PAMP recognition receptor</i>
pTRG	<i>pTarget</i> , Zielvektor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PYD	Pyrin-Domäne
PYPAF	<i>PYRIN-containing Apaf-1-like protein</i>
Q	Glutamin
R, Arg	Arginin
RA	Rheumatoide Arthritis

rb	Kaninchen (Antikörperherkunft)
RE	Restriktionsenzym/-endonuklease
RFX	<i>regulatory factor X</i>
R-Gene	Resistenz-Gene
RH	<i>Rel-homology</i>
RICK	<i>RIP-like interacting caspase-like apoptosis-regulatory protein kinase</i>
RIP	<i>receptor interacting protein</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
R-Proteine	Resistenz-Proteine
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit cDNA als <i>Template</i> , im Anschluss an Reverse Transkription
s.	siehe
si	small interfering
<i>Sal I</i>	Restriktionsendonuklease von <i>Streptomyces albus I</i>
Sap-1a	<i>serum response factor accessory protein 1a</i>
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
Ser	Serin
SIGIRR	<i>single immunoglobulin IL-1R-related molecule</i>
SMA	<i>spinal muscular atrophy</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
sog.	sogenannt(e)/er/es)
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
t	Zeit
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAB1	TAK1-binding protein 1
TAK1	<i>TGFβ-activated kinase</i>
T _{anneal}	Annealingtemperatur
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCK	Tetracyclin-Carbenicillin-Kanamycin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TGF β	<i>transforming growth factorβ</i>
Thr	Threonin
TIR	<i>Toll/Interleukin 1 repeats</i>
TLR(s)	Toll-like Rezeptor(en)
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
TNFRSF	<i>TNF-Rezeptor-Superfamilie</i>
Tollip	<i>Toll-interacting protein</i>
TP 1	<i>telomerase-associated protein</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TTBS	<i>Tris-buffered saline</i> + 0,1 % Tween20

Tyr	Tyrosin
U	<i>units</i>
u. a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i>
W	Watt
W, Trp	Tryptophan
w/v	<i>weight/volume</i>
WB	Western Blot
WDR(s)	WD40 <i>repeat(s)</i>
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-D-Galactopyranosid
<i>Xho I</i>	Restriktionsendonuklease von <i>Xanthomonas holcicola I</i>
<i>Xma I</i>	<i>Xanthomonas malvacearum</i>
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Es wurden folgende Fachtermini aus dem englischen Sprachgebrauch verwendet, deren Übersetzung ins Deutsche schwierig und in der molekularbiologischen Literatur auch nicht üblich ist:

<i>annealing</i>	Anlagerung der <i>Primer</i> an einzelsträngige DNA aufgrund komplementärer Basenpaarung
<i>beads</i>	Agarosekügelchen zum Immobilisieren bestimmter Stoffe an ihrer Oberfläche, z.B. ProteinA/G für Immunpräzipitationen
<i>blot</i>	Experimenteller Aufbau zur Übertragung von DNA, RNA oder Proteinen auf eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran
<i>housekeeping gene</i>	Gen mit konstitutiver und zeitlich konstanter Expression, das zur Kontrolle bei semiquantitativen Expressionsanalysen benutzt wird
<i>insert</i>	„Eingesetztes, Eingefügtes“, Bezeichnung für das klonierte Genprodukt innerhalb eines Vektors
<i>kit</i>	kommerziell erhältliche Zusammenstellung aller Komponenten, die für eine Versuchsdurchführung benötigt werden
<i>missense mutation</i>	Mutation, die zu einer Aminosäure-Substitution führt
<i>mock</i>	engl. „nachgemacht“, „zum Schein“; im Zusammenhang mit Transfektionen: Benutzung des Transfektionsplasmids ohne Insert als Leer-Kontrolle
<i>multiple cloning site</i>	Region eines Plasmids mit Abfolge verschiedener Restriktionsschnittstellen zur Aufnahme von Insert-DNA
<i>nonsense mutation</i>	Mutation, die in einem trunkierten Protein resultiert
<i>plate</i>	Zellkulturschale
<i>primer</i>	Kurzes Oligonukleotid, komplementär zu DNA- oder RNA-Bereichen, dient zur gerichteten enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA- oder RNA-Abschnitte
<i>scaffold</i>	Gerüst, Bezeichnung für strukturell funktionelle Proteine, die eine Art Plattform für andere Proteine ausbilden
<i>screening</i>	Selektions-, Ausleseverfahren
<i>silencing</i>	Hemmung bzw. Stilllegung der Genexpression
<i>splicing</i>	Spleißen, miteinander verbinden, Ausdruck, der unterschiedliche Transkriptionsvarianten eines Gens bezeichnet

<i>stripping</i>	Entfernen der markierten Sonde bzw. der gebundenen Antikörper nach Detektion von Nukleinsäuren bzw. Proteinen
<i>tag</i>	Aminosäuremotiv zur Markierung eines rekombinanten Proteins
<i>target gene</i>	Zielgen eines Signaltransduktionsweges
<i>template</i>	DNA oder RNA, die als Ausgangssubstanz für die Amplifikation spezifischer Bereiche durch PCR benutzt wird
<i>well</i>	Reaktionstasche, -schale oder -napf

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Domänenstruktur der NOD-Proteine	5
Abb. 2:	<i>Induced proximity model</i> der NOD-Protein-Aktivierung	7
Abb. 3:	Gen- und Proteinstruktur von NOD2	8
Abb. 4:	Der klassische NF- κ B-Signalweg	19
Abb. 5:	Vereinfachte Übersicht über MAP-Kinase-Signalwege	22
Abb. 6:	Schema der <i>Nested-PCR</i> -basierten Amplifikation der Ziel-DNA	34
Abb. 7:	Schematische Übersicht über NOD2-Varianten, die im Two-Hybrid-System eingesetzt wurden	44
Abb. 8:	Verwendeter Vektor für NOD2-Promotor-Reportergenkonstrukte	46
Abb. 9:	Schematische Darstellung der NOD2-Domänen, die für Überexpressionsversuche eingesetzt wurden	47
Abb. 10:	Verwendete Plasmide im Two-Hybrid-System	53
Abb. 11:	Reportergenkassette des Reporterstammes	53
Abb. 12:	Schematisches Diagramm des Two-Hybrid Systems	54
Abb. 13:	Beispiel einer X-Gal-Indikatorplatte mit negativen (weißen) und positiven (blauen) Klonen	61
Abb. 14:	Detektion von NOD2 mRNA über RT-PCR I	70
Abb. 15:	Detektion von NOD2 mRNA über RT-PCR II	71
Abb. 16:	Synergistischer Effekt von IFN- γ auf TNF- α -induzierte NOD2 mRNA-Expression	72
Abb. 17:	Detektion von NOD2 in epithelialen Zelllinien über Western Blot-Analyse	73
Abb. 18:	Schematische Darstellung des pGL3B-NOD2(-1316)-Konstrukts mit der Lokalisation der drei potentiellen NF- κ B-Bindeelemente im NOD2-Promotor	74
Abb. 19:	Induzierbare Reportergen-Aktivierung des NOD2-Promotors	75
Abb. 20:	Gesteigerte Reportergen-Aktivierung des NOD2-Promotors durch veränderte κ B1- und GAS-Elemente	76
Abb. 21:	IL-8-Sekretion in NOD2-überexprimierenden SW620-Zellen nach MDP-Stimulation	77
Abb. 22:	Amplifizierung der kodierenden Sequenz für NOD2 aus pcDNA3.1-NOD2wt	78
Abb. 23:	Abschätzung der DNA-Konzentrationen	78
Abb. 24:	Testverdau zur Identifizierung positiver Klone	79
Abb. 25:	Nachweis der Interaktion zwischen Emmprin und NOD2 über Immunpräzipitation	82
Abb. 26:	Nachweis der Interaktion zwischen Emmprin und NOD2 sowie den CARs über Immunpräzipitation	84
Abb. 27:	Nachweis der Interaktion zwischen endogen exprimiertem NOD2 und Emmprin in THP-1-Zellen	85
Abb. 28:	Nachweis der Interaktion zwischen Emmprin und unterschiedlichen NOD2-Domänen über Immunpräzipitation	86
Abb. 29:	Nachweis der Interaktion zwischen dem intrazellulären Teil von Emmprin und unterschiedlichen NOD2-Domänen über Immunpräzipitation mit GFP-Antikörper	87
Abb. 30:	Nachweis der Interaktion zwischen dem intrazellulären Teil von Emmprin und unterschiedlichen NOD2-Domänen über Immunpräzipitation mit XPress-Antikörper	88

Abb. 31:	Nachweis der Emmprin-Expression in unterschiedlichen Zelllinien	89
Abb. 32:	Dosis-abhängige Hemmung der NOD2-induzierten NF- κ B-Aktivierung durch Emmprin	90
Abb. 33:	Reportergen-Assay zur Bestimmung der NF- κ B-Aktivierung in CHO-Zellen	92
Abb. 34:	Western Blot-Analyse zur Detektion von phosphoryliertem I κ B- α	93
Abb. 35:	Dosis-abhängige Hemmung der NOD2-induzierten Elk-1-Aktivierung durch Emmprin	95
Abb. 36:	Reportergen-Assay zur Bestimmung der Elk-1-Aktivierung in CHO-Zellen	96
Abb. 37:	Einfluss von Emmprin auf NOD2-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung	97
Abb. 38:	Die NOD2-vermittelte Elk-1-Aktivierung wird durch den MEKK1-Inhibitor PD98059 gehemmt	98
Abb. 39:	Reportergen-Assays zur Bestimmung der c-Jun-Aktivierung	100
Abb. 40:	Einfluss von Emmprin auf die NOD2-vermittelte c-Jun-Phosphorylierung	101
Abb. 41:	Reportergen-Assay zur Bestimmung der AP-1-Aktivierung	103
Abb. 42:	Hypothetischer Einfluss von Emmprin auf das NOD2-vermittelte Signalgeschehen	117

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Die humane NOD-Proteinfamilie	6
Tab. 2:	Krankheits-assoziierte NOD-Proteine	15
Tab. 3:	Zusammensetzung des Ansatzes für die Reverse Transkription	31
Tab. 4:	Zusammensetzung des RT-PCR-Reaktionsansatzes und entsprechendes PCR-Programm	32
Tab. 5:	Zusammensetzung des <i>Nested</i> -PCR-Reaktionsansatzes und entsprechendes PCR-Programm	35
Tab. 6:	Zusammensetzung des <i>Two-Step</i> -PCR-Reaktionsansatzes und entsprechendes PCR-Programm	35
Tab. 7:	Zusammensetzung des Klonierungs-PCR-Ansatzes mit <i>Ampli-Taq</i> [®] -Polymerase und entsprechendes PCR-Programm	36
Tab. 8:	Allgemeine Zusammensetzung eines Verdauens von DNA mit Restriktionsendonukleasen	38
Tab. 9:	Zusammensetzung eines Ligationsansatzes	39
Tab. 10:	Zusammensetzung der TA-Klonierungsreaktion	40
Tab. 11:	Primerdesign für die ortsgerichtete Mutagenese des NOD2(-1316)-Promotorabschnittes zur Erzeugung von NOD2($\Delta\kappa$ B1), NOD2($\Delta\kappa$ B2) und NOD2($\Delta\kappa$ B3)	43
Tab. 12:	Reaktionsansatz und PCR-Programm für die Mutagenese	43
Tab. 13:	Zusammenfassung der hergestellten Konstrukte für das Two-Hybrid-System	45
Tab. 14:	Zusammenfassung der durch Klonierung hergestellten pcDNA4-TOPO-HisMax-Konstrukte	48
Tab. 15:	Zusammenfassung der durch Klonierung hergestellten pEGFP- und pCEV-Konstrukte	48
Tab. 16:	Zusammensetzung der verschiedenen Transfektionsansätze in Abhängigkeit von der Art des nachfolgenden Experimentes	49
Tab. 17:	Darstellung der Transformationsansätze und erwarteten Ergebnisse im Two-Hybrid-Screen	58
Tab. 18:	Darstellung der Ergebnisse der X-Gal-Validierungs-Methode	61
Tab. 19:	Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamid-Gels	63

Tab. 20: Über Two-Hybrid-System identifizierte Interaktionspartner von NOD2-Varianten

81

1 Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind durch eine schubweise exazerbierende Entzündung der Darmschleimhaut gekennzeichnet. Aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes werden zwei wesentliche Krankheitsformen unterschieden. Während die Colitis ulcerosa (CU) durch eine kontinuierliche Entzündung des Dickdarms charakterisiert ist, kann beim Morbus Crohn (M. Crohn) die gesamte Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes betroffen sein. Hier bilden sich die Entzündungen diskontinuierlich segmental auch in tieferen Wandschichten mit häufigster Lokalisation im terminalen Ileum und proximalen Kolon aus. Weiterhin können bei der Erkrankungsform des M. Crohn Komplikationen, wie Stenosen und Fisteln, und extraintestinale Manifestationen, wie Arthritis und Uveitis, auftreten.

In westlichen Ländern hat diese Krankheit eine Verbreitung von 0,01-0,02 % (1 - 2 Fälle auf 10000 Einwohner), und tritt hauptsächlich im frühen Erwachsenenalter zwischen 20 und 30 Jahren auf. Insbesondere für M. Crohn konnte man frühzeitig eine familiäre Häufung feststellen, was auf eine genetische Disposition hindeutete (Adler, 1996).

1.1.1 Pathophysiologie und Genetik des Morbus Crohn

Genetische und zellbiologisch-immunologische Forschung haben gemeinsam in den letzten Jahren zu einem tieferen Verständnis der zugrundeliegenden Krankheitsmechanismen beigetragen. Eine zentrale Rolle in der immunologischen Erkenntnis der Pathophysiologie der chronischen intestinalen Entzündung spielt das Gleichgewicht zwischen pro-inflammatorischen (TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), Interleukine (IL-1 β , IL-6, IL-8) (Schreiber *et al.*, 1991; Parronchi *et al.*, 1997; Schreiber *et al.*, 1999) und anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-4, IL-10, IL-13) (Nielsen *et al.*, 1999; Nikolaus *et al.*, 1998; Rückert *et al.*, 1996). Dieses Gleichgewicht sorgt trotz persistierender bakterieller Besiedlung des Darmes für eine normale, entzündungsfreie intestinale Immunregulation. Bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist dieses Gleichgewicht durch ein Überwiegen der Sekretion und Transkription pro-entzündlicher Zytokine, wobei TNF- α eine besondere Rolle als pleiotropes Zytokin einnimmt, und die Aktivierung pro-inflammatorischer

intrazellulärer Signalkaskaden (z.B. NF- κ B (*nuclear factor- κ B*), JAK/STAT1 (*Janus activated kinase/signal transducers and activators of transcription*) und MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*)) gestört (Rogler *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 2002; Hommes *et al.*, 2002; Waetzig *et al.*, 2002). Gleichzeitig besteht eine verminderte Verfügbarkeit anti-inflammatorischer Zytokine (IL-4, IL-10, IL-13) (Schreiber *et al.*, 1995a; Schreiber *et al.*, 1995b; Kucharzik *et al.*, 1996). Aufgrund dieser Befunde sind neue Behandlungsverfahren wie der Einsatz des humanisierten Maus-Antikörpers Infliximab (IFX) zur Neutralisierung von TNF- α entwickelt worden (van Dullemen *et al.*, 1995; Targan *et al.*, 1997; Nikolaus *et al.*, 2000; Hanauer *et al.*, 2002). Andere Verfahren, z. B. der Einsatz von anti-Integrin Antikörpern (Lew *et al.*, 2003), MAP-Kinase-Inhibitoren (Hommes *et al.*, 2002) oder rekombinantem epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) zur beschleunigten Abheilung der intestinalen epithelialen Barriere (Sinha *et al.*, 2003), befinden sich derzeit in klinischer Prüfung.

Neuere Befunde deuten in diesem Zusammenhang auch auf die besondere Rolle der Interaktion zwischen intestinaler Flora und Darmepithel hin. Die Epithelzellschicht des Darmes bildet als eine der größten Oberflächen des menschlichen Körpers eine wichtige mechanische und immunologische Barriere gegen invasive Pathogene. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist die Barrierefunktion des intestinalen Epithels strukturell und funktionell gestört. Dieser Defekt ist wahrscheinlich nicht nur sekundärer Ausdruck mukosaler Entzündungsaktivität, sondern auch verbunden mit genetischer Prädisposition. Hinweise bieten Studien, die zeigen konnten, dass Verwandte von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine im Durchschnitt höhere intestinale Permeabilität gegenüber der Normalbevölkerung aufweisen (Irvine *et al.*, 2000). Bei Patienten selbst kann eine erhöhte Permeabilität häufig lange vor dem Auftreten der ersten Krankheitssymptome nachgewiesen werden (Wyatt *et al.*, 1993; Arnott *et al.*, 2000; Irvine *et al.*, 2000). Auch das vermehrte Auftreten intrazellulärer Bakterien in intestinalen Epithelzellen kann als Ausdruck einer Barrierestörung bei Patienten mit M. Crohn gewertet werden (Swidsinski *et al.*, 2002).

Über die eigentlichen Auslöser des chronisch-entzündlichen Geschehens ist aber weiterhin sehr wenig bekannt. Früh war die Existenz einer genetischen Komponente aufgrund von epidemiologischen Untersuchungen bei M. Crohn und Colitis ulcerosa offensichtlich. Sowohl die anatomische Erkrankungslokalisation, als auch der klinische Typ des M. Crohn sind häufig in den betroffenen Familien identisch. Eine frühe Manifestation des M. Crohn ist oft mit einem Befall des Ileum sowie mit einem schwereren Verlauf assoziiert.

Aus diesen Daten wird deutlich, dass die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Gruppe von polygenen – oder komplexen genetischen – Erkrankungen darstellen, bei der mehrere Krankheitsgene und Umweltfaktoren für eine Manifestation zusammenwirken müssen. Diese Wechselwirkung von Umwelt und genetischer Prädisposition wird auch aus den Daten der Zwillingsstudien deutlich: Das Erkrankungsrisiko des eineiigen Zwillings bei positiver Diagnose des anderen Zwillings liegt bei über 56 % im Gegensatz zu eines weniger als 4 %igen Risikos bei zweieiigen Zwillingspaaren. Dieser Konkordanzunterschied zwischen zwei- und eineiigen Zwillingen spiegelt somit deutlich den Einfluss von genetischen Faktoren wider; genetisch identische Individuen sind jedoch nicht zu 100 % konkordant für chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Dies zeigt, dass Umwelteinflüsse für die Krankheitsentstehung ebenfalls eine wichtige Rolle spielen.

Aufgrund konsistenter Kopplungsbefunde in einer Region auf Chromosom 16 konzentrierten sich diverse Arbeitsgruppen weltweit auf diesen Genort, der auch als IBD1 (*inflammatory bowel disease 1*) bezeichnet wurde. Anfang 2001 wurde NOD2/CARD15 als NF- κ B-aktivierendes Protein in Monozyten erstmals beschrieben (Ogura *et al.*, 2001a). Es zeigte sich, dass das für NOD2 kodierende Gen *CARD15* in der minimalen Kopplungsregion von IBD1 lag.

1.2 Die Familie der NOD-Proteine und ihre Rolle bei der Vermittlung angeborener Immunität

Die Erkennung und Abwehr eingedrungener Krankheitserreger durch das angeborene Immunsystem spielt eine entscheidende Rolle für das Überleben vielzelliger Organismen. Pflanzen und Tiere bedienen sich hierbei spezifischer Rezeptoren (*PAMP recognition receptors*, PRRs), die molekulare Muster unterschiedlicher Pathogene (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) erkennen können. Zu diesen Mustern gehören bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharide, Peptidoglycan und Lipoproteine, aber auch intrazelluläre Moleküle, z.B. CpG DNA (DNA, die unmethylierte CpG-Motive enthält und häufig im Genom von Bakterien und Viren, aber nicht in Vertebraten vorkommt).

Neben der gut charakterisierten Antwort auf extrazelluläre PAMPs, z. B. durch Rezeptoren der Toll-like Rezeptorfamilie (Akira *et al.*, 2001; Dunne *et al.*, 2003; Akira and Takeda, 2004) oder bestimmter membranständiger R-Proteine in Pflanzen (Dangl and Jones, 2001), wurde die Existenz auch intrazellulärer Mechanismen zur Erkennung eingedrungener Bakterien

vermutet (Philpott *et al.*, 2000). Mit der Identifizierung von NOD1 und NOD2 wurden erstmals zytosolische Proteine beschrieben, die aufgrund ihrer speziellen Struktur diese Aufgabe innerhalb von Zellen erfüllen können.

Die Familie der NOD-Proteine, die auch unter dem Namen CATERPILLER (CARD, transcription enhancer, R(purine)-binding, pyrin, lots of leuicin rich repeats) bekannt ist (Harton *et al.*, 2002, Ting and Davis, 2004), umfasst mittlerweile knapp 30 Mitglieder (s. Tab. 1). Die korrespondierenden Gene verteilen sich dabei auf 8 Chromosomen, wobei es allerdings zu einer Häufung von Genen auf den Chromosomen 11, 16 und 19 kommt (Inohara *et al.*, 2002; Inohara and Nunez, 2003; Inohara and Nunez, 2001; Tschopp *et al.*, 2003).

NOD-Proteine bilden eine Gruppe von intrazellulären Sensormolekülen mit heterogener Funktion. Gemeinsam ist ihnen die Fähigkeit, durch Oligomerisierung und Rekrutierung nachgeschalteter Signalproteine makromolekulare Effektorplattformen zu schaffen.

Ihre Struktur ist gekennzeichnet durch eine zentrale Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne (NOD), eine N-terminale Effektor-bindende Domäne (EBD (*effector binding domain*), z. B. CARD (*caspase recruitment domain*) oder PYD (*pyrin domain*)) und einer carboxyterminalen Region, der möglicherweise eine Ligandenerkennungsfunktion (LRD (*ligand recognition domain*), z.B. LRR (*leucin rich repeats*)) zukommt (s. Abb. 1).

Diese Leuzin-reiche-Region (LRR) weist eine strukturelle Homologie zu einer Gruppe von Genen, den R-Genen, auf, deren Produkte in Pflanzen eine Resistenz gegen spezifische Pathogene vermitteln. Werden intrazelluläre Pathogene durch R-Proteine erkannt, führt dies zu einer Stoffwechseländerung der betroffenen Pflanzenzelle und über die Einleitung einer Form des programmierten Zelltodes („Hypersensitivitätsreaktion“) zum Absterben der betroffenen Zellen und damit zur Limitierung der Infektion (Dangl and Jones, 2001).

Die aminoterminalen Region der NOD-Domäne enthält einen P-Loop, der auch in ATP/GTPasen gefunden wurde, und eine Mg²⁺-Bindestelle, die als Nukleotid-bindendes ARC-Motiv (NB-ARC) bestimmt werden konnte (van der Biezen and Jones, 1998). Dieses NB-ARC-Motiv vermittelt die Nukleotid-Bindung und ist für die Selbst-Oligomerisierung und Caspase-Aktivierung essentiell, was sowohl für den Apoptose-Protease aktivierenden Faktor 1 (APAF1), als auch für dessen Homolog des Nematoden *C. elegans* CED-4 beschrieben werden konnte (Hu *et al.*, 1998; Srinivasula *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Außerdem besitzt NB-ARC Sequenz-Homologie zur sog. NACHT-Domäne, die in der ATP/GTPase von NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*), CIITA (*MHC class II transcription activator*), HET-E (*incompatibility locus protein from Podospora anserina*) und

TP1 (*telomerase-associated protein*) vorkommen (Koonin and Aravind, 2000). Neuere Analysen einer größeren Anzahl von Proteinen in öffentlich zugänglichen Datenbanken deuten allerdings darauf hin, dass das NACHT- und NB-ARC-Motiv mit bioinformatischen Methoden nicht unterschieden werden kann (Inohara and Nunez, 2003).

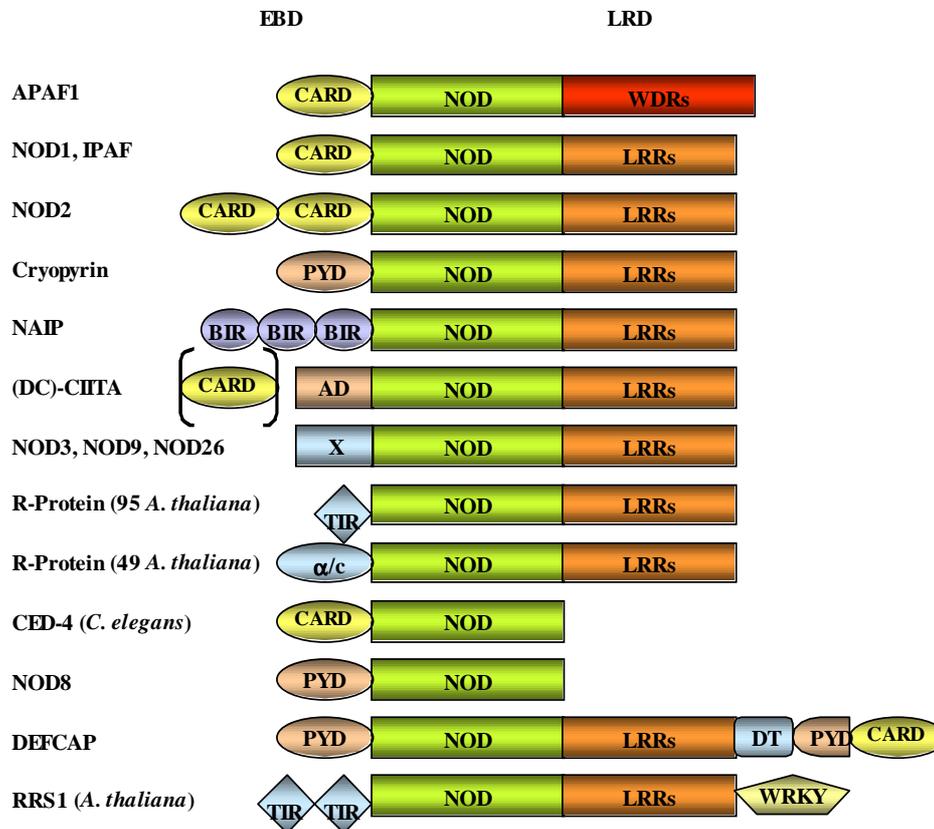


Abb. 1: Domänenstruktur der NOD-Proteine

Die meisten NOD-Proteine bestehen aus variablen aminoterminalen Effektor-Bindedomänen (EBDs), einer zentral gelegenen Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne (NOD), die die Selbst-Oligomerisierung vermittelt, und einer carboxyterminalen Liganden-Erkennungsdomäne (LRD). Die Anzahl der Leuzin-reichen *repeats* (LRRs) und der Toll/Interleukin-1-Rezeptordomänen (TIRs) variiert zwischen den einzelnen NOD-Proteinen. X = mutmaßliche EBDs von NOD3, NOD9 und NOD26, die keine Homologie zu bekannten Proteinen besitzen.

Abkürzungen: α/c = α-Helix/coiled-coil-reich, AD = Aktivierungsdomäne, APAF1 = Apoptose-Protease aktivierender Faktor 1, BIR = Baculovirus-Inhibitor-der-Apoptose-*repeats*, CARD = Caspase-aktivierende und rekrutierende Domäne, CIITA = MHC Klasse II-Transaktivator, DT = DEFCAP/TUCAN ausgedehnte Homologie-Domäne, IPAF = ICE-Protease aktivierender Faktor, NAIP = neuronales Apoptose-inhibierendes Protein, PYD = Pyrin-Domäne, WDRs = WD40 *repeats*. Verändert nach: Inohara and Nunez, 2003

Tab. 1: Die humane NOD-Proteinfamilie

Funktion und nachfolgende Effektoren wurden nur genannt, wenn mindestens zwei Publikationen vorlagen. AC = Apoptose und/oder Caspase-Aktivierung, AD = Aktivierungsdomäne, BIR = Baculovirus Inhibitor der Apoptose- *repeats*, CARD = Caspase-rekrutierende Domäne, EBD = Effektor-Binde-Domäne, LRD = Liganden-Erkennungsdomäne, LRR = Leuzin-reiche *repeats*, MDP = Muramyl-Dipeptid, NALP = *NACHT*-, *LRR*-, and *PYD-containing protein*, PYD = Pyrin-Domäne, WDRs = WD40-*repeats*. Nach: Inohara and Nunez, 2003; Verschiedene Autoren.

Protein	Synonym	Genort	EBD	Effektor	LRD	Ligand	Funktion
APAF1		12q23	CARD	Caspase-9	WDRs	Cytochrom c	aktiviert Caspase-9, induziert AC
NOD1	CARD4	7p14	CARD	RICK, Caspase1	LRRs	DAP = Diamino-pimelinsäure	aktiviert NF-κB, steigert AC
NOD2		16q12	2CARDs	RICK	LRRs	MDP, Peptidoglycan	aktiviert NF-κB, steigert AC
IPAF	CARD12, CLAN	2p22	CARD	(ASC, Caspase1)	LRRs		aktiviert NF-κB, steigert AC
Cryopyrin	PYPAF1, NALP3	1q44	PYD	(ASC)	LRRs		
PYPAF5	NALP6	11p15	PYD		LRRs		
NOD5	NALP14	11p15	PYD		LRRs		
PYPAF7	NALP12	19q13	PYD		LRRs		
MATER	NALP5	19q13	PYD		LRRs		
PAN2	PYPAF4, NALP4	19q13	PYD		LRRs		
NALP2	PYPAF2	19q13	PYD		LRRs		
PYPAF3	NALP7, NOD12	19q13	PYD		LRRs		
PYPAF6	NOD17, NALP11	19q13	PYD		LRRs		
NOD6	NALP9	19q13	PYD		LRRs		
NOD14	NALP13	19q13	PYD		LRRs		
NOD16	NALP8	19q13	PYD		LRRs		
NOD27		16q13	PYD		LRRs		
NOD8	NALP10	11q15	PYD		-		
NAIP		5q13	3 BIRs		LRRs		
CIITA		16q13	AD	(RFX5, CBF, NF-Y)	LRR		MHC-II-Coaktivator
DEFCAP	NALP1, CARD7, NAC	17p13.1	PYD, CARD		LRR		steigert AC
NOD3		16p13	X		LRR		
NOD9		11q23	X		LRR		

Erkenntnisse über die Funktionsweise dieser Moleküle liefern Studien zu APAF1, dem ersten identifizierten Protein der NOD-Familie (Zou *et al.*, 1997). Die carboxyterminale Liganden-Erkennungsdomäne von APAF1 besteht aus zahlreichen WD40 *repeats* (WDRs), welche Cytochrom *c* binden können, das aus geschädigten Mitochondrien im Verlauf des Apoptose-Geschehens freigesetzt wird. Die Bindung von Cytochrom *c* vermittelt die Oligomerisierung von APAF1-Molekülen und die nachfolgende Rekrutierung und Autoaktivierung von Procaspase-9 (Saleh *et al.*, 1999; Benedict *et al.*, 2000). Der entstandene Proteinkomplex wird als „Apoptosom“ bezeichnet. Eine ähnliche Komplexbildung findet sich auch beim „Inflammasom“, wobei hier sowohl das NOD-Protein NALP1/NAC/DEFCAP (NALP = *NACHT*-, *LRR*-, and *PYD-containing protein*) (Tschopp *et al.*, 2002), als auch NALP3/CIAS1/Cryopyrin (Manji *et al.*, 2002; Agostini *et al.*, 2004) mit ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*)/Pycard, Caspase-5 und/oder Caspase-1 interagiert und über die Aktivierung von Caspase-1 zur Prozessierung von pro-IL-1 β zu aktivem IL-1 β führt (Tschopp *et al.*, 2003). Die Rekrutierung der nachgeschalteten Moleküle durch Oligomerisierung erfolgt bei CARD- oder PYD-tragenden NOD-Proteinen über homophile CARD/CARD- oder PYD/PYD-Interaktionen. Dieser Vorgang wird auch als *induced proximity signalling* oder *induced proximity model* (s. Abb. 2) bezeichnet (Inohara and Nunez, 2001).

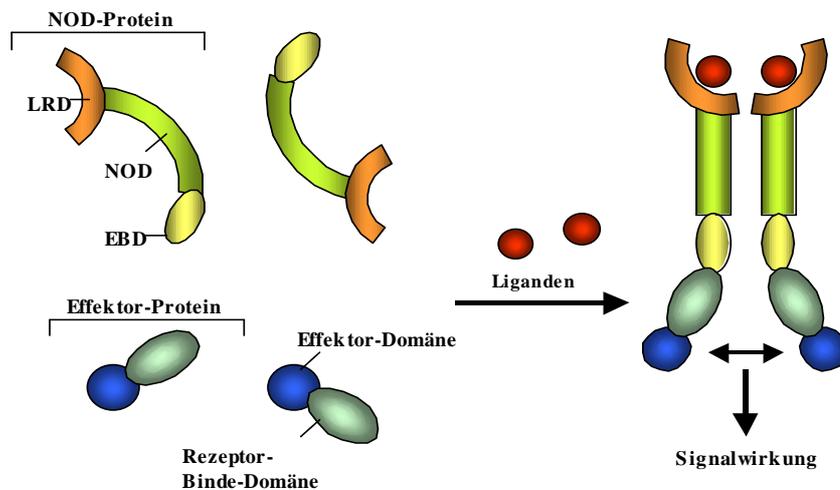


Abb. 2: *Induced proximity model* der NOD-Protein-Aktivierung

Exogene oder endogene Liganden werden durch die Liganden-Erkennungsdomäne (LRD) der NOD-Proteine erkannt, die dann durch Konformationsänderung die Selbst-Oligomerisierung über die NOD-Domäne erlaubt, die wiederum für die Induktion der Rekrutierung nachfolgender Effektormoleküle über die Effektor-Bindedomäne (EBD) essentiell ist. Nach: Inohara and Nunez, 2003

Die Aktivierung der NOD-Proteine unterliegt offenbar einer strengen funktionellen Kontrolle. So wird beispielsweise die NOD-Domäne des *C. elegans*-Homologs von APAF1 (CED-4) durch die Bindung des antiapoptischen Proteins CED-9 vor Selbstaktivierung geschützt (Yang *et al.*, 1998). In Abwesenheit von Cytochrom c verhindern die WDRs von APAF1 durch Bindung an die eigene NOD-Domäne eine unkontrollierte Oligomerisierung (Hu *et al.*, 1998). Bei den LRR-tragenden NOD-Proteinen sind die Mechanismen, die die Selbstaktivierung bzw. Oligomerisierung verhindern, noch unklar. Vermutet wird, dass die LRR in Abwesenheit bestimmter Stimuli mit der eigenen NOD-Domäne interagiert und so die Oligomerisierung sterisch verhindert wird (Albrecht *et al.*, 2003).

1.2.1 NOD2/CARD15

Die initiale Beschreibung von NOD2 in einem zellbiologischen Ansatz erfolgte über die Suche nach APAF1-homologen Molekülen. Das aus 12 Exons bestehende Gen kodiert für ein 116 kDa großes Protein mit 1040 Aminosäuren. N-terminal trägt das Protein als Effektorbindende Region zwei CARD-Domänen, der C-Terminus besteht aus 10 Tandem-Leuzinreichen Wiederholungen (s. Abb. 3). Northern Blot-Analysen zeigen eine starke konstitutive Expression in Monozyten (Ogura *et al.*, 2001a).

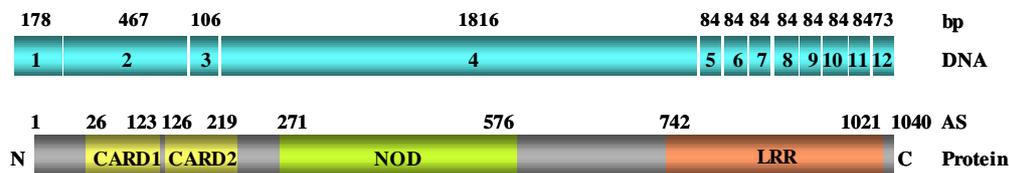


Abb. 3: Gen- und Proteinstruktur von NOD2

Das Gen von NOD2 umfasst 12 Exons mit insgesamt 3120 Basenpaaren und kodiert für ein 116 kD großes Protein mit 1040 Aminosäuren. N-terminal besitzt NOD2 zwei CARD-(Caspase aktivierende und rekrutierende-) Domänen, zentral liegt die NOD-(Nukleotidbindende-Oligomerisierungs-) Domäne und C-terminal die LRR-(*leucin-rich-repeats*) Region mit 10 Leuzin-reichen Wiederholungen. Abk.: bp = Basenpaare, AS = Aminosäuren.

Die NOD2-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B erfolgt bereits durch starke transiente Überexpression von NOD2 ohne Einsatz von Stimulantien (Ogura *et al.*, 2001a). In Ko-Immünpräzipitationsexperimenten wurde nachgewiesen, dass NOD2 mit der Kinase RICK/RIP2 (*RIP-like interacting caspase-like apoptosis-regulatory protein kinase/receptor interacting protein2*) interagiert (Ogura *et al.*, 2001a). Diese wiederum bindet den NEMO/IKK-Komplex (Inohara *et al.*, 2000) und stellt somit die Verbindung zwischen NOD2 und dem IKK-Komplex her, der für die Aktivierung von NF- κ B über die Phosphorylierung und Degradierung des endogenen NF- κ B-Inhibitors I κ B- α verantwortlich ist (DiDonato *et al.*, 1997). Mutationsanalysen zeigten, dass beide CARDS für die homophile Interaktion mit der CARD-Domäne von RICK/RIP2 notwendig sind und dass die komplette Deletion der LRR zu einer deutlichen Verstärkung der konstitutiven NF- κ B-Aktivierung führt (Ogura *et al.*, 2001a). In RICK/RIP2^{-/-}-Zellen konnte nur nach Rekonstitution der Zellen mit RICK/RIP2-Expressionsplasmiden über NOD2 NF- κ B aktiviert werden (Kobayashi *et al.*, 2002). Eine direkte pro-apoptotische Rolle von NOD2, wie sie z. B. für NOD1 über RICK/RIP2 nachgewiesen wurde, konnte nicht gezeigt werden.

Andere Befunde deuteten auf die postulierte intrazelluläre Sensorfunktion der LRR-Region von NOD2 für Bakterienbestandteile hin. Zellen, die aufgrund ihrer moderaten NOD2-Expression keine konstitutive NF- κ B-Aktivierung aufwiesen, zeigten dennoch eine starke Induktion der NF- κ B-Aktivität bei Stimulation mit kommerziellen LPS-Präparationen (Inohara *et al.*, 2001; Bonen *et al.*, 2003). Die partielle Deletion der LRR-Region konnte diesen Effekt unterbinden. In späteren Arbeiten konnte Muramyl-Dipeptid (MDP), ein Bestandteil des bakteriellen Peptidoglycans, als Ligand der LRR-Domäne von NOD2 identifiziert werden (Inohara *et al.*, 2003b; Girardin *et al.*, 2003a).

Weiterhin konnte das für NOD2 kodierende Gen *CARD15* in der minimalen Kopplungsregion von IBD1 auf Chromosom 16 (16q12) lokalisiert werden (Ogura *et al.*, 2001a). Dieser Befund lieferte den Anlass, NOD2 auf Mutationen, die mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert sein könnten, zu prüfen. Im Sommer 2001 publizierten drei Gruppen (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001b; Hampe *et al.*, 2001) innerhalb von vier Wochen unabhängig voneinander die Beschreibung von Mutationen in NOD2/CARD15 als auslösende Faktoren für den Morbus Crohn. Es konnten drei wesentliche Mutationen, bezeichnet mit SNP8, SNP12 und SNP13 (Hugot *et al.*, 2001), identifiziert werden, die für den Großteil des genetischen Risikos verantwortlich sind. Bei SNP8 und SNP12 handelt es sich um Aminosäuresubstitutionen (R702W, G908R), die die LRR-Region und deren

angrenzenden Bereich betreffen. Die Mutation SNP13 führt durch eine C-Insertion zu einer Leserasterverschiebung im letzten Leuzin-reichen Motiv der LRR-Region, die in einem verfrühten Stop-Kodon und dadurch verkürztem Protein resultiert (L1007fs).

Diese drei wesentlichen M. Crohn-assoziierten Mutationen zeigen alle eine verminderte Induzierbarkeit von NF- κ B nach Stimulation mit Bakterienwandbestandteilen bzw. MDP (Inohara *et al.*, 2001; Bonen *et al.*, 2003; Inohara *et al.*, 2003). Die jeweils unterschiedliche Stärke der Funktionseinbuße der individuellen Mutation ist hierbei mit dem Erkrankungsrisiko korreliert (Bonen *et al.*, 2003). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine einzelne Kopie eines mutierten Allels zu einem 2 – 4-fachen Risikos, M. Crohn zu entwickeln, führt und eine Homozygotie bzw. verbindende Heterozygotie der NOD2-Mutationen das Risiko um das 20 – 40-fache steigert (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001b; Hampe *et al.*, 2001). Die Beobachtungen, dass die Reaktion auf bakterielle Komponenten in M. Crohn-assoziierten NOD2-Varianten gestört ist, deutet darauf hin, dass ein Verlust der Bakterienerkennung sekundär zu einer verbreiteten NF- κ B-Aktivierung und der Entzündung des intestinalen Gewebes über einen NOD2-unabhängigen Mechanismus führt. Ein gestörter NOD2-Signalweg könnte möglicherweise auch zu einer defekten Induktion kostimulatorischer Signale für T-Zellen führen und somit in der Entwicklung entzündlicher Krankheiten resultieren. Der genaue pathophysiologische Mechanismus, wie die NOD2-Varianten zu einer chronisch intestinalen Entzündung führen, oder der Einfluss RICK/RIP2-unabhängiger Signaltransduktionswege ist allerdings weiterhin unklar.

Zusätzlich zu den mit M. Crohn verbundenen NOD2-Varianten konnten Aminosäuresubstitutionen (R334W, R334Q und L469F) innerhalb der kodierenden Region der NOD-Domäne von NOD2 mit der autosomalen, dominant vererbaren Krankheit Blau-Syndrom, die durch Arthritis, Uveitis und Psoriasis charakterisiert ist, assoziiert werden (Miceli-Richard *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002). Protein-Varianten von NOD2, die in Patienten mit Blau-Syndrom gefunden wurden, induzieren interessanterweise eine gesteigerte basale NF- κ B-Aktivierung als der Wildtyp (Chamaillard *et al.*, 2003).

Die Beteiligung von NOD2 an der Pathogenese unterschiedlicher mukokutaner Entzündungssyndrome deutet auf eine besondere Rolle dieses Proteins in der Regulation der angeborenen Immunabwehr epithelialer Grenzflächen hin.

1.2.2 Variabilität in anderen NOD-Familienmitgliedern verursacht Erkrankungen des Immunsystems

Genetische Variationen, die mit der Entwicklung von Krankheiten des Immunsystems assoziiert sind, konnten außer für NOD2 noch für drei weitere CATERPILLER- bzw. NOD-Familienmitglieder – CIITA, Cryopyrin und NAIP - beschrieben werden (s. Tab. 2, S. 15).

1.2.2.1 CIITA (*major histocompatibility complex (MHC) class II transactivator*)

CIITA fungiert als *Scaffold*-Protein für DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, die den MHC II-Promotor erkennen, z. B. NF-Y, RFX und CREB (Reith and Mach, 2001). Obwohl CIITA selbst nicht an die DNA bindet, agiert das Protein als potenter transkriptioneller Aktivator der Induktion der Gene, die für die Funktion Antigen-präsentierender Zellen von Bedeutung sind, wie MHC Klasse II, HLA-DM, MHC Klasse I und Plexin-A1 (Wright *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1997; Gobin *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2003). Außerdem koordiniert CIITA über eine Histon-Acetylase-Domäne innerhalb des N-Terminus die Rekrutierung des Histon-modifizierenden Enzyms (Raval *et al.*, 2001). Strukturell ist CIITA ein Mitglied der Familie der NTPasen oder der NACHT-Familie (Koonin and Aravind, 2000). N-terminal besitzt das Protein eine saure Domäne, die für die Transaktivierung benötigt wird (Riley *et al.*, 1995), und eine funktionell inaktive CARD-ähnliche Domäne (Nickerson *et al.*, 2001). Der mittlere Abschnitt beinhaltet die NACHT-Domäne mit einer geringen GTP-Bindungsaktivität, die für die Oligomerisierung und den nukleären Im- und Export essentiell ist (Chin *et al.*, 1997; Harton *et al.*, 1999). Die C-terminale Domäne besteht aus einer LRR-Region, die die Kerntranslokation und die Selbst-Assoziierung beeinflusst (Linhoff *et al.*, 2001).

Mutationen im *MHC2TA*-Gen, das für CIITA kodiert, führen zu einer Verminderung, bzw. einem vollständigem Verlust der MHC Klasse II-Genexpression und resultieren in einem genetischen Defekt, der mit dem *bare lymphocyte syndrome type II* (BLS), einer autosomalen rezessiven Immunerkrankung, assoziiert ist (Steimle *et al.*, 1993). Die beschriebenen Mutationen können in drei Gruppen unterteilt werden (Reith and Mach, 2001): *Spleiß*-Varianten innerhalb der LRR-Region (Steimle *et al.*, 1993), wie z. B. BLS2, eine Mutation, die die Kernlokalisierung beeinflusst (Cressman *et al.*, 1999), *Nonsense*-Mutationen, die in einem trunkeierten Protein resultieren (Brown *et al.*, 1996), und *Missense*-Mutationen, die

durch Aminosäure-Substitutionen zu verschiedenen Phänotypen führen (Quan *et al.*, 1999; Wiszniewski *et al.*, 2001).

1.2.2.2 *CIAS1/Cryopyrin/NALP3*

Ein weiteres Krankheits-assoziiertes Gen der CATERPILLER-Familie *CIAS1* konnte in Familienmitgliedern, die am Familiären Kälteurtikaria- (FCU (*familial cold urticaria*)) Syndrom oder am Muckle-Wells Syndrom (MWS) leiden, identifiziert werden (Hoffman *et al.*, 2001). Mutationen dieses Gens, auch beschrieben als PYPAF1 (Manji *et al.*, 2002) und NALP3 (Aganna *et al.*, 2002), sind außerdem mit NOMID (*neonatal-onset multi-system inflammatory disease*), bzw. dem CINCA (*chronic infantile neurologic cutaneous articular*)-Syndrom assoziiert (Feldmann *et al.*, 2002).

Die Aufklärung der Funktion des vom *CIAS1*-Gen kodierten Proteins Cryopyrin zeigte ein widersprüchliches Bild: Mit Hilfe eines Two-Hybrid-Systems konnte eine homophile Interaktion der N-terminalen Pyrin-Domäne von Cryopyrin mit der Pyrin-Domäne von ASC beschrieben werden. In Koexpressionsversuchen wurde eine signifikante NF- κ B-Aktivierung nachgewiesen, die über die alleinige Cryopyrin-Expression nicht erfolgte (Manji *et al.*, 2002). In einer weiteren Arbeit konnte der synergistische Effekt von Cryopyrin und ASC außer für die NF- κ B- auch für die Procaspase-1-Aktivierung gezeigt werden (Dowds *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu wurde beschrieben, dass Cryopyrin alleine die NF- κ B-Aktivierung und die Procaspase-1-vermittelte Prozessierung von Pro-IL-1- β zu aktivem IL-1- β reduziert und dass der inhibierende Effekt sowohl von der zentralen NOD-, als auch der C-terminalen LRR-Region, aber nicht von der Pyrin-Domäne abhängig ist (Stehlik *et al.*, 2003; O'Connor *et al.*, 2003).

Die autoinflammatorischen Krankheiten FCU/FCAS, MWS und NOMID/CINCA, mit denen Mutationen in *CIAS1* assoziiert sind, manifestieren sich in wiederkehrenden Folgen von Entzündungsanfällen, die mit Arthritis, Fieber und Nesselausschlag einhergehen (Kile and Rusk, 1940; Tindall *et al.*, 1969). Alle 27 Krankheits-assoziierten *missense*-Mutationen liegen innerhalb des zentralen NACHT-Exons (Neven *et al.*, 2004), einschließlich der häufigsten, R260W, die in allen drei Krankheiten beschrieben wurde und eine Analogie zur Blau-Syndrom-assoziierten Mutation R334Q in NOD2/CARD15 aufweisen könnte (Neven *et al.*, 2004). Zwei kürzlich erscheinende Studien lieferten eingehende Beweise, dass Varianten von Cryopyrin spontan pro-entzündliche Reaktionen auslösen (Agostini *et al.*, 2004; Dowds *et al.*,

2004). Expression der Mutationen R260W, D303N und E637G in monozytischen THP-1-Zellen, die endogen das ASC-Protein exprimieren, führte zu einer spontanen IL-1- β -Sekretion, wohingegen das Wildtyp-Protein trotz Anwesenheit von ASC die IL-1- β -Produktion nicht veränderte (Dowds *et al.*, 2004). Die verstärkte Funktion der Protein-Varianten korrelierte mit einer drastisch gesteigerten Assoziation dieser Proteine mit ASC (Dowds *et al.*, 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Cryopyrin ein Teil des Inflammasom-Komplexes ist und mit ASC, Caspase-1 und CARDINAL/CARD8 assoziiert vorliegt (Agostini *et al.*, 2004). Die Interaktion dieser Moleküle führt zur Aktivierung von Pro-IL-1- β , die in IL-1- β -Produktion resultiert. In der gleichen Arbeit wurde eine gesteigerte, spontane IL-1- β -Synthese in Monozyten, die von MWS-Patienten mit der R260W-Mutation stammten, gegenüber Wildtyp-exprimierender Zellen beschrieben (Agostini *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit den Beobachtungen, dass *CIAS1*-Mutationen zu spontaner Aktivierung inflammatorischer Signalwege, die pro-entzündliche Zytokine synthetisieren, führt, wohingegen die genaue Funktion des Wildtyp-Proteins noch unklar ist.

1.2.2.3 NAIP (*neuronal Apoptose-inhibierendes Protein*)

Als erstes Mitglied einer großen humanen Proteinfamilie, bezeichnet als IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*), konnte NAIP (*neuronal apoptosis inhibitor protein*) beschrieben werden (Liston *et al.*, 1996), dessen Expression hauptsächlich in motorischen Nervenzellen und Makrophagen und/oder inaktiven dendritischen Zellen erfolgt (Liston *et al.*, 1996; Matsunaga *et al.*, 2002). Die Mitglieder dieser Proteinfamilie sind durch eine N-terminale BIR- (*baculovirus IAP repeat*)-Domäne gekennzeichnet und können den programmierten Zelltod inhibieren (Roy *et al.*, 1995). Zusätzlich zur BIR-Domäne besitzt NAIP eine NBD-LRR-Region. Deletionen und trunke Varianten von NAIP sind genetisch mit der autosomal rezessiven Krankheit Spinale Muskelatrophie (SMA (*spinal muscular atrophy*)) assoziiert, die durch eine Atrophie der Rückenmuskulatur durch Dezimierung von motorischen Nervenzellen im Rückenmark und eine fortschreitende Neurodegeneration charakterisiert ist (Roy *et al.*, 1995). Aufgrund der anti-apoptotischen Wirkung von NAIP wurde angenommen, dass eine unkontrollierte Apoptose in motorischen Nervenzellen von SMA-Patienten verantwortlich für den exzessiven Zelltod ist, der zur Atrophie führt (Deveraux *et al.*, 1998). Mehrere Apoptose-Mechanismen konnten für NAIP beschrieben werden: Eine Annahme ist, dass NAIP die Hemmung von Caspasen induziert (Maier *et al.*, 2002; Deveraux *et al.*, 1998),

während eine andere Studie auf eine NAIP-vermittelte Anti-Apoptose über den TAK1/JNK1-Signalweg hindeutet (Sanna *et al.*, 2002). Letztlich konnte gezeigt werden, dass NAIP mit Hippocalin, einem Calcium-bindenden Protein, interagiert und somit die Calcium-induzierte Caspase-Aktivierung und den Zelltod in Nervenzellen inhibiert (Mercer *et al.*, 2000).

Die NAIP-Gene der Maus kodieren für eine Vielzahl von NAIP-Proteinen (NAIP1-7) (Growney and Dietrich, 2000). NAIP^{-/-}-Mäuse zeigen eine gesteigerte Apoptose in Reaktion auf eine Toxin-vermittelte Hirnverletzung (Holcik *et al.*, 2000), was auf eine Beteiligung von NAIP an Apoptose-Vorgängen in Nervenzellen hinweist. Außerdem konnte für *NAIP/BIR*-Gene eine Beteiligung an der Immunabwehr nachgewiesen werden. Maus-Makrophagen zeigten eine gesteigerte NAIP-Expression nach bakterieller Infektion, z. B. durch *Legionella pneumophila* (Diez *et al.*, 2000). *Legionella* ist ein gram-positives Bakterium, das im Menschen die Legionärskrankheit hervorruft. Mutationen in den zwei C-terminalen Exons des *NAIP5/Birc1e*-Gens sind mit einer gesteigerten Anfälligkeit für die Replikation von *Legionella pneumophila* assoziiert (Wright *et al.*, 2003; Diez *et al.*, 2003); allerdings konnte bisher keine Verbindung zwischen NAIP-induzierter Apoptose und der Resistenz gegen eine Legionellen-Infektion beschrieben werden. Die Rolle von NAIP, proinflammatorische Zytokine und Immunreaktionen in Makrophagen zu produzieren oder als Bakteriensensor zu fungieren, bedarf daher weiterer Untersuchungen.

1.2.2.4 CARD7/NALP1/DEFCAP

Das CARD7/NALP1/DEFCAP-Protein zeigt eine strukturelle Besonderheit innerhalb der NOD-Familie: Neben einer N-terminalen Pyrin-Domäne und einer zentralen NBD-LRR-Region besitzt CARD7 eine C-terminale CARD-Domäne (Martinon *et al.*, 2001; Bertin and DiStefano, 2000). Für das Protein konnte eine weit verbreitete Expression, vor allem in Immunzellen, nachgewiesen werden (Bertin and DiStefano, 2000). CARD7 interagiert mit Caspasen in Überexpressionsstudien und mit Apaf-1 über homotypische CARD-CARD-Bindung (Martinon *et al.*, 2002; Hlaing *et al.*, 2001). Überexprimiertes CARD7 steigert die APAF-1-induzierte Apoptose- und Caspase-Aktivierung, während die einzelne CARD- oder NBD-Domäne von CARD7 diese Induzierung behindert (Chu *et al.*, 2001).

CARD7/NALP1 konnte bisher zwar mit keiner genetischen Krankheit assoziiert werden, ist aber eine Komponente eines wichtigen, großen Proteinkomplexes: dem Inflammasom (Martinon *et al.*, 2002). Das Inflammasom ist ein Komplex bestehend aus Caspase-1/5, ASC

und CARD7, zusätzlich zu anderen Molekülen, wie z. B. Cryopyrin (Martinon *et al.*, 2002). Als Bestandteil dieses Komplexes und aufgrund der verbreiteten Expression in Immunzellen spielt somit auch CARD7 eine wichtige Rolle innerhalb der Immunreaktion.

Tab. 2: Krankheits-assoziierte NOD-Proteine

Aufgeführt sind die bisher identifizierten NOD-Proteine, deren Varianten mit genetisch bedingten Krankheiten assoziiert werden konnten. BLS II = *bare lymphocyte syndrome II*, CIITA = *MHC class II transactivator*, CINCA = *chronic infantile neurologic cutaneous articular syndrome*, FCU = *familiar cold urticaria*, MWS = *Muckle-Wells syndrome*, NOMID = *neonatal-onset multisystem inflammatory disease*, SMA = *Spinal muscular atrophy*. In Anlehnung an Chamailard *et al.*, 2003; Inohara and Nunez, 2003.

Protein	Gen	Genlokus	Genetisch-assoziierte Krankheiten	Vererbung	Vorhergesagter Defekt
NOD2	<i>CARD15</i>	16q12	M. Crohn Blau-Syndrom	rezessiv dominant	defekte Bakterien-Liganden-Erkennung konstitutive NF-κB-Aktivierung
CIITA	<i>MHC2TA</i>	16p13	BLSII	rezessiv	Verlust der MHCII-Expression aufgrund fehlender Kerntranslokation
Cryopyrin	<i>CIAS1</i>	1q44	FCU MWS NOMID (CINCA)	dominant dominant dominant	Liganden-unabhängige Aktivierung von NF-κB und Caspase-1, gesteigerte IL-1-β-Sekretion
NAIP NAIP5 (murin)	<i>Birc1</i> <i>Birc1e</i>	5q13	SMA <i>Legionella</i> -Infektion	rezessiv rezessiv	Defekt der Caspase-Inhibition fehlende Bakterien-Erkennung

Zusammengefasst übernimmt die NOD-Proteinfamilie eine wichtige Aufgabe in der Kontrolle von Entzündungsreaktionen und der Apoptose, und hat nicht nur einen großen Einfluss auf das Immunsystem und auf Immunzellen-reiche Gewebe und Organe, wie Haut, ZNS, Lunge und Gastrointestinaltrakt, sondern auch eine Funktion außerhalb der Immunzellen. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass diese Proteinfamilie ihren evolutionären Ursprung in Pflanzen hat und eine verwandte Genfamilie zu den R-Genen darstellt. Ihre Bedeutung zeigt sich zusätzlich in der Assoziation mit einer Störung in einer Vielzahl autoinflammatorischer, immunologischer und neurologischer Krankheiten. Da für diverse Familienmitglieder Interaktionen untereinander, bzw. mit anderen Proteinen beschrieben werden konnten, scheint ihr Einfluss auf Signaltransduktion und Pathogenerkennung entscheidend für die

Unterscheidung der verschiedensten Signale und der Verfeinerung der Immunreaktionen in Zellen zu sein. Es konnte z. B. gezeigt werden, dass NOD1 intrazelluläres LPS in epithelialen Zellen, die mit pathogenem *S. flexneri* infiziert wurden, detektiert und in Reaktion auf die bakterielle Invasion sowohl die NF- κ B-, als auch die JNK-Aktivierung vermittelt (Girardin *et al.*, 2001).

1.3 Der NF- κ B-Signalweg

Der NF- κ B-Signalweg ist Teil eines evolutionär konservierten Systems, das eine wichtige Rolle in der Regulation diverser Gene spielt, die mit der Entwicklung angeborener und adaptiver Reaktionen zur Erkennung und immunologischer Kontrolle pathogener Organismen assoziiert sind. Weiterhin reguliert NF- κ B zelluläre Prozesse, die für eine koordinierte Immunreaktion, wie Aufrechterhaltung der Homöostase, Entzündungsreaktionen, Zellproliferation und -Differenzierung, Überleben und Zelltod, essentiell sind.

Der Name dieser Proteinfamilie (*nuclear factor- κ B*) entstammt dem zuerst beschriebenen Einfluss der Transkriptionsfaktoren auf die Genregulation der κ -Kette von Immunglobulinen in B-Lymphozyten und wurde ursprünglich für das prototypische p50/p65 Heterodimer verwendet (Sen and Baltimore, 1986a, b). Die Bedeutung der gesamten Genfamilie spiegelt sich in den Beobachtungen der letzten Jahre wider, die eine Dysregulation des NF- κ B-Signalweges mit pathologischen Störungen von Hautentzündung, ähnlich der Incontinentia pigmenti, über Diabetes mellitus bis hin zu Krebs assoziieren (Ben-Neriah and Schmitz, 2004).

Aufgrund des strukturellen Aufbaus ihrer C-terminalen Domäne und der daraus resultierenden mechanistischen Konsequenzen, wird die NF- κ B-Familie in zwei Gruppen untergliedert: Die erste Gruppe umfasst NF- κ B1/p105 und NF- κ B2/p100, deren C-Terminus eine Domäne aus repetitiven Ankyrin-Wiederholungen beinhaltet, die für eine Selbstinhibition der Proteinfunktion verantwortlich ist. Durch limitierte Proteolyse bzw. alternative Translation werden aus diesen beiden Vorläufern aktive kleinere Proteine gebildet - und zwar p50 aus p105 und p52 aus p100 -, die die charakteristische N-terminale RH-(*Rel-homology*-) Domäne beinhalten (Lin and Ghosh, 1996; Karin and Ben-Neriah, 2000; Lin *et al.*, 2000). Die Mitglieder dieser Gruppe können alleine nicht als Transkriptionsaktivatoren wirken, sondern nur in Form eines Heterodimers mit Faktoren der zweiten Gruppe. Zu dieser gehören

RelA/p65, RelB und c-Rel. Sie sind gekennzeichnet durch ihre C-terminale Aktivierungsdomäne, die für ihre Funktionalität als Transkriptionsfaktoren essentiell ist (Baeuerle and Henkel, 1994; Siebenlist *et al.*, 1994).

Beide NF- κ B-Gruppen sind zur Bildung von Homo- und Heterodimeren fähig, die im Organismus ubiquitär exprimiert werden und als inaktiver zytosolischer Proteinkomplex, gebunden an Inhibitorproteine der I κ B-Klasse, vorliegen. Die I κ B-Proteine maskieren die nukleäre Lokalisationssequenz und die DNA-Bindungsdomäne des NF- κ B-Komplexes und sind so maßgeblich an der negativen Regulation des Signalgeschehens beteiligt (Baeuerle and Baltimore, 1996; Chen *et al.*, 1998; Ghosh *et al.*, 1995).

Zu den unterschiedlichen Aktivatoren des NF- κ B-Signalweges gehören neben Zytokinen, wie TNF- α und IL-1 β , hauptsächlich allgemeine Stressfaktoren (Pathogenbefall durch Bakterien und Viren, UV-Strahlung, oxidativer Stress, Chemikalien) (Li and Stark, 2002). Während die Rezeptoren für die TNF-Superfamilie-Liganden und für IL-1 β Peptidliganden erkennen, dienen die Proteine der Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und der NOD-Familie der zellulären Signalantwort auf molekulare Bestandteile von Bakterien und Viren. TLRs reagieren als PRRs (*pattern recognition receptors*) auf konservierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), wie z. B. Bestandteile der Bakterienzellwand, doppelsträngige RNA oder unmethylierte prokaryotische DNA in der nahen Umgebung der Zelle (Beutler, 2004; Pasare and Medzhitov, 2003), wohingegen die NOD-Proteine intrazelluläre Sensoren (zytosolische PRRs) für Pathogenbefall darstellen (Girardin *et al.*, 2003b; Inohara and Nunez, 2003).

Über diese vier Rezeptorklassen erfolgt gemäß des klassischen NF- κ B-Signalweges die Aktivierung des IKK-(I κ B-Kinase-) Signalosoms (Pahl, 1999). Dieser Proteinkomplex stellt eine Serin-Kinase aus drei monomeren Untereinheiten dar: IKK α und IKK β besitzen beide eine Kinaseaktivität, IKK γ = NEMO (*NF- κ B essential modulator*) ist eine regulatorische Untereinheit, die für die Interaktion mit vorgeschalteten Kinasen verantwortlich ist (DiDonato *et al.*, 1997; Yamaoka *et al.*, 1998). Als Aktivatoren von IKK konnten bisher mehrere Proteinkinasen, darunter die MAP3-Kinasen MEKK1, MEKK2 und MEKK3 sowie TAK1 und NIK identifiziert werden. Im Kontext der TNF- α -Signalgebung scheinen dabei NIK und MEKK3 die wichtigste Rolle zu spielen (Xiao *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001), während die TLRs über TAK1 (Irie *et al.*, 2000; Akira and Takeda, 2004) und NODs über RICK agieren (Ogura *et al.*, 2001a).

In der Abbildung 4 sind die verschiedenen Ebenen der Aktivierung von NF- κ B am Beispiel des p50/p65-Heterodimers dargestellt. Nach Aktivierung phosphoryliert IKK zwei konservierte Serin-Reste (S32 und S36) von I- κ B, was zu dessen Ubiquitinierung und zum Abbau über das Proteasom führt. Durch die Dissoziation von I- κ B wird das Kernlokalisations-Signal von NF- κ B (p50/p65) freigegeben, und es erfolgt eine Translokation in den Kern, wo nach Bindung an spezifische Konsensus-Sequenzen auf der DNA eine Aktivierung der Genexpression erfolgen kann (Karin and Ben-Neriah, 2000; Mercurio and Manning, 1999a, b; Read *et al.*, 2000). Ein zweiter Level der NF- κ B-Transkriptionskontrolle besteht in der Möglichkeit der Phosphorylierung von p65/RelA selbst und in der Interaktion mit Coaktivatoren wie CBP/p300 (Silverman and Maniatis, 2001; Zhong *et al.*, 1998). Über die Notwendigkeit und die Regulation dieses Vorgangs ist bisher relativ wenig bekannt.

Die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges kann auf zellulärer und physiologischer Ebene verschiedene Auswirkungen haben, die allgemeine Stressantworten, die Regulation des Immunsystems und die Feinjustierung von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen betreffen. Die unterschiedlichen Auswirkungen der NF- κ B-Aktivierung lassen sich im wesentlichen auf zwei Hauptfunktionen der regulierten Gene zurückführen:

Einerseits induziert NF- κ B eine Vielzahl *pro-inflammatorischer* Gene, die eine Rolle bei der Modulation der angeborenen und der adaptiven Immunantwort spielen (Li and Stark, 2002). Hierzu zählt vor allem die Kontrolle der Expression unterschiedlicher Immunmodulatoren (Interleukine wie IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF; Chemokine, Mediatoren) und ihrer Rezeptoren, wichtiger Enzyme (iNOS, MMP-9, COX-2) und Zelloberflächen-Adhäsionsmoleküle (E-Selektine) (Pahl, 1999).

Andererseits dient die Expression *anti-apoptotischer* Gene über NF- κ B als molekularer Gegenspieler des physiologischen Zelltods, da die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose inhibieren kann. Die wichtigsten Beispiele NF- κ B-abhängiger anti-apoptotischer Proteine sind FLIP_L, TRAF1, A20, MnSOD und Mitglieder der IAP- und der Bcl2-Genfamilien (Chawla-Sarkar *et al.*, 2004; Li *et al.*, 1998; Micheau *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 1997).

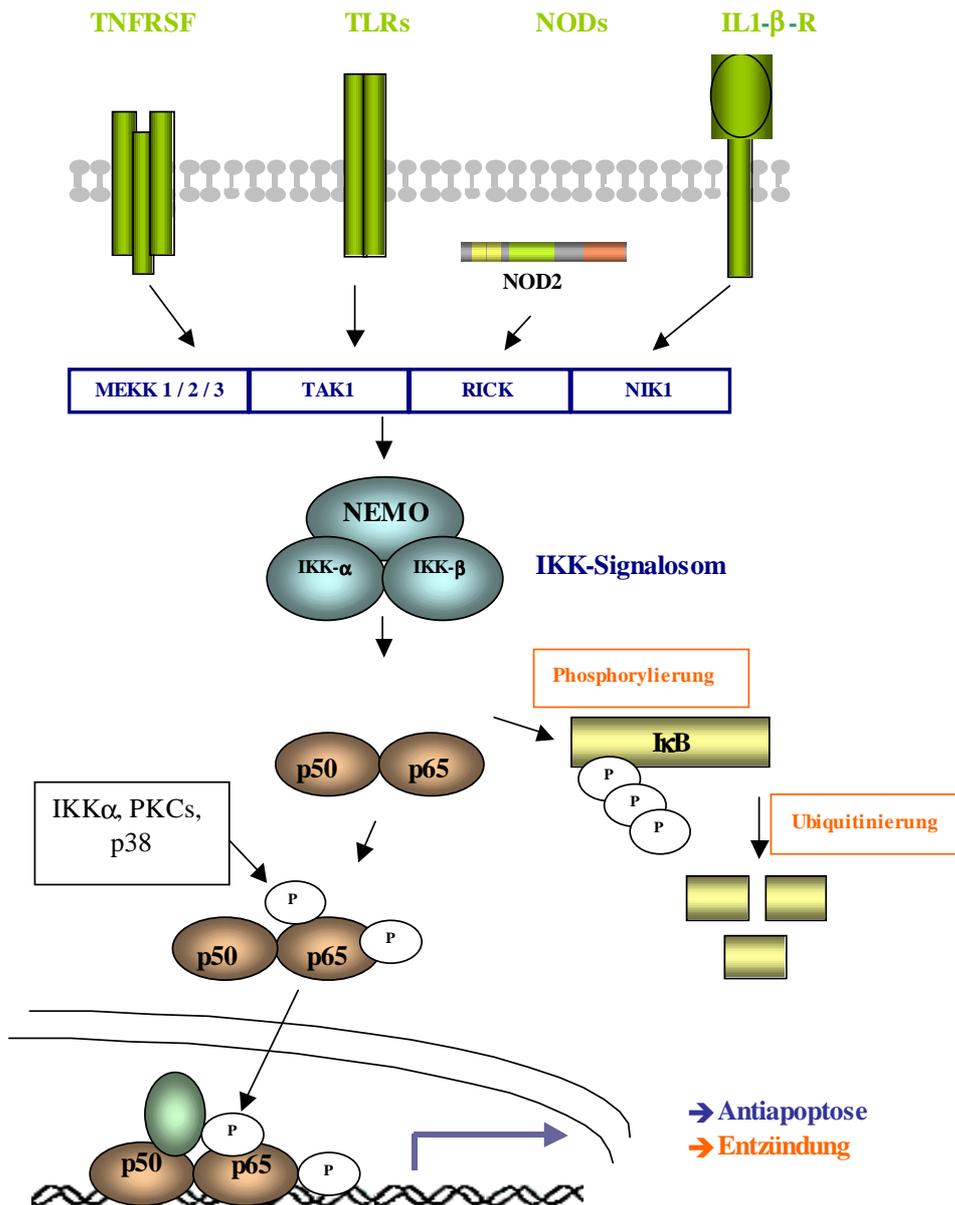


Abb. 4: Der klassische NF-κB-Signalweg

Nach Aktivierung des IKK-Signalosoms wird IκB phosphoryliert, ubiquitiniert und über Proteasomen abgebaut. Dies führt zur Freisetzung von NFκB (p50/p65), wobei die p65-Untereinheit durch verschiedene Proteinkinasen modifiziert werden kann. Nach Translokation in den Kern und Assoziation mit Co-Aktivatoren wird die Genexpression initiiert. Abkürzungen: TNFRSF = TNF-Rezeptor-Superfamilie, TLRs = Toll-like-Rezeptoren, IL-1βR = Interleukin-1β-Rezeptor, MEKK = MAP3-Kinase, IKK = IκB-Kinase, TAK1 = Transforming growth factor β-activated kinase1, NIK1 = NF-κB-inducing kinase, NEMO = NFκB essential modulator, IκB = Inhibitor von NF-κB, P = Phosphat, PKC = Proteinkinase C.

1.4 Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAP-Kinase)-Signalwege

Die Entscheidung einer Zelle, zu sterben oder zu überleben, wird außer über den NF- κ B-Signalweg über ein breites Spektrum von Signaltransduktionskaskaden, die hauptsächlich von Protein-Kinasen kontrolliert werden, koordiniert. Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Signalwege sind innerhalb der Eukaryoten stark konserviert und haben Einfluss auf verschiedenste zelluläre Prozesse, wie z. B. Proliferation, Überleben, programmiertem Zelltod, Initiierung und Verbreitung von Entzündungsprozessen und Zellzyklus-Regulation (Widmann *et al.*, 1999; Kyriakis and Avruch, 2001; Meskiane and Hirt, 2000; Tibbles and Woodgett, 1999; Chang and Karin, 2001).

Vier Hauptgruppen von MAP-Kinasen wurden bisher in mammalischen Zellen identifiziert: die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen (ERKs = *extracellular signal-regulated kinases*), die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNKs = *c-Jun N-terminal kinases*) oder Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPKs = *stress-activated protein kinases*), die p38 MAP-Kinasen und ERK5/großen MAP-Kinasen (BMK = *ERK5/big MAPK*) (Widmann *et al.*, 1999; Kyriakis and Avruch, 2001; Chang and Karin, 2001; Robinson and Cobb, 1997). Allen eukaryotischen Zellen ist eine gewaltige Diversität der MAP-Kinase-Signaltransduktionskaskaden gemeinsam. Jede einzelne wird bevorzugt durch verschiedenste Arten von Stimuli aktiviert und ermöglicht somit der Zelle, koordiniert auf die Fülle diverser Einflüsse zu reagieren. Die MAP-Kinase-Signalwege werden über verschiedene Rezeptorfamilien wie Tyrosin (Tyr)- oder Serin/Threonin (Ser/Thr)-Kinase-Rezeptoren, Zytokin-Rezeptoren oder GTP-Bindeprotein (G-Protein)-gekoppelte Siebentransmembran-Rezeptoren (GPCRs) aktiviert. Hierauf koordinieren die MAPK-Signalwege die Aktivierung von Gentranskription und -expression, Proteinsynthese, Zellzyklus-Maschinerie, Zelldifferenzierung und Zelltod, wodurch ein profunder Effekt auf die Zellphysiologie ausgeübt wird (Widmann *et al.*, 1999; Kyriakis and Avruch, 2001) (s. Abb. 5).

Die Aktivierung der MAP-Kinasen erfolgt über ein dreistufiges hierarchisches System aus Protein-Phosphorylierungsprozessen, der sog. MAP-Kinase-Kaskade, bestehend aus MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K oder MEKK), MAP-Kinase-Kinase (MAP2K/MKK oder MEK) und MAP-Kinase (MAPK) (Widmann *et al.*, 1999):

Die Threonin/Tyrosin-Phosphorylierung innerhalb eines konservierten Motivs in der Kinasedomäne der MAP-Kinasen wird durch eine Familie der dual-spezifischen Kinasen, den MAP-Kinase-Kinasen (MAP2Ks/MKKs) oder MAP-Kinase/ERK-Kinasen (MEKs) katalysiert. Die MAP-Kinase-Kinasen-Aktivierung wiederum erfolgt durch Serin/Threonin-

Phosphorylierung durch eine von mehreren Proteinkinase-Familien, die zusammenfassend als MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MAP3Ks) bezeichnet werden.

Interessanterweise wurde kürzlich beschrieben, dass Stimulus-spezifische Autophosphorylierung und Aktivierung von p38 α durch die Interaktion mit dem Bindeprotein TAB1 induziert wird (Ge *et al.*, 2002). Diese Beobachtung widerlegt die ursprüngliche Annahme, dass MAP-Kinasen nur über vorgeschaltete MAP2-Kinasen aktiviert werden können.

Neben dem Mechanismus der Signaltransduktion teilen MAP-Kinase-Signalwege weitere gemeinsame Prinzipien:

- (i) Die Organisation der MAP-Kinase-Signalwege wird durch *scaffold*- (Gerüst-) Proteine vermittelt (Chang and Karin, 2001; Pawson and Scott, 1997). In einigen MAP-Kinase-Signalwegen besitzen deren Komponenten selbst wesentliche Eigenschaften der *scaffold*-Proteine (Kyriakis and Avruch, 2001; Chang and Karin, 2001).
- (ii) Individuelle Elemente der MAP-Kinase-Signalwege können sowohl in mehreren Signalwegen funktionieren, als auch Subjekt der Regulation vielfacher Einflüsse sein, die zu einem komplizierten Netzwerk von Wechselwirkungen der Signalwege-Komponenten führen.
- (iii) MAP-Kinasen können indirekt die Expression von Liganden und Inhibitoren der Zelloberflächenrezeptoren, die die MAP-Kinase-Kaskaden speisen, regulieren (Wasserman and Freeman, 1998).
- (iv) MAP3-Kinasen, z. B. Raf1, werden in drei aufeinanderfolgenden Schritten, Membranrekrutierung, Oligomerisierung und Phosphorylierung, reguliert. (Marshall, 1995; King *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1996). Stress-regulierte MAP3-Kinasen werden wahrscheinlich ähnlich reguliert (Kyriakis and Avruch, 2001).
- (v) Alle MAP-Kinasen können nach Translokation in den Kern spezifische Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und aktivieren (Widmann *et al.*, 1999; Kyriakis and Avruch, 2001; Chang and Karin, 2001; Robinson and Cobb, 1997). Diese Faktoren induzieren die Transkription vieler früh-regulierter Gene (*immediate early genes*), die in Zell-Aktivierung, Proliferation und Transformation involviert sind. Eine Vielzahl zytoplasmatischer MAP-Kinase-Zielproteine sind bereits identifiziert (s. Abb. 5).

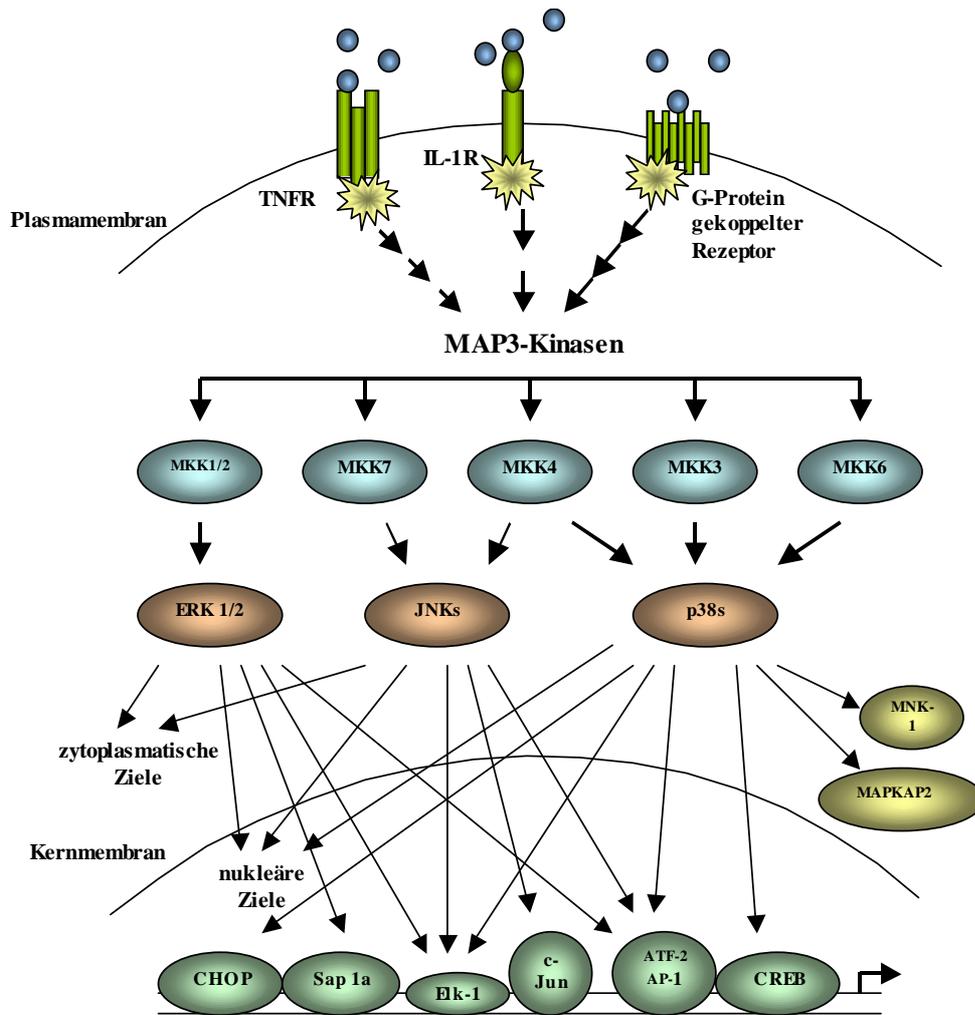


Abb. 5: Vereinfachte Übersicht über MAP-Kinase-Signalwege

Das Kernmodell Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK)-Signalwege ist in sämtlichen eukaryotischen Zellen konserviert. Es beinhaltet drei Kinasen - MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3-Kinase), MAP-Kinase-Kinase (MAP2-Kinase) und MAP-Kinase -, die einen sequentiell aktivierten Signalweg etablieren. Abhängig von der exakten Komposition der Stimuli, kann eine Kombination verschiedener MAP-Kinase-Signalwege unter entzündlichen Bedingungen aktiviert werden. Kreuzwirkungen mit anderen Signaltransduktionskaskaden, wie dem NF- κ B (nuclear factor- κ B)- oder JAK/STAT (Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription)- Signalweg, führen zu einem komplexen Netzwerk von Signalwegen. Viele MAP-Kinase-Ziele können über mehr als einen Signalweg aktiviert werden. Dargestellt ist nur eine Auswahl von MAP-Kinase-Substraten. Abkürzungen: AP-1 = Aktivator-Protein-1, ATF-2 = Aktivierender Transkriptionsfaktor-2, CHOP = CREB-homologes Protein, CREB = *cAMP response element*- bindendes Protein, Elk-1 = *Ets-like* Gen-1, ERK1/2 = extrazellulär Signal-regulierte Kinase-1/-2, IL-1R = Interleukin-1 Rezeptor, JNKs = c-Jun N-terminale Kinasen, MAPKAP-2 = MAP-Kinase-aktivierende Proteinkinase-2, MKK = MAP-Kinase-Kinase, MNK-1 = MAP-Kinase-interagierende Kinase-1, Sap1a = *serum response factor accessory protein 1a*. Die kürzlich beschriebene Gruppe der „big ERKs“ ist hier nicht dargestellt. Verändert nach Waetzig, 2002.

Wie zuvor erwähnt kooperieren alle MAP-Kinase-Kaskaden in der Initiierung und Verbreitung von Entzündungsprozessen. In mehreren Arbeiten wurden umfassende Quervernetzungen zwischen Mitgliedern der MAP-Kinase-Signalwege und anderer entzündlicher Signaltransduktionskaskaden – wie dem NF- κ B- und dem JAK/STAT- (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) Signalweg – beschrieben (Kyriakis and Avruch, 2001; Tibbles and Woodgett, 1999; Tang *et al.*, 2001; Saccani *et al.*, 2002; Haq *et al.*, 1999).

Akute entzündliche Reaktionen durch Gewebe-Makrophagen können durch bakterielle Produkte, wie Lipopolysaccharid oder Peptidoglycan, ausgelöst werden. LPS-bindende Proteinkomplexe aktivieren ERK1/2, JNKs und p38 über CD14- (Hambleton *et al.*, 1996; Sanghera *et al.*, 1996) und Toll-like- (Rao, 2001) Oberflächenrezeptoren. Die gleichen Signalwege werden ebenfalls von phagozytierten Bakterien gebunden an Immunglobulin G (IgG) über den Fc γ -Rezeptor auf Makrophagen aktiviert, und diese Aktivierung führt zur Produktion von TNF- α (Rose *et al.*, 1997). Makrophagen ihrerseits antworten auf TNF- α mit der Aktivierung von JNKs (besonders die p46-Isoform) und p38 (Chan *et al.*, 1997; Winston *et al.*, 1997) und initiieren somit eine positive Rückkopplung. Weiterhin konnte eine starke Aktivierung der p38 MAP-Kinase in Makrophagen und Neutrophilen in entzündetem Gewebe von M. Crohn-Patienten nachgewiesen werden (Waetzig *et al.*, 2002).

Die Aktivierung der MAP-Kinasen in Reaktion auf pathogene Stimuli in Immunzellen und die folgende Induzierung von Entzündungsprozessen deutet auf eine wichtige Rolle der MAP-Kinasen im Zusammenhang mit der angeborenen Immunität hin.

1.4.1 p38 MAP-Kinasen

Die mammalische p38-Kinase-Familie besteht aus vier homologen Proteinen: p38 α (Lee *et al.*, 1994; Rouse *et al.*, 1994), p38 β (Jiang *et al.*, 1996; Stein *et al.*, 1997), p38 γ (Li *et al.*, 1996; Lechner, *et al.*, 1996) und p38 δ (Wang *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1997). Die p38-Homologe werden auf verschiedenen Ebenen in humanem Gewebe exprimiert und können über unterschiedliche, manchmal überlagernde Stressstimuli (UV-Strahlung, osmotischer Schock, Hitzeschock, LPS, Proteinsynthese-Inhibitoren), bestimmte Zytokine (IL-1, TNF- α) und GPCRs aktiviert werden (Widmann *et al.*, 1999; Whitmarsh and Davis, 1996). Die Phosphorylierung aller p38-Kinasen kann über MKK6 und mit Ausnahme von p38 β über

MKK3 erfolgen (Keesler *et al.*, 1998; Enslen *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 1997). Die MAP2-Kinasen wiederum werden von MAP3-Kinasen aktiviert, die auch JNK-MAP2-Kinasen phosphorylieren (ASK1, MEKK1-4, MLKs und TAK1). Weiterhin phosphorylieren alle p38-Kinasen die Transkriptionsfaktoren ATF-2, Sap-1a und GADD153 (Wang and Ron, 1996). Extrazelluläre Stimuli, wie Zytokine, und verschiedene Pathogen-assoziierte Muster, wie LPS, Peptidoglycan und Enterotoxine, aktivieren p38 über diverse Toll-like-Rezeptoren (z. B. TLR9 und TLR3) (Doyle *et al.* 2004) Die zelluläre Reaktion auf die Aktivierung von p38 verdeutlicht sich hauptsächlich in der Produktion und Aktivierung inflammatorischer Mediatoren, die die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten initiieren (Read *et al.*, 1997). Somit spielt p38 vermutlich eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunabwehr, was sich auch in der Beteiligung von p38 in Entzündungskrankheiten widerspiegelt (Waetzig *et al.*, 2002)

1.4.2 c-Jun N-terminale Kinasen (JNKs)

Die JNK-Familie der MAP-Kinasen besteht aus JNK1 und JNK2, deren Vorkommen stark verbreitet ist, und JNK3, welche vornehmlich in Herz, Gehirn und Hoden exprimiert wird (Widmann *et al.*, 1999, Ip and Davis, 1998; Davis, 2000; Yang *et al.*, 1997).

JNKs werden über die MAP2-Kinasen MKK4 und MKK7 aktiviert, welche ihrerseits von MAP3-Kinasen, wie ASK1, MEKK1-4, MLKs, TAK1 und Tpl-2 aktiviert werden. Ziele der JNKs sind hauptsächlich Transkriptionsfaktoren, wie z. B. c-Jun, ATF-2, Elk-1, p53, DPC4 und NFAT4 (Widmann *et al.*, 1999).

Aktiviert werden JNKs, wenn Zellen einer Vielzahl von Stimuli, wie extrazellulären Matrixfaktoren, Wachstumsfaktoren, Hormonen, Zytokinen oder umweltbedingten Stresssignalen, wie Hitzeschock, osmotischem Ungleichgewicht, Endotoxinen, verschiedenen Chemikalien und direkter Zerstörung der DNA durch ionisierende Strahlung, ausgesetzt werden (Davis, 2000). In allen Fällen rekrutieren die Stimuli, die auf p38-Kinasen einwirken, auch JNKs (Kyriakis and Avruch, 2001; Kyriakis and Avruch, 1996). Der JNK-Signalweg ist wie p38 in vielen pathologischen Gegebenheiten, wie Krebs, Herzinfarkt und Entzündungskrankheiten, involviert. JNK2 spielt z. B. eine wichtige Rolle in der TH1-Zell-Differenzierung und Produktion von Zytokinen (Yang *et al.*, 1998). In epithelialen Zellen konnte eine NOD1-vermittelte JNK-Aktivierung in Reaktion auf LPS des pathogenen

Bakteriums *S. flexneri* nachgewiesen werden (Girardin *et al.*, 2001), was auf eine Beteiligung in der angeborenen Immunabwehr schließen lässt.

1.4.3 Extrazellulär Signal-regulierte Kinasen (ERKs)

Der Terminus „ERKs“ verweist auf eine sehr heterogene Gruppe innerhalb der MAP-Kinasen, die die ERK1/2, ERK3/4 und ERK5/BMK-Unterfamilien umfasst (Widmann *et al.*, 1999; Kyriakis and Avruch, 2001; Robinson and Cobb, 1997). ERK1 (44 kDa) und ERK2 (42 kDa), die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, werden meist koordiniert reguliert. Der ERK1/2-Signalweg wird durch Ligation vieler Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, z. B. Rezeptoren für die Wachstumsfaktoren EGF und PDGF, aktiviert (Widmann *et al.*, 1999). Eine zweite Gruppe von Rezeptoren, die ERK1/2 aktivieren, beinhalten einige Zytokin-Rezeptoren (z. B. der IL-6 Rezeptor), der T-Zell-Rezeptor, CD 28 und der B-Zell-Rezeptor. GPCRs und gruppenbildende Integrine können ebenfalls den ERK1/2-Signalweg in Anspruch nehmen. MAP3-Kinasen der Raf-Familie, Mos, MEKK1-3 und Tpl-2 aktivieren die MAP2-Kinasen MEK1 und MEK2, welche ihrerseits ERK1/2 aktivieren (Widmann *et al.*, 1999).

Gesteigerte ERK1/2-Phosphorylierung führt zur Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren, z. B. die Aktivatorprotein-1- (AP-1-) Komponenten c-Fos und c-Jun, ebenso wie Elk-1, Ets-1, Sap1a, c-Myc und einige STATs (Widmann *et al.*, 1999, Whitmarsh and Davis, 1996).

Auch in Entzündungsreaktionen zeigt sich die Vielseitigkeit des ERK1/2-Signalweges: ERK1/2 aktiviert Phospholipase A₂ (Lin *et al.*, 1993). Dieses Enzym katalysiert die Freisetzung von Arachidonsäure, welche die Biosynthese von Eicosanoiden (z. B. Prostaglandinen und Leukotrienen) limitiert. Außerdem wird die T-Zell-vermittelte Apoptose durch ERK1/2 beeinflusst (Holmström *et al.*, 2000). Die Aktivierung von primären und Jurkat T-Zellen durch den T-Zell-Rezeptor unterdrückt unmittelbar CD95/Fas-vermittelte Apoptose der T-Zellen über den ERK1/2-Signalweg (Holmström *et al.*, 2000). In ERK1/2-defizienten Mäusen konnte eine defekte Thymozyten-Reifung und eine reduzierte Expression der α - und β -Kette des T-Zell-Rezeptors nachgewiesen werden (Bettini *et al.*, 2002), was auf eine wichtige Rolle der ERK1/2-Kinase in der T-Zell-Aktivierung und der adaptiven Immunität schließen lässt.

Eine Beteiligung an der angeborenen Immunabwehr zeigt die Aktivierung der ERK1/2-Kinase über Mitglieder der Toll-like Rezeptoren (z. B. TLR4) (Yang *et al.*, 2000). LPS-

Stimulation in Makrophagen zeigte eine gesteigerte ERK-Aktivierung, die wiederum zu einer verstärkten Genexpression von TLR9 führte, was in einer effektiveren Antwort auf eindringende Pathogene resultieren könnte (An *et al.*, 2002).

1.5 Zielsetzungen dieser Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Bedeutung von NOD2 im Zusammenhang mit intestinaler Entzündung funktionell näher zu charakterisieren. Zu diesem Zweck werden die Untersuchungen in zwei Teile untergliedert:

Im ersten Abschnitt soll die Genexpression und Genregulation von NOD2 in intestinalen epithelialen Zelllinien analysiert werden. In intestinalen Epithelzellen von Morbus Crohn-Patienten konnten vermehrt intrazelluläre Bakterien nachgewiesen werden, was auf eine gestörte Barriere-Funktion hindeutet. Somit stellt sich hier die Frage, ob NOD2 innerhalb der intestinalen Epithelzellen an der Abwehr pathogener Bakterien teilnimmt und eine Rolle in der angeborenen Immunität spielen könnte.

Im einzelnen sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Genexpression
Lässt sich eine Genexpression von NOD2 in intestinalen epithelialen Zelllinien *in vitro* nachweisen? Unter welchen Bedingungen ist die Expression induzierbar? Lässt sich die differentielle mRNA-Expression auch auf Protein-Ebene nachweisen?
- Genregulation
Wie ist der Promotor von NOD2 aufgebaut? Welche DNA-Bindestellen sind für die Genregulation von NOD2 verantwortlich? Welche Gene werden über NOD2 reguliert?

Der zweite Teil umfasst die Detektion möglicher Interaktionspartner des NOD2-Proteins, um über interagierende Partner eine Vertiefung bereits bekannter Funktionen und Aufschluss über neue Funktionen von NOD2 zu erhalten.

- Interaktionspartner von NOD2
Findet man über ein Bacteria-Two-Hybrid-System unbekannte Interaktionspartner von NOD2? Welche Domänen sind für eine Bindung verantwortlich? Ist eine Interaktion induzierbar?
- Exemplarische Analyse der identifizierten Protein-Interaktion
Beeinflusst ein Interaktionspartner von NOD2 die im ersten Teil untersuchten Funktionen? Kann über die Interaktion auf neue Funktionen von NOD2 geschlossen werden?
- Beteiligung an anderen Signalwegen
Ist NOD2 an anderen Signalwegen als dem beschriebenen NF- κ B-Signalweg, wie z. B. den MAP-Kinase-Signalwegen, die ebenfalls eine wichtige Rolle in Entzündungsprozessen spielen, beteiligt?

2 Methoden

Eine Auflistung aller Puffer- und Medienzusammensetzungen sowie eine vollständige Liste der verwendeten Kits, Antikörper, Enzyme und Primer findet sich im Anhang. Die Zusammensetzung der in kommerziellen Kits enthaltenen Puffer wurde in den meisten Fällen vom Hersteller nicht bekannt gegeben.

2.1 Zellkultur

Für alle Arbeitsschritte mit Zellkulturen wurden ausschließlich sterile Materialien, Puffer und Medien verwendet und alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Epitheliale HeLa S3 Cervix-Adenokarzinomzellen (ACC 161), intestinale epitheliale HT-29-Zellen (aus einem kolorektalem Adenokarzinom) (ACC 299), HEK (*human embryo kidney*) 293-Zellen (ACC 305) und THP-1-Zellen (*human acute monocytic leukemia*) (ACC 16) stammten von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig). Die zwei Darmepithelzelllinien SW 620 und SW 948 waren freundlicherweise von Prof. Holger Kalthoff (Molekulare Onkologie, CAU, Kiel), CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen von Prof. Stefan Rose-John (Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie, CAU, Kiel) zur Verfügung gestellt worden. HeLa S3 Cervix-Karzinomzellen, SW 620-, SW 948- und THP-1-Zellen wurden in RPMI-Medium (Gibco BRL Life Technology, Eggenstein), HT-29-, HEK 293- und CHO-Zellen in DMEM-Medium (Gibco, Eggenstein) ergänzt mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin) (jeweils 50 µg/ml) bei 37°C und 5 % (v/v) CO₂ kultiviert, zweimal pro Woche mittels eines Inversmikroskops (h500, Hund, Wetzlar) optisch überprüft und bei etwa 80 %iger Konfluenz passagiert. Zum Passagieren wurden die adhären Zellen mit vorgewärmten PBS (Gibco, Eggenstein) gewaschen und mittels Überschichtung mit 1 X Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) für 5 min bei 37°C abgelöst. Die Zelllinie THP-1 benötigte keine Trypsinbehandlung, da die Zellen in Suspension wachsen. Nach Zugabe von FCS-haltigem Medium, um die Enzymreaktion zu beenden, wurden die Zellsuspensionen in 50 ml-Röhrchen (Falcon, Becton-Dickinson Biosciences, Heidelberg) überführt und für 5 min bei 1.700 UpM (400 x g) in einer Zentrifuge (Varifuge3.0R, Heraeus, Kendro Laboratory Products Sorvall® und Heraeus® Laborgeräte, Langenselbold) pelletiert. Nach Resuspendieren der sedimentierten Zellen in 1 - 2 ml Medium wurde ein entsprechender Anteil an Zellen zur weiteren Kultivierung in die 25 ml-Kulturflaschen (Falcon, Heidelberg)

überführt (durchschnittlich 1:4 - 1:6) bzw. ein Aliquot der Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer (VWR International, Darmstadt) ausgezählt und nach Berechnung in entsprechender Konzentration für weitere Experimente über Nacht kultiviert. Für die Experimente wurden nur Zellen bis zur maximal 25. Passage verwendet und außerdem einmal pro Monat auf Kontamination mit Mykoplasmen untersucht.

2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Für die RNA-Isolierung aus intestinalen epithelialen Zelllinien (HT-29, SW620, SW948) und HeLa-Zellen wurde das RNeasy® -Kit von Qiagen (Qiagen, Hilden) mit einem optimierten Protokoll verwendet.

Die intestinalen epithelialen Zelllinien und HeLa-Zellen wurden zu 5×10^5 Zellen/well in 2 ml Medium auf 6-well-Platte (Nunc, Wiesbaden) ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte eine 24-stündige Stimulation mit frisch angesetzten Verdünnungen von TNF- α (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) zwischen 0,5 und 100 ng/ml, bzw. eine Stimulation mit 10 ng/ml TNF- α , 5 μ g/ml LPS (Sigma-Aldrich Chemie, München) oder 10 μ g/ml MDP (Bachem, Weil am Rhein) für unterschiedliche Zeiträume (0 bis 24 Stunden), wonach die Zellen in PBS gewaschen, abgeschabt und sedimentiert wurden. Nach Resuspendieren des Pellets in 550 μ l RLT (+ 10 μ l/ml β -Mercaptoethanol (Sigma, München)) wurden die Zellen durch Zentrifugation (Tischzentrifuge Centrifuge5415 C, Eppendorf, Hamburg) über eine QiaShredder® -Säule (13.000 UpM (15.700 x g), 2 min, RT) aufgeschlossen. Der Durchfluss wurde mit 550 μ l Isopropanol versetzt und auf eine RNA-bindende RNeasy® -Säule übertragen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (8.000 UpM (5.900 x g), 1 min, RT) wurde die nun auf der Matrix gebundene RNA durch drei 15-minütige Inkubationen mit DNase I -Lösung (pro Säule 10 μ l DNase I in 70 μ l RDD, Qiagen, Hilden) von verbliebener genomischer DNA gereinigt. Es folgten drei weitere Waschschrte mit 700 μ l RW1 und zweimal 500 μ l RPE mit anschließender Zentrifugation, wonach die Säule in ein unbenutztes Auffangröhrchen überführt und nochmals zur Trocknung für 2 min bei 13.000 UpM (15.700 x g) zentrifugiert wurde. Im Anschluss wurde die trockene Säulenmatrix mit 30 – 50 μ l RNase-freiem Wasser (Qiagen, Hilden) versetzt und die Säule für 10 min bei RT inkubiert. Zur Elution der Gesamt-RNA wurde unter Verwendung eines

RNase-freien Auffanggefäßes ein letzter Zentrifugationsschritt (2 min, 13.000 UpM (15.700 x g)) durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte am UV-Photometer mit automatischer Quantifizierung (Ultrospec 3100 pro, UV/visible Spectrophotometer, Amersham Biosciences Europe, Freiburg). Von jeder RNA-Probe wurden 200 µl einer 1:40-Verdünnung (mit RNase-freiem Wasser) hergestellt und deren Extinktion bei $\lambda = 260$ nm (Absorptions-maximum von Nukleinsäuren) in einer Quarzküvette gemessen. Dabei entsprach eine optische Dichte OD_{260} von 1,0 einer Nukleinsäurekonzentration von 40 µg/ml RNA.

Da das Absorptionsmaximum für Proteine bei $\lambda = 280$ nm liegt, zeigten hohe Extinktionswerte bei 280 nm eine Verunreinigung der RNA-Lösung mit Proteinen an. Aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm (E_{260}/E_{280}) ließ sich die Reinheit der RNA bestimmen; im Idealfall lag er zwischen 1,8 und 2,0.

Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C , alle weiteren Arbeitsschritte mit RNA wurden auf Eis durchgeführt.

Um Kontaminationen der RNA-Proben mit genomischer DNA auszuschließen, wurde eine Test-PCR gemäß den Angaben in (2.2.4.1.2) durchgeführt. Nur RNA-Proben, die keine GAPDH-Bande beruhend auf Amplifikation genomischer DNA zeigten, konnten für die Reverse Transkription verwendet werden. Kontaminierte Proben wurden nochmals auf eine RNeasy® -Säule aufgebracht und mit DNase I behandelt.

2.2.2 Reverse Transkription

Durch den Prozess der Reversen Transkription wird die Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) aus einem mRNA-Template ermöglicht. Die Reverse Transkriptase ist ein zuerst bei Retroviren entdecktes Enzym, das eine Doppelstrang-DNA-Kopie von einer Einzelstrang-RNA-Matrize erzeugt, indem es den Poly-A-Schwanz erkennt, daran bindet und zunächst ein RNA/DNA-Hybrid-Molekül und dann eine DNA/DNA-Doppelhelix synthetisiert. Für die vorliegende Arbeit wurden für diesen Zweck eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (= Reverse Transkriptase) aus dem Retrovirus *MMLV* (*moloney-murine leukemia virus*) und Oligo-(dT)₁₈-Primer zum Binden an den 3'-Poly-A-Schwanz der mRNA benutzt. Alle Komponenten entstammten dem *Advantage*® RT-for-PCR-Kit von Clontech (BD Bioscience/Clontech, Heidelberg).

Zunächst wurden 200 ng Gesamt-RNA mit 1 µl Oligo(dT)₁₈-Primer in einem mit RNase-freiem Wasser aufgefüllten Gesamtvolumen von 13,5 µl für 2 min bei 70°C vorinkubiert, um das Anlagern (*Annealen*) des Primers an die mRNA-Moleküle zu ermöglichen. Nach Abkühlen des Ansatzes auf Eis wurden 6,5 µl eines Mastermixes hinzugefügt, der neben dem 5 X RT-Puffer dNTPs, synthetischen RNase-Inhibitor und das Enzym *MLLV*-Reverse Transkriptase enthielt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 42°C wurde das Enzym durch Erhitzen für 5 min auf 95°C inaktiviert (s. Tab. 3). Die erhaltene cDNA wurde durch Zugabe von 80 µl A. bidest. 1:5 verdünnt und bis zur weiteren Nutzung bei – 80°C gelagert.

Tab. 3: Zusammensetzung des Ansatzes für die Reverse Transkription

Die rechte Spalte zeigt die Inkubationsschritte der jeweiligen Teilansätze.

Komponente	Menge	Inkubation
Gesamt-RNA	200 ng	
Oligo-(dT) (20 µM)	1 µl	
A. bidest.	ad 13,5 µl	<i>2 min 70°C</i>
5 X Puffer	4 µl	
dNTPs (jeweils 10 mM)	1 µl	
RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl	
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl	<i>1 h 42°C + 5 min 95°C</i>

2.2.3 RT-PCR

Um die Expression des NOD2-Gens in den verwendeten Zellsystemen auf mRNA-Ebene analysieren zu können, wurden genspezifische Primerpaare entworfen, von der Firma Eurogentec (Eurogentec Deutschland, Köln) auf Bestellung synthetisiert und diese in Anlehnung an die Methode nach Mullis zur Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt (Mullis and Faalona, 1987).

Die Nukleotidfolge der Primerpaare basierte auf der Sequenzinformation der jeweiligen mRNA von der Genbank des nationalen Zentrums für Biotechnologische Informationen NCBI (Bethesda, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und wurde so gewählt, dass das resultierende amplifizierte Fragment eine Größe von 600 - 800 bp aufwies.

Tabelle 4 zeigt die Zusammensetzung einer typischen RT-PCR (alle Komponenten: *GeneAmp*® PCR Reagent-Kit, Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt) mit cDNA als Template, sowie ein darauf abgestimmtes PCR-Programm, durchgeführt in einem Thermocycler der Firma Perkin Elmer (Gene Amp. PCR System 9700, Perkin Elmer, Weiterstadt).

Tab. 4: Zusammensetzung des RT-PCR-Reaktionsansatzes und entsprechendes PCR-Programm

Die benutzten Primerpaare mit Annealingtemperatur und Zyklenzahl sind im Anhang aufgelistet.

Komponente	Menge (µl)
A. bidest.	34,5
10 X PCR Puffer	5
MgCl ₂ (25mM)	3
dNTPs (je 10 mM)	1
Primermix (je 10 µM)	1
cDNA-Template	5
<i>AmpliTaq</i> -Polymerase	0,5

Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
95	4 min	} 25 – 40 x
95	30 sec	
T _{anneal}	30 sec	
72	1 - 2 min	
72	7 min	
4	Pause	

Die Anzahl der Zyklen wurde entsprechend des zu untersuchenden Gens so gering gewählt, dass die Reaktion sich noch im linearen Bereich der Amplifikationskinetik befand, damit eine semiquantitative Auswertung möglich war.

Als Überprüfung auf genomische Kontamination der isolierten RNA wurde eine Test-PCR mit 1000 ng RNA als Template, Primern für das *housekeeping*-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) und 40 Amplifikations-Zyklen durchgeführt.

Nach Auftrennung des kompletten Reaktionsansatzes auf einem 1 %igen (w/v) Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel, wurde die DNA mit Hilfe einer UV-Dokumentationsanlage (BioDocAnalyse, Biometra, Göttingen) sichtbar gemacht und mit einer Software für densitometrische Auswertung (SigmaGel, Jandel Scientific Corp., Erkrath) quantifiziert. Die Expression des NOD2-Gens bzw. entsprechender NOD2-Zielgene wurde als Mittelwert von mindestens zwei unabhängigen Experimenten in Relation zur GAPDH- oder β-Aktin-Expression berechnet.

2.2.4 Herstellung von Konstrukten für das Two-Hybrid-Screening, zur Überexpression und für Reporter-gen-Assays

Nach einer Darstellung der methodischen Vorgehensweise findet sich in 2.2.4.12 eine Zusammenfassung der verwendeten Konstrukte mit der jeweiligen Zielsetzung der Klonierung.

2.2.4.1 Amplifikation der Zielsequenzen

Für das Konstrukt pBT-SNP13 wurde cDNA von an Morbus Crohn erkrankten Blutspendern als Template für die Amplifikation des kodierenden Bereichs und für pGL3-Konstrukte humane genomische DNA verwendet. Die Konstrukte zur Überexpression wurden aus von HeLa-Zellen-stammender cDNA amplifiziert; NOD2-Konstrukten diente pcDNA3.1-NOD2wt (G. Nunez, Ann Arbor, Michigan, USA) als Vorlage. Für die unterschiedlichen Zielsequenzen sind genspezifische Primerpaare entworfen worden, die von der Firma Eurogentec (Eurogentec, Köln) auf Bestellung synthetisiert wurden. Die Nukleotidfolge der Primerpaare basierte wiederum auf der Sequenzinformation der jeweiligen mRNA von der Genbank des nationalen Zentrums für Biotechnologische Informationen NCBI.

Die Amplifikation wurde mit *Advantage2*[®] -Polymerase-Mix (Clontech, Heidelberg) durchgeführt. Dieser Mix enthielt TITANIUM[™]Taq-DNA-Polymerase – mit einer Nuklease-defizienten N-terminalen Deletion der Taq-DNA-Polymerase und einem TaqStart[™]-Antikörper, um eine automatische „Hot-Start“-PCR zu gewährleisten- und zu einem geringeren Anteil eine Taq-Polymerase mit zusätzlicher Korrekturleseaktivität.

2.2.4.1.1 Nested- und Two-Step-PCR zur Amplifizierung des NOD2-Gens

Aufgrund der Größe des Genproduktes von NOD2 (3120 bp) und der damit verbundenen Schwierigkeiten, ein sauberes Genprodukt mit einer einzigen Amplifizierungsreaktion zu erhalten, wurde für die Konstrukte, die im Two-Hybrid-Screen eingesetzt wurden, das Prinzip der Nested-PCR angewandt (s. Abb. 6).

Dazu wurde zunächst ein Primerpaar gewählt, welches sich einige Basenpaare außerhalb der eigentlichen Primer an die DNA anlagert, um dann aus dem angereicherten Anfangsprodukt

das eigentliche Genfragment zu amplifizieren – in diesem Fall mit einer *Two-Step*-Reaktion, die bei geeignetem Primerpaar für die *Advantage2*® Polymerase (Clontech, Heidelberg) vom Hersteller empfohlen wurde. Das zweite Primerpaar enthielt am 5'-Ende zusätzliche Schnittstellen für Restriktionsenzyme und diente der gerichteten Insertion des Amplikons in die multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*) des jeweiligen Zielvektors.

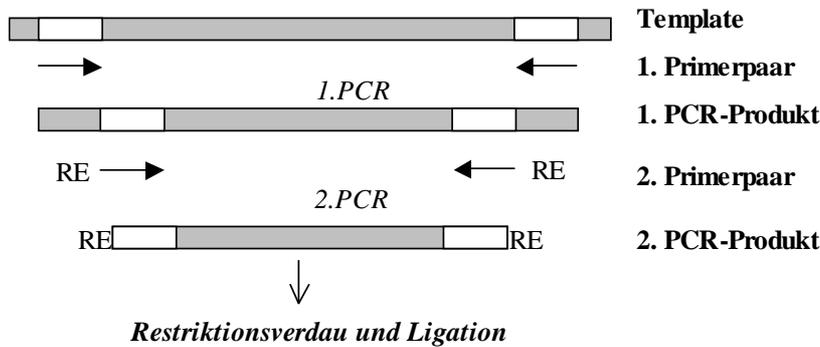


Abb. 6: Schema der *Nested-PCR*-basierten Amplifikation der Ziel-DNA

Die Pfeile stehen für die jeweiligen Primer, weiße Kästchen symbolisieren die Primer-Bindungsstellen, RE steht für zusätzliche Restriktionsschnittstellen an den 5'-Enden der Primer.

In Tabelle 5 und 6 sind die Zusammensetzungen sowohl der *Nested-PCR*, als auch der anschließenden *Two-Step-PCR* (alle Komponenten: *Advantage2*® PCR Reagent-Kit, Clontech, Heidelberg) mit cDNA als Template, sowie darauf abgestimmte PCR-Programme, durchgeführt in einem Thermocycler (Gene Amp. PCR System 9700, Perkin Elmer, Weiterstadt), dargestellt.

Tab. 5: Zusammensetzung des *Nested-PCR*-Reaktionsansatzes und entsprechendes PCR-Programm

Komponente	Menge (µl)
A. bidest.	37
10 X PCR Puffer (+ 1,5 mM MgCl ₂)	5
dNTPs (je 10 mM)	1
Primermix (je 10 µM)	1
Template (cDNA)	5
Advantage2® Taq	1

Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
95	2 min	} 40 x
95	30 sec	
56	30 sec	
72	4 min	
72	7 min	
4	Pause	

Tab. 6: Zusammensetzung des *Two-Step-PCR*-Reaktionsansatzes und entsprechendes PCR-Programm

Bei der *Two-Step-PCR* werden Primer-Annealing und Elongation in einem Schritt durchgeführt; daher müssen die Primer ein Temperatur-Optimum besitzen, welches dem der Polymerase (*Advantage 2*®-Polymerase = 68°C) entspricht.

Komponente	Menge (µl)
A. bidest.	37
10 X PCR Puffer (+ 1,5 mM MgCl ₂)	5
dNTPs (je 10 mM)	1
Primermix (je 10 µM)	1
Template (PCR-Produkt)	5
Advantage2® Taq	1

Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
95	2 min	} 50 x
95	30 sec	
68	4 min	
68	4 min	
4	Pause	

2.2.4.1.2 *Amplifikation der übrigen Zielkonstrukte*

Für eine Klonierung kleinerer Genfragmente aus cDNA oder für NOD2-Konstrukte aus pcDNA3.1-NOD2wt wurde wie im Fall der RT-PCR *AmpliTaq®* -Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt) verwendet.

Tabelle 7 zeigt die Zusammensetzung einer typischen Klonierungs-PCR. Die Amplifikation erfolgte mit 30 Zyklen bei der idealen Annealingtemperatur, die in Vorversuchen mit Hilfe eines Gradientencyclers ermittelt worden war. Im Anschluss an die PCR wurde der Reaktionsansatz auf einem 1 %igem (w/v) Ethidiumbromid-enthaltenden Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht bei 312 nm analysiert.

Tab. 7: Zusammensetzung des Klonierungs-PCR-Ansatzes mit *Ampli-Taq®*-Polymerase und entsprechendes PCR-Programm

Die linke Tabelle zeigt die typische Zusammensetzung der PCR, wobei als Template entweder cDNA oder Plasmid-DNA benutzt wurde. Rechts ist ein typisches PCR-Programm abgebildet. Die Annealingtemperatur richtete sich dabei nach den Klonierungsprimern (s. Anhang).

Komponente	Menge (µl)
A. bidest.	34,5
10 X PCR Puffer	5
MgSO ₄ (50 µM)	3
dNTPs (je 10 mM)	1
Primermix (je 10 µM)	1
Template (cDNA/ 50 ng Plasmid)	5
AmpliTaq-Polymerase	0,5

Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
95	5 min	} 30 x
95	30 sec	
T _{anneal}	30 sec	
72	1 min/ 1000b	
72	4 min	
4	Pause	

2.2.4.2 Gelelektrophorese der Genfragmente

Die Gelelektrophorese verwendet man, um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen. In vielen Geltypen ist die elektrophoretische Beweglichkeit eines DNA-Fragments bis zu einer gewissen Grenze umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare. Zur Auftrennung der Genfragmente wurden Agarosegele verwendet.

2.2.4.2.1 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Herstellung eines 1 %igen (w/v) Agarosegels wurden für die Mini-Gelkammer 0,5 g Agarose mit 50 ml 1 X TAE-Laufpuffer aufgekocht und nach kurzem Abkühlen mit 1 µl Ethidiumbromid (Gibco, Eggenstein) versetzt. Nach Polymerisierung wird das Gel mit 1 X TAE-Puffer bedeckt und die mit 10 X DNA-Ladepuffer (1:10) versetzten Proben aufgetragen. Die Probenauftrennung erfolgt bei 5 V/cm für ca. 30 Minuten.

Die PCR-Produkte wurden abschließend mittels Geldokumentationsanlage (BioDocAnalyse, Biometra, Göttingen) detektiert.

2.2.4.3 Aufreinigung der DNA

Um eine möglichst hohe Reinheit der Ziel-DNA zu gewährleisten, wurde die Bande der erwarteten Größe mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des MiniElute® DNA-Kits (Qiagen, Hilden) aus dem Gelstück eluiert.

Das Gelstück wurde mit 3 µl QG-Puffer pro mg Gel versetzt und für 10 min bei 50°C aufgelöst. Daraufhin wurde dem gesamten Ansatz ein Drittel des QG-Volumens an Isopropanol zugefügt, auf eine MiniElute-Säule aufgebracht und zentrifugiert (10.000 UpM (9.300 x g), 1 min, Tischzentrifuge Centrifuge5415 C, Eppendorf). Die auf der Säule fixierte DNA wurde durch zwei weitere Waschschriffe mit QG und PE gewaschen und schließlich nach 5-minütiger Inkubation in 11 µl EB eluiert. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 20°C gelagert.

2.2.4.4 *Enzymatischer Verdau der DNA mit Restriktionsendonukleasen*

10 μl der aufgereinigten Bande des amplifizierten Inserts und 1 μl (ca. 1 μg) des jeweiligen Zielvektors wurden mit derselben Kombination von Restriktionsenzymen verdaut.

Tab. 8: Allgemeine Zusammensetzung eines Verdaus von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Komponente	Vektorverdau (μl)	Insertverdau (μl)
A. bidest.	21	12
10 X Puffer	3	3
10 X BSA (10 mg/ml)	3	3
Enzym 1 (20 U/ μl)	1	1
Enzym 2 (20 U/ μl)	1	1
DNA	1	10

Der Verdau (s. Tab. 8) wurde auf Eis angesetzt, um dann für 2 h bei 37°C im Wasserbad zu inkubieren. Daraufhin wurde der Ansatz mit dem Insert gekühlt gelagert, während der Vektoransatz mit 1 μl alkalischer Phosphatase CIP (NEB, New England Biolabs, Bad Schwalbach) versetzt und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert wurde, um durch die Dephosphorylierung die Selbstligation des Vektors zu minimieren. Nach einem Denaturierungsschritt bei 75°C für 10 min wurden die gesamten Ansätze von geschnittenem Vektor und Insert auf einem 1 %igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden Banden aus dem Gel aufgereinigt.

2.2.4.5 *Ligation*

Zur semiquantitiven Bestimmung der DNA-Konzentration der geschnittenen und eluierten Banden, wurden je 1 μl von Insert und Vektor mit 9 μl A. bidest. und 1 μl 10 X DNA-Ladepuffer versetzt und zusammen mit 5 μl eines Größenmarkers (*Smart Ladder*, Eurogentec, Köln) auf einem 1 - 2 %igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Durch optischen Vergleich der Bandenstärke mit den bekannten Konzentrationen der Markerbanden konnte die

Konzentration der Ligationskomponenten abgeschätzt werden. Durch die Kenntnis der genauen Länge von Insert und Vektor wurde aus der Konzentration (in ng/μl) die molare Konzentration (in fmol/μl) nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{molare Konzentration [fmol/}\mu\text{l]} = \frac{\text{Konzentration [ng/}\mu\text{l]} \times 10^6}{\text{Länge [bp]} \times 649 \text{ [pg/fmol bp]}}$$

Für die anschließende Ligation wurden 15 fmol dephosphorylierter Vektor, 45 fmol Insert und 2,5 U T4-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe) in 1 X Ligationspuffer in einem Endvolumen von 20 μl eingesetzt (s. Tab. 9). Die Ligation wurde für 15 min bei RT durchgeführt. Direkt im Anschluss wurden 8 μl des Ligationsansatzes für die anschließende Transformation eingesetzt.

Tab. 9: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.

Komponente	Menge
A.bidest.	ad 20 μl
10 X Ligationspuffer	2 μl
Vektor	15 fmol
Insert	45 fmol
T4 Ligase (2,5 U/μl)	1 μl

2.2.4.6 TA-Klonierung in einen TOPO-Vektor

Die Klonierung der ligierten PCR-Produkte in pcDNA4/HisMax-Vektor erfolgte mit Hilfe des TOPO™ TA Cloning ® Kits (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerprotokoll.

Diese Methode macht sich die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase zu Nutze, einen einzelnen Adenosinrest an das 3`-Ende eines synthetisierten DNA-Stranges zu hängen. Ein dazu komplementärer Vektor (pcDNA4/HisMax, Invitrogen, Karlsruhe) weist an den entsprechenden Strangenden der Klonierungsstelle einen überhängenden Thymidinrest auf, wodurch eine Paarung mit dem Adenosinrest des PCR-Produkts erleichtert wird.

Die Bezeichnung "TOPO" bezieht sich hierbei auf die Topoisomerase II, die einen schnellen Einbau der DNA (innerhalb von 5 Minuten) in den Vektor vollzieht.

Tab. 10: Zusammensetzung der TA-Klonierungsreaktion

Komponente	Menge
A.bidest.	ad 6 μ l
Salzlösung	1 μ l
TOPO TA-Klonierungsvektor	1 μ l
PCR-Produkt	1 - 4 μ l

Der Reaktionsansatz (s. Tab. 10) wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, worauf 2 μ l für die anschließende Transformation eingesetzt wurden.

2.2.4.7 Transformation von Bakterien

Für die Klonierung der ligierten Vektor-Insert-Konstrukte wurden chemisch kompetente *E. coli* TOP10 – Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt und nach Angaben des Herstellers transformiert:

Nachdem die Zellen auf Eis aufgetaut worden waren, wurden sie mit 8 μ l des Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert, danach für 30 sec einem Hitzeschock von 42°C unterzogen und direkt im Anschluss für 2 - 5 min auf Eis gelagert. Die Zellen wurden in 250 μ l vorgewärmten S. O. C. -Medium (Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen und für 1 h in einem Schüttelinkubator (Orbital Incubator SI50, VWR, Darmstadt) bei 37°C und 225 UpM inkubiert. Danach wurden je 125 μ l der Bakteriensuspension mit Hilfe eines sterilen Drugalski-Spatels (VWR, Darmstadt) auf einer LB-Agarplatte (mit dem entsprechendem Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht invers bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.4.8 Identifizierung von positiven Klonen

Pro Ligation wurden 6 – 12 Kolonien zur Identifizierung positiver Klone mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte abgenommen und in 2 ml Antibiotika-enthaltendes LB-Medium überführt. Nach einer Inkubation über Nacht im Schüttelinkubator (Orbital Incubator SI50, VWR, Darmstadt) bei 37°C und 225 UpM wurden 1,5 ml jedes expandierten Klons in ein

Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation bei 10.000 UpM (9.300 x g) (Tischzentrifuge Centrifuge5415 C, Eppendorf, Hamburg) für 1 min pelletiert. Die Isolierung der bakteriellen Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des QIAprep® MiniPrep-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben: Das Bakterienpellet wurde in 250 µl P1 (+ RNase A) resuspendiert unter Zugabe von 250 µl P2 lysiert und nach Neutralisierung mit 350 µl N3 und mehrmaligem Invertieren des Reaktionsgefäßes bei 10.000 UpM (9.300 x g) für 10 min abzentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde auf eine DNA-bindende QIAprep® -Säule überführt, zweimal durch Zentrifugation (10.000 UpM (9.300 x g), 1 min) mit 750 µl PE gewaschen, luftgetrocknet und nach 5-minütiger Quellphase in 30 µl Elutionspuffer EB eluiert.

Durch Restriktionsverdau bzw. PCR mit entsprechenden Klonierungsprimern wurden die isolierten Plasmide auf die korrekte Insertion der Ziel-DNA überprüft.

2.2.4.9 Präparative Aufreinigung der Plasmid-DNA (Maxiprep)

Als positiv identifizierte Klone wurden in 250 ml-LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37°C bei 225 UpM im Schüttelinkubator (Orbital Incubator SI50, VWR, Darmstadt) inkubiert. Zur Erhaltung der positiven Klone wurden 5 ml Zellsuspension mit 800 µl sterilem Glycerol versetzt und die Bakterien als 1 ml-Glycerolstocks bei - 80°C gelagert. Die Bakterien der restlichen Suspension wurden für 15 min bei 4°C und 4.500 UpM (6.000 x g) (Varifuge3.0R, Heraeus, Langenselbold) sedimentiert und mit Hilfe des Qiagen® Plasmid-Maxi-Kits einer Plasmidisolierung unterzogen. Dabei wurde prinzipiell wie unter 2.2.4.8 vorgegangen, nur wurden entsprechend größere Puffervolumina und einige modifizierte Puffer eingesetzt. Resuspendieren und 5-minütige Lyse der Bakterien erfolgte in 10 ml P1 bzw. P2, gefolgt von Präzipitation der DNA für 10 min nach Zugabe von 10 ml P3. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 4.500 UpM (6.000 x g) wurde das Präzipitat über eine QIA® Maxi-Cartridge gereinigt und die die DNA-enhaltende Lösung auf eine vorher equilibrierte Qiagen® tip-500-Säule überführt. Nach Durchlauf durch Gravitationsfluss wurde zweimal mit je 30 ml QC gewaschen und anschließend die gebundene DNA in 15 ml Elutionspuffer QF eluiert. Nach Zugabe von 10,5 ml Isopropanol wurde die DNA bei 4.500 UpM (6.000 x g) für 60 min bei 4°C pelletiert, in 5 ml 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, nochmals bei 4.500 UpM

(6.000 x g) für 30 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde luftgetrocknet und schließlich in 100 – 400 µl TE (pH 8,0) gelöst.

Die Konzentration wurde im UV-Photometer (Amersham, Freiburg) (280 nm) mit einem spezifischen Umrechnungsfaktor von 50 ng/µl (für OD = 1,0) bestimmt.

2.2.4.10 Sequenzierungsreaktion

Die Sequenz aller hergestellten Konstrukte wurde im Anschluss an die Aufreinigung mit Hilfe von *Taq-Cycle-Sequencing*, einer Modifikation der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977), überprüft. Hierfür wurde das Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Weiterstadt) benutzt.

100 ng der zu sequenzierenden Plasmide wurden mit 1 µl Sequenzierprimer (1,6 pmol/µl) und 1 µl Big Dye™ Terminator-Reaction-Mix (+ Ampli™ Taq FS) in einem Gesamtvolumen von 10 µl einer Sequenzierungs-PCR unterworfen. Das zugehörige Programm beinhaltete neben den Standard-Denaturierungsschritten eine Annealingphase von 20 sec und eine Elongationsphase von 4 min bei 60°C mit einer Zyklenzahl von 25. Nach dieser *Cycle Sequencing*-Reaktion wurden die Proben mit 10 µl A. bidest. versetzt und über eine DyeEx®-Säule (Qiagen, Hilden) oder bei einer Vielzahl von Proben über eine selbst-hergestellte 96 well- Sephadex-Platte (Amersham, Freiburg; Millipore, Schwalbach) aufgereinigt. Die Proben wurden in eine 96-well-reaction-plate (Micro-Amp® Optical, Perkin Elmer, Weiterstadt) überführt und auf einem ABI PRISM ® 3700 Kapillarsequenzierer (Perkin Elmer, Weiterstadt) analysiert.

2.2.4.11 Ortsgerichtete Mutagenese

Die Herstellung der NOD2-Promotorkonstrukte pGL3B-NOD2(ΔκB1), pGL3B-NOD2(ΔκB2) und pGL3B-NOD2(ΔκB3) wurde durch Mutagenese des Wildtyp-Konstruktes pGL3B-NOD2(-1316) (s. Abb. 8, S. 46) mit sequenzspezifischen Primern und dem Mutagenese-Kit QuickChange® Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Zunächst wurden Primerpaare hergestellt (Eurogentec, Köln), die die zu mutierende Region überspannen und in denen die Sequenzen der zu mutierenden putativen Bindestellen deletiert waren (s. Tab. 11). Nach Amplifikation des gesamten Plasmids mit

Pfu-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim) (s. Tab. 12), die im Vergleich zu herkömmlicher *Taq*-DNA-Polymerase eine deutlich höhere Temperaturstabilität und eine zusätzliche 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt, wurde die unmutierte Ausgangs-DNA (pGL3B-NOD2(-1316)-Plasmid) durch die Restriktionsendonuklease *Dpn* I, die nur die methylierte bakterielle DNA erkennt, verdaut.

Tab. 11: Primerdesign für die ortsgerichtete Mutagenese des NOD2(-1316)-Promotorabschnittes zur Erzeugung von NOD2(Δ κ B1), NOD2(Δ κ B2) und NOD2(Δ κ B3)

Abgebildet sind nur die *sense*-Primer. Die verwendeten *antisense*-Primer entsprachen der komplementären Sequenz in 3'→5'-Orientierung.

Primer	Sequenz 5'→3'	bp	Tm [°C]
NOD2(Δ κ B1)_s	GACTGACAGATTTTCGCCTGAAGAGACCAGGTAATAAAGGAGTAAGAGGAAG	51	60
NOD2(Δ κ B2)_s	CGAGTCACGTGGCTTGGGCTTCTTGGTGTCCACAGAAG	38	60
NOD2(Δ κ B3)_s	GGCCTCCGGCTTTTCCTTCTTGAAGGTGGGGTTGGTAG	39	60

Tab. 12: Reaktionsansatz und PCR-Programm für die Mutagenese

Die linke Tabelle zeigt die Zusammensetzung der PCR-Reaktion, wobei als Template das Konstrukt pGL3B-NOD2(-1316) verwendet wurde. Rechts ist das PCR-Programm dargestellt. Die Elongationszeit betrug 1 min pro kb Plasmid, in diesem Fall 7 min. Die Anzahl der Zyklen richtete sich nach Art der Mutagenese. Bei einem einzelnen Basenaustausch – einer Punktmutation – benötigt man 12 Zyklen.

Komponente	Menge
A. bidest.	ad 50 μ l
10 X Reaktionspuffer	5 μ l
<i>sense</i> -Primer	125 ng
<i>antisense</i> -Primer	125 ng
dNTPs (je 10 mM)	1 μ l
Template-Plasmid	50 ng
<i>Pfu</i> -DNA- Polymerase	1 μ l

Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
95	30 sec	} 12 x
95	30 sec	
55	1 min	
68	7 min	
68	14 min	
4	Pause	

Das unverdaute mutierte Plasmid wurde wie in 2.2.4.7 beschrieben durch Transformation in *E. coli* (XL1-Blue superkompetente Zellen, Stratagene, Heidelberg) kloniert.

2.2.4.12 Übersicht über die hergestellten Konstrukte

Der Vektor pBT (Stratagene, Heidelberg) (s. Abb. 10, S. 53) diente innerhalb des Two-Hybrid-Screens der Detektion von Protein-Protein-Interaktionen. Untersucht wurden NOD2wt, die N-terminalen CARD-Domänen (CARDs) und die C-terminale LRR-Region, die aus dem pcDNA3.1-NOD2wt-Plasmid amplifiziert wurden, sowie die mutierte NOD2-Variante SNP13, amplifiziert aus cDNA von freiwilligen an Morbus Crohn erkrankten Spendern (s. Abb. 7).

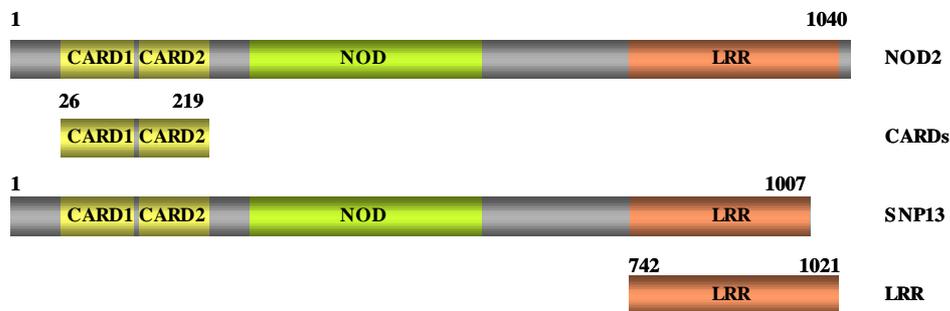


Abb. 7: Schematische Übersicht über NOD2-Varianten, die im Two-Hybrid-System eingesetzt wurden

CARD1 (Caspase-aktivierende und -rekrutierende Domäne 1), CARD2 (Caspase-aktivierende und -rekrutierende Domäne 2), CARDs = CARD1 und CARD2), NOD = Nukleotid-bindende Oligomerisierungs-Domäne, LRR = Leuzin-reiche Wiederholungen, SNP13 = M. Crohn-assoziierte Variante mit trunzierter LRR-Region. Die Zahlen verdeutlichen die Aminosäureposition.

In Tabelle 13 werden die im Two-Hybrid-Screening eingesetzten Konstrukte mit Angabe von Vektordaten, Insert-Herkunft und -Größe sowie verwendeten Restriktionsenzymen aufgeführt.

Tab. 13: Zusammenfassung der hergestellten Konstrukte für das Two-Hybrid-System

„Enzym 1“ bezeichnet die am 5′-Ende des Inserts verwendete Restriktionsschnittstelle, „Enzym 2“ diejenige am 3′-Ende. Alle Enzyme, 10 X BSA und die entsprechenden 10 X Puffer stammten von der Firma NEB (Schwalbach).

Klonierungsprodukt:	pBT-NOD2wt	pBT-LRR	pBT-CARDs	pBT-SNP13
Vektor	pBT	pBT	pBT	pBT
Resistenz (Vektor)	Chloramphenicol	Chloramphenicol	Chloramphenicol	Chloramphenicol
Grösse Vektor (bp)	3200	3200	3200	3200
Insert	NOD2wt	LRR	NODs	SNP13
Herkunft des Inserts	pcDNA3.1-NOD2wt	pcDNA3.1-NOD2wt	cDNA, Blutspender	cDNA, Blutspender
Größe Insert (bp)	3120	880	630	3120
Enzym 1	<i>Not</i> I	<i>Not</i> I	<i>Not</i> I	<i>Not</i> I
Enzym 2	<i>Xho</i> I	<i>Xho</i> I	<i>Xho</i> I	<i>Xho</i> I
10 X Puffer	NEB3	NEB3	NEB3	NEB3
BSA (+/-)	+	+	+	+

Um die Auswirkungen der TNF- α - und IFN- γ -Stimulation auf regulatorische Regionen des NOD2-Gens zu analysieren, wurde der Promotorbereich von NOD2 von – 1316 bis + 51 in den pGL3-Basic-Vektor (Promega, Mannheim) kloniert (s. Abb. 8). Das Konstrukt beinhaltet die Luziferase aus *Photinus pyralis* (Glühwürmchen) als Reporter gen und wird für *Dual Luciferase Assays* (DLAs) verwendet.

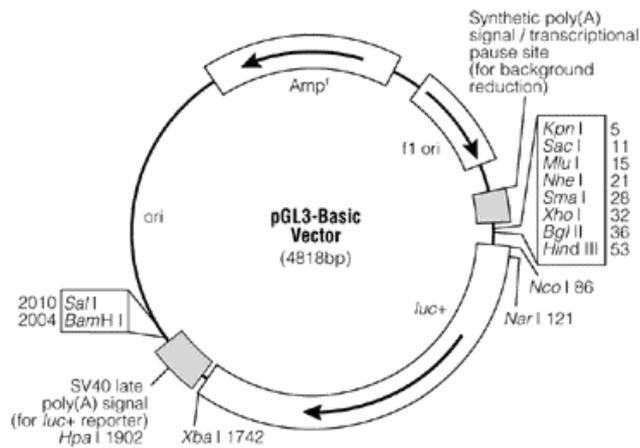


Abb. 8: Verwendeter Vektor für NOD2-Promotor-Reportergenkonstrukte

Der Bereich von - 1316 bis + 51 des NOD2-Promotors wird in den pGL3-Basic-Vektor inseriert. Zur Klonierung wurden die Restriktionsschnittstellen *Kpn* I und *Mlu* I verwendet. Quelle: Technical Manual No. 033, Promega, Mannheim.

Für Überexpressionsversuche – vor allem in den Immunpräzitationsexperimenten – wurden verschiedene Vektoren verwendet, mit deren Hilfe Fusionsproteine aus dem Zielgen und zusätzlichen terminalen *Tags* (meist eine kurze Sequenz sich wiederholender Aminosäuren, die von spezifischen Antikörpern erkannt werden) erzeugt wurden.

- (i) pcDNA4/HisMax – N-terminal der multiplen Klonierungsstelle besitzt das Plasmid zwei Erkennungssequenzen: ein 5 X-His-*Tag* sowie das sogenannte XPress-*Tag*.
- (ii) pCEV – ebenfalls N-terminal kodiert der Vektor für das sog. *Flag-Tag*

Zusätzlich wurden für Immunpräzitations-Versuche Konstrukte hergestellt, die für Fusionsprodukte aus dem gewünschten Protein, z. B. NOD2 und dem modifizierten GFP- (*green fluorescent protein*) Derivat EGFP (*enhanced GFP*) kodieren. Hierfür wurde der Vektor pEGFP-C3 (Clontech, Heidelberg), der für das EGFP-Protein C-terminal vom gewünschten Protein kodiert, verwendet.

Zur Detektion spezifischer Interaktionsbereiche wurden in die o. a. Vektoren neben dem NOD2wt-Protein einzelne Domänen von NOD2 kloniert (s. Abb. 9). Dafür wurden sequenz-spezifische Primer hergestellt, die bereits die entsprechende Sequenz für die Restriktionsschnittstellen enthielten, um die anschließende Klonierung zu ermöglichen. Die eingesetzten Domänen umfassten CARD1 (Caspase-aktivierende und -rekrutierende Domäne 1), CARD2 (Caspase-aktivierende und -rekrutierende Domäne 2), CARDS = CARD1

und CARD2, NOD = Nukleotid-bindende Oligomerisierungs-Domäne, LRR = Leuzin-reiche Wiederholungen und N/L = NOD und LRR.

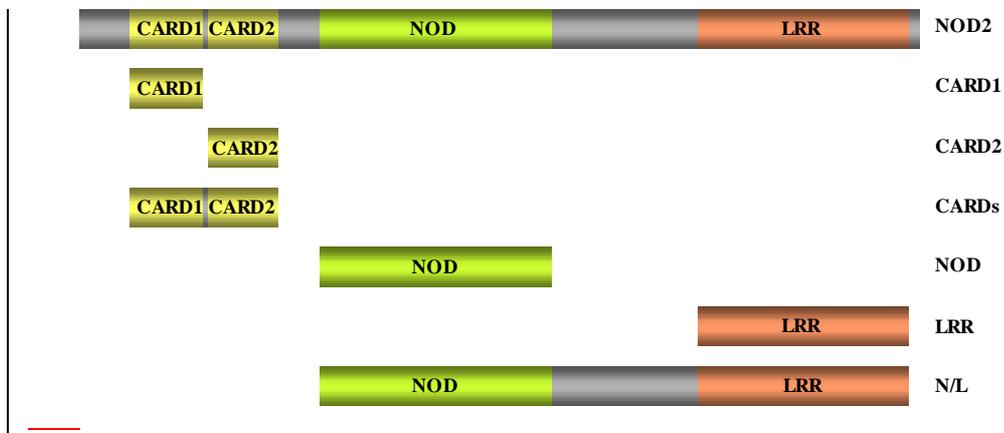


Abb. 9: Schematische Darstellung der NOD2-Domänen, die für Überexpressionsversuche eingesetzt wurden

CARD1 (Caspase-aktivierende und -rekrutierende Domäne 1), CARD2 (Caspase-aktivierende und -rekrutierende Domäne 2), CARDs = CARD1 und CARD2, NOD = Nukleotid-bindende Oligomerisierungs-Domäne, LRR = Leuzin-reiche Wiederholungen und N/L = NOD und LRR. Aminosäurepositionen: s. Abb. 3 und Abb. 7.

In den Tabellen 14 und 15 wurden die Konstrukte, die für Immunpräzipitations- und Überexpressions-Experimente eingesetzt wurden, mit Angabe von Vektordaten, Insert-Herkunft und -Größe sowie verwendeten Restriktionsenzymen aufgeführt (verwendete Vektoren und Restriktionsenzyme, s. Anhang; alle verwendeten Restriktionsenzyme, Enzym-Puffer und BSA waren von NEB, Bad Schwalbach).

Tab. 14: Zusammenfassung der durch Klonierung hergestellten pcDNA4-TOPO-HisMax-Konstrukte

Abkürzungen: siehe Text

Konstrukt	pcDNA4-NOD2wt	pcDNA4-CARD1	pcDNA4-CARD2	pcDNA4-CARDs	pcDNA4-NOD	pcDNA4-LRR	pcDNA4-N/L
Vektor	pcDNA4						
Resistenz	Ampicillin						
Größe	5100	5100	5100	5100	5100	5100	5100
Insert	NOD2wt	CARD1	CARD2	CARDs	NOD	LRR	N/L
Herkunft	NOD2wt						
Größe	3120	240	210	630	910	880	2300
Enzym 1	<i>Eco</i> RI						
Enzym 2	<i>Xho</i> I						
10 X Puffer	EcoR I						
BSA (+/-)	+	+	+	+	+	+	+

Tab. 15: Zusammenfassung der durch Klonierung hergestellten pEGFP- und pCEV-Konstrukte

Emmprin-IC = intrazellulärer Teil von Emmprin.

Konstrukt	pEGFP-NOD2	pEGFP-CARDs	pEGFP-Emmprin-IC	pCEV-Emmprin
Vektor	pEGFP	pEGFP	pEGFP	pCEV
Resistenz	Kanamycin	Kanamycin	Kanamycin	Ampicillin, Kanamycin
Größe	4700	4700	4700	6700
Insert	NOD2	CARDs	Emmprin-IC	Emmprin
Herkunft	cDNA	NOD2	Emmprin	cDNA
Größe	3120	630	123	810
Enzym 1	<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Xho</i> I	<i>Bam</i> HI
Enzym 2	<i>Bam</i> H I	<i>Bam</i> H I	<i>Xma</i> I	<i>Sal</i> I
10 X Puffer	BamH I	BamH I	BamH I	NEB 1
BSA (+/-)	+	+	+	+

2.3 Transfektion von Zellen

2.3.1 Transfektion von Zellen mit DNA

Alle Transfektionen wurden mit Hilfe des lipidbasierten Transfektionsreagenz FuGENE 6 (Roche, Applied Science, Mannheim) durchgeführt. Je nach Art des anschließenden Experimentes wurden unterschiedliche Zelldichten und Mengen an DNA, FuGENE 6 und Zellmedium benutzt (s. Tab. 16). Für Kotransfektionsversuche wurden die einzelnen Plasmid-Konzentrationen so gewählt, dass jeder Ansatz vergleichbare Mengen an DNA beinhaltete.

Der Ablauf der Transfektion war stets identisch: Nach Aussäen der Zellen mit einer bestimmten Zelldichte auf den entsprechenden Kulturplatten (in Vollmedium = RPMI/DMEM + 10 % (v/v) FCS, + 1 % (v/v) Pen/Strep) wurden die Zellen über Nacht inkubiert, so dass sie am Tag der Transfektion ca. 80 %ige Konfluenz zeigten. Entsprechende Mengen an DNA wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und ein zweites mit Transfektionsmedium (RPMI/DMEM ohne Serum oder Antibiotika) und FuGENE 6 vorbereitet. Hierbei war darauf zu achten, dass das Transfektionreagenz nicht in Berührung mit der Plastikwand des Gefäßes kam, sondern direkt in das Medium pipettiert wurde. Nach Invertieren des Medium/FuGENE 6-Gefäßes wurde die DNA hinzugegeben und der Transfektionsansatz für 15 min bei RT inkubiert, damit sich DNA-FuGENE 6-Komplexe bilden konnten. Nach der Inkubation wurde der Transfektionsansatz einmal invertiert und tropfenweise zu den Zellen gegeben. Es erfolgte eine 18 - 24-stündige Inkubation, wonach die Zellen geerntet wurden, bzw. das Medium erneuert und entsprechend der weiteren Versuchsplanung verfahren wurde.

Tab. 16: Zusammensetzung der verschiedenen Transfektionsansätze in Abhängigkeit von der Art des nachfolgenden Experimentes

Art des Experimentes	Ausgesäte Zelldichte (10 ⁶ /Ansatz)	Zellkulturformat	Medium im Ansatz (µl)	FuGENE 6 im Ansatz (µl)	DNA im Ansatz (µg)
Co-IP	5	10 ml-Schale	400	12	4
Stimulation für Protein- oder RNA-Isolierung	0,4	6-well-Platte	100	3	1
Dual Luciferase Assay (DLA)	0,015	96-well-Platte	50	0,15	0,05

2.3.2 Transfektion von Zellen mit siRNA

RNAi (*RNA interference*) ist ein biologischer Prozess, in welchem die Einführung doppelsträngiger RNA in eukaryotischen Zellen zu gezieltem posttranslationalem Gen-*Silencing* führt.

Hierbei werden 19-21 Nukleotide lange, meist doppelsträngige RNA-Moleküle hergestellt, die nach Einbringen in die Zelle und nach Aufspaltung dieser si (*small interfering*) RNA in ihre Einzelstränge mit dem komplementären mRNA-Strang interferieren und somit die Proteinsynthese verhindern, da nur einzelsträngige RNA-Moleküle über die Ribosomen translatiert werden können. Außerdem werden doppelsträngige RNA-Moleküle innerhalb einer gesunden Zelle degradiert. Somit kann der Prozess des *RNA-interference* sowohl auf Protein-, als auch auf RNA-Ebene nachgewiesen werden.

Die Transfektionen mit siRNA spezifisch für Emmprin wurden nach Herstellerangaben sowohl mit dem TransMessenger™ Transfection Reagent- als auch dem verbesserten RNAiFect™ Transfection-Kit von Qiagen (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Das Prinzip der Transfektion entsprach der unter 2.3.1 angegebenen DNA-Transfektion, wobei dem TransMessenger™ Transfektionsreagenz noch zusätzlich ein *Enhancer* hinzugefügt wurde, der in einem ersten Schritt in einem speziellen Puffer die RNA kondensiert, um im folgenden die Komplexbildung mit dem lipidbasierten Transfektions-Reagenz zu erleichtern. Bei der RNAiFect™ Transfektion wurde identisch zur DNA-Transfektion nur noch das Reagenz zu der entsprechend verdünnten RNA hinzugegeben. Für eine 24-well-Platte wurde pro Ansatz 1 µg siRNA verdünnt in 100 µl Medium benötigt, die darauf mit 6 µl Transfektions-Reagenz vermischt wurde und nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur tropfenweise auf die Zellen gegeben werden konnte.

2.4 Das Two-Hybrid-System in *E. coli* zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen

2.4.1 Allgemein

Die Regulation von Protein-Protein-Interaktionen spielt eine entscheidende Rolle für die meisten biologischen Prozesse. Ihre funktionelle Bedeutung erstreckt sich von der Bildung zellulärer makromolekularer Strukturen und enzymatischer Komplexe bis zur Regulation von Signaltransduktionskaskaden.

Das Two-Hybrid-System stellt genetische Lösungen zur Identifikation potentieller Interaktionen und deren Charakterisierung bereit, um Probleme bei biochemischen Methoden zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen, z. B. Schwierigkeiten bei der molekularen Klonierung oder bei der Detektion Interaktions-defekter Allele, zu umgehen (Vidal *et al.*, 1999).

Das TH-System in *E. coli* (BacterioMatch™Two-Hybrid System, Stratagene, Heidelberg) erlaubt eine schnelle, einfache und effiziente Detektion von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*, hat aber auch deutliche Vorteile gegenüber anderen TH-Screening-Methoden. Verglichen mit dem Yeast-Two-Hybrid-System eröffnet das Arbeiten mit Bakterien die Möglichkeit, größere Genbanken zu überprüfen, um somit auch gering-exprimierte Proteine zu erfassen. Die Nutzung von *E. coli* bedeutet im Ganzen eine signifikante Beschleunigung der Methode, da Bakterien wesentlich schneller als Hefen wachsen und zudem mit einer höheren Effizienz transformiert werden, wodurch man eine größere Anzahl von Interaktionen erhält. Außerdem ist die Plasmid-Isolation aus Bakterien einfach und schnell im Gegensatz zu Hefen durchführbar.

Weiterhin reduziert die Verwendung von Prokaryoten das Vorkommen eukaryotischer Homologe von einem der Interaktionspartner, wenn man einen bakteriellen Wirt verwendet. Einige eukaryotische Regulationsproteine, z. B. Zellzyklusproteine oder auch Signaltransduktionsproteine, könnten sich für Hefen toxisch auswirken, indem sie mit der Funktion homologer Proteine interferieren, was in Bakterien möglicherweise nicht erfolgt und somit weniger falsche Resultate detektiert werden. Im Gegensatz dazu könnten auch heterologe Proteine für einen *E. coli*-Wirt gefährlich werden. Ein weiterer Nachteil könnte sein, dass Prokaryoten keine posttranslationalen Modifizierungen ausführen.

Zusammengefasst steht mit dem Two-Hybrid-System in Bakterien eine wichtige experimentelle Alternative zum klassischen Hefe-System zur Verfügung. Da das System nur

auf physikalischen Bindungen basiert, kann letztlich eine breite Variation verschiedenster Protein-Protein-Interaktionen unter Verwendung eines einzigen allgemeinen Protokolls detektiert und charakterisiert werden.

2.4.2 Prinzip des BacterioMatch-Two-Hybrid-Systems

Einerseits wendet man das TH-System an, um zwei schon bekannte bzw. schon klonierte Proteine auf eine Interaktion zu testen, andererseits, um eine Genbank – deren Gene für neue oder schon klonierte Proteine kodiert – auf eine Interaktion mit einem bekanntem Köderprotein zu testen.

Das Prinzip dieser Methode basiert auf einem prokaryotischen *trans*-agierenden Transkriptionsfaktor, der aus zwei funktionell unterschiedlichen Domänen besteht, der DNA-Bindedomäne (DNA-BD) und der Aktivierungsdomäne (AD). Das System beruht auf der Tatsache, dass beide Domänen getrennt voneinander als Fusionsproteine exprimiert werden und dass eine physische Interaktion der fusionierten Zielproteine den aktiven Transkriptionsfaktor wieder rekonstruiert.

Die *DNA-Bindedomäne* (DNA-BD) bindet an spezifische Promotorsequenzen und wird von dem Köderplasmid pBT (Stratagene, Heidelberg) exprimiert (s. Abb. 10).

Die *Aktivierungsdomäne* (AD) wird von dem Zielplasmid pTRG (Stratagene, Heidelberg) exprimiert (s. Abb. 10), das die Transkription der aminoterminalen Domäne der RNA-Polymerase α -Untereinheit über eine multiple Klonierungsstelle am 3'-Ende des Gens dirigiert.

Für die Aktivierung der Reportergentranskription müssen DNA-BD und AD einen Komplex bilden. Da in diesem System die Gene der beiden Domänen aber auf unterschiedlichen Vektoren liegen, können diese – trotz Expression in einer Zelle – nicht miteinander interagieren und somit keinen aktiven Transkriptionsfaktor bilden (Ma and Ptashne, 1988; Brent and Ptashne, 1985). Diesen Umstand macht man sich zu Nutze, indem man ein Ködergen mit dem Gen für DNA-BD (auf Vektor pBT = *bait*) und die Gene einer Genbank mit dem Gen für AD (auf Vektor pTRG = *target*) fusioniert. Werden diese Fusionsprodukte transkribiert, erhält man das Zielprotein fusioniert mit DNA-BD und ein Genbank-Protein fusioniert mit AD.

Kommt es nun zur Interaktion des Köderproteins mit dem Protein aus der Genbank, gelangen BD und AD in funktionelle Nähe und aktivieren die Transkription des dahinterliegenden Reportergens (Gyuris *et al.*, 1993; Golemis *et al.*, 1994 – s. Abb. 12).

Um eine Interaktion zu identifizieren, werden verschiedene Reportergene – eine sogenannte Reportergenkassette (s. Abb. 11) - hinter den Operator geschaltet:

Carbenicillin-Resistenz-Reportergen - Nur bei Interaktion kommt es zum Wachstum auf Carbenicillin-enthaltendem Medium.

lacZ-Reportergen - Bei Interaktion entsteht neben anderen Proteinen das Galaktosehydrolysierende Enzym β -Galaktosidase, das über das sogenannte Blau-Weiß-Screening quantitativ nachweisbar ist (Sambrook and Russell, 2001).

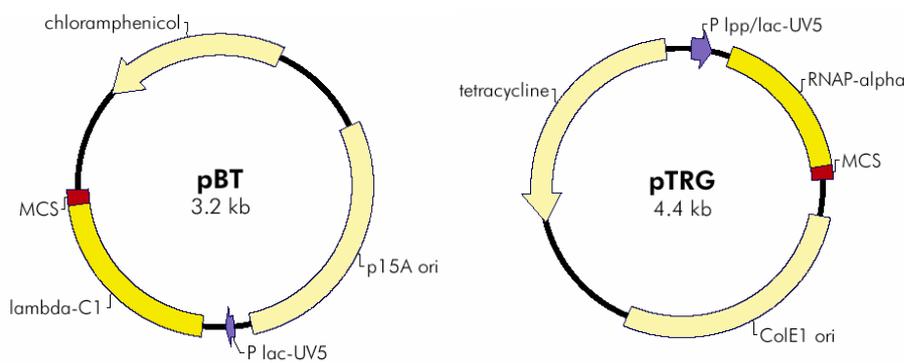


Abb. 10: Verwendete Plasmide im Two-Hybrid-System

Abk.: MCS = multiple Klonierungsstelle, ori = Replikationsursprung, P = Promotor, pBT = pBait = Köderplasmid, pTRG = pTarget = Zielplasmid. Quelle: BacterioMatch™Two-Hybrid System Instruction Manual, Stratagene, Heidelberg.

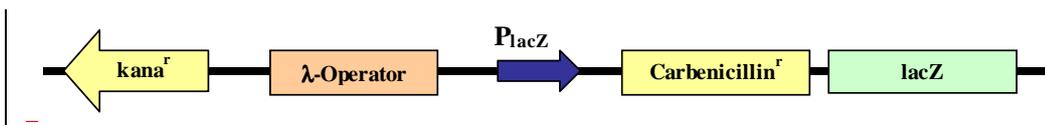
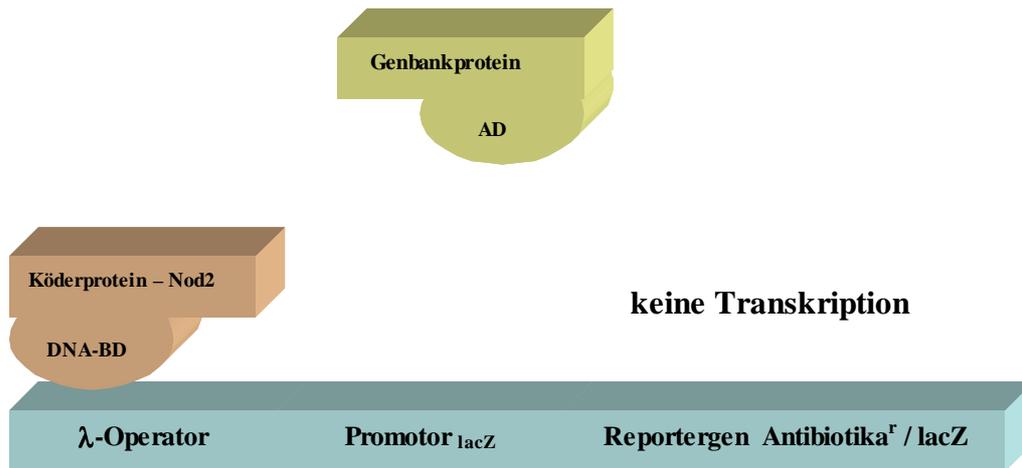


Abb. 11: Reportergenkassette des Reporterstammes

Abk.: $kana^r$ = Kanamycin-Resistenzgen, lacZ = lacZ-Reportergen, P_{lacZ} = modifizierter lacZ-Promotor. Verändert nach BacterioMatch™Two-Hybrid System Instruction Manual, Stratagene, Heidelberg.

a)



b)

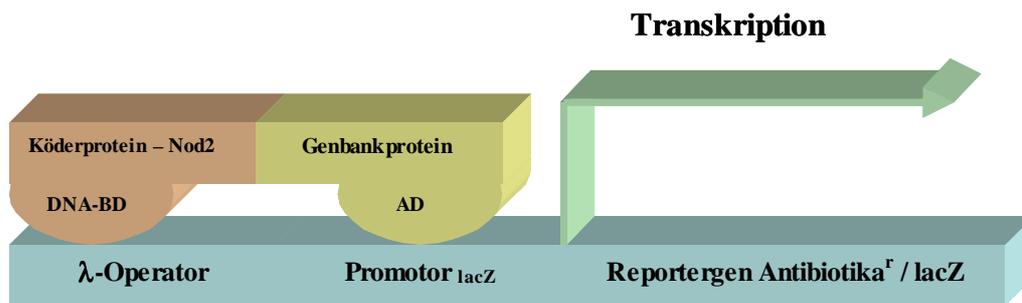


Abb. 12: Schematisches Diagramm des Two-Hybrid-Systems

- Keine Interaktion: Das DNA-BD/Köderprotein-Hybrid (λ cI-NOD2-Fusionsprodukt) bindet an den λ cI-Operator, die Transkription wird aber ohne Aktivierungsdomäne nicht aktiviert. In Abwesenheit des Zielproteins bzw. fehlender Interaktion kann das AD/Genbankprotein-Fusionsprodukt nicht an den λ cI-Operator binden, und somit auch nicht die Transkription aktivieren.
- Eine Interaktion zwischen dem Zielprotein (NOD2) und dem Genbankprotein *in vivo* aktiviert die Transkription des Reportergens. AD = Aktivierungsdomäne, DNA-BD = DNA-Bindedomäne.

2.4.3 Präparation des Köderproteins

Die Herstellung der Konstrukte für die im Two-Hybrid-System eingesetzten Köderproteine verlief wie unter 2.2.4.1 und 2.2.4.12 beschrieben.

2.4.4 Test auf Eignung des rekombinanten Köderproteins

Alle Schritte erfolgten mit Hilfe des BacterioMatch™Two-Hybrid System-Kits (Stratagene, Heidelberg) nach Herstellerangaben.

Vor dem eigentlichen *Screen* nach Interaktionspartnern von NOD2 sollte das rekombinante pBT-NOD2-Konstrukt auf Tauglichkeit im Two-Hybrid-System getestet werden, indem es zusammen mit dem nicht-rekombinanten - also Insert-freiem pTRG (pTarget-Vektor) - in den Reporterstamm transformiert wurde und nach Inkubation auf LB-CTCK-Agarplatten (C = 250 µg/ml Carbenicillin, T = 15 µg/ml Tetracyclin, 34 µg/ml Chloramphenicol und 50 µg/ml Kanamycin) keine oder nur vereinzelt Kolonien ergeben sollte. Wachstum würde bedeuten, dass das NOD2-Protein in der Lage ist, mit dem reinem Zielvektor (pTRG) zu interagieren und somit nicht zur Detektion von Interaktionspartnern verwendet werden könnte.

Abweichend zum Transformationsprotokoll – wie in 2.2.4.7 beschrieben – wurden hier 100 µl eines speziellen Two-Hybrid-Reporterstammes (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Nachdem die Bakterien langsam auf Eis aufgetaut waren, wurden 1,7 µl einer 1,42 M β-Mercaptoethanol-Lösung hinzugefügt und nach leichtem Antippen des Reaktionsgefäßes der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert, um die Transformationseffizienz der Bakterien zu erhöhen. Hierauf wurden jeweils 10 ng des pBT-NOD2-Plasmids und des pTRG-Vektors zu den Bakterien pipettiert, einmal invertiert und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgte für 45 sec bei 42°C, worauf der Transformations-Ansatz für 2 min auf Eis wieder abgekühlt und nach Zugabe von 0,9 ml vorgewärmten NZY-Medium für 1,5 h im Schüttelinkubator (Orbital Incubator SI50, VWR, Darmstadt) bei 30°C und 225 UpM inkubiert wurde. Jeweils 1 bzw. 10 µl der Test-Transformation wurden auf 100 mm-LB-CTCK-Agarplatten ausgestrichen, indem man zunächst 100 µl NZY-Medium vorlegte und daraufhin den Ansatz hinzugab. Anschließend wurden die Platten umgedreht bei 30°C für 17 - 24 h im Brutschrank (Incucell, Schröder & Henke, Wiesloch) inkubiert. Geringes Wachstum (< 10 - 20 Kolonien) nach der angegebenen Inkubationszeit veranschaulichte, dass das hergestellte Köderprotein für den Two-Hybrid-*Screen* geeignet war.

2.4.5 Amplifizierung und Aufreinigung der cDNA-Genbank

Für die Suche nach Interaktionspartnern von NOD2 wurde eine kommerziell erworbene Kolon-cDNA-Genbank (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Diese war bereits vorgefertigt amplifiziert, in den Zielvektor pTRG kloniert und anschließend in ein Derivat der superkompetenten XL1-Blue *E. coli*-Zellen (XL-1 Blue MRF^rKan) transformiert worden. Über den vom Hersteller angegebenen Titer (cfu = *colony-forming unit*/ml) der Genbank wurde das Volumen der auszuplattierenden Kultur bestimmt, um die korrekte Dichte von 20.000 – 30.000 Bakterien pro 150 mm-Agarplatte zu erhalten. Zunächst wurde die gesamte cDNA-Genbank bzw. die die Genbank tragenden Bakterien auf Eis aufgetaut und durch Invertieren sichergestellt, dass alle Bakterien vollständig resuspendiert waren. Daraufhin wurde die einzusetzende Menge berechnet, um eine Gesamtkonzentration von 1×10^6 individuellen Klonen zu ernten. Bei 1×10^6 Klonen wurden 40 150 mm-Platten benötigt, wenn man von einer Durchschnittsmenge von 25.000 Kolonien pro Platte ausging. Die berechnete Menge der Genbank-Kultur wurde in 250 µl S. O. C. /Platte, also in 10 ml S. O. C. bei 40 Platten verdünnt, um eine gleichmäßige Verteilung auf den LB-Tetracyclin-enthaltenden Agar-Platten zu gewährleisten. Die restlichen Bakterien wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Nach Inkubation der ausplattierten Genbank-Kultur für 17 – 30 h bei 30°C wurden die herangewachsenen Bakterienklone in einem gekühlten Reaktionsgefäß gepoolt. Hierzu wurden kleine Mengen Flüssigmedium auf die Platten pipettiert und anschließend alle Kolonien mit einem Gummischaber vorsichtig von den Platten abgeschabt, um diese in das vorgekühlte Gefäß zu überführen. Daraufhin wurde soviel S. O. C. -Medium hinzugefügt, um durch Pipettieren eine komplette Resuspension der gesammelten Bakterienmasse zu erhalten. Einer Hälfte der Suspension wurden 20 % einer 80 %igen (v/v) Glycerol-Lösung hinzugefügt, diese in 1 ml-Stocks aliquotiert und bei -80°C für den späteren Gebrauch gelagert. Aus der anderen Hälfte wurde mit Hilfe eines kommerziellen Plasmid-Maxi-Kits (Qiagen, Hilden; s. 2.2.4.8) die Plasmid-DNA präparativ aufgereinigt, die nun für die folgende Transformation in den Reporterstamm eingesetzt werden konnte.

2.4.6 Bestimmung der Kotransformations-Effizienz

Zur Bestimmung der Effizienz der Kotransformation von Köderplasmid und Zielvektor in 100 µl Reporterstamm-Zellen wurde zunächst eine Kotransformation von 10 ng pBT-NOD2 und 10 ng pTRG-Genbank wie in 2.4.4 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle wurden parallel zwei kommerzielle Plasmide, deren Genprodukte miteinander interagieren – pBT-LGF2 und pTRG-Gal11^P (Stratagene, Heidelberg) – kotransformiert. Nach der Inkubationsphase wurden 100 µl sowohl der Genbank- als auch der Kontroll-Transformation seriell in 1:10er Schritten mit NZY auf 1:1000 verdünnt. Hiervon wurden jeweils zweimal 100 µl auf LB-TCK-Agarplatten ausgestrichen, für 17 - 30 h bei 30°C inkubiert und die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Um die Transformations-Effizienz zu bestimmen, wurde bei einer durchschnittlich ausgezählten Kolonienmenge von 50 Kolonien folgende Formel angewendet:

$$[50 \text{ cfu}/0,1 \text{ ml}] \times [1000 \text{ (Verdünnungsfaktor)}] = 5 \times 10^5 \text{ cfu}$$

Somit konnte die Effizienz der Kotransformation der beiden Plasmide mit 5×10^5 bestimmt werden.

2.4.7 Abschätzung der Anzahl der Kotransformationen zum *Screening* der gesamten Genbank

Die Anzahl der durchzuführenden Kotransformationen wurde basierend auf der Gesamtanzahl der Kolonien, die für ein *Screening* der kompletten Genbank ($1-2 \times 10^6$) benötigt wurden, und dem Koloniertrag der Kotransformation (2.4.6) nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Anzahl der Kotransformationen} = \frac{\text{Gesamtzahl der zu screenenden Kolonien}}{\text{Kolonie-Ertrag der Kotransformation}}$$

Mit einer Gesamtzahl von 2×10^6 und dem Kolonie-Ertrag von 5×10^5 erhält man für die Kotransformationen eine Zahl von 4. Ausgehend von dieser Berechnung wurden demnach pro Genbank-*Screening* 4 Transformationsansätze durchgeführt.

2.4.8 Genbank-Screening

Entsprechend der in 2.4.7 bestimmten Anzahl wurden neben der Positiv- und Negativkontrolle 4 Kotransformationen mit 10 ng pBT-NOD2 und 10 ng pTRG-Genbank für das Genbank-Screening durchgeführt (s. 2.4.4). Da nicht mehr als 5×10^4 Kotransformanten pro 150 mm-Agar-Platte ausplattiert werden sollten, wurden die einzelnen Ansätze zunächst gepoolt und entsprechend NZY-Medium hinzugefügt, um jeweils 250 µl pro LB-CTCK-Platte auszustreichen. Insgesamt wurden 40 150 mm-Platten für das Genbank-Screening ausplattiert, um eine Gesamtzahl von 2×10^6 Kotransformanten zu untersuchen. Für die Kontroll-Transformationen wurden 1 bzw. 10 µl des jeweiligen Ansatzes, verdünnt in 250 µl NZY-Medium, auf die LB-CTCK-Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubationszeit betrug 17-24 h bei 30°C.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Ergebnisse wie in Tabelle 17 dargestellt interpretiert.

Tab. 17: Darstellung der Transformationsansätze und erwarteten Ergebnisse im Two-Hybrid-Screen

Plasmid	Erwartetes Ergebnis
<i>Positivkontrolle:</i> pBT-LGF2 und pTRG- Gal11 ^P	Die Interaktion zwischen exprimierten Gal11 ^P - und LGF2-Proteinen sollte in Wachstum auf LB-CTCK-Agarplatten resultieren.
<i>Negativkontrolle:</i> pBT-LGF2 und pTRG	Kein bzw. geringfügiges Wachstum sollte auf LB-CTCK-Agarplatten beobachtet werden (die Anzahl der Kolonien sollte ≤ 1 % im Vergleich zu der der Positivkontrolle betragen).
pBT-NOD2 und pTRG-Genbank	Kolonien auf LB-CTCK-Agarplatten deuten auf Interaktion hin; Ausbleiben von Wachstum weist auf fehlgeschlagene Interaktion oder auf zu hohe Carbenicillin-Konzentration hin.

Mutmaßlich positive Kolonien wurden auf LB-TCK-Agarplatten überführt und dienten als Ausgangspunkt für die Aufreinigung von Plasmid-DNA. Mögliche positive Klone wurden einer Verifikationsanalyse unterzogen.

2.4.9 Validierung der detektierten Protein-Protein-Interaktionen

2.4.9.1 Methode I: Transformation des isolierten Zielplasmids mit dem Ködervektor

2.4.9.1.1 Aufreinigung der Plasmid-DNA isolierter Carbenicillin-resistenter Kolonien

Für die Plasmid-Präparation wurden die auf LB-TCK-Agarplatten übertragenden Kolonien in 5 ml LB-Medium mit Tetracyclin (15 µl/ml) angeimpft und über Nacht bei 30°C und 225 - 250 UpM inkubiert. Die Zugabe von Chloramphenicol wurde bewusst unterlassen, um einen Verlust des Köderplasmids zu bewirken. Gewachsene Kulturen wurden durch Zentrifugation bei 4500 UpM (6.000 x g) (Varifuge3.0R, Heraeus, Langenselbold) für 10 min pelletiert und die DNA-Isolierung wie in 2.2.4.8 beschrieben durchgeführt. Da es sich sowohl bei dem Köder- (10 Kopien / Zelle), als auch dem Zielvektor (20 - 30 Kopien/Zelle) um sog. *low-copy-number*-Plasmide handelte, wurde ein zusätzlicher DNA-Bindungsschritt zur Anreicherung der Plasmide mit dem vom Hersteller empfohlenen pB-Puffer vorgenommen.

2.4.9.1.2 Retransformation des Reporterstammes mit isoliertem Zielplasmid in Kombination mit pBT-NOD2

Die Durchführung der Transformation erfolgte mit identischen Konzentrationen und unter gleichen Bedingungen wie im Genbank-Screening. Klone, die reproduzierbar auf LB-CTCK-Agarplatten wuchsen, wurden für die weitere Analyse verwendet.

2.4.9.1.3 Retransformation des Reporterstammes mit aufgereinigtem Zielplasmid in Kombination mit dem pBT-Plasmid

Dieser Verifikationsschritt diente dazu, eine Kategorie falscher Positiver, bei denen das Zielplasmid in der Lage ist, in der Abwesenheit des Köderproteins (pBT-NOD2) die Reporter-Expression zu aktivieren, auszuschließen. Hierzu war es notwendig, das mutmaßlich positive Zielplasmid zunächst vom rekombinanten Köderplasmid zu trennen:

Teil 1: Aufreinigung des Zielplasmids

100 ng der in 2.4.9.1.1 isolierten Plasmid-DNA wurde zur Transformation (s. 2.2.4.7) eines geeigneten *E. coli*-Stammes ohne Chloramphenicol- und Tetracyclin-Resistenz (z. B. JM109, Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Vom Transformationsansatz wurden 10 µl auf eine Tetracyclin-haltige LB-Agarplatte ausplattiert und bei 30°C für 17 - 30 h inkubiert. Von dieser Kulturplatte wurden 10 Kolonien zweifach übertragen: jede einzelne Kolonie wurde sowohl auf einer Chloramphenicol-, als auch einer Tetracyclin-enthaltenden LB-Agarplatte ausgestrichen. Kolonien, die resistent gegen Tetracyclin, aber sensitiv für Chloramphenicol waren, trugen nur das rekombinante Zielplasmid und wurden für die weitere Kultivierung und Plasmid-Isolierung genutzt.

Teil 2: Kotransformation des Reporterstammes mit rekombinanten Zielplasmid und pBT

10 ng des im 1. Teil aufgereinigtem Zielplasmid wurden mit 10 ng pBT (Köderplasmid ohne NOD2) nach 2.4.4 transformiert, jeweils 10 µl auf LB-CTCK-Agarplatten ausplattiert und bei 30°C über Nacht inkubiert. Bei der Analyse der Kulturplatten wurden für weitere Versuche die Zielplasmide ausgewählt, die kein Wachstum zeigten, was bedeutete, dass die Zielproteine nur über Interaktion mit NOD2 und nicht selbständig zur Reporter-Expression führen.

2.4.9.2 Methode II: Verifizierung der Protein-Protein-Interaktion über den β -Galaktosidase-Reporter

Der Reporterstamm enthält neben der Carbenicillin-Resistenz ein alternatives Reportergen, das β -Galaktosidase-Gen, um eine Verifizierung isolierter Zielplasmide zu erleichtern. Durch ein zweites Reportergen wurden falsch-positive Kolonien ausgeschlossen, in denen spontane Mutationen oder basale Transkription des Test-Promotors, die zu einer Carbenicillin-Resistenz ohne Köder- und Zielplasmid-Interaktion führen, vorkommen. Zur Detektion der β -Galaktosidase-Expression wurden LB-X-Gal-TCK-Agarplatten hergestellt. Diese Indikatorplatten enthielten neben Tetracyclin, Chloramphenicol und Kanamycin 80 µg/ml X-Gal und 0,2 mM β -Galaktosidase-Inhibitor (Phenylethyl- β -D-thio-Galaktosid). Der Inhibitor wurde hinzugefügt, um den Hintergrund an Blaufärbung, die vom Reporterstamm durch basale Transkription des Testpromotors produziert wurde, zu minimieren.

Die auf LB-TCK-Agarplatten gelagerten Carbenicillin-resistenten Kolonien (s. 2.4.8) wurden direkt auf X-Gal-Indikatorplatten mit sterilen Pipettenspitzen ausgestrichen, bei 37°C für

mindestens 17 h inkubiert und analysiert (s. Abb. 13 und Tab. 18). Als Positiv- bzw. Negativkontrolle dienten die in 2.4.8 gewachsenen Kolonien der Kontrollen.



Abb. 13: Beispiel einer X-Gal-Indikatorplatte mit negativen (weißen) und positiven (blauen) Klonen

Tabelle 18 beschreibt die Interpretation der Ergebnisse.

Tab. 18: Darstellung der Ergebnisse der X-Gal-Validierungs-Methode

Kolonie	Färbung
<i>Positivkontroll-Kolonie:</i>	Intensive blau Farbe
<i>Negativkontroll-Kolonie:</i>	Weißer bis Cremefarbene Kolonien
Carbenicillin-resistente Kolonien	Hellblaue bis intensiv blaufarbene Kolonien werden für weitere Untersuchungen verwendet

Um die Proteine, die von den positiven Zielplasmiden kodiert wurden, zu identifizieren, wurde die Nukleotidsequenz über Sequenzierung (s. 2.2.4.10) bestimmt und über NCBI

BLAST Search (2.7) mit bekannten Sequenzen verglichen, um so Aufschluss über die interagierenden Proteine zu erhalten.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Herstellung von Gesamtproteinlysate aus Zellen

Zellen wurden mit einer Dichte von 4×10^5 /well auf 6-well-Platten ausgesät und über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen dem Experiment entsprechend stimuliert, danach zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit Hilfe eines Gummischabers in 1 ml PBS von der Platte gelöst. Nach Ernte der Zellen durch Zentrifugation (2.000 UpM (400 x g), Tischzentrifuge Centrifuge5415 C, Eppendorf, Hamburg, 5 min, RT) wurde der Überstand verworfen und die Zellen je nach Größe des Pellets in 70 - 100 µl gekühltem Lysepuffer 1 X DLB + 1 % (v/v) 100 X Phosphatase-Inhibitor Cocktail (Sigma) + 2 % (v/v) 50 X Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma, München) resuspendiert. Nach Aufkochen der Zellen (99°C, 5 min) und Ultraschallbehandlung (Bandelin electronic UW 200, Bandelin, Berlin) (2 x 5 sec) mit zwischenzeitlicher Kühlung wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (13.200 UpM (16.000 x g), 15 min, 4°C, Sigma 3K30, Braun Biotech, Sartorius BBI Systems, Melsungen). Der Überstand (= denaturiertes Proteinlysate) wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Für Langzeitlagerung wurden die Proteinlysate bei - 20°C (einige Tage bis Wochen) oder bei - 80°C (mehrere Wochen bis Monate) aufbewahrt.

2.5.2 Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese in Anlehnung an die Methode nach Laemmli (Laemmli, 1970). Dabei wurden die Proben in einem Sammelgel (pH 6,8, 3 % (w/v) Acrylamid) fokussiert und anschließend in einem Trenngel mit geeigneter Zusammensetzung (7,5 - 15 % (w/v) Acrylamid, pH 8,8) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (s. Tab. 19).

Während der Polymerisation der Gelkomponenten wurden die Proteinproben vorbereitet, indem gleiche Proteinmengen mit 0,2 Volumen 5 X SDS-LB versetzt, kurz vor Beladen des

Gels 3 min aufgekocht und anschließend auf Eis gelagert wurden. Es wurden 10 - 20 µg/Tasche aufgetragen und zusammen mit 5 µl eines Proteingrößenmarkers (Bio-Rad Laboratories, München) elektrophoretisch aufgetrennt (Gelkammer: Multigel G44, Biometra, Göttingen). Nach einem Sammellauf von 25 min bei 15 mA pro Gel (PP 3000 High Voltage Power Pack, Biometra) wurde je nach Prozentigkeit und Größe des zu detektierenden Proteins ein Trennlauf von 45 min bis 2 h bei 30 mA pro Gel durchgeführt und anhand der Markerbanden dokumentiert.

Tab. 19: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamid-Gels

Die Zusammensetzung des Trenngels (*links*) richtete sich nach der Proteingröße des Zielproteins, das Sammelgel (*rechts*) enthielt immer 3 % (w/v) Acrylamid. Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung 30 : 0,8 (w/v) stammte von Bio-Rad, München, TEMED und APS von Sigma, München.

Proteingröße (kDa)	50-200	30-120	20-100	10-60
<i>Acrylamid</i>	7,5 %	10 %	12 %	15 %
A.bidest. (ml)	5	4,15	3,5	2,5
4X Trenngelpuffer (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5
(Bis-)Acrylamid (ml)	2,5	3,35	4	5
TEMED (µl)	10	10	10	10
10%(w/v) APS (µl)	100	100	100	100

<i>Acrylamid</i>	3 %
A.bidest. (ml)	1,95
4X Sammelgelpuffer (ml)	0,75
(Bis)Acrylamid (ml)	0,3
TEMED (µl)	3
10%(w/v) APS (µl)	30

2.5.3 Immobilisierung von Proteinen durch Elektrotransfer (Western Blot)

Für die folgende Immundetektion durch Antikörper wurden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer auf einer chemisch inerten PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach) immobilisiert (Tobwin *et al.*, 1997) Die PVDF-Membran wurde 10 sec in Methanol aktiviert, anschließend mindestens 5 min in A. bidest. äquilibriert und danach 5 min in Anodenpuffer 1 aufbewahrt. Jeweils ein Filterpapier (Whatman, Dicke 3 mm, Biometra, Göttingen) wurde für 5 min in einem der frisch angesetzten Blotpuffer (Kathodenpuffer, Anodenpuffer 1 und Anodenpuffer 2) zum Quellen belassen. Nach Ende des Gellaufs wurde das Gel aus der Blotkammer entfernt, von unpolymerisierten Gelresten gereinigt und blasenfrei mit dem Filterpapier_{Kathode} bedeckt. Der „Blot-Sandwich“ wurde nach Umdrehen des Gels durch blasenfreies Aufbringen von PVDF-Membran, Filterpapier_{Anode 1} und Filter-

papier_{Anode 2} vervollständigt. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte bei 300 W und 11 mA/cm² für 1 h mit Hilfe einer Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, München).

2.5.4 Immundetektion von Proteinen

Eine vollständige Liste der hier benutzten Antikörper mit Angaben zu Verdünnung, Ursprungsspezies und Bezugsfirmen findet sich im Anhang.

Die Detektion der immobilisierten Proteine wurde mit Hilfe spezifischer Primärantikörper und HRP-(*horseradish peroxidase*-) gekoppelter Sekundärantikörper nach dem ECL-(*enhanced chemiluminescence*) Verfahren durchgeführt.

Nach Ende des elektrophoretischen Transfers wurde die PVDF-Membran zunächst in 5 %igem (w/v) Magermilchpulver (Bio-Rad, München) in TTBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen abzublocken. Darauf erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht. Am folgenden Tag wurde die Membran zunächst

3 x 10 min in TTBS gewaschen und anschließend für 30 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 5 %igem (w/v) Magermilchpulver (Bio-Rad, München) in TTBS oder 5 % (w/v) BSA (NEB, Schwalbach) in TTBS mit einem Verdünnungsfaktor von 1:500 bis 1:2000 entsprechend den Herstellerangaben. Nach weiterem dreimaligem Waschen für je 15 - 30 min in TTBS wurde der Blot mit ECL-Reagenz-Mix (ECLTM PLUS, Amersham Biosciences, Freiburg) überschichtet und 3 min bei RT inkubiert. Nach Trocknung der Membran (3 - 4 min) erfolgte ein Belichten von Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia, Frankfurt am Main) für 45 sec - 10 min und maschinelles Entwickeln der Filme (Curix 60, GFA, Leverkusen).

Um Vergleichbarkeit der aufgetragenen Proteinmengen und gleichmäßigen Transfer der Proteine auf die Membran zu überprüfen, können die gebundenen Antikörper durch „Strippen“ von der Membran entfernt und diese bis zu dreimal zur wiederholten Immundetektion benutzt werden. Das Strippen erfolgte durch Inkubation der PVDF-Membran für 45 min bei 55°C in Stripping-Puffer, gefolgt von mehrmaligem Waschen in TTBS und Wiederholung des Inkubationsprozesses mit Antikörpern, die entweder gegen die unphosphorylierte Form des Zielproteins oder gegen ein gut charakterisiertes *house-keeping*-Gen (β -Actin, GAPDH) gerichtet waren.

2.5.5 Immunpräzipitation

Um die über das Two-Hybrid-System detektierte Interaktion zwischen NOD2 und Emmprin zu verifizieren und die exakten Domänen, die für die Bindung verantwortlich sind, zu identifizieren, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Zum Präzipitieren wurden diverse Antikörper – gerichtet gegen Emmprin und verschiedene *Tags* verwendeter Plasmide (polyklonaler goat-anti EMMPRIN K20-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg); monoklonaler anti-XPress-Antikörper (Invitrogen, Karlsruhe) und polyklonaler anti-GFP-Antikörper (Clontech, Heidelberg)) und Agarose-*Beads* mit immobilisiertem Protein A/G (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) eingesetzt.

HEK 293-Zellen – ausgesät mit einer Dichte von $5 \times 10^6/10$ ml-Schale und über Nacht kultiviert - wurden mit den Plasmiden der zu untersuchenden Interaktionspartner bzw. derer Domänen transfiziert. Nach Waschen und Sedimentieren der Zellen wurde das Zellpellet in 300 μ l eiskaltem IP-Lysepuffer mit jeweils 1 %igem (v/v) Phosphatase- und Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma, München) resuspendiert. Die Lyse erfolgte nach Zugabe von 10 μ l ProteinA/G-Agarose-*Beads* (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) unter Kühlung zunächst durch dreimaliges Vortexen der Zellen für 10 sec und anschließender Inkubation für 30 min bei 4°C mit abschließender Zentrifugation (13.200 UpM (16.000 x g), 15 min, 4°C, Sigma 3K30, Braun Biotech, Melsungen), um neben der Lyse unspezifisch bindende Proteine und Zelltrümmer aus dem Lysat zu entfernen. Daraufhin wurde den Überständen – entsprechend der gewünschten Präzipitation - 1 μ g Antikörper hinzugefügt und für 1 h bei 4°C vorinkubiert, gefolgt von einer Präzipitation über Nacht nach Zugabe von 20 μ l immobilisierter ProteinA/G-Agarose. Am folgenden Morgen wurden die Agarose-*Beads* mit den daran gebundenen Protein-Komplexen durch Zentrifugation (2.000 UpM (400 x g), 1 min, RT, Tischzentrifuge Centrifuge5415 C, Eppendorf, Hamburg) pelletiert und dreimal für 15 - 30 min in kaltem IP-Lysepuffer gewaschen. Die Elution der Proteinkomplexe erfolgte durch Zugabe von 40 μ l 2 X SDS-LB, anschließendem Aufkochen (5 min, 99°C), erneuter Zentrifugation und Abnehmen des Überstandes. Die denaturierten Proteinlysate wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und mit entsprechenden Antikörpern auf die Anwesenheit der gewünschten präzipitierten Proteine und deren kopräzipitierten Interaktionspartnern überprüft. Als Kontrolle diente Lysat ohne Antikörperkontakt bzw. Antikörper ohne Lysat-Kontakt. Für den Nachweis der Expression der verwendeten Proteine wurden vor der Präzipitation abgenommene Lysate eingesetzt.

2.5.6 Detektion von löslichen Proteinen – ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Beim ELISA wird ein für das betreffende Zielprotein spezifischer Antikörper (*coating antibody*) an eine polymere Matrix, z. B. an eine Polyvinylchloridplatte, gebunden. Zur Bildung des Antikörper-Antigen-Komplexes wird der an die Matrix gebundene Antikörper mit Zellextrakten oder Zellüberständen überschichtet. Nach der Inkubation und einem Waschschrift fügt man einen zweiten Antikörper (*detection antibody*) hinzu, der ein anderes Epitop des Antigens erkennt und wäscht nach Bindung erneut. Der zweite Antikörper ist entweder direkt mit einem Enzym, z. B. alkalischer Phosphatase oder der *horseradish*-Peroxidase, verknüpft oder aber man fügt dem Antikörper-Antigen-Antikörper-Sandwich einen Streptavidin-*horseradish*-Peroxidase-Komplex hinzu. Diese Enzyme können in hoher Geschwindigkeit ein zugegebenes Substrat zu einem farbigen Produkt umwandeln, dessen Intensität nach Abstoppen der Reaktion, bzw. nach der Inaktivierung der Enzyme, in einem Photometer gemessen werden kann. Die Intensität des Farbstoffs ist dabei proportional der Menge des zu detektierenden Proteins.

2.5.6.1 ELISA zur Detektion von sezerniertem IL-8

Zur Bestimmung der IL-8-Sekretion wurden Überstände der intestinalen Epithelzelllinie SW 620 eingesetzt. Diese waren 24 Stunden vor der Ernte mit pcDNA3.1-mock (der Insertfreien Vektorkontrolle) und pcDNA3.1-NOD2 transfiziert worden und mit MDP (10 µg/ml, Bachem, Weil am Rhein) stimuliert oder unstimuliert belassen.

Zur Detektion vom Zytokin IL-8 wurden passende Antikörperpaare sowie rekombinantes Protein zum Erstellen einer Eichkurve von der Firma R&D (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) bezogen.

In dieser Arbeit wurde ein Interleukin-8-ELISA (Human IL-8 CytoSets) von Biosource (Biosource, Solingen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Optische Dichte (OD) des Reaktionsansatzes wurde bei 450 nm mit Hilfe eines *ELISA-plate-readers* (Milenia Kinetic, DPC Biermann, Bad Nauheim) bestimmt und durch Messung der Standardkurve in absolute Konzentrationen umgerechnet. Die Ergebnisse wurden in pg Zytokin/5 x 10⁵ Zellen dargestellt. Alle Experimente wurden in 3 Parallelansätzen durchgeführt.

2.6 Reporter-gen-Assay

Genetische Reportersysteme werden weitverbreitet eingesetzt, um eukaryotische Genexpression und zelluläre Physiologie zu erforschen. Anwendbar ist das System für Studien an Rezeptoraktivitäten, Transkriptionsfaktoren, intrazellulären Signaltransduktionskaskaden, mRNA Prozessierung und Proteinfaltung. Duale Reporter werden im Allgemeinen genutzt, um experimentelle Genauigkeit zu erlangen. Der Ausdruck „Dualreporter“ bezieht sich auf die simultane Expression und Messung von zwei individuellen Reporterenzymen innerhalb eines einzelnen Systems. Dabei ist der „experimentelle“ Reporter mit dem Effekt der spezifischen Versuchskonditionen korreliert, während die Aktivität des kotransfizierten „Kontroll“-Reporters eine interne Kontrolle der basalen Reaktion bereitstellt.

Zur quantitativen Analyse der NF- κ B-Aktivierung und Aktivität der regulatorischen Sequenzen des NOD2-Promotors unter verschiedenen Stimulationsbedingungen wurde transiente Überexpression von sowohl NOD2, als auch Emmprin-Varianten, sowie NOD2-Promotorkonstrukten mit Kotransfektion von Reporter-genen verwendet. Der Reportervektor pNF- κ B-Vektors (Clontech, Heidelberg) beinhaltet das Reporter-gen *Firefly*-Luziferase (aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis*) unter Kontrolle eines Minimalpromoters mit drei NF- κ B-*consensus-Enhancer*-Elementen und setzte die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch Expression des Zielgens in Luziferase-Aktivität um. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz und der Zellvitalität wurde der Kontrollvektor pRL-TK (Promega, Mannheim) mit einem moderat konstitutiven Promoter (Thymidinkinase-Promoter) und dem davon abhängigen Luziferase-Gen des marinen Cnidariers *Renilla reniformis* benutzt.

Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen/*well* auf einer 96-*well*-Platte ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den entsprechenden Plasmiden (5 ng pcDNA3.1-NOD2wt und 5 – 20 ng pCEV-Emmprin) zusammen mit 20 ng pNF- κ B-LUC und 5 ng pRL-TK transfiziert (s. 2.3.1).

Zur Analyse der Aktivierung von MAP-Kinase-Signalwegen wurden außer dem pAPI1-LUC-Vektor (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Conaris, Kiel), der identisch zu pNF- κ B-LUC verwendet wurde, Vektoren des PathDetect® *in vivo* signal transduction pathway *trans* Reportersystem (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Dieser Reporter-genassay beinhaltet ein Fusions-Transaktivator-Plasmid, das ein Fusionsprotein exprimiert, welches als ein *trans*-agierender, Signalweg-spezifischer Transkriptionsfaktor fungiert. Dieses Fusions-*trans*-Aktivatorprotein besteht aus einer Aktivierungsdomäne des z. B. cJun-Aktivatorproteins fusioniert mit der GAL4-DNA-Bindedomäne. Phosphorylierung der Transkriptions-

Aktivierungsdomäne des Fusions-Transaktivator-Proteins aktiviert die Transkription des Luziferase-Gens des Reporterplasmid, da dessen synthetischer Promotor GAL4-Bindestellen besitzt, an die die DNA-Bindedomäne des Fusions-*trans*-Aktivatorproteins bindet. Als Fusions-Transaktivator-Plasmide wurden jeweils 8 ng pFA2-Elk1 bzw. pFA2-cJun eingesetzt und mit sowohl 15 ng Reporterplasmid pFR-Luc, als auch 2 ng pRL-TK (zur Kontrolle der Transfektionseffizienz) sowie identischer Mengen zum NF- κ B-Assays an pcDNA3.1-NOD2 und pCEV-Emmprin kotransfiziert. Nach 18 h – 24 h Inkubation wurden die Zellen in einigen Fällen für 30 min mit dem MAP-Kinase-Inhibitor PD98059 (10 μ M, Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main) vorinkubiert oder ohne Vorbehandlung mit 10 μ g/ml MDP für 6 h stimuliert, bzw. als Kontrolle unstimuliert belassen.

Hierauf wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 25 μ l 1 X PLB (Promega, Mannheim) lysiert. Die Messung der Luziferase-Aktivitäten erfolgte mit Hilfe eines MicroLumatPlus-Luminometers (Berthold, Bad Wildbad) durch automatisierte Zugabe von 75 μ l Firefly-Luziferase-Substrat (Promega, Mannheim) mit anschließender Messzeit von 10 sec, gefolgt von Zugabe von 75 μ l Stop-and-Glow-Lösung (Promega, Mannheim) und Messung für weitere 10 sec.

Als Leerkontrollen dienten untransfizierte Zellen. Die relative Luziferase-Aktivität (RLU) wurde nach Abzug der Leerkontrollwerte als Quotient aus LUC_{firefly} und LUC_{renilla} berechnet und aus den Parallelexperimenten gemittelt. Alle Experimente wurden in 3 Parallelansätzen durchgeführt.

2.7 Statistische Auswertung

Die zuvor ermittelten DNA-Sequenzen der unbekannt Genbankfragmente (s. 2.2.10) wurden mit Hilfe eines Suchalgorithmus des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) mit bereits bekannten Nukleotidsequenzen verglichen. Das Programm lieferte eine Auflistung der mit der höchsten Homologie der angegebenen Nukleotidabfolge übereinstimmenden Sequenz und einen genauen Vergleich der entsprechenden Sequenzen mit dem prozentualen Anteil der Übereinstimmungen. Mit Hilfe dieses Datenbankabgleichs sollten die unbekannt Genbankfragmente, die ursprünglich mit NOD2 eine Interaktion eingegangen waren, identifiziert werden.

Für die Literatur-Recherche wurde der Literatur-Algorithmus des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>) verwendet.

Für die statistische Auswertung der Daten wurde ein kommerzielles Tabellenkalkulationsprogramm (Excel™, Microsoft, München) verwendet. Die Ergebnisse der DLAs und ELISAs wurden als arithmetisches Mittel \pm SEM (Standardabweichung des Mittelwertes) dargestellt. Die Berechnung der Signifikanzen für Unterschiede zwischen dem NOD2-Promotor und seiner Mutanten, sowie NOD2 und NOD2 + Emmpin erfolgte mit Hilfe des doppelseitigen T-Tests für Gauss'sche Normalverteilung. Ein Signifikanzniveau mit einem p -Wert von $p < 0,05$ wurde hierbei als signifikant, $p < 0,01$ als hochsignifikant definiert.

3 Ergebnisse

3.1 Detektion der NOD2-Expression

3.1.1 Detektion der NOD2 mRNA-Expression

3.1.1.1 *NOD2 mRNA-Expression wird in intestinalen Zelllinien durch TNF- α -Stimulation verstärkt*

Verschiedene intestinale epitheliale Zelllinien (HT-29, SW620, SW948) und HeLa S3-Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume mit TNF- α (10 ng/ml) stimuliert und anschließend die Gesamt-RNA isoliert. Nach reverser Transkription wurde die DNA über RT-PCR mit Hilfe NOD2-spezifischer Primer amplifiziert und über ein Agarose-Gel analysiert.

Unbehandelte HT-29- und HeLa S3-Zellen zeigten eine geringe Menge des NOD2-Transkriptes, jedoch konnte nach 2- bis 4-stündiger TNF- α -Stimulation ein deutlicher Anstieg der NOD2 mRNA-Expression nachgewiesen werden (s. Abb. 14).

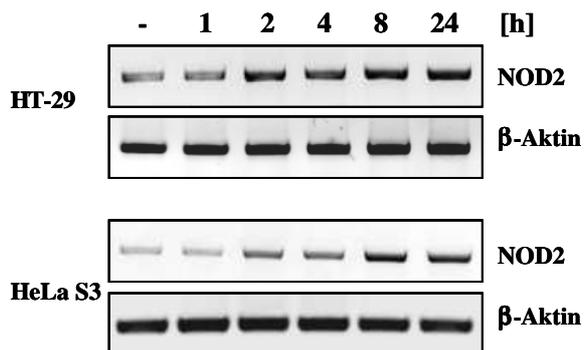


Abb. 14: Detektion von NOD2 mRNA über RT-PCR I

Stimulation von HT-29- und HeLa S3-Zellen mit 10 ng/ml TNF- α für unterschiedliche Zeiträume (0 - 24 h). Das *housekeeping*-Gen β -Aktin diente als Kontrolle.

Eine Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α (0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml und 50 ng/ml) für 20 h wies auf eine klare Dosis-Abhängigkeit dieses TNF- α -induzierten Anstiegs der NOD2 mRNA in HT-29- und HeLa S3-Zellen hin (s. Abb. 15).

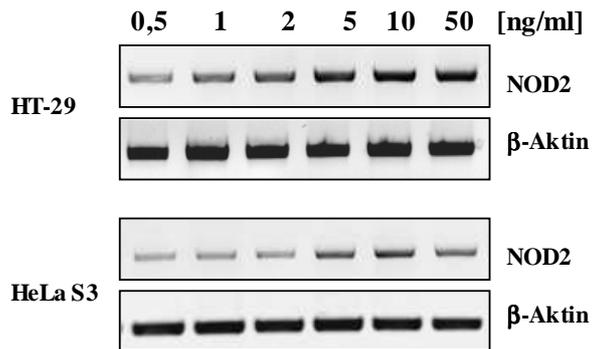


Abb. 15: Detektion von NOD2 mRNA über RT-PCR II

Stimulation von HT-29- und HeLa S3-Zellen für 20 h mit verschiedenen TNF- α -Konzentrationen (0,5 ng/ml - 50 ng/ml). Das *housekeeping*-Gen β -Aktin diene als Kontrolle.

Sowohl in der intestinalen epithelialen Zelllinie HT-29, als auch in der Cervix-Karzinomzelllinie HeLa S3 kam es zu einer deutlichen Zunahme der NOD2 mRNA-Expression bei steigenden TNF- α -Konzentrationen.

3.1.1.2 *NOD2 mRNA-Expression wird in intestinalen Zelllinien durch kombinierte TNF- α - und IFN- γ -Stimulation positiv reguliert*

Intestinale epitheliale HT-29- und HeLa S3-Zellen wurden für 20 h neben TNF- α (10 ng/ml) zusätzlich mit IFN- γ (1000 U/ml) stimuliert, die Gesamt-RNA isoliert, DNA über RT-PCR mit Hilfe NOD2-spezifischer Primer amplifiziert und über Agarose-Gel analysiert.

Die Kostimulation mit TNF- α und IFN- γ zeigte eine deutliche Verstärkung der NOD2 mRNA gegenüber der alleinigen TNF- α -Stimulation, womit der synergistische Effekt von TNF- α - und zusätzlicher IFN- γ -Behandlung auf die NOD2 mRNA-Expression nachgewiesen wurde. Eine Stimulation ausschließlich mit IFN- γ resultierte in keinem signifikanten Anstieg der NOD2 mRNA-Expression (s. Abb. 16a).

Die densitometrische Analyse der Ergebnisse verdeutlichte den signifikanten Anstieg der NOD2 mRNA-Expression nach Kostimulation mit TNF- α und IFN- γ (s. Abb. 16b).

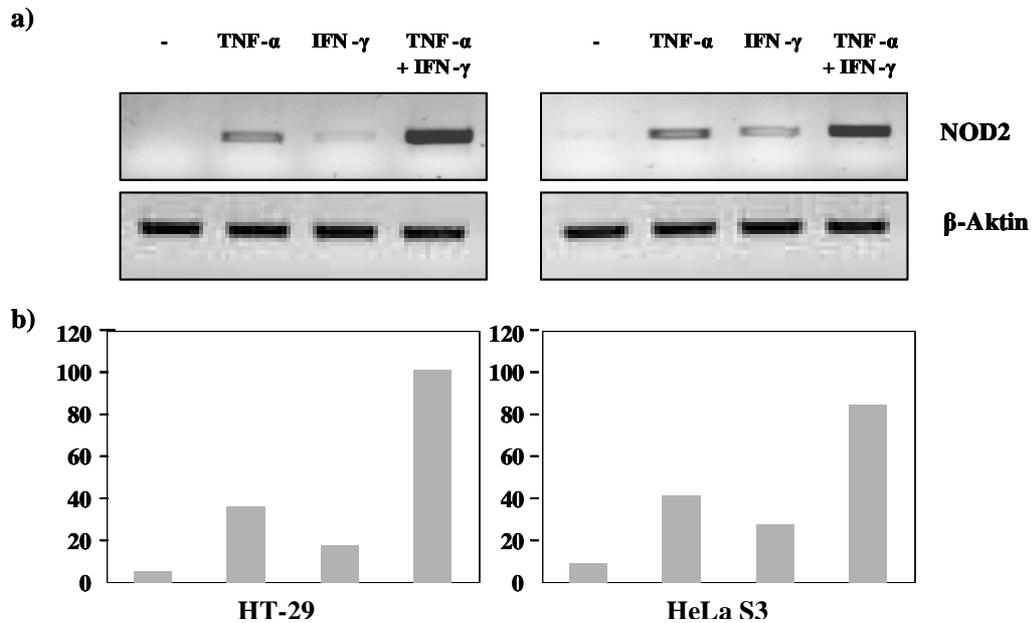


Abb. 16: Synergistischer Effekt von IFN- γ auf TNF- α -induzierte NOD2 mRNA-Expression

- a) Stimulation von HT-29- und HeLa S3-Zellen für 20 Stunden mit TNF- α (10 ng/ml) und/oder IFN- γ (1000 U/ml).
 b) Das Histogramm repräsentiert die Werte nach der densitometrischen Auswertung.

3.1.2 Detektion der NOD2-Proteinexpression

Aufgrund der Beobachtungen der NOD2 mRNA-Expression sollte überprüft werden, ob sich die bisherigen Ergebnisse auch auf die Proteinebene übertragen lassen. Hierzu wurden Western Blot-Analysen mit einem polyklonalen Antikörper gegen NOD2 durchgeführt.

3.1.2.1 Gesteigerte NOD2-Proteinexpression in intestinalen Zelllinien durch TNF- α -Stimulation

Die intestinalen epithelialen Zelllinien HT-29, SW620 und SW948 und die Cevix-Karzinom-Zelllinie HeLa S3 wurden mit TNF- α (10 ng/ml) stimuliert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Ein deutlicher Anstieg der NOD2-Proteinexpression konnte für HT-29-, SW620- und SW948-Zellen nach 8- und für HeLa S3-Zellen nach 4-stündiger Stimulation beobachtet werden (s. Abb. 17).

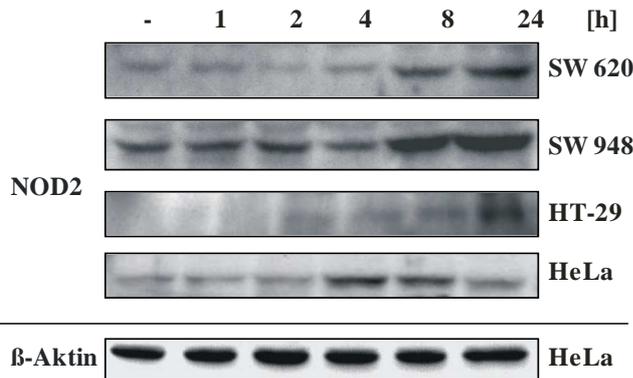


Abb. 17: Detektion von NOD2 in epithelialen Zelllinien über Western Blot-Analyse

Die Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume mit $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml) stimuliert. Einsetzen gleicher Proteinmengen wurde (exemplarisch an HeLa-Zellen abgebildet) über die zusätzliche Verwendung eines anti- β -Aktin-Antikörpers kontrolliert.

3.2 Regulation der NOD2-Expression

3.2.1 Analyse potentieller κB - und γ -Interferon-Aktivierungs- (GAS-) Bindestellen im NOD2-Promotor

Mittels bioinformatischer Analysemethoden (Genomatrix Algorithm) wurde die Existenz dreier DNA-Elemente mit starker Homologie zur NF- κB -Binde-Konsensus-Sequenz aufgedeckt. Diese Elemente liegen an Position - 674 (5'-GGGGAAGCCC-3', κB1), - 301 (5'-GGGCCTCCCC-3', κB2) und - 26 (5'-GGGAATTTCC-3', κB3) (s. Abb. 18). Da $\text{TNF-}\alpha$ als starker Aktivator des NF- κB -Signalweges bekannt ist, sollte die folgende Untersuchung zeigen, ob die Aktivierung von NF- κB und dessen Bindung an den NOD2-Promotor für die $\text{TNF-}\alpha$ -induzierte NOD2-Expression notwendig ist.

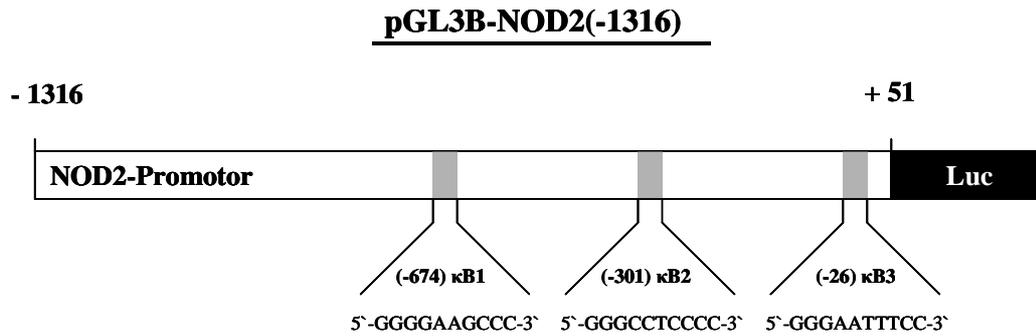


Abb. 18: Schematische Darstellung des pGL3B-NOD2(-1316)-Konstrukts mit der Lokalisation der drei potentiellen NF-κB-Bindeelemente im NOD2-Promotor

Um eine mögliche Bedeutung der homologen NF-κB-Bindestellen nachzuweisen, wurden durch zielgerichtete Mutagenese die Sequenzen so verändert, dass die Bindestellen funktionell inaktiv wurden. Im anschließenden Reporterassay zeigte der intakte NOD2-Promotor pGL3B-NOD2(-1316) eine induzierbare NF-κB-Aktivität. Die Veränderung der κB3-Stelle resultierte in einer hochsignifikanten Abnahme der TNF-α- und TNF-α-/IFN-γ-induzierten Luziferase-Aktivität. Ein schwächerer Effekt konnte für das Ausschalten der κB2-Stelle nachgewiesen werden (s. Abb. 19).

Zur Kontrolle der Spezifität des Assays zeigte eine gleichzeitige Überexpression des Superrepressors von IκB-α durch Kotransfektion des pCMV-IκB-αM-Plasmids (Clontech, Heidelberg) ebenfalls einen Rückgang induzierter NOD2-Promotor-Aktivität (s. Abb. 19).

Diese Ergebnisse lassen somit auf eine Beteiligung von NF-κB an der Regulation des NOD2-Gens durch TNF-α schließen und spiegeln gleichzeitig den TNF-α-/IFN-γ-Synergismus wider.

Gelöscht: ¶
¶

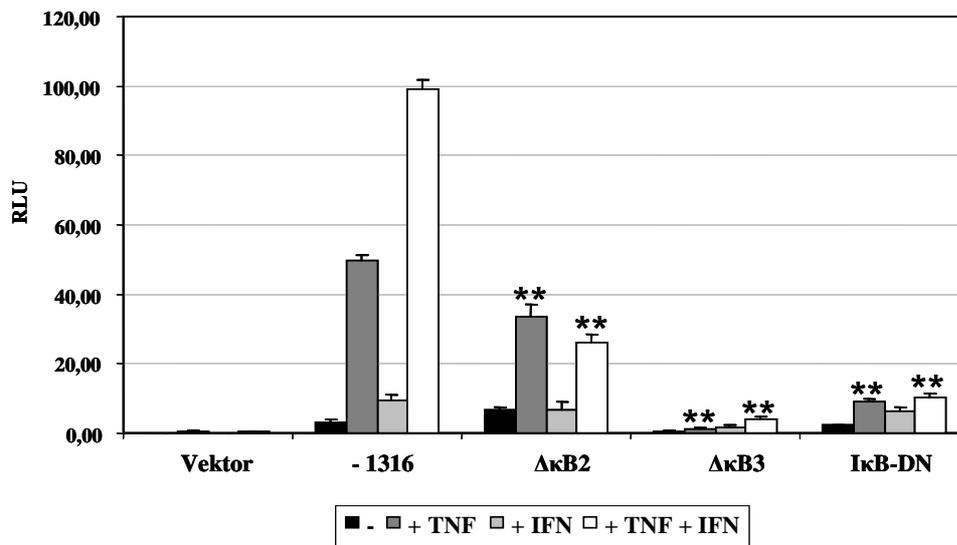


Abb. 19: Induzierbare Reporter-Gen-Aktivierung des NOD2-Promotors

HeLa S3-Zellen wurden mit dem intakten NOD2-Promotor pGL3B-NOD2(-1316), dem über Mutagenese veränderten κ B2- ($\Delta\kappa$ B2) bzw. κ B3-Element ($\Delta\kappa$ B3) und dem Superrepressor von I- κ B- α (I- κ B-DN) transfiziert, mit TNF- α - und TNF- α /IFN- γ stimuliert bzw. unstimuliert belassen und die NF- κ B-Aktivierung über Reporter-Gen-Assay nachgewiesen. HeLa S3-Zellen, die mit dem pGL3B-basic Plasmid (Insert-freier Vektor) transfiziert wurden, dienten als Negativ-Kontrolle. T-Test: ** $p < 0,01$

Im Gegensatz dazu zeigte das Ausschalten der κ -B1-Stelle eine hochsignifikante Steigerung der TNF- α - und TNF- α /IFN- γ -induzierten Luciferase-Aktivität, was vermuten lässt, dass diese Sequenz keine funktionelle NF- κ B-Bindestelle im intakten NOD2-Promotor darstellt (s. Abb. 20).

Weitere Computer-Analysen deuteten auf 2 unabhängige GAS-Bindestellen an Position - 622 (GAS1) und - 379 (GAS2) hin. Allerdings erwiesen sich diese Bindestellen im unveränderten NOD2-Promotor als nicht funktionell, da IFN- γ alleine nicht zu einer gesteigerten NOD2 mRNA-Menge führte. Eine zielgerichtete Mutagenese zum Ausschalten dieser GAS-Bindestellen unterstrich die Hypothese und zeigte hingegen einen Reduzierung sogar einen deutlichen Anstieg der TNF- α - und TNF- α /IFN- γ -stimulierten Reporter-Gen-Aktivität (s. Abb. 20).

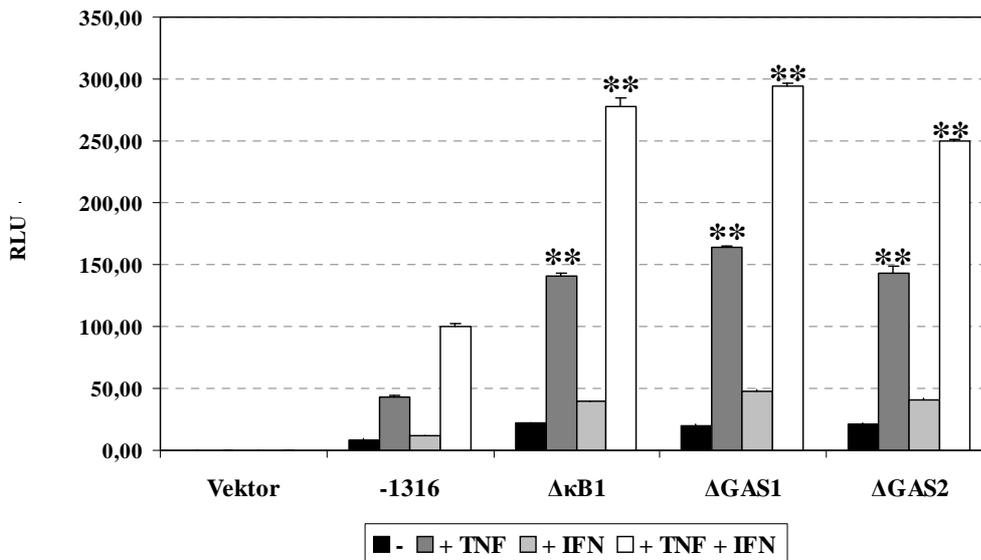


Abb. 20: Gesteigerte Reporter-gen-Aktivierung des NOD2-Promotors durch veränderte κ B1- und GAS-Elemente

HeLa S3-Zellen wurden mit dem intakten NOD2-Promotor pGL3B-NOD2(-1316), dem über Mutagenese veränderten κ B1 ($\Delta\kappa$ B1)-Element sowie veränderten putativen GAS-Bindestellen (Δ GAS1 und Δ GAS2) transfiziert, mit TNF- α - und TNF- α /IFN- γ stimuliert bzw. unstimuliert belassen und die NF- κ B-Aktivierung über Reporter-gen-assay nachgewiesen. HeLa S3-Zellen, die mit dem pGL3B-basic Plasmid (Insert-freier Vektor) transfiziert wurden, dienen als Negativ-Kontrolle. T-Test: ** $p < 0,01$.

3.3 Analyse der Rolle von NOD2 in intestinalen epithelialen Zellen

3.3.1 NOD2-Expression steigert MDP-induzierte IL-8-Sekretion in SW620-Zellen

Das hier verwendete Expressionsplasmid für NOD2 (pcDNA3.1-NOD2wt) wurde freundlicherweise von G. Nunez (Ann Arbor, Michigan, USA) zur Verfügung gestellt. Das Expressionsplasmid für die NOD2-Variante SNP13 (pcDNA3.1-NOD2-SNP13) war im Rahmen vorangegangener Studien unseres Labors hergestellt worden.

Die Überstände NOD2- und SNP13-überexprimierender SW620-Zellen wurden nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von MDP (1-10 μ g/ml) zum Nachweis für sezerniertes IL-8 im ELISA eingesetzt.

NOD2-exprimierende SW 620-Zellen zeigten deutlich gesteigerte Mengen an sezerniertem IL-8 nach Stimulation mit ansteigenden MDP-Konzentrationen. Im Gegensatz hierzu kam es sowohl in mit entsprechendem Kontrollplasmid-, als auch SNP13-exprimierenden Zellen zu keiner signifikanten Veränderung der IL-8-Sekretion nach MDP-Stimulation (s. Abb. 21).

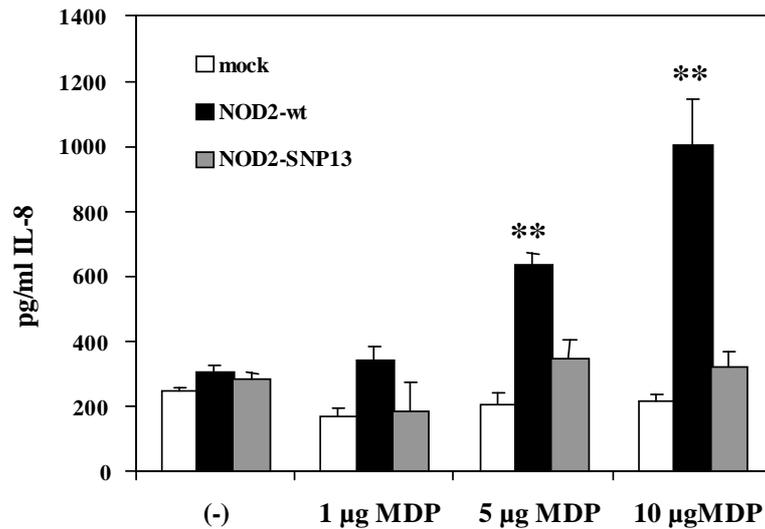


Abb. 21: IL-8-Sekretion in NOD2-überexprimierenden SW620-Zellen nach MDP-Stimulation

SW620-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden von NOD2 (pcDNA3.1-NOD2wt) und SNP13 (pcDNA3.1-NOD2-SNP13) bzw. mit dem entsprechenden Kontrollplasmid (pcDNA3.1-mock) transfiziert und nach 8 h mit verschiedenen Konzentrationen von MDP (1-10 µg/ml) für 16 h stimuliert. Die Sekretion von IL-8 wurde über ELISA detektiert. T-Test: ** $p < 0,01$.

3.4 Untersuchungen zu potentiellen Interaktionspartnern von NOD2

3.4.1 Two-Hybrid-Screening

3.4.1.1 Klonierung von NOD2wt in das Köderplasmid pBT

Die Ergebnisse zur Expression eines NOD2-DNA-Bindedomänen-Fusionsproteins wird hier anhand des Expressionskonstruktes pBT-NOD2 exemplarisch für die Herstellung anderer Konstrukte dargestellt.

Die Amplifikation der gesamten kodierenden Sequenz von NOD2 aus dem Expressionsplasmid pcDNA3.1-NOD2wt lieferte die erwartete Bande (NOD2wt) von 3120 bp (s. Abb. 22).

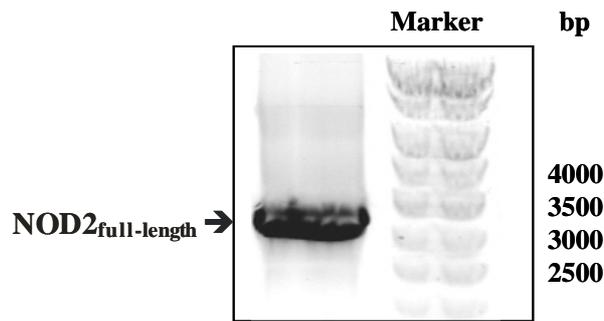


Abb. 22: Amplifizierung der kodierenden Sequenz für NOD2 aus pcDNA3.1-NOD2wt

Für die Amplifikation der kodierenden Sequenz für NOD2 aus pcDNA3.1-NOD2wt wurden sequenzspezifische Primer mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen am 5'-Ende der Oligonukleotide eingesetzt.

Nach enzymatischem Verdau (*Not I* und *Xho I*) wurden die Konzentrationen von Insert und Plasmid (NOD2_{dig} und pBT_{dig-cip}) im Vergleich zu den bekannten Konzentrationen eines DNA-Markers quantifiziert. Die geschätzten Konzentrationen betragen 25 ng/μl für NOD2_{dig} und 10 ng/μl für den Vektor pBT_{dig-cip} (s. Abb. 23).

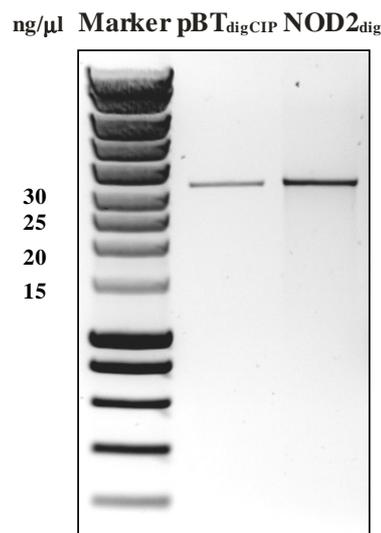


Abb. 23: Abschätzung der DNA-Konzentrationen

Die Abschätzung der DNA-Konzentrationen von Insert und Vektor erfolgte nach enzymatischem Verdau (*dig*) und Dephosphorylierung des Vektors (*cip*) mit alkalischer Phosphatase durch Vergleich mit bekannten Konzentrationen der Markerbanden.

Die anschließende Transformation und Ausplattierung lieferte für pBT-NOD2 ca. 40 – 60 Kolonien, von denen 8 Einzelklone gepickt und einer Plasmidisolierung unterzogen wurden. Mit der aufgereinigten Plasmid-DNA wurde ein Kontrollverdau durchgeführt, um das Vorhandensein des gesuchten Inserts zu überprüfen. Abweichend vom Restriktionsverdau wurden hier Enzyme gewählt, die anstelle der Gesamtlänge nur einen definierten Abschnitt des Inserts aus dem Konstrukt schneiden. Die Gründe hierfür liegen einerseits darin, dass Insert und Plasmid ähnliche Basenlängen von 3120 bp und 3200 bp aufweisen und sie daher schwer unterscheidbar sind. Andererseits ermöglicht diese Methode zusätzlich, die korrekte Orientierung des klonierten Inserts zu bestimmen.

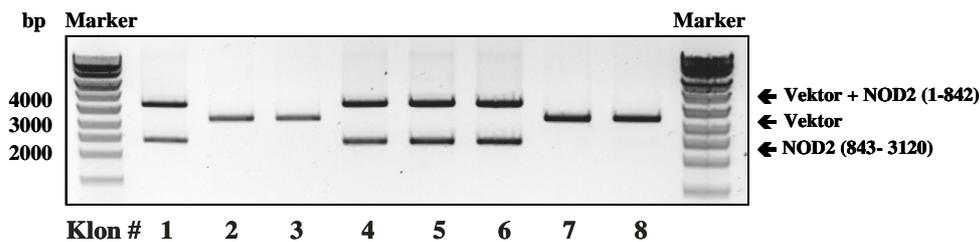


Abb. 24: Testverdau zur Identifizierung positiver Klone

Der Verdau wurde nach Isolierung der Plasmid-DNA aus gepickten Einzelklonen mit den Enzymen *SacI* und *XhoI* durchgeführt.

Die pBT-NOD2-Klone #1, #4, #5 und #6 zeigten bei enzymatischem Verdau mit *SacI* und *XhoI* die erwarteten Fragmentgrößen von 4042bp und 2278bp (s. Abb. 24) und wurden nach Sequenz-Verifizierung einer präparativen Plasmidisolierung unterzogen.

3.4.1.2 Vorversuche zur Verwendbarkeit der hergestellten pBT-Konstrukte und Transformationsmethodik

Die aufgereinigten, rekombinanten Köderplasmide (s. Tab. 13) wurden vor dem anschließenden Two-Hybrid-Screen zunächst auf ihre Tauglichkeit zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen getestet. Das Ergebnis zeigte, dass das Fusionsprotein aus DNA-Bindedomäne und NOD2 nicht vorab mit der Aktivierungsdomäne, die vom Insert-freiem Zielplasmid exprimiert wird, interagiert, womit die Köderplasmide bedenkenlos für die eigentlichen Two-Hybrid-Versuche eingesetzt werden konnten.

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz von Köder- und Zielploid konnten bei einer Verdünnung von 1:1000 eines 100 µl-Ansatzes ca. 50 Kolonien ausgezählt werden, was einer Transformationseffizienz von 50×10^5 cfu (*colony-forming units*) entsprach.

Die Anzahl der Kotransformationen wurde basierend auf der gesamten Anzahl von Kolonien, die für das *Screening* einer kompletten Genbank benötigt wurden (2×10^6), und der Effizienz der Kotransformation (5×10^5 cfu) festgelegt. Für das *Screening* der gesamten Genbank mussten demnach bei Verwendung der nachfolgenden Gleichung 4 Transformationsansätze pro Two-Hybrid-Screen durchgeführt werden:

$$\frac{\text{Gesamtzahl der zu screenenden Kolonien}}{\text{Kolonie-Ertrag der Kotransformation}} = \text{Anzahl der Kotransformationen}$$

$$\frac{2 \times 10^6}{5 \times 10^5} = 4$$

3.4.1.3 Genbank-Screening

Insgesamt konnten jeweils 400 mutmaßlich positive Klone mit NOD2wt und den CARDs, sowie je 200 Klone mit SNP13 und LRR zur weiteren Analyse detektiert werden. Die anschließende Plasmidisolierung und Sequenzierung identifizierte folgende mögliche Interaktionspartner (s. Tab. 20):

Tab. 20: Über Two-Hybrid-System identifizierte Interaktionspartner von NOD2-Varianten

Die Zielgene sind nach ihrer Häufigkeit entsprechend aller durchgeführten Two-Hybrid-Experimente aufgeführt. Abgebildet sind nur die Klone, die mindestens dreimal als Interaktionspartner von NOD2wt, SNP13, den CARDs (beide CARD-Domänen) und/oder den LRRs (Leuzinreiche Wiederholungen) auftraten.

Abkürzungen: eEF2 - eukaryotischer Translations-Elongationsfaktor 2; EMMPRIN – *extracellular matrix metalloproteinase inducer*; eEF1- γ - eukaryotischer Elongationsfaktor 1 gamma; IGg3 - Ig heavy chain constant gamma 3; eEF1- α - eukaryotischer Elongationsfaktor 1 alpha; CSRP1 – Cystein/Serin reiches Protein 1; IGFBP4 - *Insulin like growth factor binding protein 4*; ARMET - *arginine- rich, mutated in early stage tumors*; TsPK1 – *testis specific protein kinase 1*; CDX2 - *caudal type homeobox transcription factor 2*.

Two-Hybrid-Interaktionspartner					
Name	Anzahl	NOD2wt	SNP13	CARDs	LRR
eEF2	11	4	3	4	-
Prosaposin	11	9	1	-	1
Emmprin	8	3	2	3	-
Creatin Kinase B	6	1	2	1	2
eEF1- γ	6	3	-	3	-
Galectin_4	6	-	-	4	2
IGg3	6	3	-	2	1
Aldolase A	6	1	1	2	-
ATPase H+	6	2	2	2	-
Myosin 6	5	4	-	1	-
eEF1- α	5	-	1	3	1
ribosomales Protein S5	4	2	-	2	-
CSRP1	4	1	-	2	1
ribosomale S6 Kinase	3	1	-	2	-
IGFBP4	3	2	-	1	-
Desmin	3	2	-	1	-
Semaphorin	3	3	-	-	-
frizzled homolog 9	3	3	-	-	-
ARMET	3	1	-	-	2
TsPK1	3	3	-	-	-
CDX2	3	-	-	3	-

Überraschenderweise zeigte keines der durch diesen experimentellen Ansatz identifizierten potentiellen Interaktionspartner strukturelle Ähnlichkeiten zum NOD2-Protein, wie z. B. CARD-Domänen oder Leuzinreiche Regionen. Unter den am häufigsten detektierten Bindungspartnern wurde Emmprin ausgewählt, um die Interaktion mit NOD2 zu verifizieren und charakterisieren. Emmprin induziert die Expression von Matrixmetalloproteinasen, deren Bedeutung in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, im Speziellen in M. Crohn beschrieben werden konnte (Pender *et al.*, 1997; Pender *et al.*, 1998). Anhand des Two-Hybrid-Screens konnte eine Interaktion mit der M. Crohn-assoziierten NOD2-Variante SNP13 nachgewiesen werden, die mit der unmutierten LRR-Region ausblieb, und somit auf eine interessante Funktion hinweisen könnte. Weiterhin wurden mehrere Interaktionen von Emmprin mit den CARDS nachgewiesen, die für die Bindung an RICK und die RICK-abhängige NOD2-vermittelte NF- κ B-Aktivierung essentiell sind, was auf eine Funktion von Emmprin innerhalb des NOD2-Signalgeschehens hindeuten könnte.

3.4.2 Immunpräzipitations-Analysen von NOD2 und Emmprin

Die im Two-Hybrid-System identifizierte Interaktion von Emmprin mit den unterschiedlichen NOD2-Varianten sollten mit Immunpräzipitations-Experimenten verifiziert werden.

3.4.2.1 *Emmprin interagiert mit NOD2 und SNP13*

Endogen exprimiertes Emmprin wurde mit einem polyklonalen anti-Emmprin-Antikörper in NOD2- und SNP13- überexprimierenden HEK 293-Zellen immunpräzipitiert.

Sowohl kopräzipitiertes NOD2-Protein, als auch SNP13-Protein konnten in der folgenden Western Blot-Analyse mit polyklonalem anti-NOD2-Antikörper detektiert werden. Für die NOD2-Variante SNP13 konnte in der Immunpräzipitation nur eine schmale Bande nachgewiesen werden, was auf eine schwächere Interaktion mit Emmprin gegenüber dem Wildtyp hindeutet. Allerdings erfolgte auch in den Lysaten eine geringere Expression von SNP13 als NOD2, was zusätzlich eine Erklärung für die abgeschwächte Interaktion sein könnte (s. Abb. 25).

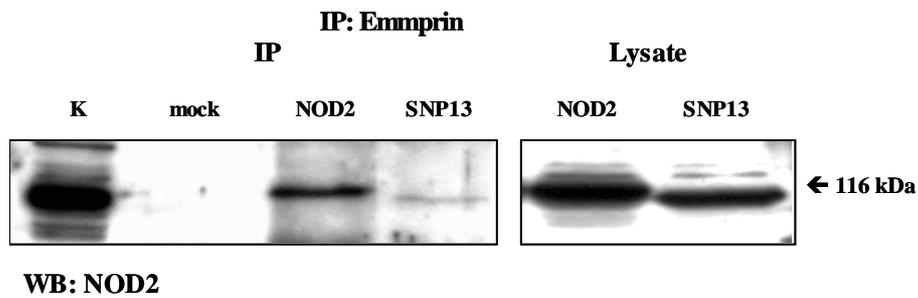


Abb. 25: Nachweis der Interaktion zwischen Emmprin und NOD2 über Immunpräzipitation

HEK 293-Zellen wurden mit den Konstrukten pcDNA3.1-mock, pcDNA3.1-NOD2wt (NOD2) und pcDNA3.1-NOD2-SNP13 transfiziert (mock = Insert-freier Vektor = Negativkontrolle, K = Positivkontrolle). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und mit einem polyklonalen anti-Emmprin-Antikörper, der gegen den intrazellulären Teil Emmprins gerichtet ist, immunpräzipitiert. Die anschließende Detektion erfolgte mittels Western Blot-Analyse mit einem polyklonalen anti-NOD2-Antikörper.

3.4.2.2 *Emmprin interagiert mit den CARDS*

Um die im *Two-Hybrid-Screen* identifizierte Interaktion von Emmprin und den beiden CARD-Domänen über Immunpräzipitation zu bestätigen, wurden GFP-(*green fluorescent protein*-) Fusionsproteine des Wildtyps und der CARDS für die Transfektion eingesetzt und wie unter 3.4.2.1 vorgegangen.

Sowohl der Wildtyp (NOD2), als auch die beiden CARD-Domänen (CARDS) wurden gebunden an Emmprin kopräzipitiert und konnten anhand der anschließenden Western Blot-Analyse über einen anti-GFP-Antikörper detektiert werden (s. Abb. 26).

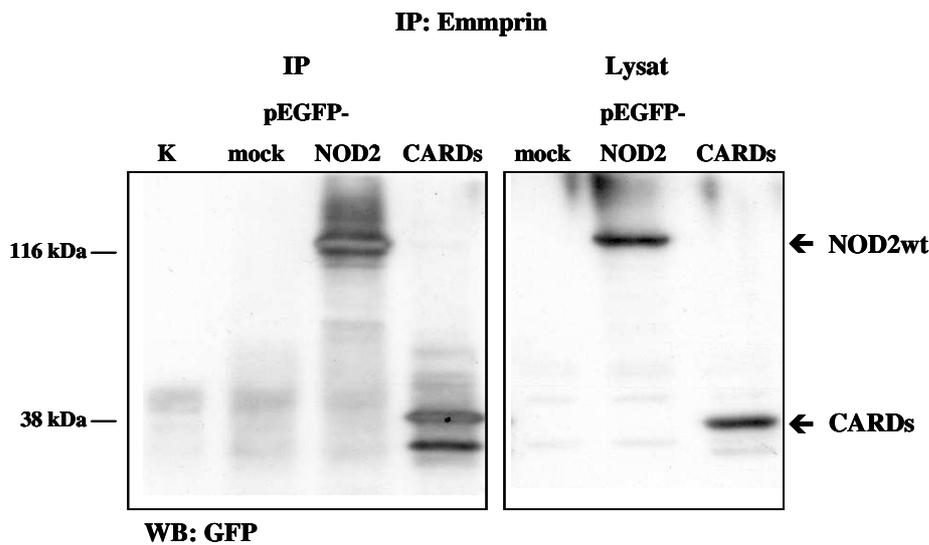


Abb. 26: Nachweis der Interaktion zwischen Emmprin und NOD2 sowie den CARDs über Immunpräzipitation

Gelöscht: ¶

HEK 293-Zellen wurden mit den Konstrukten pEGFP-mock, pEGFP-NOD2 und pEGFP-CARDs transfiziert, 24 Stunden nach Transfektion lysiert und mit einem polyklonalen anti-Emmprin-Antikörper immunpräzipitiert. K: Kontrolle, Lysat ohne Antikörper-Kontakt. Die anschließende Detektion erfolgte über Western Blot-Analyse mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper.

3.4.2.3 *Emmprin interagiert mit endogenem NOD2*

Um die Interaktion unter Bedingungen zu testen, bei denen beide Proteine nicht durch Transfektion exogen überexprimiert worden waren, wurden Monozyten-ähnliche THP-1-Zellen, in denen endogene NOD2-Expression beschrieben wurde (Ogura *et al.*, 2001a), verwendet. Es zeigte sich, dass auch unter diesen Bedingungen eine Interaktion von Emmprin mit NOD2 erfolgte.

Konstitutiv exprimiertes NOD2 zeigt in THP-1 Zellen eine Doppelbande für NOD2 und liegt somit in zwei unterschiedlichen Isoformen vor. Trotz der verwendeten hohen Zellzahl ($1,5 \times 10^7$) wurde NOD2 nur gering exprimiert, was die schwachen Banden im Lysat verdeutlichen. Im Anschluss an die Detektion wurde mit dem anti-Emmprin-Antikörper endogen exprimiertes Emmprin nachgewiesen (s. Abb. 27).

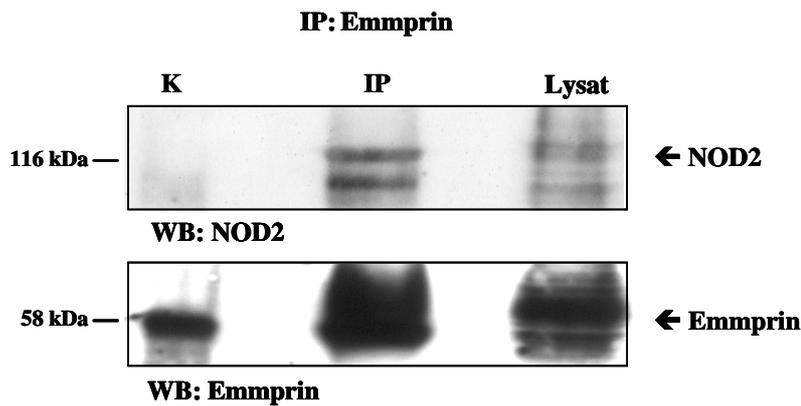


Abb. 27: Nachweis der Interaktion zwischen endogen exprimiertem NOD2 und Emmprin in THP-1-Zellen

24 Stunden nach Aussaat von $1,5 \times 10^7$ THP-1-Zellen wurden diese lysiert, Emmprin mit anti-Emmprin-Antikörper immunpräzipitiert und sowohl NOD2, als auch Emmprin über Western Blot-Analyse mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. K: Kontrolle, Lysat ohne Antikörper-Kontakt.

3.4.2.4 Die CARD-Domänen binden an Emmprin

Zur Identifizierung der exakten Proteindomäne von NOD2, die mit Emmprin interagiert, wurden CARD1, CARD2, beide CARD-Domänen, die NOD- und die LRR-Region, kloniert in einen Expressionsvektor mit XPress-Tag (pcDNA4-TOPOHisMax), für Immunpräzipitations-Experimente eingesetzt. In der anschließenden Western Blot-Analyse wurde der anti-XPress-Antikörper verwendet.

Während sich weder eine Interaktion der ersten (C1) und zweiten CARD-Domäne (C2), noch der zentralen NOD-Domäne (NOD) und der LRR-Region (LRR) mit Emmprin nachweisen ließ, zeigte sich die beobachtete Interaktion nur bei vollständiger Expression beider CARD-Domänen (CARDs) (s. Abb. 28, links).

Die Analyse der Lysate ergab zudem, dass die Überexpression aller eingesetzten XPress-Konstrukte erfolgreich nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 28, rechts).

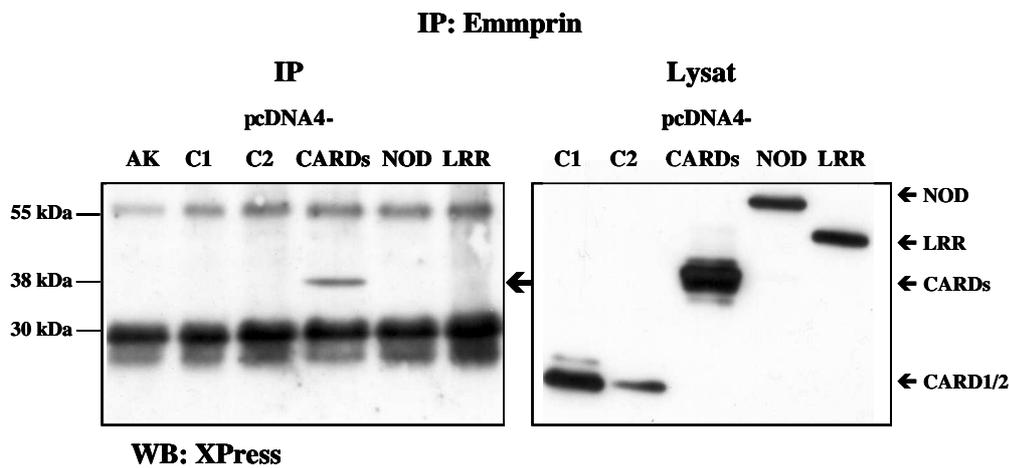


Abb. 28: Nachweis der Interaktion zwischen Emmprin und unterschiedlichen NOD2-Domänen über Immunpräzipitation

HEK 293-Zellen wurden mit den Konstrukten pcDNA4-mock (mock), pcDNA4-CARD1 (C1), pcDNA4-CARD2 (C2), pcDNA4-CARDs, pcDNA4-NOD und pcDNA4-LRR transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und mit einem polyklonalen anti-Emmprin-Antikörper immunpräzipitiert. AK: Kontrolle, Antikörper ohne Lysat-Kontakt. In der anschließenden Western Blot-Analyse wurden die NOD2-Domänen anhand des monoklonalen XPress-Antikörpers detektiert. Die Banden bei 55 und 30 kDa verdeutlichen die schwere und leichte Ig-Kette des Antikörpers.

3.4.2.5 Die CARD-Domänen binden an den intrazellulären Teil von Emmprin

Nachdem bewiesen werden konnte, dass für die Interaktion von NOD2 und Emmprin beide CARD-Domänen essentiell sind, sollte in diesem Versuchsansatz überprüft werden, welcher Bereich von Emmprin mit NOD2 interagiert. Hierzu wurde ein Fusionsprotein, bestehend aus GFP und dem intrazellulären Bereich von Emmprin (Aminosäuren 687 bis 810) zusammen mit den einzelnen NOD2-Domänen in HEK 293-Zellen überexprimiert, mit Hilfe eines GFP-Antikörpers präzipitiert und über Western Blot-Analyse mit XPress-Antikörper detektiert (s. Abb. 29).

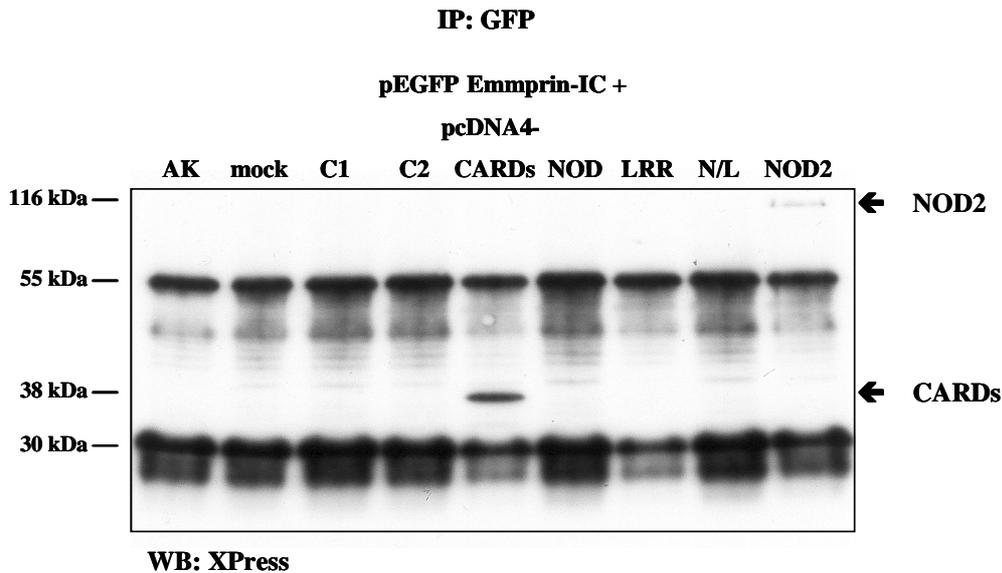
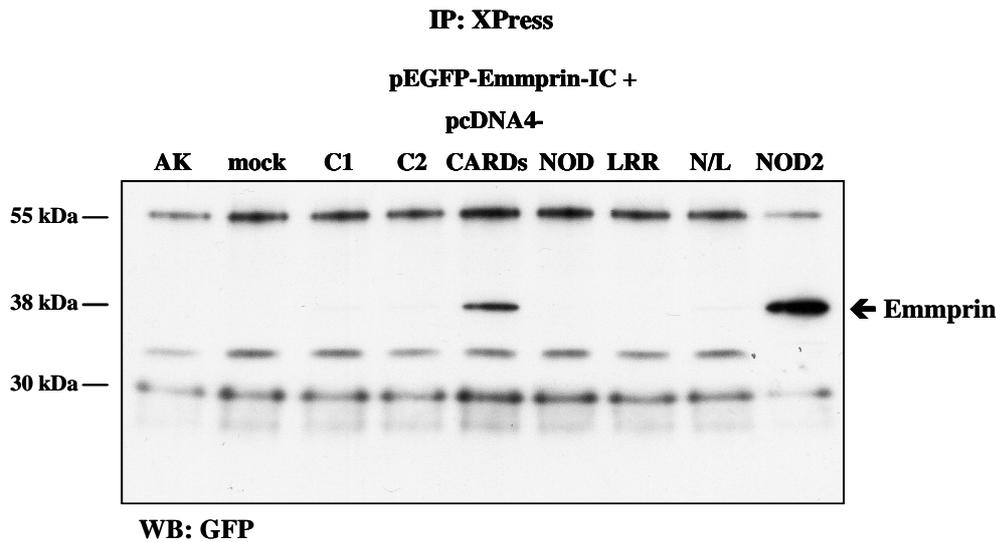


Abb. 29: Nachweis der Interaktion zwischen dem intrazellulären Teil von Emmprin und unterschiedlichen NOD2-Domänen über Immunpräzipitation mit GFP-Antikörper

HEK 293-Zellen wurden mit pEGFP-Emmprin-IC (einem GFP-Protein- und intrazellulärem Teil von Emmprin-Fusionsprodukt) und jeweils einem der Konstrukte pcDNA4-mock (mock), pcDNA4-CARD1 (C1), pcDNA4-CARD2 (C2), pcDNA4-CARDs, pcDNA4-NOD, pcDNA4-LRR, pcDNA4-NOD/LRR (N/L) und pcDNA4-NOD2wt (NOD2) kotransfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und der intrazelluläre Teil von Emmprin als GFP-IC-Fusionsprodukt mit einem monoklonalem anti-GFP-Antikörper immunpräzipitiert. AK: Kontrolle, Antikörper ohne Lysat-Kontakt. Die anschließende Detektion erfolgte über Western Blot-Analyse mit dem monoklonalem anti-XPress-Antikörper. Die Banden bei 55 und 30 kDa verdeutlichen die schwere und leichte Ig-Kette des Antikörpers.

Wie in Abbildung 29 dargestellt, wurden für die Interaktion wiederum beide CARD-Domänen von NOD2 benötigt, um an den intrazellulären Teil von Emmprin zu binden, während sowohl für die CARD1-, CARD2-, als auch die NOD- und LRR- Domäne und das Konstrukt aus NOD und LRR (N/L) keine Interaktion nachgewiesen werden konnte.

Um zu überprüfen, ob die Wahl der Antikörper-Reihenfolge einen Einfluss auf die Interaktion ausüben würde, wurden in einer weiteren Immunpräzipitations-Analyse zunächst die NOD2-Konstrukte mit Hilfe eines anti-XPress-Antikörpers präzipitiert und eine Bindung des Fusionsproteins aus GFP und intrazellulärem Emmprin über den GFP-Antikörper nachgewiesen. Es zeigte sich, dass bei Präzipitation der NOD2-Varianten, sowohl die Interaktion der beiden CARD-Domänen, als auch des gesamten NOD2wt-Proteins mit Emmprin bzw. dessen intrazellulären Teils verifiziert werden konnte.



Gelöscht: ¶

Abb. 30: Nachweis der Interaktion zwischen dem intrazellulären Teil von Emmprin und unterschiedlichen NOD2-Domänen über Immunpräzipitation mit XPress-Antikörper

HEK 293-Zellen wurden mit pEGFP-Emmprin-IC (einem GFP-Protein- und intrazellulärem Teil von Emmprin-Fusionsprodukt) und jeweils einem der Konstrukte pcDNA4-mock (mock), pcDNA4-CARD1 (C1), pcDNA4-CARD2 (C2), pcDNA4-CARDs, pcDNA4-NOD, pcDNA4-LRR, pcDNA4-NOD/LRR (N/L) und pcDNA4-NOD2wt (NOD2) kotransfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und pcDNA4-Konstrukte mit einem monoklonalen anti-XPress-Antikörper immunpräzipitiert. AK: Kontrolle, Antikörper ohne Lysat-Kontakt. Die anschließende Detektion des intrazellulären Teils von Emmprin als GFP-IC-Fusionsprodukt erfolgte über Western Blot-Analyse mit dem monoklonalen anti-GFP-Antikörper. Die Banden bei 55 und 30 kDa verdeutlichen die schwere und leichte Ig-Kette des Antikörpers.

3.5 Untersuchungen der funktionellen Bedeutung der NOD2-Emmprin-Interaktion

Um die Funktion der Interaktion von Emmprin und NOD2 zu charakterisieren, wurde zunächst über *RNAi*-Experimente mehrfach versucht, die mRNA- und Proteinexpression von Emmprin auszuschalten, um sicherzustellen, dass nur ein Effekt bei *in vitro*-Kotransfektion von Emmprin auf die Funktion von NOD2 ausgeübt werden kann. Trotz Ausschöpfung aller anwendbarer siRNA-Nukleotide, gelang es weder auf mRNA-, noch auf Protein-Ebene, die Emmprin-Expression deutlich zu vermindern oder gar auszuschalten. Daher wurde in den folgenden Versuchen neben der klassischen Laborzelllinie HEK 293 zur Untermauerung der Ergebnisse CHO- (*chinese hamster ovary*-) Zellen verwendet. Western Blot-Analysen bestätigten den Befund aus früheren Veröffentlichungen (Guo *et al.*, 1997), dass diese Zelllinie keine nachweisbare endogene Emmprin-Expression aufweist.

Die unterschiedlichen Proteingrößen deuten auf verschiedene Glykolysierungszustände des Emmprins in den untersuchten Zelllinien hin.

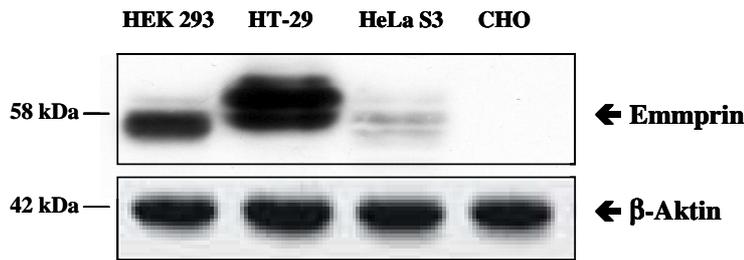


Abb. 31: Nachweis der Emmprin-Expression in unterschiedlichen Zelllinien

Lysate verschiedener Zelllinien wurden sowohl mit einem monoklonalen anti-Emmprin-Antikörper gegen den extrazellulären Teil, als auch mit dem für die Immunpräzipitationen verwendeten polyklonalen Antikörper gegen den intrazellulären Teil von Emmprin untersucht. In beiden Fällen wurde in CHO-Zellen keine Emmprin-Expression nachgewiesen. Abgebildet ist die Detektion über Western Blot-Analyse mit monoklonalem Antikörper. Einsetzen gleicher Proteinmengen wurde über die zusätzliche Verwendung eines anti-β-Aktin-Antikörpers kontrolliert.

3.5.1 Einfluss von Emmprin auf die NOD2-induzierte NF-κB-Aktivierung

Im Folgenden sollte anhand von Reportergen-Assays und Phosphorylierungs-spezifischer Immunoblots die Aktivierung des NF-κB-Signalweges nach Stimulation der Zellen mit MDP untersucht werden. Hierbei sollte die Rolle der NOD2-Emmprin-Interaktion näher analysiert werden.

3.5.1.1 Dosis-Abhängigkeit des inhibierenden Effekts von Emmprin auf die NOD2-induzierte NF-κB-Aktivierung

Um den Einfluss von Emmprin auf die MDP-stimulierte Induktion der NF-κB-Aktivierung durch NOD2 zu untersuchen, wurde ein Reportergen-Assay mit NF-κB-abhängigem Reporter gen durchgeführt.

Hierzu wurden HEK 293-Zellen mit NOD2 (5 ng) und unterschiedlichen DNA-Konzentrationen von Emmprin (5 – 20 ng) transfiziert, nach 18-stündiger Inkubation für weitere 6 Stunden mit 10 µg/ml MDP stimuliert bzw. als Kontrolle unstimuliert belassen und die Luziferase-Aktivität gemessen (s. Abb. 32).

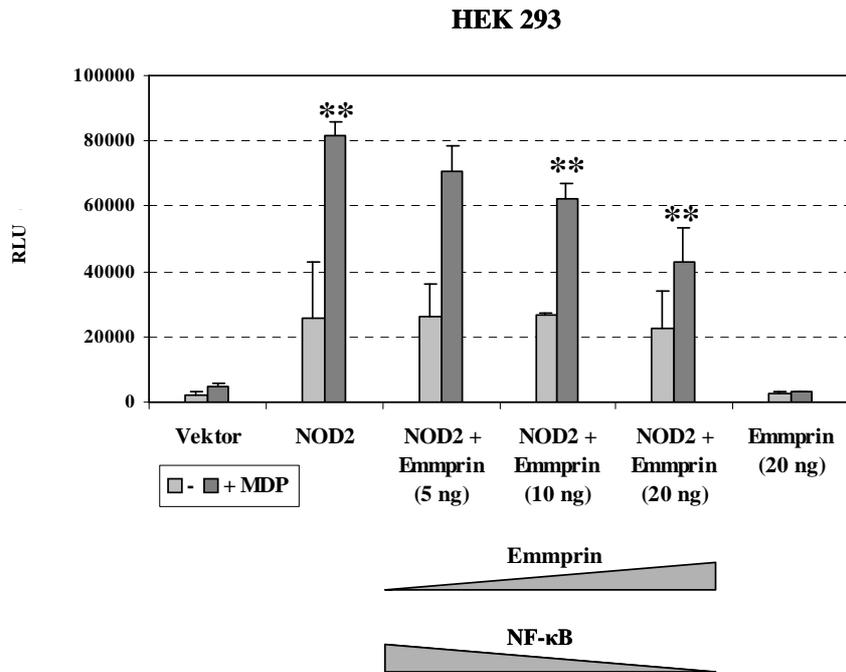


Abb. 32: Dosis-abhängige Hemmung der NOD2-induzierten NF-κB-Aktivierung durch Emmprin

HEK 293-Zellen wurden sowohl mit dem Kontrollvektor (Vektor), mit 5 ng NOD2 und 20 ng Emmprin transfiziert, als auch mit NOD2 und unterschiedlichen Konzentrationen von Emmprin (5 – 20 ng) kotransfiziert und nach 18-stündiger Inkubation für weitere 6 h mit 10 µg/ml MDP stimuliert bzw. als Kontrolle unstimuliert belassen. Die NF-κB-Aktivierung wurde über Reporterassay nachgewiesen. Der Einsatz gleicher Plasmid-Mengen wurde über Kotransfektion des Kontrollvektors gewährleistet. T-Test: ** $p < 0,01$ für NOD2 (-/+ MDP), ** $p < 0,01$ für NOD2 gegen NOD2 + Emmprin.

Es konnte in HEK 293-Zellen ein deutlicher Anstieg der NF-κB-Aktivierung um den Faktor 17 in NOD2-exprimierenden Zellen nach MDP-Stimulation im Vergleich zur Vektorkontrolle nachgewiesen werden, was in guter Übereinstimmung mit den bisher veröffentlichten Daten steht (Ogura *et al.*, 2001a; Inohara *et al.*, 2003b). In unstimulierten NOD2-exprimierenden Zellen zeigte sich eine Basalaktivität von NF-κB, was übereinstimmend mit Beobachtungen in früheren Veröffentlichungen (Ogura *et al.*, 2001a) auf eine Überexpression von NOD2 zurückzuführen ist. Da diese Aktivierung in allen NOD2-exprimierenden Zellen nahezu identisch war, konnte sie in Hinsicht des Einflusses von Emmprin auf die NOD2-vermittelte NF-κB-Aktivierung vernachlässigt werden.

Die Koexpression von NOD2 und Emmprin resultierte nach MDP-Stimulation in einer hochsignifikanten dosis-abhängigen Inhibition der NOD2-induzierten NF-κB-Aktivierung

durch Emmprin. Bei steigenden Emmprin-DNA-Konzentrationen von 5 – 20 ng wurde der Einfluss von Emmprin kontinuierlich stärker, was sich in einer Verminderung der NF- κ B-Aktivierung darstellte. Emmprin-transfizierte Zellen zeigten keine Induzierung von NF- κ B.

Je nach Transfektionsansatz wurde zusätzlich die entsprechende Menge des Insert-freien Vektors kotransfiziert, um den Einsatz identischer Plasmid-Mengen pro Ansatz und Versuch zu gewährleisten.

3.5.1.2 Inhibierender Effekt von Emmprin auf die NOD2-induzierte NF- κ B-Aktivierung in CHO-Zellen

Zur Kontrolle des beschriebenen inhibierenden Effekts von Emmprin auf die MDP-stimulierte Induktion der NF- κ B-Aktivierung durch NOD2 wurde der Reporter-gen-Assay mit NF- κ B-abhängigem Reporter-gen in CHO-Zellen durchgeführt, um sicherzustellen, dass nur ein Effekt bei *in vitro*-Kotransfektion von Emmprin auf die Funktion von NOD2 ausgeübt wird.

Hierzu wurden die CHO-Zellen mit 5 ng NOD2 und 20 ng Emmprin transfiziert, mit 10 μ g/ml MDP stimuliert und bezüglich der Luziferase-Aktivität gemessen. Der Einsatz gleicher Plasmid-Mengen wurde wiederum über Kotransfektion der entsprechenden Mengen des Kontrollvektors gewährleistet.

Die zur Kontrolle der Ergebnisse verwendeten CHO-Zellen (s. Abb. 33) zeigten ein ähnliches Bild wie die HEK 293-Zellen (s. Abb. 32). Aufgrund der schlechteren Transfektionseffizienz wurden allerdings wesentlich geringere Werte für die Luziferase-Aktivitäten erzielt. In unstimulierten Zellen wurde eine relativ hohe basale NF- κ B-Aktivierung nachgewiesen, die sich allerdings in allen Transfektionsansätzen widerspiegelte, und somit vernachlässigbar war. MDP-stimulierte NOD2-transfizierte Zellen zeigten eine um den Faktor 2 gesteigerte NF- κ B-Aktivierung im Gegensatz zu unstimulierten Zellen. Der hemmende Effekt von Emmprin war trotz der geringeren Gesamtaktivierung signifikant und führte zu einer nahezu vollständigen Inhibition der NF- κ B-Aktivierung.

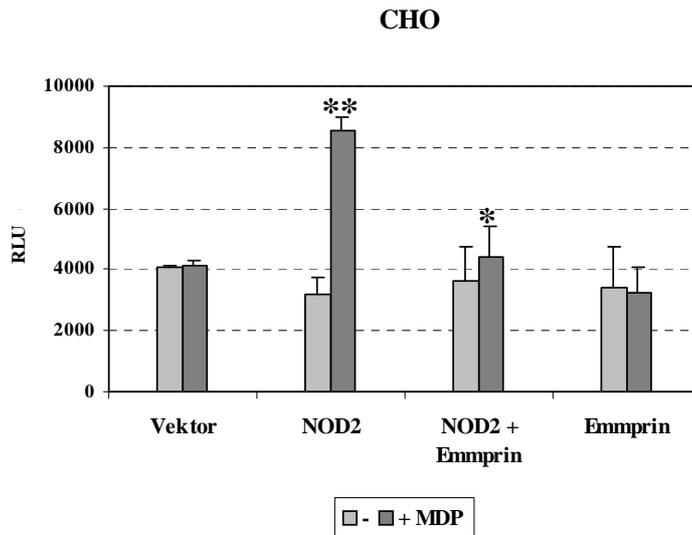


Abb. 33: Reporter-gen-Assay zur Bestimmung der NF- κ B-Aktivierung in CHO-Zellen

CHO-Zellen wurden sowohl mit dem Kontrollvektor (Vektor), mit 5 ng NOD2 und 20 ng Emmprin transfiziert, als auch mit NOD2 und Emmprin kotransfiziert und nach 18-stündiger Inkubation für weitere 6 h mit 10 μ g/ml MDP stimuliert bzw. als Kontrolle unstimuliert belassen. Die NF- κ B-Aktivierung wurde über Reporter-gen-assay nachgewiesen. Der Einsatz gleicher Plasmid-Mengen wurde über Kotransfektion des Kontrollvektors gewährleistet. T-Test: ** $p < 0,01$ für NOD2 (-/+ MDP), * $p < 0,05$ für NOD2 gegen NOD2 + Emmprin.

3.5.1.3 Einfluss von Emmprin auf die NOD2-vermittelte NF- κ B-Aktivierung: Phosphorylierung von I κ B- α

Zusätzlich zum Reporter-gen-Assay sollte über eine Western Blot-Analyse der negative Einfluss von Emmprin auf die NOD2-vermittelte NF- κ B-Aktivierung bestätigt werden. Hierfür wurden HEK 293-Zellen mit Kontrollplasmid (mock) und mit 200 ng NOD2 transfiziert sowie mit 200 ng NOD2 und 800 ng Emmprin kotransfiziert, nach Inkubation mit 10 μ g/ml MDP stimuliert bzw. unstimuliert belassen. Die hergestellten Proteinlysate wurden zur Detektion der Phosphorylierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B- α mit Hilfe eines anti-phospho-I κ B- α -Antikörpers in der Western Blot-Analyse eingesetzt (s. Abb. 34).

Nach 30-minütiger Stimulation mit MDP konnte für I κ B- α eine deutliche Phosphorylierung in NOD2-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. In Zellen mit NOD2 und Emmprin blieb die Phosphorylierung nach MDP-Stimulation aus.

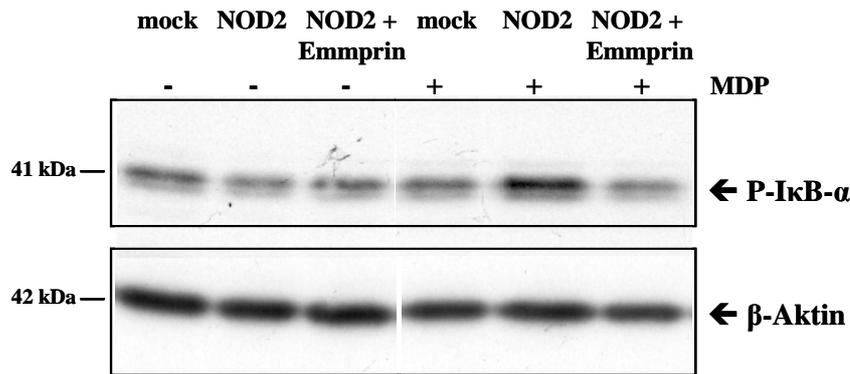


Abb. 34: Western Blot-Analyse zur Detektion von phosphoryliertem IκB-α

Aus mock-(Kontrollvektor-) und NOD2- (200 ng) transfizierten, sowie NOD2- (200 ng) + Emmprin- (800 ng) kotransfizierten Zellen hergestellte Proteinlysate wurden zur Analyse von phosphoryliertem IκB-α über Western Blot-Analyse untersucht. Der Vergleich zwischen phosphoryliertem IκB-α und β-Aktin zeigte nach 30-minütiger Stimulation mit 10 µg/ml MDP eine Aktivierung von IκB-α in NOD2-exprimierenden Zellen, die in NOD2 + Emmprin-koexprimierenden Zellen ausblieb.

Es konnte sowohl durch Luziferase-Assay, als auch anhand des phospho-spezifischen Antikörpers gezeigt werden, dass die NOD2 vermittelte NF-κB-Aktivierung nach MDP-Stimulation durch die Interaktion mit Emmprin negativ beeinflusst wird.

3.6 Untersuchungen zur potentiellen Beteiligung von NOD2 und Emmprin an Mitogen-aktivierten Protein-Kinase-Signalwegen

In den letzten Jahren gibt es zunehmend Hinweise auf Querverbindungen zwischen dem NF-κB-Signalweg und anderen Signaltransduktionskaskaden, vor allem den MAP-Kinasen (Read *et al.*, 1997; Thome *et al.*, 1998). Um eine Beteiligung von NOD2 und einer eventuellen Beeinflussung durch Emmprin innerhalb der MAP-Kinase-Signalwege zu untersuchen, wurden Reportergen-Assays und Phosphorylierungs-spezifische Immunoblots, die die Aktivierung der MAP-Kinase-Signalwege nachweisen, durchgeführt.

3.6.1 Einfluss von NOD2 und Emmprin auf den Extrazellulär Signal-regulierten Kinase- (ERK-) Signalweg

3.6.1.1 Dosis-Abhängigkeit des inhibierenden Effekts von Emmprin auf die NOD2-vermittelte Elk-1-Aktivierung nach MDP-Stimulation

Eine Beteiligung von NOD2 an der ERK1/2-Signaltransduktionskaskade und ein eventueller Einfluss von Emmprin sollte zunächst über einen Reporter-gen-Assay, der über ein *trans*-System die Aktivierung des von der MAP-Kinase ERK1/2 phosphorylierten Transkriptionsfaktors Elk-1 nachweist (s. 2.6), untersucht werden.

Hierzu wurden HEK 293-Zellen entsprechend des Versuchsansatzes unter 3.5.1.1 mit NOD2 (5 ng) und unterschiedlichen DNA-Konzentrationen von Emmprin (5 – 20 ng) und den zugehörigen Reporter-gen-Plasmiden zur Elk-1-Detektion transfiziert, nach 18-stündiger Inkubation für weitere 6 Stunden mit 10 µg/ml MDP stimuliert bzw. als Kontrolle unstimuliert belassen und die Luziferase-Aktivität gemessen (s. Abb. 35).

In HEK 293-Zellen zeigte sich ein hochsignifikanter Anstieg der Elk-1-Aktivierung um den Faktor 8,5 in NOD2-exprimierenden Zellen nach MDP-Stimulation gegenüber der Leerkontrolle, was auf eine Beteiligung von NOD2 an MAP-Kinase-Signalwegen – speziell der ERK-Kaskade - hinweist.

Die Koexpression von NOD2 und Emmprin resultierte nach MDP-Stimulation in einer dosis-abhängigen Inhibition der NOD2-induzierten Elk-1-Aktivierung durch Emmprin. Bei steigenden Emmprin-DNA-Konzentrationen von 5 – 20 ng wurde der Einfluss von Emmprin kontinuierlich stärker, was sich in einer Verminderung der Elk-1-Aktivierung darstellte.

In unstimulierten NOD2-exprimierenden Zellen zeigte sich ähnlich wie für NF-κB auch eine Basalaktivität von Elk-1, was vermutlich wiederum auf eine Überexpression von NOD2 zurückzuführen ist und aufgrund identischer Mengen in allen NOD2-exprimierenden Zellen vernachlässigt wurde. Emmprin-transfizierte Zellen zeigten keine Induzierung von Elk-1.

Je nach Transfektionsansatz wurde zusätzlich die entsprechende Menge des Insert-freien Vektors kotransfiziert, um den Einsatz identischer Plasmid-Mengen pro Ansatz und Versuch zu gewährleisten.

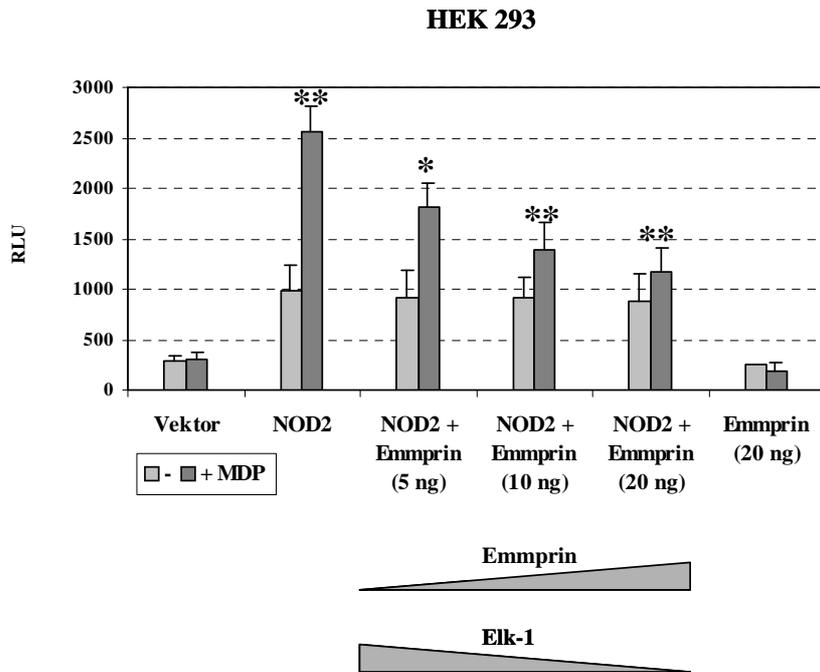


Abb. 35: Dosis-abhängige Hemmung der NOD2-induzierten Elk-1-Aktivierung durch Emmprin

HEK 293-Zellen wurden sowohl mit dem Kontrollvektor (Vektor), mit 5 ng NOD2 und 20 ng Emmprin transfiziert, als auch mit NOD2 und unterschiedlichen Konzentrationen von Emmprin (5 – 20 ng) kotransfiziert und nach 18-stündiger Inkubation für weitere 6 h mit 10 µg/ml MDP stimuliert bzw. als Kontrolle unstimuliert belassen. Die Elk-1-Aktivierung wurde über Reporteragenassay nachgewiesen. Der Einsatz gleicher Plasmid-Mengen wurde über Kotransfektion des Kontrollvektors gewährleistet. T-Test: ** $p < 0,01$ für NOD2 (-/+ MDP), ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ für NOD2 gegen NOD2 + Emmprin.

3.6.1.2 Inhibierender Effekt von Emmprin auf die NOD2-induzierte Elk-1-Aktivierung in CHO-Zellen

Um den gezeigten inhibierenden Effekt von Emmprin auf die MDP-stimulierte NOD2-vermittelte Elk-1-Aktivierung zu überprüfen, wurde ebenfalls der Reporteragen-Assay mit Elk-1-abhängigem Reporteragen in CHO-Zellen durchgeführt, um sicherzustellen, dass nur ein Effekt bei *in vitro*-Kotransfektion von Emmprin auf die Funktion von NOD2 ausgeübt wird.

Hierzu wurden die CHO-Zellen mit 5 ng NOD2 und 20 ng Emmprin transfiziert, mit 10 µg/ml MDP stimuliert und bezüglich der Luziferase-Aktivität gemessen. Der Einsatz gleicher Plasmid-Mengen wurde wiederum über Kotransfektion der entsprechenden Mengen des Kontrollvektors gewährleistet.

Die zur Kontrolle der Ergebnisse verwendeten CHO-Zellen (s. Abb. 36) zeigten ein ähnliches Bild wie die HEK 293-Zellen (s. Abb. 35). Aufgrund der schlechteren Transfektionseffizienz wurden allerdings wesentlich geringere Werte für die Luziferase-Aktivitäten erzielt. In unstimulierten Zellen wurde eine relativ hohe basale Elk-1-Aktivierung nachgewiesen, die sich allerdings in allen Transfektionsansätzen widerspiegelte, und somit vernachlässigbar war. MDP-stimulierte NOD2-transfizierte Zellen zeigten eine um den Faktor 2 gesteigerte Elk-1-Aktivierung im Gegensatz zu unstimulierten Zellen.

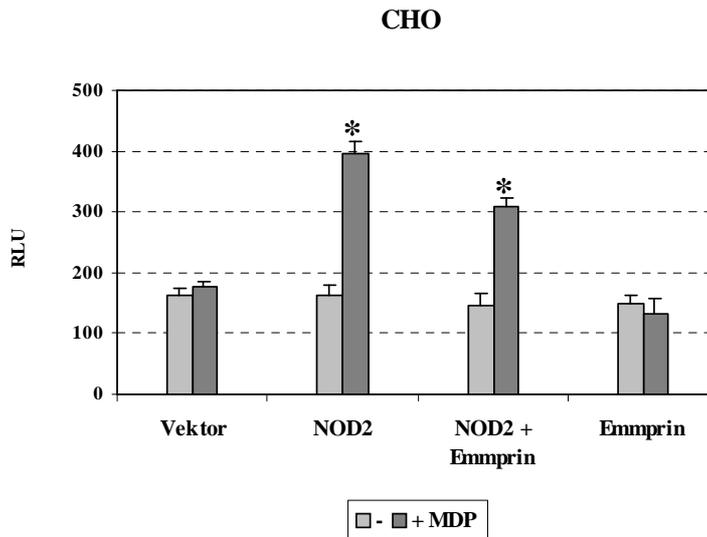


Abb. 36: Reporteragen-Assay zur Bestimmung der Elk-1-Aktivierung in CHO-Zellen

CHO-Zellen wurden sowohl mit dem Kontrollvektor (Vektor), mit 5 ng NOD2 und 20 ng Emmprin transfiziert, als auch mit NOD2 und Emmprin kotransfiziert und nach 18-stündiger Inkubation für weitere 6 h mit 10 µg/ml MDP stimuliert bzw. als Kontrolle unstimuliert belassen. Die Elk-1-Aktivierung wurde über Reporteragenassay nachgewiesen. Der Einsatz gleicher Plasmid-Mengen wurde über Kotransfektion des Kontrollvektors gewährleistet. T-Test: * $p < 0,05$ für NOD2 (-/+ MDP), * $p < 0,05$ für NOD2 gegen NOD2 + Emmprin.

3.6.1.3 Einfluss von Emmprin auf die NOD2-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung

Da das Substrat der MAP-Kinase ERK1/2 – Elk-1 – über MDP-stimuliertes NOD2 aktiviert wurde, sollte im Folgenden nachgewiesen werden, ob auch eine Phosphorylierung der MAP-Kinase stattfindet und Emmprin ebenfalls eine eventuelle NOD2-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung beeinflusst. Hierzu wurden mit NOD2-transfizierte (200 ng) und NOD2- und Emmprin-kotransfizierte (800 ng) HEK 293-Zellen nach Inkubation mit 10 µg/ml MDP

stimuliert oder unstimuliert belassen und phosphoryliertes ERK1/2 mit einem anti-phospho-p44/42-Antikörper über Western Blot-Analyse detektiert (s. Abb. 37).

Der Vergleich zwischen phosphoryliertem und unphosphoryliertem ERK1/2 zeigte nach 30-minütiger Stimulation mit MDP eine Aktivierung von ERK1/2 in NOD2-exprimierenden Zellen, was eine Beteiligung von NOD2 an dem klassischen MAP-Kinase-Signalweg untermauerte. Auch auf die NOD2-vermittelte ERK1/2-Aktivierung konnte ein hemmender Einfluss durch Emmprin nachgewiesen werden, da in NOD2- und Emmprin-koexprimierenden Zellen eine ERK1/2-Phosphorylierung nach MDP-Stimulation ausblieb.

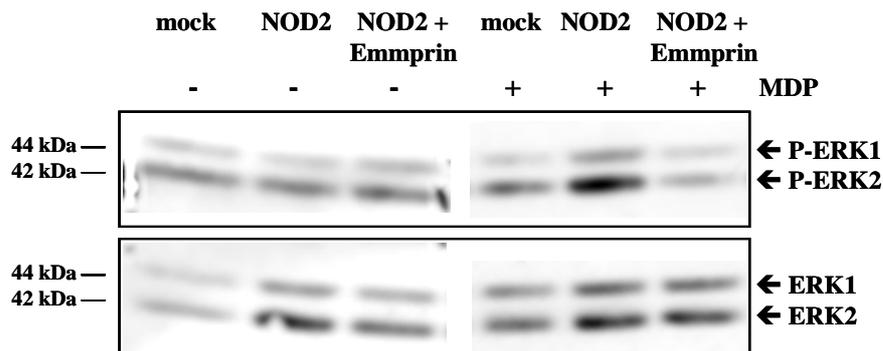


Abb. 37: Einfluss von Emmprin auf NOD2-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung

Aus mock-(Kontrollvektor-) und NOD2- (200 ng) transfizierten, sowie NOD2- (200 ng) + Emmprin- (800 ng) kotransfizierten Zellen hergestellte Proteinlysate - mit 10 µg/ml MDP stimuliert bzw. als Kontrolle unstimuliert belassen - wurden zur Analyse von phosphoryliertem ERK1/2 über Western Blot-Analyse untersucht. Anhand eines zweiten Antikörpers, der die gesamte Expression von ERK (anti-ERK1/2-Antikörper) detektiert, wurden die eingesetzten Proteinmengen überprüft und diese mit der Stärke der Phosphorylierung verglichen.

3.6.1.4 Hemmung der NOD2-vermittelten Elk-1-Aktivierung durch den MAP-Kinase-Inhibitor PD98059

Wie in Abbildung 5 (s. S. 22) dargestellt kann der Transkriptionsfaktor Elk-1 sowohl über ERK1/2-, als auch JNK1/2- und p38-MAP-Kinase aktiviert werden. Daher sollte gezeigt werden, dass die NOD2-vermittelte Elk-1-Aktivierung durch Verwendung des Inhibitors der MAP2-Kinase von ERK1/2 - MEKK1 – über die Phosphorylierung der ERK1/2-Kinase erfolgt und somit die Beteiligung von NOD2 am klassischen MAP-Kinase-Weg untermauert werden kann.

HEK 293-Zellen wurden wie unter 3.6.1.1 beschrieben transfiziert, mit MDP stimuliert, unstimuliert belassen oder vor der MDP-Stimulation mit dem Inhibitor von MEKK1 PD98059 (10 μ M) vorstimuliert (s. Abb. 38).

Eine Vorstimulation mit 10 μ M des klassischen MAP-Kinase-Inhibitors PD98059 führte in mit MDP-behandelten NOD2-exprimierenden HEK 293-Zellen zu einer hochsignifikanten Hemmung der NOD2-induzierten Elk-1-Aktivierung. Die in NOD2- und Emmprin-exprimierenden Zellen beobachtete Hemmung der Elk-1-Aktivierung wurde durch PD98059 zusätzlich vermindert. Die MDP-Stimulation mit oder ohne Inhibitor hatte auf die Emmprin-exprimierenden Zellen keinen Einfluss.

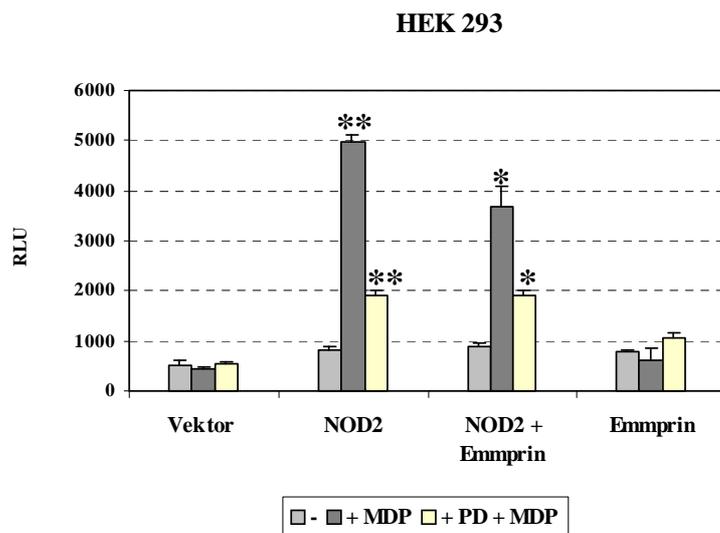


Abb. 38: Die NOD2-vermittelte Elk-1-Aktivierung wird durch den MEKK1-Inhibitor PD98059 gehemmt

HEK 293-Zellen wurden sowohl mit dem Kontrollvektor, 5 ng NOD2 und 20 ng Emmprin transfiziert, als auch mit NOD2 und Emmprin kotransfiziert und nach 18-stündiger Inkubation für weitere 6 h mit 10 μ g/ml MDP stimuliert bzw. als Kontrolle unstimuliert belassen oder vor MDP-Stimulation mit 10 μ M des MEKK1-Inhibitors PD98059 für 30 min vorstimuliert. Die Elk-1-Aktivierung wurde über Reporterassay nachgewiesen. T-Test: ** $p < 0,01$ für NOD2 (-/+ MDP), * $p < 0,01$ für NOD2 gegen NOD2 + Emmprin, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ für MDP gegen PD + MDP.

Es zeigte sich, dass NOD2 neben der Beteiligung am NF- κ B-Signalweg ebenfalls den klassischen MAP-Kinase-Signalweg beeinflusst. NOD2-exprimierende Zellen induzieren nach MDP-Stimulation die ERK-MAP-Kinase-Phosphorylierung und die Elk-1-Aktivierung, welche zum größten Teil durch den MEKK1-Inhibitor PD98059 gehemmt werden konnte.

Außerdem führt eine Koexpression von Emmprin zu einer verminderten Antwort des ERK-MAP-Kinase-Signalweges, wie diese auch für die NF- κ B-Aktivierung nachgewiesen werden konnte.

3.6.2 Untersuchung der Beteiligung von NOD2 und Emmprin am c-Jun N-terminalen Kinase- (JNK1/2-) Signalweg

Gelöscht: ¶

¶
¶
¶
¶
¶

3.6.2.1 Emmprin hemmt die NOD2-vermittelte c-Jun-Aktivierung nach MDP-Stimulation

Um eine Beteiligung von NOD2 und Emmprin an der JNK1/2-Signaltransduktionskaskade zu untersuchen, sollte zunächst über einen Reporter-gen-Assay die Aktivierung des von der MAP-Kinase JNK1/2 phosphorylierten Transkriptionsfaktors c-Jun bestimmt werden.

HEK 293- und CHO-Zellen wurden entsprechend des Versuchsansatzes unter 3.5.1.1 mit den zugehörigen Reporter-gen-plasmiden zur c-Jun-Detektion behandelt und die Luziferase-Aktivitäten gemessen (s. Abb. 39 a, b).

Sowohl in HEK 293 -, als auch in CHO-Zellen zeigte sich ein Aktivierung von c-Jun in MDP-stimulierten NOD2-exprimierenden Zellen um den Faktor 1,8 bzw. 3. Wiederum kam es in NOD2 exprimierenden Zellen zu einer relativ hohen Basalaktivierung von c-Jun ohne Stimulus. Die zusätzliche Koexpression von Emmprin führte sowohl in HEK 293-, als auch in CHO-Zellen zu einer verminderten c-Jun-Aktivierung, womit ebenfalls auf die NOD2-vermittelte c-Jun-Aktivierung ein hemmender Effekt von Emmprin ausging. Emmprin-exprimierende Zellen zeigten im Vergleich zur Vektorkontrolle keine Aktivierung in HEK 293-Zellen (s. Abb. 39 a). In CHO-Zellen kam es auch in mock- und Emmprin-exprimierenden Zellen zu einer leichten c-Jun-Aktivierung nach MDP-Stimulation (s. Abb. 39 b).

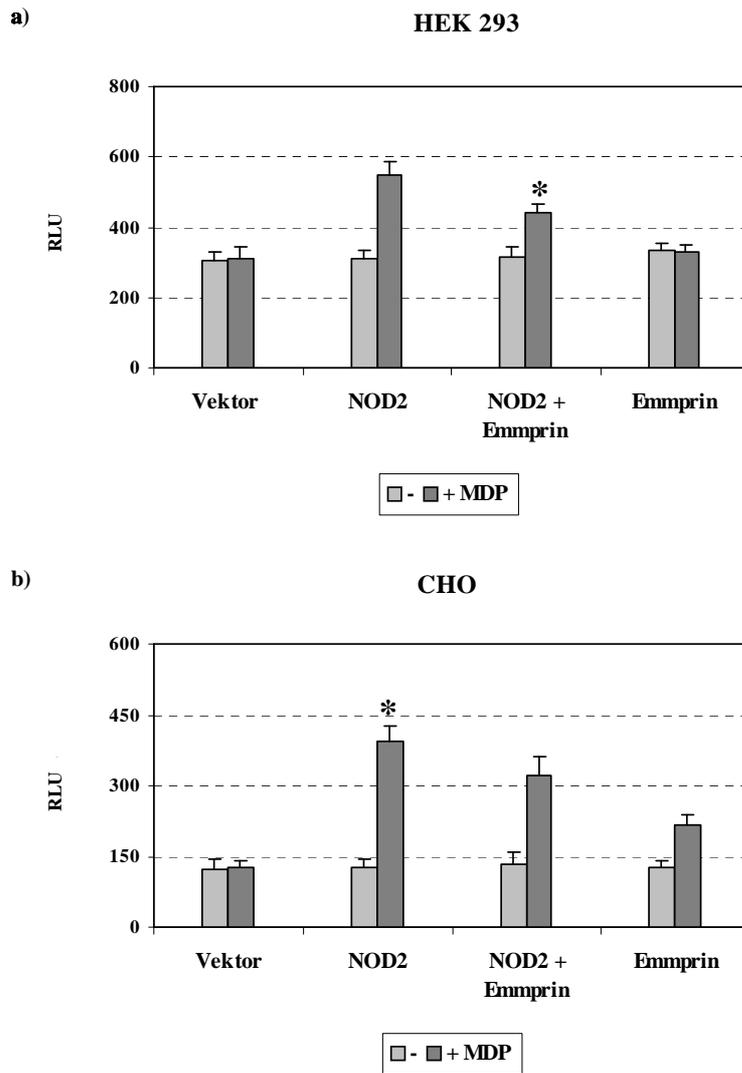


Abb. 39: Reporteragen-Assays zur Bestimmung der c-Jun-Aktivierung

a) HEK 293- und b) CHO-Zellen wurden sowohl mit dem Kontrollvektor, 5 ng NOD2 und 20 ng Emmprin transfiziert, als auch mit NOD2 und Emmprin kotransfiziert und nach 18-stündiger Inkubation für weitere 6 h mit 10 µg/ml MDP stimuliert bzw. als Kontrolle unstimuliert belassen. Die c-Jun-Aktivierung wurde über Reporteragenassays nachgewiesen. Der Einsatz gleicher Plasmid-Mengen wurde über Kotransfektion des Kontrollvektors gewährleistet. T-Test: * $p < 0,05$ für NOD2 (-/+ MDP), * $p < 0,05$ für NOD2 gegen NOD2 + Emmprin.

3.6.2.2 Einfluss von NOD2 auf die Phosphorylierung von c-Jun nach MDP-Stimulation

Da in den vorangegangenen Reporter-Gen-Assays nur geringe Transfektionswerte erzielt wurden, was auf eine schwache NOD2-vermittelte c-Jun-Aktivierung hinweisen könnte, wurden zur Untermauerung der Ergebnisse Western Blot-Analysen durchgeführt.

Hierzu wurden NOD2-transfizierte (200 ng) und NOD2- und Emmprin-kotransfizierte (800 ng) HEK 293-Zellen für unterschiedliche Zeiträume mit MDP stimuliert oder unstimuliert belassen und phosphoryliertes c-Jun mit einem anti-phospho-c-Jun-Antikörper über Western Blot-Analyse detektiert (s. Abb. 40).

NOD2-exprimierende Zellen zeigten nach 15-, 30- und 120-minütiger MDP-Stimulation eine gesteigerte c-Jun-Phosphorylierung, was auf eine Beteiligung von NOD2 am JNK1/2 MAP-Kinase-Signalweg hinweist, da der Transkriptionsfaktor c-Jun über die c-Jun-phosphorylierende Kinase aktiviert wird.

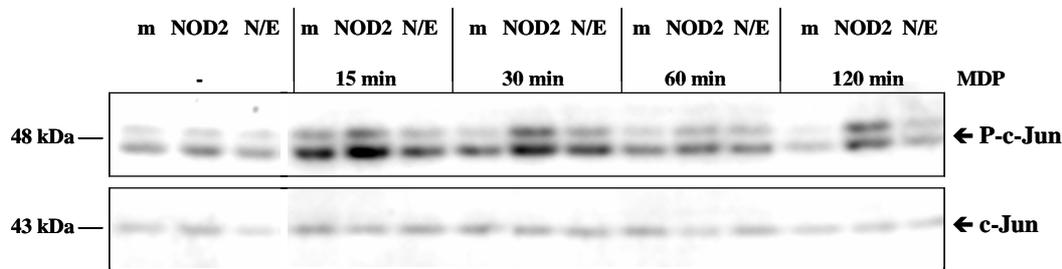


Abb. 40: Einfluss von Emmprin auf die NOD2-vermittelte c-Jun-Phosphorylierung

Aus mock-(Kontrollvektor-) und NOD2- (200 ng) transfizierten, sowie NOD2- (200 ng) + Emmprin- (800 ng) kotransfizierten Zellen hergestellte Proteinlysate – mit MDP für unterschiedliche Zeiträume (5 – 120 min) stimuliert - wurden mit einem anti-phospho-c-Jun-Antikörper über Western Blot-Analyse untersucht. Anhand eines zweiten Antikörpers, der die gesamte Expression von cJun (anti-c-Jun-Antikörper) detektiert, wurden die eingesetzten Proteinmengen überprüft und diese mit der Stärke der Phosphorylierung verglichen. Abk.: m = mock = Vektorkontrolle; N/E = NOD2 + Emmprin.

Die NOD2-vermittelte c-Jun-Aktivierung zeigte einen charakteristischen biphasischen Verlauf mit einem Maximum der Phosphorylierung nach 15-minütiger MDP-Stimulation. Nach einer Abschwächung der Phosphorylierung nach 60 min führte die vorangegangene Aktivierung der c-Jun-Expression zu erneuter c-Jun-Phosphorylierung (positive Autoregulation).

Wiederum konnte eine Inhibierung der NOD2-vermittelten c-Jun-Phosphorylierung nach 15-, 30- und 120-minütiger MDP-Stimulation durch die Koexpression des Emmprins gezeigt werden.

Trotz des geringen Effekts von NOD2 auf die c-Jun-Aktivierung, der anhand des Reporterassay gezeigt werden konnte, wurde über Western Blot-Analyse eine deutliche Induzierung der c-Jun-Phosphorylierung in MDP-stimulierten NOD2-exprimierenden Zellen nachgewiesen, was eine Beteiligung von NOD2 auch am JNK1/2-Signalweg vermuten lässt. Wie in den vorangegangenen Untersuchungen scheint Emmprin auch in diesem Fall als Inhibitor der NOD2-vermittelten c-Jun-Aktivierung zu fungieren.

3.6.2.3 Emmprin hemmt die NOD2-vermittelte AP-1-Aktivierung nach MDP-Stimulation

Die Beteiligung von NOD2 am JNK1/2-Signalweg sollte anhand eines weiteren Reporterassays, der die Aktivierung von AP-1 nachweist, verifiziert werden. AP-1-Transkriptionsfaktoren sind Dimere aus basischen Leuzin-Zipper-Proteinen (bZIP) und bestehen hauptsächlich aus Mitgliedern der Jun-, Fos- und ATF-Familien (Karin *et al.*, 1997). HEK 293-Zellen wurden entsprechend des Versuchsansatzes unter 3.5.1.1 mit den zugehörigen Reporterplasmiden zur AP-1-Detektion behandelt und die Luziferase-Aktivitäten gemessen.

In NOD2-exprimierenden HEK 293-Zellen zeigte sich eine AP-1-Aktivierung um den Faktor 2,5 nach MDP-Stimulation gegenüber unstimulierter Zellen. Die Koexpression von Emmprin führte zu einer vollständigen Hemmung der NOD2-vermittelten AP-1-Aktivierung. Der Effekt auf die AP-1-Aktivierung war im Gegensatz zur Elk-1-Aktivierung deutlich geringer und vergleichbar zu der c-Jun-Aktivierung durch ein hohe basale Aktivierung ohne MDP-Stimulus gekennzeichnet.

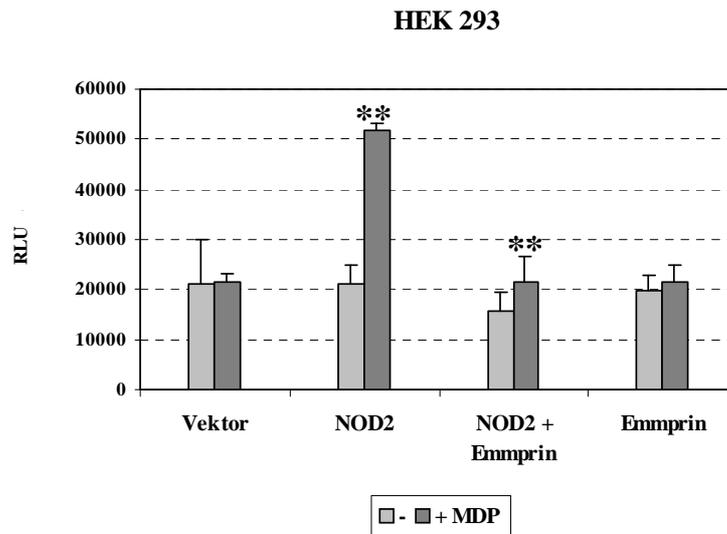


Abb. 41: Reporteragen-Assay zur Bestimmung der AP-1-Aktivierung

HEK 293-Zellen wurden sowohl mit dem Kontrollvektor, 5 ng NOD2 und 20 ng Emmprin transfiziert, als auch mit NOD2 und Emmprin kotransfiziert und nach 18-stündiger Inkubation für weitere 6 h mit 10 µg/ml MDP stimuliert, bzw. als Kontrolle unstimuliert belassen. Die AP-1-Aktivierung wurde über Reporteragenassay nachgewiesen. Der Einsatz gleicher Plasmid-Mengen wurde über Kotransfektion des Kontrollvektors gewährleistet. T-Test: ** $p < 0,01$ für NOD2 (-/+ MDP), ** $p < 0,01$ für NOD2 gegen NOD2 + Emmprin.

In den vorliegenden Ergebnisse konnte ein positiver Einfluss von NOD2 nach MDP-Stimulation auf die MAP-Kinase-Untergruppen ERK1/2 und JNK1/2 bzw. auf deren Substrate, nachgewiesen werden. Für Emmprin konnte in beiden Signalwegen eine inhibierende Funktion beschrieben werden.

4 Diskussion

4.1 Ausgangsfragestellung

NOD2 wurde 2001 als Mitglied der APAF1/NOD1-Familie beschrieben (Ogura *et al.*, 2001a). Neben der strukturellen Identifizierung dieses zytosolischen Proteins konnte in der gleichen Arbeit der erste Bindungspartner von NOD2, die Serin-Threonin-Kinase RICK/Rip2/CARDIAK, nachgewiesen werden. Die Interaktion erfolgt über homophile CARD-CARD-Bindung und ist essentiell für die NOD2-vermittelte Induzierung der NF- κ B-Aktivierung (Ogura *et al.*, 2001a). Bereits 2001 wurde der erste Hinweis geliefert, dass NOD-Proteine bakterielle Komponenten über die LRR-Domäne detektieren und als Reaktion NF- κ B-Aktivierung induzieren können (Inohara *et al.*, 2001). In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Muramyl-Dipeptid (MDP), eine konservierte Struktur des Zellwandbestandteiles Peptidoglycan sowohl gram-negativer, als auch -positiver Bakterien (Holtje, 1998), als Ligand an die LRR bindet (Inohara *et al.*, 2003; Girardin *et al.*, 2003). MDP fungiert als ein Adjuvant für Antigen-spezifische T-Zell-Reaktionen und Antikörper-Produktion (Takada and Kotani, 1995) und induziert pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 β (Nau *et al.*, 2002), die eine wichtige Rolle innerhalb der angeborenen Immunabwehr spielen. Außerdem löst MDP die Sekretion verschiedener Zytokine, wie IL-6 und IL-12, in Monozyten und dendritischen Zellen aus und induziert die Expression Membran-gebundener kostimulatorischer Moleküle, die die Differenzierung naiver Effektor-T-Zellen fördern (Nau *et al.*, 2002; Heinzlmann *et al.*, 2000; Todate *et al.*, 2001). Die Identifizierung seines Liganden unterstrich die wichtige Rolle für NOD2 innerhalb der angeborenen Immunität als zytosolischer PAMP- (Pathogen assoziierte molekulare Muster-) Rezeptor.

Obwohl die Expression von NOD2 bisher nur in Monozyten (Ogura *et al.*, 2001a) und myelomonozytären Zellen (Gutierrez *et al.*, 2002) beschrieben worden ist, könnte NOD2 eine wichtige Komponente der angeborenen Immunabwehr in intestinalen Epithelzellen darstellen. Das intestinale Epithel stellt die vorderste Barriere gegenüber pathogener Mikroorganismen dar und ruft im Zuge der angeborenen Immunität entzündliche Reaktionen hervor, die für die Erhaltung der Homöostase des Darms notwendig sind. Stimulation mit TNF- α , IL-1 β oder Lipopolysaccharid führte in intestinalen Epithelzellen zu einer gesteigerten Expression und Sekretion des Zytokins IL-8 (Eckmann *et al.*, 1993). Außerdem konnte beschrieben werden, dass Infektionen humaner Kolon-Epithelzelllinien (T84, HT29, Caco-2) mit pathogenen

Bakterien in einer verstärkten Expression und Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-8, MCP-1 und GM-CSF resultierte (Jung *et al.*, 1995).

Die beschriebene Funktion von NOD2, die NF- κ B-Aktivierung zu induzieren (Ogura *et al.*, 2001a), scheint ebenfalls auf eine Beteiligung als PAMP-Rezeptor in der angeborenen Immunabwehr intestinaler Epithelzellen hinzuweisen. Eine Vielzahl der Gene, die in intestinalen Epithelzellen nach bakterieller Invasion aktiviert werden, sind Zielgene des Transkriptionsfaktors NF- κ B (z. B. IL-8) (Baeuerle and Henkel, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass NF- κ B als zentraler Regulator in der Aktivierung der epithelialen zellulären Immunreaktion nach bakterieller Infektion fungiert (Elewaut *et al.*, 1999).

4.2 Expression und Regulation von NOD2 in intestinalen Epithelzellen

Es sollte untersucht werden, ob NOD2 in intestinalen epithelialen Zellen exprimiert wird, da diese integraler Bestandteil der mechanischen und immunologischen Abwehrgrenze gegen eindringende pathogene Mikroorganismen darstellen. Zu Beginn dieser Arbeit war eine Expression von NOD2 hauptsächlich in Monozyten beschrieben worden (Ogura *et al.*, 2001a); kürzlich konnte NOD2 mRNA auch in myelomonozytären Zellen nachgewiesen werden (Gutierrez *et al.*, 2002). Daher war der wichtigste Befund des ersten Teils dieser Arbeit die Beobachtung, dass die Expression der NOD2 mRNA spezifisch über das pleiotrope Entzündungszytokin TNF- α in intestinalen epithelialen Zelllinien dosis- und zeitabhängig verstärkt wird. Ein weiterer Hinweis für die transkriptionelle Aktivierung von NOD2 liefern Luziferase-Reportergen-Studien, die eine Transaktivierung des humanen NOD2-Promotors nach TNF- α -Stimulation zeigten. Diese Aktivierung konnte einerseits durch Koexpression des Superrepressors von I κ B- α , andererseits durch Deletion der NF- κ B-regulatorischen Elemente an Position - 26 bp (κ B3) bzw. - 301 bp (κ B2) vor dem Transkriptionsstart aufgehoben werden. Eine Deletion des κ B1-Elements (Δ κ B1) zeigte ebenso wie die Veränderung putativer GAS-Elemente (Δ GAS1 und Δ GAS2) einen gegensätzlichen Effekt, der nach TNF- α - und IFN- γ -Stimulation in einer signifikanten Steigerung der Luziferase-Aktivität resultierte. Daher wurde vermutet, dass κ B1 keine funktionelle NF- κ B-Bindestelle im intakten NOD2-Promotor darstellt. Die nicht nachweisbare Funktion der GAS-Elemente spiegelte sich auch in dem fehlenden oder nur schwachen Einfluss von IFN- γ auf die NOD2 mRNA-Expression wider. Allerdings konnte eine signifikante Steigerung TNF- α -vermittelter

Induktion der NOD2-mRNA durch zusätzliche Stimulation mit IFN- γ erzielt werden. Dieses weist auf einen Synergismus der beiden Zytokine hin, der auch schon für die Induktion anderer Gene (z. B. ICAM-1) beschrieben wurde (Cheshire and Baldwin, 1997). Die induzierbare Expression des NOD2-Gens in intestinalen Epithelzellen durch TNF- α - und IFN- γ -Stimulation könnte somit an einer regulatorischen Kaskade von Ereignissen während früher Entzündungsprozesse beteiligt sein. Mutationen im NOD2-Promotor, die in M. Crohn-Patienten innerhalb der untersuchten κ B1-, GAS1- oder GAS2-Elemente ($\Delta\kappa$ B1, Δ GAS1 und Δ GAS2) vorkommen könnten, wären eine mögliche Erklärung für die Krankheits-assoziierte gesteigerte NF- κ B-Aktivierung. Mutationsanalysen des NOD2-Promotors in M. Crohn-Patienten könnten somit einen interessanten Versuchsansatz zur näheren Aufklärung der gesteigerten NF- κ B-Aktivierung in M. Crohn darstellen.

Anhand der Western Blot-Analyse konnte in verschiedenen intestinalen Epithelzelllinien und der klassischen Laborzelllinie HeLa S3 eine gesteigerte NOD2-Proteinexpression nach TNF- α -Stimulation gezeigt werden. Das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α nimmt eine wichtige Funktion in Entzündungsreaktionen epithelialer Zellen im Zuge der angeborenen Immunabwehr ein (Baud and Karin, 2001). Es konnte beschrieben werden, dass intestinale Epithelzellen in pathologischen Prozessen, wie bei M. Crohn-Patienten mit akut entzündetem Darm, eine gesteigerte Expression von TNF- α zeigen (Reinecker, *et al.*, 1993; Schreiber *et al.*, 1999; Podolsky, 2002). Parallele Untersuchungen unserer Laborgruppe konnten nach Isolierung primärer intestinaler Epithelzellen von Crohn-Patienten ebenfalls eine gesteigerte Proteinexpression von NOD2 nachweisen (Rosenstiel *et al.*, 2003). Außerdem konnte in den vorliegenden Ergebnissen dargestellt werden, dass die Überexpression von NOD2 intestinale Epithelzellen für MDP sensitiviert, was in einer verstärkten Produktion und Sekretion von IL-8 resultierte und somit zu einer gesteigerten Immunreaktion auf pathogene Bakterien führen könnte. Hingegen zeigten sowohl Epithelzellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden, als auch solche, die die NOD2-Variante SNP13 exprimierten und eine defiziente MDP-Erkennung aufwiesen, eine deutlich verminderte IL-8-Sekretion.

Diese Befunde weisen starke Parallelen zu der Regulation extrazellulärer PAMP-Rezeptoren, den TLRs, in intestinalen Epithelzellen auf. Intestinale Epithelzellen exprimieren kein MD-2, ein für die TLR4-vermittelte LPS-Erkennung essentielles Korezeptormolekül, sowie nur geringe Mengen an TLR4 und zeigen keine Reaktion auf reines LPS. Transiente Expression von MD-2 und TLR4 konnte die Fähigkeit intestinaler Epithelzellen, LPS zu erkennen, wiederherstellen (Abreu *et al.*, 2001). Weiterhin konnte beschrieben werden, dass eine

positive Regulation der Expression von MD-2 über IFN- γ und von TLR4- über IFN- γ und TNF- α in intestinalen Epithelzellen erfolgt (Abreu *et al.*, 2002). Eine TNF- α - und IFN- γ -vermittelte gesteigerte Expression konnte auch für NOD2 gezeigt werden. Als negative Regulatoren der TLR-Expression konnten SIGIRR (*single immunoglobulin IL-1R-related molecule*) (Wald *et al.*, 2003) und Tollip (*Toll-interacting protein*) (Otte *et al.*, 2004) nachgewiesen werden. SIGIRR-defiziente Mäuse zeigten eine gesteigerte Entzündungsreaktion in Reaktion auf IL-1 und verschiedener TLR-Liganden (Wald *et al.*, 2003). Die Expression von Tollip war in hyporesponsiven Zellen verstärkt und eine Überexpression dieses Proteins in intestinalen Epithelzellen resultierte in einer deutlich verminderten Entzündungsreaktion (Otte *et al.*, 2004). Daher könnte die negative Regulation der Expression von TLRs einen Mechanismus intestinaler Epithelzellen darstellen, mit dem sie sich vor einer dysregulierten Immunabwehr gegenüber kommensaler Bakterien, die in einer großen Anzahl im Darm vorkommen, schützen. Trotz fehlender Hinweise auf einen negativen Regulator könnte für NOD2 ein ähnlicher Sachverhalt vermutet werden, da NOD2 nur eine geringe Expression in unstimulierten Epithelzellen aufweist.

Im intestinalen Epithel von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte eine gesteigerte Expression von TLR4 nachgewiesen werden (Cario and Podolsky, 2000), was kürzlich auch für die NOD2-Expression gezeigt werden konnte (Rosenstiel *et al.*, 2003). Somit scheint sowohl eine gesteigerte NOD2-, als auch TLR-Expression im intestinalen Epithel über eine veränderte Reaktion des angeborenen Immunsystems an der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, wie M. Crohn, beteiligt zu sein.

4.3 Die Rolle von NOD2 und angeborener Immunität für die Etiopathogenese des Morbus Crohn

Das angeborene Immunsystem ist evolutionär unter allen multizellulären Organismen stark konserviert und stellt die erste Abwehrgrenze gegenüber Mikroorganismen dar. Es erlaubt dem Wirt nicht nur, pathogene Organismen zu bekämpfen, sondern auch eine Koexistenz nicht-pathogener Mikroorganismen. Im Darm wird diese Aufgabe von den intestinalen Epithelzellen als integralem Bestandteil der mechanischen und immunologischen Barriere gegenüber Mikroorganismen erfüllt. Diese Funktion ist in Entzündungsreaktionen durch ein Überwiegen pro-inflammatorischer Zytokine gestört: Periphere Blut-Monozyten und Lamina Propria-mononukleäre Zellen von Morbus Crohn-Patienten sezernieren verstärkt pro-

inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1 β (Schreiber *et al.*, 1999). Diese gesteigerte Sekretion geht mit einer signifikanten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B einher (Schreiber *et al.*, 1998; Rogler *et al.*, 1998) und könnte nach den hier vorgelegten Daten mit einer starken Expression von NOD2 in intestinalen Epithelzellen assoziiert sein. Die Überexpression von NOD2 zeigte zudem eine gesteigerte IL-8-Sekretion nach MDP-Stimulation. Somit könnte die gesteigerte NOD2-Expression in intestinalen Entzündungen eine generelle Antwort auf bakterielle Invasion, sowohl gramnegativer, als auch –positiver Bakterien, repräsentieren. Weiterhin konnten in M. Crohn-Patienten hohe Konzentrationen an luminalen Bakterien und das Auftreten von Bakterien innerhalb der Epithelzellen nachgewiesen werden (Swidsinski *et al.*, 2002), was auf eine gestörte Reaktion der angeborenen Immunität hindeutet. Daher scheint NOD2 eine wichtige Rolle in der Erhaltung der intestinalen Barrierefunktion und Homöostase zu spielen und an der Regulation der angeborenen Immunität beteiligt zu sein.

Die Frage bleibt zu lösen, inwiefern die SNP13-Mutation des NOD2-Gens, die in 20 % der M. Crohn-Patienten vorliegt und zu einem defekten MDP-induzierten NF- κ B-Signalweg führt (Inohara *et al.*, 2003), zur Etiopathogenese des Morbus Crohn beiträgt, der seinerseits mit einer Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B assoziiert ist.

Die am häufigsten diskutierte Hypothese besagt, dass bei fehlender oder verminderter NOD2-Aktivität ein Defekt in der Aktivierung von Makrophagen besteht, der zu einer anhaltenden Infektion infolge einer deutlichen NOD2-unabhängigen Effektor-T-Zell-Reaktion führt.

Eine zweite Erklärung könnte sein, dass bei Abwesenheit der NOD2-Expression in intestinalen Epithelzellen mikrobielle Produkte in ihrer Funktion, die Sekretion von Chemokinen und Defensinen von Epithelzellen zu aktivieren, versagen. In den vorliegenden Ergebnissen zeigten intestinale Epithelzellen, die die NOD2-Variante SNP13 exprimierten, aufgrund fehlender MDP-Erkennung eine deutlich verminderte Sekretion des Chemokins IL-8 nach Stimulation, was in einer defizienten Aktivierung der angeborenen Immunabwehr resultieren könnte. Somit käme es zu einer gesteigerten Proliferation der Bakterien in den Krypten des Darms und zum Verlust der Barrierefunktion, die infolgedessen eine verstärkte Stimulation mukosaler Zellen durch mukosale Antigene erlaubt (Wehkamp *et al.*, 2004; Rosenstiel *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2004).

Eine dritte Hypothese besagt, dass die Erkennung mikrobieller Liganden durch NOD2 normalerweise Antigen-präsentierende Zellen zur Induktion regulatorischer oder Effektor-T-Zell-Reaktionen veranlasst, und dass ein Defekt dieses Mechanismus zu einer gestörten mukosalen Homöostase führt (Jain *et al.*, 2001; Bouma and Strober, 2003).

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass NOD2 eine wichtige Rolle innerhalb intestinaler Epithelzellen spielt. Die TNF- α -gesteuerte Steigerung der NOD2-Expression in intestinalen Epithelzellen könnte Teil einer komplexen Pathophysiologie von entzündlichen Darmerkrankungen sein und weiterhin zu entzündlichen Prozessen beitragen, indem es die Balance zwischen mukosaler Flora und intestinalem Epithel beeinflusst. Als integraler Bestandteil der vordersten Barriere gegenüber pathogener Bakterien obliegt dem intestinalen Epithel die Aufgabe, mikrobielle Produkte zu erkennen, um über die Aktivierung der angeborenen Immunität durch Sekretion von Chemokinen und Defensinen die intestinale Homöostase zu erhalten. Da die SNP-13-Variante sowohl einen Defekt in der Erkennung von MDP (Inohara *et al.*, 2003), als auch eine deutlich verminderte IL-8-Sekretion aufweist (s. 3.3.1) wird hier die Hypothese vertreten, dass die Krankheitsursache des Morbus Crohn eher in einer defekten Immunantwort, als in einer Überempfindlichkeit des mukosalen Immunsystems begründet ist. Epithelzellen und Makrophagen könnten Ort des primären pathophysiologischen Defekts sein, während die T-Zell-Aktivierung, die für die Induzierung der chronischen Entzündung notwendig ist, als sekundärer Effekt erfolgt.

Kürzlich konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die NOD2-vermittelte Immunabwehr durch die Erkennung bakterieller MDPs des grampositiven intrazellulären Bakteriums *Listeria monocytogenes* in NOD2-defizienten Mäusen ausbleibt, was in einer gesteigerten Anfälligkeit für eine bakterielle Infektion resultierte (Kobayashi *et al.*, 2005). Daher scheint eine defiziente Bindung von MDP und mutiertem NOD2 in der intestinalen Mukosa in einem Verlust, bakterielle Infektionen zu kontrollieren, zu resultieren. Dies könnte systemische Reaktionen initiieren, die zu abweichenden Entzündungsprozessen führen.

Außerdem konnte in NOD2-defizienten Tieren eine geringere Expression der Cryptdine im Gegensatz zum Wildtyp nachgewiesen werden. Cryptdine, Homologe der humanen α -Defensine, sind antimikrobielle Peptide (Wilson *et al.*, 1999), die hauptsächlich in intestinalen Paneth-Zellen produziert werden. Die Matrixmetalloproteinase Matrylisin (MMP7) aktiviert die Cryptdine durch Proteolyse der inaktiven Pro-Cryptdine, um somit ihre antibakterielle Wirkung zu induzieren (Wilson *et al.*, 1999; Ayabe *et al.*, 2002). Diese antimikrobielle Aktivität (Selsted *et al.*, 1992; Ayabe *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 2002; Eckmann, 2005) ist essentiell für die Unterdrückung der Infektion durch z. B. *L. monocytogenes* (Eisenhauer *et al.*, 1992) und *Mycobacterium paratuberculosis*, ein Organismus, dessen Vorkommen mit M. Crohn assoziiert werden konnte (Naser *et al.*, 2004; Selby, 2004). Die Funktion von NOD2 in der Regulation der Cryptdine bietet eine plausible Erklärung der Assoziation zwischen NOD2 und der Anfälligkeit für M. Crohn.

Außer der NOD2-abhängigen Regulation innerhalb der angeborenen Immunität im Intestinaltrakt konnte auch eine Beteiligung von NOD2 an der adaptiven Immunabwehr gezeigt werden (Kobayashi *et al.*, 2005). Vorher mit MDP- und humanem Serum-Albumin (HSA)- immunisierte NOD2-defiziente Mäuse konnten im Gegensatz zu ebenfalls immunisierten Wildtyp-Mäusen keine Antigen-spezifischen Immunglobuline produzieren. Diese Untersuchungen deuteten darauf hin, dass NOD2 in der Lage ist, die adaptive Immunität zu aktivieren und eine unterstützende Aktivierung in der Antikörperproduktion gegenüber T-Zell-abhängigen Antigenen zu vermitteln. Eine Beteiligung an der angeborenen, sowie adaptiven Immunität konnte auch für RICK beschrieben werden (Kobayashi *et al.*, 2002). RICK wird sowohl für das Signalgeschehen der Rezeptoren der angeborenen Immunität (TLRs, NOD-Proteine), als auch der T-Zell-Rezeptoren (adaptive Immunität) benötigt (Kobayashi *et al.*, 2002).

Die Beteiligung von NOD2 auch an der adaptiven Immunität liefert einen weiteren Hinweis, dass NOD2 eine Schlüsselrolle in der Immunabwehr des Organismus gegenüber intestinaler bakterieller Infektion spielt. Es scheint, dass Mutationen im NOD2-Gen eine Prädisposition für M. Crohn vorwiegend über eine defekte Regulation der Reaktion auf kommensale und/oder pathogene Bakterien in intestinalen Epithelzellen fördern.

4.4 Identifizierung neuer Interaktionspartner von NOD2: Emmprin

Im zweiten Abschnitt dieser Doktorarbeit sollte über die Identifikation neuer Interaktionspartner von NOD2 dessen Funktion näher charakterisiert werden. Zu Beginn dieser Untersuchung war bisher nur die Serin-Threonin-Kinase RICK/Rip2/CARDIAK als NOD2-bindendes Protein identifiziert worden (Ogura *et al.*, 2001a). Die Interaktion erfolgt über homophile CARD-CARD-Bindung und ist essentiell für die NOD2-vermittelte Induktion der NF- κ B-Aktivierung.

Anhand des Two-Hybrid-Systems und anschließender Immunpräzipitations-Analysen konnte das Transmembranprotein Emmprin (extrazellulärer Matrixmetalloproteinase-Induzierer/CD147/Basigin) als Interaktionspartner von NOD2 identifiziert werden. Emmprin ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und spielt eine entscheidende Rolle in der Invasion, Metastase und Neoangiogenese unterschiedlichster Tumore durch die Stimulation der Produktion und Sezernierung von Matrixmetalloproteinase (MMPs) (Guirguis *et al.*, 1990; Biswas *et al.*, 1995; Guo *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 1998). Das Protein ist auf Tumorzellen

stark exprimiert und stimuliert umgebende Fibroblasten zur Produktion von MMP1, MMP2 und MMP3 (Kataoka *et al.*, 1993; Ellis *et al.*, 1989; Nabeshima *et al.*, 1991).

Eine gesteigerte Emmprin-Expression konnte auch auf aktivierten Lymphozyten und Monozyten in synovialen Gewebe betroffener Gelenke in rheumatoider Arthritis (RA) nachgewiesen werden (Kasinrerk *et al.*, 1992; Kontinen *et al.*, 2000; Tomita *et al.*, 2002), was auf eine zentrale Rolle von Emmprin innerhalb der fortschreitenden Gelenkzerstörung bei der Pathogenese des chronischen Gelenkrheumatismus hindeuten könnte.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Expression von MMP1 (interstitielle Collagenase) und MMP3 (Stromelysin-1), eine wichtige Rolle bei T-Zell-vermittelter Gewebszerstörung im Darm von CED-Patienten spielt (Pender, 1997). Da eine Aktivierung der MMPs 1 und 3 durch Emmprin induziert wird (Kataoka *et al.*, 1993; Ellis *et al.*, 1989; Nabeshima *et al.*, 1991), könnte auch Emmprin in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen involviert sein. Kürzlich konnte beschrieben werden, dass Variationen des Gens für Stromelysin-1 in Beziehung zu M. Crohn stehen (Pender *et al.*, 2004). Sowohl im Two-Hybrid-System, als auch über Immunpräzipitations-Analyse konnte eine Interaktion zwischen Emmprin und der M. Crohn-assoziierten Variante von NOD2, SNP13, nachgewiesen werden, was auf eine Funktion der Interaktion in der chronisch entzündlichen Darmerkrankung hindeuten könnte. Ein weiteres Auswahlkriterium, Emmprin als Interaktionspartner von NOD2 näher zu untersuchen, war die im Two-Hybrid-System mehrfach nachgewiesene Bindung an die CARD-Domänen von NOD2. Diese sind essentiell für die Interaktion mit RICK und die davon abhängige NOD2-vermittelte Induzierung der NF- κ B-Aktivierung. Daher konnte vermutet werden, dass die Interaktion das NOD2-vermittelte Signalgeschehen beeinflussen könnte.

Die genaue Lokalisation der Interaktion von NOD2 und Emmprin sollte durch Immunpräzipitations-Experimente der einzelnen Domänen von NOD2 bestimmt werden und ergab eindeutig, dass beide CARD-Domänen von NOD2 für die Bindung an den intrazellulären Teil von Emmprin essentiell sind. Genau dieser Bereich von NOD2 wird ebenso für die Interaktion mit der CARD-Domäne von RICK benötigt, mit dem Unterschied, dass im Fall von Emmprin keine homophile, sondern eine heterophile Interaktion mit der intrazellulären Domäne des Transmembranproteins vorliegt. Eine kürzlich beschriebene Arbeit konnte die bisherige Vermutung widerlegen, dass CARD-, DD- (*death domain*-) und DED- (*death effector domain*-) enthaltende Proteine ausschließlich über homophile Interaktion ihrer Domänen agieren. Es konnte gezeigt werden, dass die CARD-Domäne von ARC mit der DD-Domäne von Fas und FADD über heterophile Bindung interagiert und

dadurch die Interaktion zwischen Fas und FADD unterbindet, was in einer Inhibition der Bildung des DISC- (*death-inducing signaling complex*-) Komplexes resultiert und somit das nachgeschaltete Apoptose-Geschehen unterdrückt (Nam *et al.*, 2004).

Um die Bedeutung des identifizierten Interaktionspartners für NOD2 zu charakterisieren, wurden folgende Untersuchungen zunächst auf die RICK-abhängige NOD2-vermittelte NF- κ B-Aktivierung (Ogura *et al.*, 2001a) fokussiert. Durch Reporterstudien und Western Blot-Analysen konnte eine inhibierende Wirkung von Emmprin auf die NOD2-induzierte NF- κ B-Aktivierung nach MDP-Stimulation beobachtet werden. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass Emmprin mit RICK um die Bindung an die CARD-Domänen von NOD2 konkurriert und somit die RICK-abhängige NF- κ B-Aktivierung dadurch gehemmt wird.

Eine weitere Erklärung für die verminderte NF- κ B-Aktivierung durch den Einfluss von Emmprin könnte eine veränderte Konformation des NOD2-Proteins ausgelöst durch die Interaktion sein, wodurch z. B. die NOD2-Oligomerisierung über die NOD-Domänen, die zu einer verstärkten NF- κ B-Aktivierung führt (*induced proximity model*, Inohara *et al.*, 2000), verhindert werden könnte.

Für APAF-1 konnte beschrieben werden, dass die Selbstassoziation und die daraus resultierende Aktivierung der Pro-Caspase 9 über die WDR-Domäne negativ reguliert wird, indem diese im inaktiven Zustand an die NOD-Domäne bindet und somit durch eine veränderte Konformation die Oligomerisierung verhindert (Hu *et al.*, 1998). Eine ähnlicher Autoinhibitions-Mechanismus wurde für NOD2 angenommen (Albrecht *et al.*, 2003), bei dem im inaktiven Zustand die LRR-Region an die NOD-Domäne binden könnte. Nach Interaktion des Liganden MDP mit der LRR-Region kommt es zu einer Konformationsänderung des NOD2-Proteins, die die Oligomerisierung über die NOD-Domäne erlaubt und somit zur Aktivierung des nachfolgenden Signalgeschehens führt. Daher könnte der hemmende Effekt von Emmprin auf die NOD2-vermittelte NF- κ B-Aktivierung auch dadurch resultieren, dass die Interaktion von Emmprin und NOD2 zu einer Stabilisierung der inaktiven intramolekularen Bindung der LRR- und NOD-Domäne führt und somit eine verminderte Oligomerisierung und Aktivierung von NOD2 erfolgt.

Emmprin könnte in Ahnlehnung an die TLRs eine ähnliche Rolle wie SIGIRR oder Tollip einnehmen und als negativer Regulator von NOD2 fungieren. SIGIRR zeigt als Mitglied der TLR/IL-1R- (*Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling*-) Rezeptor-Superfamilie bereits strukturell als Transmembranprotein mit extrazellulärer Immunglobulin- (Ig-) Domäne (Thomassen *et al.*, 1999) eine Ähnlichkeit zu Emmprin, welches zwei extrazelluläre

Ig-Domänen besitzt (Biswas *et al.*, 1995). Außerdem konnte beschrieben werden, dass SIGIRR die TLR-vermittelte Immunreaktion durch Bindung an Mitglieder des TLR-IL-1R-Signalkomplexes (TLR4, IRAK und TRAF6) negativ moduliert (Wald *et al.*, 2003). Ein ebenfalls zur TLR-IL-1R-Familie gehörender negativer Regulator ist ST2, welches das IL-1R- und TLR4-Signalgeschehen inhibiert. Überexpression von ST2 führt über die Assoziation mit MyD88 und TIRAP zu einer Inhibierung der NF- κ B-Aktivierung (Brint *et al.*, 2004), was seine Rolle als negativer Regulator in Immunreaktionen unterstreicht und eine Parallele zum beobachteten Einfluss von Emmprin aufweisen könnte.

Scheinbar führt eine Interaktion zwischen dem Transmembran-ständigen Emmprin und dem zytosolischen NOD2 zu einer Translokation von NOD2 an die Zellmembran, was erste Ergebnisse von Fluoreszenz-Mikroskopie-Analysen bestätigen konnten (Rosenstiel und Bräutigam, unveröffentlichte Daten).

Die genaue Funktion des neu identifizierten Interaktionspartners von NOD2, Emmprin, ist aufgrund der bisher vorliegenden Daten nicht eindeutig geklärt. Anhand der strukturellen Ähnlichkeit zu anderen Scavenger-Proteinen, erscheint es denkbar, dass Emmprin über heterophile Bindung an NOD2 eine negativ-regulierende Funktion einnehmen könnte, was die Inhibition der NOD2-vermittelten Funktionen, wie NF- κ B-Aktivierung und MAP-Kinase-Phosphorylierung über die Interaktion mit den CARDS vermuten lässt.

Die Interaktion von NOD2 und Emmprin könnte ebenfalls die Funktion von Emmprin hemmen. Emmprin induziert die Matrixmetalloproteinasen 1, 2 und 3. Für diese MMPs konnte eine verstärkte Expression in Gewebe-Läsionen im Darm, wie z. B. bei M. Crohn, nachgewiesen werden, nachdem diese von aktivierten T-Zellen vermehrt produziert wurden (Pender *et al.*, 1998). Somit könnte die Bindung von NOD2 an Emmprin dessen Funktion, MMPs zu induzieren, hemmen. In M. Crohn-Patienten, die Mutationen im NOD2-Gen besitzen, könnte dieser hemmende Effekt durch eine abgeschwächte Interaktion geringer sein, wodurch Emmprin verstärkt seiner Rolle als MMP-Induzierer nachgehen könnte und somit vermehrt MMP-Produktion stattfindet, wie in Entzündungsreaktionen in M. Crohn (Bailey *et al.*, 1994) und in Gewebszerstörung im Darm nachgewiesen werden konnte (Pender *et al.*, 1998).

Neben der ursprünglich beschriebenen Rolle als Induzierer der Matrixmetalloproteinasen, ist Emmprin an Zelloberflächen-Interaktionen mit Integrinen und Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie beteiligt, was auf eine Funktion innerhalb der Zelladhäsion und Chemotaxis hindeutet. Die chemotaktische und MMP-induzierende Wirkung von Emmprin konnte auch in verschiedenen pathologischen Gegebenheiten neben der Tumorerkrankung

gezeigt werden, wie z. B. in rheumatoider Arthritis und CED (Tomita *et al.*, 2002; Bailey *et al.*, 1994). Eine gesteigerte MMP1- und MMP3- Expression in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen resultiert in einer Degradation der Lamina Propria-extrazellulären Matrix und der Basalmembran (Pender *et al.*, 1996). Die identifizierte Interaktion zwischen NOD2 und Emmprin könnte somit auch einen Einfluss auf die Barriere-Funktion des intestinalen Epithels und auf Funktionen des angrenzenden Bindegewebes haben.

4.5 Beteiligung von NOD2 an MAP-Kinase-Signalwegen

Um eine Beteiligung von NOD2 auf die Signaltransduktionskaskade der MAP-Kinasen nachzuweisen, bzw. eine Beeinflussung durch das interagierende Emmprin zu analysieren, wurden zunächst verschiedene Ebenen des klassischen MAP-Kinase-Signalweges untersucht. Anhand von einem Reporterassay, der die Phosphorylierung bzw. Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 nachweist, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MDP-Stimulation in NOD2-exprimierenden HEK 293-Zellen zu einer Steigerung der Elk-1-Aktivierung etwa um den Faktor 8,5 gegenüber der untransfizierten Kontrolle führte. Die anschließende Western Blot-Analyse konnte eine Phosphorylierung der MAP-Kinase Untergruppe ERK1/2 nach MDP-Stimulation NOD2-exprimierender Zellen nachweisen. Somit konnte eine bisher nicht beschriebene Beteiligung von NOD2 nach MDP-Stimulation für den ERK1/2-MAP-Kinase-Signalweg gezeigt werden. Elk-1 kann sowohl über ERK1/2, als auch über die MAP-Kinasen JNK1/2 und p38 phosphoryliert werden. Durch den Einsatz eines spezifischen Inhibitors (PD98059) konnte allerdings eine ERK1/2-spezifische Elk-1-Aktivierung nachgewiesen werden. Gleichzeitig sollte der Einfluss von Emmprin auf die Funktion von NOD2 im ERK1/2-Signalweg untersucht werden. Koexprimiertes Emmprin hemmte sowohl die NOD2-vermittelte Elk-1-, als auch die ERK1/2-Aktivierung nach Stimulation von MDP, womit die Hypothese gestützt wird, dass Emmprin als Interaktionspartner von NOD2 eine Inhibitorfunktion einnehmen könnte.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte auch eine mögliche Beteiligung von NOD2 an dem MAP-Kinase JNK1/2-Signalweg untersucht werden. Für die c-Jun-N-terminale Kinase JNK1/2 konnte auf der Ebene ihres Substrates (c-Jun) anhand der Western Blot-Analyse eine deutliche biphasische Phosphorylierung bzw. Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun in NOD2-exprimierenden und MDP-stimulierten Zellen gezeigt werden. Auch hier erfolgte eine eindeutige Inhibition der Phosphorylierung durch koexprimiertes Emmprin, was in

anschließenden Reporterassays bestätigt werden konnte. In einem weiteren Reporterassay konnte eine NOD2-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktor-Komplexes AP-1 nachgewiesen werden. Dieser Komplex setzt sich aus den Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos oder aus einer Kombination mit Mitgliedern der ATF-Familie zusammen. AP-1 kann sowohl über die MAP-Kinasen JNK1/2 und ERK1/2, als auch über p38 aktiviert werden. Eine eindeutige Aufklärung, ob die gezeigte NOD2-vermittelte AP-1-Aktivierung über die beschriebene Aktivierung des JNK1/2- oder ERK1/2-Signalweges oder aber über den p38-MAP-Kinase-Signalweg erfolgt, gestaltet sich schwierig, da der gängige Inhibitor der p38-MAP-Kinase (SB203580) ebenfalls RICK inhibiert und daher das NOD2-vermittelte Signalgeschehen beeinflussen könnte.

Somit konnte in der vorliegenden Arbeit neben der MDP-vermittelten NOD2-induzierten NF- κ B-Aktivierung in intestinalen epithelialen Zelllinien erstmals eine Beteiligung von NOD2 an MAP-Kinase-Signalwegen gezeigt werden. Eine NOD2-vermittelte Aktivierung sowohl der ERK1/2-, als auch der JNK1/2-Kinase nach MDP-Stimulation wurde auf Ebene der MAP-Kinasen und/oder derer Substrate nachgewiesen.

Mehrere Veröffentlichungen lieferten Hinweise, dass NOD2 außer in der NF- κ B-Aktivierung auch in der Aktivierung der MAP-Kinasen involviert sein könnte:

RICK vermittelt neben der NF- κ B-Aktivierung zusätzlich einen induzierenden Effekt auf die MAP-Kinase JNK1/2 (Thome *et al.*, 1998). Da RICK für die NOD2-vermittelte NF- κ B-Aktivierung essentiell ist, könnte die Interaktion auch für die NOD2-vermittelte JNK1/2 notwendig sein. Außerdem konnte für einige Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die in Analogie zu den NOD-Proteinen die *extrazellulären* PAMP-Rezeptoren darstellen, neben der NF- κ B-Aktivierung die Aktivierung der drei MAP-Kinasen ERK1/2, JNK1/2 und p38 beschrieben werden (Huang *et al.*, 2004; Cario *et al.*, 2000; Dumitru *et al.*, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass NOD1 in Reaktion auf das pathogene Bakterium *Shigella flexneri* die Aktivierung von NF- κ B und JNK1/2 vermittelt (Girardin *et al.*, 2001).

Eine direkte Beteiligung von NOD2 am klassischen MAP-Kinase-Signalweg ließ eine kürzlich beschriebene Arbeit von Pauleau und Murray vermuten: Obwohl NOD2 keine essentielle Rolle in der Reaktion von Makrophagen auf verschiedene TLR-Agonisten ausübt, konnte eine geringfügige Phosphorylierung der ERK1/2-Kinase nach MDP-Stimulation nachgewiesen werden (Pauleau and Murray, 2003). Einen weiteren Hinweis auf eine Involvierung von NOD2 innerhalb der MAP-Kinasen konnte mit Hilfe eines erst kürzlich

identifizierten Interaktionspartners von NOD2, die MAP-Kinase-Kinase TAK1 (*TGF- β -activated kinase 1*), nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 2004).

TAK1 ist eine essentielle Komponente in Signalwegen vielfacher inflammatorischer Zytokine und fungiert als eine Art Zweigstelle zwischen NF- κ B- und JNK/p38-Signalwegen, da es in Reaktion auf Interleukin (IL)-1, TNF- α , LPS, IL-18, RANKL und TGF- β sowohl die Aktivierung des IKK-Komplexes, als auch von MKK6 induziert (Wang *et al.*, 2001; Irie *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Sakurai *et al.*, 1999; Takaesu *et al.*, 2000; Takaesu *et al.*, 2001; Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999; Wald *et al.*, 2001; Yamaguchi *et al.*, 1995; Mizukami *et al.*, 2002).

Die N-terminale Kinase-Domäne von TAK1 interagiert mit der C-terminalen LRR-Domäne von NOD2. Über den Einsatz von dominant-negativem TAK1 konnte gezeigt werden, dass diese Bindung essentiell für die NOD2-induzierte NF- κ B-Aktivierung in NOD2-überexprimierenden HEK 293-Zellen ist (Chen *et al.*, 2004). Eine Beteiligung von NOD2 an der über TAK1-vermittelten JNK-Aktivierung wurde in dieser Arbeit nicht beschrieben, allerdings konnte eine negativ-regulierende Funktion über die Interaktion der LRR-Region von NOD2 auf die TAK1-vermittelte NF- κ B-Aktivierung in RICK^{-/-}-Fibroblasten nachgewiesen werden. Somit konnte über die Interaktion ein weiterer Hinweis für eine mögliche reziproke Kreuzverbindung zwischen NOD2 und inflammatorischen Zytokin-Signalwegen erbracht werden.

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine Stimulation von Makrophagen des Knochenmarks mit MDP in der Aktivierung von NF- κ B, ERK1/2 und p38 resultiert. Diese MDP-vermittelte Aktivierung wurde in NOD2^{-/-}-Makrophagen stark reduziert, was auf ein NOD2-abhängiges Signalgeschehen hinweist (Kobayashi *et al.*, 2005).

Eine koordinierte Regulation sowohl anti-, als auch pro-inflammatorischer sowie proliferativer Aktivitäten der MAP-Kinase-Signalwege ist für den Erhalt der intestinalen Homöostase essentiell. In ERK1/2-defizienten Mäusen konnte eine defekte Thymozyten-Reifung und eine reduzierte Expression der α - und β -Kette des T-Zell-Rezeptors nachgewiesen werden (Bettini *et al.*, 2002), was auf eine wichtige Rolle der ERK1/2-Kinase in der T-Zell-Aktivierung und der adaptiven Immunität schließen lässt. Eine Involvierung der MAP-Kinasen in der angeborenen Immunabwehr zeigt deren Aktivierung innerhalb des TLR-Signalgeschehens. Die MAP-Kinasen JNK1/2 und p38 werden über MEKK3 innerhalb des TLR4-Signalweges nach LPS-Stimulation aktiviert (Huang *et al.*, 2004), während die TLR4-

vermittelte ERK1/2-Aktivierung über TPL2 erfolgt (Dumitru *et al.*, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der ERK1/2-Signalweg an LPS-induzierter TNF- α -Produktion in monozytären Zellen beteiligt ist (van der Bruggen *et al.*, 1999).

NOD2 könnte somit analog zu den TLRs sowohl über die Aktivierung von NF- κ B, als auch der MAP-Kinasen eine Funktion in der Regulation der angeborenen Immunität einnehmen.

Innerhalb des NOD2-Signalgeschehens übernimmt der identifizierte Interaktionspartner Emmprin vermutlich eine negativ-regulierende Rolle (s. Abb. 42). Ausgehend von der Vermutung, dass Emmprin mit RICK um die Bindung an den CARDS konkurriert, wäre folgende Situation vorstellbar: In Abwesenheit von Emmprin bindet RICK an NOD2 und führt zur NOD2-vermittelten NF- κ B-Aktivierung. Außerdem erfolgt eine gesteigerte Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und JNK1/2 bzw. derer Substrate Elk-1 und c-Jun nach MDP-Stimulation. Ob diese Aktivierung ebenfalls von der Interaktion mit RICK abhängig ist, bedarf weiterer Untersuchungen. Emmprin scheint über die Interaktion mit den CARDS das Signalgeschehen von NOD2 zu blockieren. Da es sowohl zu einer Hemmung der NOD2-vermittelten NF- κ B-, als auch der MAP-Kinasen-Aktivierung durch vermehrte Expression von Emmprin kommt, lässt die NOD2-vermittelte MAP-Kinasen-Aktivierung einen identischen Mechanismus wie die NF- κ B-Aktivierung und eine Beteiligung von RICK vermuten.

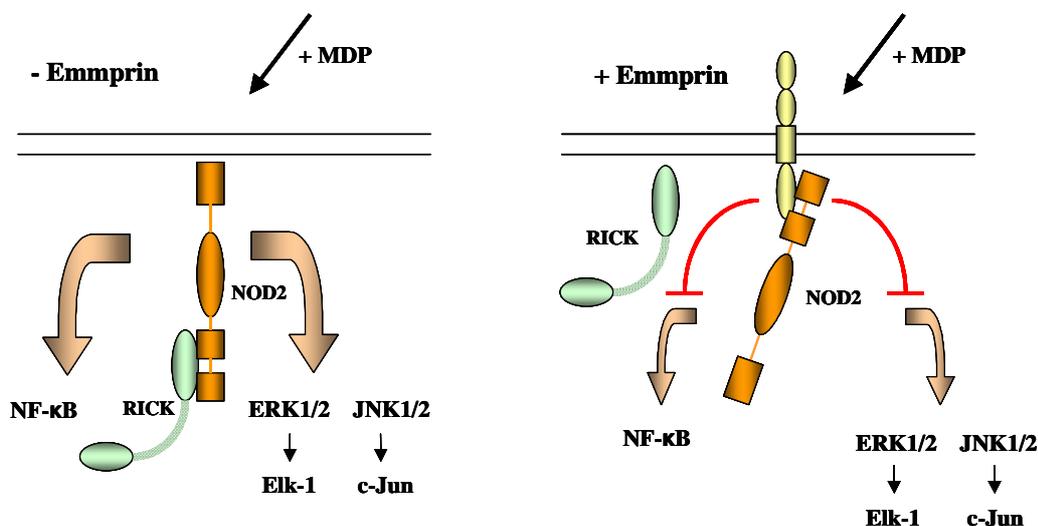


Abb. 42: Hypothetischer Einfluss von Emmprin auf das NOD2-vermittelte Signalgeschehen

Erklärung: s. Text.

4.6 MAP-Kinase-Signalwege in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

MAP-Kinasen spielen neben dem NF- κ B-Signalweg eine wichtige Rolle in Entzündungsprozessen. In chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte eine signifikante Aktivierung von p38, JNK1/2 und ERK1/2 gezeigt werden, wobei p38- α die stärkste Kinase-Aktivierung in entzündeter intestinaler Mukosa aufwies (Waetzig *et al.*, 2002). Eine gesteigerte Aktivierung der Stress-aktivierten MAP-Kinasen JNK1/2 und p38 konnte auch in Biopsien von M. Crohn-Patienten nachgewiesen werden (Waetzig *et al.*, 2002; Hommes *et al.*, 2002). In einer klinischen Pilotstudie zeigte der Einsatz eines spezifischen Inhibitors gegen die in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen aktivierten MAP-Kinasen eine Verminderung dieser Aktivierung und eine Verbesserung des Klinikbildes (Hommes *et al.*, 2002). Daher wurden die MAP-Kinase-Signalwege als neues therapeutisches Ziel zur Heilung bzw. Linderung chronischer Entzündungen im M. Crohn angesehen und intensiv diskutiert (Waetzig *et al.*, 2003; Hommes *et al.*, 2003; Saklatvala *et al.*, 2004; Boldt and Koch, 2004). Bisher konnte ein positiver Effekt der Inhibition der MAP-Kinasen nur in kleinen klinischen Studien beschrieben werden (Hommes *et al.*, 2002). Da die MAP-Kinasen ebenfalls eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der angeborenen Immunität spielen, könnte sich eine Suppression der MAP-Kinasen auch negativ auswirken; z. B. könnte eine Inhibition in einer deutlich gesteigerten Entzündungsreaktion aufgrund fehlender MAP-Kinase-vermittelter Apoptosemechanismen resultieren. Ob Inhibitoren als Entzündungs-hemmendes Therapeutikum im M. Crohn einsetzbar sind, muss anhand von Ergebnissen umfassenderer Studien untersucht werden.

4.7 Ausblick

Die hier vorgestellten Ergebnisse zur Charakterisierung der Funktion von NOD2 führen zu weiteren Fragestellungen:

- Welche Rolle spielen die Subfamilien der MAP-Kinasen beim NOD2-Signalgeschehen? Gibt es eine unterschiedliche Gewichtung in der NOD2-vermittelten Aktivierung, wie es für PGN-stimulierte Induzierung der MAP-Kinasen beschrieben wurde (Dziarski *et al.*, 1996)? Übernimmt JNK1/2 in diesem Zusammenhang eine pro- oder anti-apoptische Funktion? Ist RICK an der NOD2-vermittelten MAP-Kinasen-Aktivierung beteiligt?
- Kann die mögliche negative Regulatorfunktion von Emmprin näher charakterisiert werden? Gibt es weitere Interaktionspartner von NOD2, die eine Rolle bei der Reaktion der Zelle auf bakterielle Komponenten wie MDP spielen?
- Welche Gene außer IL-8 werden durch das NOD2-Signalgeschehen reguliert?

Die Beantwortung einiger der hier aufgeworfenen Fragen könnte zu einem besseren Verständnis der Rolle von NOD2 bei der Pathophysiologie von entzündlichen Prozessen beitragen.

Gelöscht: ¶

5 Zusammenfassung

Die unmittelbare Erkennung und Abwehr von Krankheitserregern durch das angeborene Immunsystem spielt eine entscheidende Rolle für das Überleben vielzelliger Organismen. Epitheliale Zellen sind integraler Bestandteil der vordersten mechanischen und immunologischen Barriere gegenüber eindringenden Pathogenen. Pflanzen und Tiere bedienen sich hierbei spezifischer Rezeptoren (*PAMP recognition receptors*, PRRs), die molekulare Muster unterschiedlicher Pathogene (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs), wie Lipopolysaccharid (LPS) und Muramyl-Dipeptid (MDP) erkennen. NOD-Proteine umfassen eine Familie intrazellulärer Proteine, die aufgrund ihrer speziellen Struktur die Funktion der Erkennung intrazellulärer PAMPs erfüllen können. NOD2 zeigt nach Stimulation mit seinem Liganden eine RICK-abhängige Induzierung der NF- κ B-Aktivierung. Varianten des NOD2-Gens, die in einer defekten NF- κ B-Aktivierung resultieren, sind mit M. Crohn assoziiert, einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, die durch diskontinuierliche transmurale Entzündungen des terminalen Ileums und Kolons durch ein Überwiegen pro-inflammatorischer Zytokine, wie TNF- α , gekennzeichnet ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression und Regulation von NOD2 in intestinalen Epithelzellen, die als vorderste Barriere gegenüber pathogenen Bakterien im Darm fungieren, zu untersuchen und über die Identifizierung neuer Interaktionspartner und einer eventuellen Beteiligung an MAP-Kinase-Signalwegen, die Funktion von NOD2 näher zu charakterisieren. Die Regulation der NOD2-Expression wurde in verschiedenen intestinalen Epithelzelllinien und HeLa-Zellen über Stimulation mit rekombinantem TNF- α und IFN- γ durchgeführt. Interaktionsstudien wurden über Two-Hybrid-System und Ko-Immunpräzipitations-Analysen bewerkstelligt. Als weiterer methodischer Ansatz wurde transiente Überexpression von NOD2, NOD2-Varianten und dem Interaktionspartner Emmprin in SW620-, HEK 293- und CHO-Zellen gewählt, um durch Einsatz von rekombinantem MDP und entsprechender Antikörper, sowohl Sezernierungs-Analysen und Reporterassays, als auch Bindungsstudien und Signaltransduktions-Analysen durchzuführen.

Es konnte eine dosis- und zeitabhängige Steigerung der mRNA- und Protein-Expression von NOD2 nach TNF- α -Stimulation und ein synergistischer Effekt auf die NOD2 mRNA-Expression über gleichzeitige Stimulation von TNF- α und IFN- γ gezeigt werden. Die Transaktivierung des NOD2-Promotors wird über zwei funktionelle NF- κ B-Bindestellen reguliert. Zusätzlich konnte eine verstärkte IL-8-Sekretion in NOD2-exprimierenden

intestinalen Epithelzellen nach Stimulation mit dem bakteriellen Zellwandbestandteil MDP nachgewiesen werden. Weiterhin konnte eine NOD2-vermittelte gesteigerte Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und JNK1/2 bzw. derer Substrate nach MDP-Stimulation beschrieben werden. Der neu-identifizierte Interaktionspartner Emmprin zeigte sowohl einen hemmenden Effekt auf die NOD2-vermittelte NF- κ B-Aktivierung, als auch auf die NOD2-abhängige Aktivierung der MAP-Kinasen und scheint als negativer Regulator des NOD2-vermittelten Signalgeschehens zu fungieren.

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnte NOD2 eine wichtige Funktion innerhalb der angeborenen Immunität in intestinalen Epithelzellen einnehmen, indem es als intrazellulärer PAMP-Rezeptor pathogene Organismen bzw. deren Produkte erkennt, was über eine parallele Aktivierung pro-inflammatorischer Signalwege, wie NF- κ B und MAP-Kinasen, in einer verstärkten Immunreaktion resultiert. Eine defekte Funktion von NOD2 im M. Crohn könnte mit einer verminderten Erkennung pathogener Bakterien assoziiert sein, was sekundär in einer verstärkten Entzündungsreaktion resultiert.

6 Summary

The innate immunity plays a pivotal role for the survival of multicellular organisms providing fast recognition and defense mechanisms against microbial agents. Epithelial cells are an integral part of the primary mechanical and immunological barrier against the invasion of pathogens. Plants and animals offer specific receptors (*PAMP recognition receptors*, PRRs) recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) like lipopolysaccharide (LPS) and muramyl dipeptide (MDP). NOD proteins comprise a family of intracellular proteins, which are considered to accomplish the function of intracellular PAMP recognition. After stimulation with its ligand NOD2 induces RICK-dependent NF- κ B activation. Variants of the *NOD2* gene which result in a defective induction of NF- κ B activity, are associated with Crohn's disease, a human chronic inflammatory bowel disease characterized by discontinuous transmural inflammation of the terminal ileum and colon through a preponderance of proinflammatory cytokines like TNF- α .

The aim of this study was to determine the regulation of NOD2 expression in intestinal epithelial cells which function as the primary barrier against invading pathogens and to qualify the function of NOD2 by identifying new interaction partners and a possible participation in MAP kinase pathways.

Regulation of NOD2 expression was investigated in different intestinal epithelial cell lines and HeLa cells upon stimulation with recombinant TNF- α and IFN- γ . The interaction experiments were accomplished by a Two Hybrid system and Co-IPs. Transient overexpression experiments of NOD2, NOD2 variants and the interaction partner Emmprin were established in SW620, HEK 293 und CHO cells. Recombinant MDP and appropriate antibodies were employed to carry out secretion analyses, reporter gene assays, binding and signaltransduction pathway studies.

An upregulation of NOD2 mRNA and protein could be demonstrated by TNF- α stimulation in a dose- and time-dependent manner. A synergistic effect was shown by a concomitant TNF- α /IFN- γ stimulation. Transactivation of the NOD2 promotor is regulated by two functional NF- κ B binding sites. In addition, NOD2 expressing intestinal epithelial cells showed an enhanced IL-8 secretion upon stimulation with the bacterial cell wall component MDP. Furthermore a NOD2-mediated increased activation of the MAP kinases ERK1/2 und JNK1/2 could be revealed after MDP stimulation. The newly identified interaction partner Emmprin demonstrated both an inhibition of NOD2-mediated NF- κ B activation and NOD2-

dependent activation of MAP kinases. Emmprin seems to function as a negative regulator of NOD2-mediated signalling.

The results of the presented study suggest that NOD2 exhibits an important function for innate immune responses of intestinal epithelial cells. NOD2 may act as intracellular PAMP receptor recognizing microbial pathogens and their products respectively and leads to parallel activation of proinflammatory signalling pathways including NF- κ B and MAP kinases. The impaired function of the NOD2 variant described in Crohn`s disease could be associated with a diminished recognition of bacterial pathogens and results secondarily in increasing inflammatory reactions.

7 Literatur

- Abreu, M. T., Vora, P., Faure, E., Thomas, L. S., Arnold, E. T., and Arditi, M. (2001) Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* **167**:1609-16
- Abreu, M. T., Arnold, E. T., Thomas, L. S., Gonsky, R., Zhou, Y., Hu, B., and Arditi, M. (2002) TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* **277**:20431-7
- Adler, Guido (1996) *Morbus Crohn – Colitis ulcerosa. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage*, Springer-Verlag
- Aganna, E., Martinon, F., Hawkins, P. N., Ross, J. B., Swan, D. C., Booth, D. R., Lachmann, H. J., Bybee, A., Gaudet, R., Woo, P., Feighery, C., Cotter, F. E., Thome, M., Hitman, G. A., Tschopp, J., and McDermott, M. F. (2002) Association of mutations in the NALP3/CIAS1/PYPAF1 gene with a broad phenotype including recurrent fever, cold sensitivity, sensorineural deafness, and AA amyloidosis. *Arthritis Rheum* **46**:2445-52
- Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M. F., Hawkins, P. N., and Tschopp, J. (2004) NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* **20**:319-25
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**:675-80
- Akira, S., and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**:499-511
- Albrecht, M., Domingues, F. S., Schreiber, S., and Lengauer, T. (2003) Structural localization of disease-associated sequence variations in the NACHT and LRR domains of PYPAF1 and NOD2. *FEBS Lett* **554**:520-8
- Arnott, I. D., Kingstone, K., and Ghosh, S. (2000) Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* **35**:1163-9
- An, H., Yu, Y., Zhang, M., Xu, H., Qi, R., Yan, X., Liu, S., Wang, W., Guo, Z., Guo, J., Qin, Z., and Cao, X. (2002) Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology* **106**:38-45
- Ayabe, T., Satchell, D. P., Wilson, C. L., Parks, W. C., Selsted, M. E., and Ouellette, A. J. (2000) Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* **1**:113-8
- Ayabe, T., Satchell, D. P., Pesendorfer, P., Tanabe, H., Wilson, C. L., Hagen, S. J., and Ouellette, A. J. (2002) Activation of Paneth cell alpha-defensins in mouse small intestine. *J Biol Chem* **277**:5219-28
- Baeuerle, P. A., and Baltimore, D. (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell* **87**:13-20
- Baeuerle, P. A., and Henkel, T. (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* **12**:141-79
- Bailey, C. J., Hembry, R. M., Alexander, A., Irving, M. H., Grant, M. E., and Shuttleworth, C. A. (1994) Distribution of the matrix metalloproteinases stromelysin, gelatinases A and B, and collagenase in Crohn's disease and normal intestine. *J Clin Pathol* **47**:113-6
- Baud, V. and Karin, M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* **11**:372-7

- Benedict, M. A., Hu, Y., Inohara, N., and Nunez, G. (2000) Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra WD-40 repeat is required for cytochrome- c binding and regulated activation of procaspase-9. *J Biol Chem* **275**:8461-8
- Ben-Neriah, Y., and Schmitz, M. L. (2004) Of mice and men. *EMBO Rep* **5**:668-73
- Bertin, J., and DiStefano, P. S. (2000) The PYRIN domain: a novel motif found in apoptosis and inflammation proteins. *Cell Death Differ* **7**:1273-4
- Bettini, M., Xi, H., Milbrandt, J., and Kersh, G. J. (2002) Thymocyte development in early growth response gene 1-deficient mice. *J Immunol* **169**:1713-20
- Beutler, B. (2004) Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling. *Nature* **430**:257-63
- Biswas, C., Zhang, Y., DeCastro, R., Guo, H., Nakamura, Y., Kataoka, H., and Nabeshima, K. (1995) The human tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* **55**:434-9
- Boldt, S., and Kolch, W. (2004) Targeting MAPK signalling: Prometheus' fire or Pandora's box? *Curr Pharm Des* **10**:1885-905
- Bonen, D. K., Ogura, Y., Nicolae, D. L., Inohara, N., Saab, L., Tanabe, T., Chen, F. F., Foster, S. J., Duerr, R. H., Brant, S. R., Cho, J. H., and Nunez, G. (2003) Crohn's disease-associated NOD2 variants share signalling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* **124**:140-6
- Bouma, G., and Strober, W. (2003) The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* **3**:521-33
- 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**:248-54
- Brent, R., and Ptashne, M. (1985) A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*; **43**:729-36
- Brint, E. K., Xu, D., Liu, H., Dunne, A., McKenzie, A. N., O'Neill, L. A., and Liew, F. Y. (2004) ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* **5**:373-9
- Brown, J. A., He, X. F., Westerheide, S. D., and Boss J. M. (1996) Characterization of the expressed CIITA allele in the class II MHC transcriptional mutant RJ2.2.5. *Immunogenetics* **43**:88-91
- Cain, K., Bratton, S. B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D. G., Sun, X. M., and Cohen, G. M. (2000) Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* **275**:6067-70
- Cario, E., and Podolsky, D. K. (2000) Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* **68**:7010-7
- Chamaillard, M., Philpott, D., Girardin, S. E., Zouali, H., Lesage, S., Chareyre, F., Bui, T. H., Giovannini, M., Zaehring, U., Penard-Lacronique, V., Sansonetti, P. J., Hugot, J. P., and Thomas, G. (2003) Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3455-60.
- Chan, E. D., Winston, B. W., Jarpe, M. B., Wynes, M. W., and Riches, D. W. (1997) Preferential activation of the p46 isoform of JNK/SAPK in mouse macrophages by TNF alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:13169-74
- Chang, L., and Karin, M. (2001) Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* **410**:37-40

- Chawla-Sarkar, M., Bae, S. I., Reu, F. J., Jacobs, B. S., Lindner, D. J., and Borden, E. C. (2004) Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **11**:915-23
- Chen, C. M., Gong, Y., Zhang, M., and Chen, J. J. (2004) Reciprocal cross-talk between NOD2 and TAK1 signalling pathways. *J Biol Chem* **279**:25876-82
- Chen, F. E., Huang, D. B., Chen, Y. Q., and Ghosh, G. (1998) Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature* **391**:410-13
- Chesire, J. L., and Baldwin, A. S. Jr. (1997) Synergistic activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon via enhanced I kappaB alpha degradation and de novo I kappaB beta degradation. *Mol Cell Biol* **17**:6746-54
- Chin, K. C., Li, G. G., and Ting, J.P. (1997) Importance of acidic, proline/serine/threonine-rich, and GTP-binding regions in the major histocompatibility complex class II transactivator: generation of transdominant-negative mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:2501-6
- Chu, Z. L., Pio, F., Xie, Z., Welsh, K., Krajewska, M., Krajewski, S., Godzik, A., and Reed, J. C. (2001) A novel enhancer of the Apaf1 apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem* **276**:9239-45
- Cressman, D. E., Chin, K. C., Taxman, D. J., and Ting, J. P. (1999) A defect in the nuclear translocation of CIITA causes a form of type II bare lymphocyte syndrome. *Immunity* **10**:163-71
- Dangl, J. L., and Jones, J. D. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**:826-33
- Davis, R. J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**:239-52
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1998) IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* **17**:2215-23
- DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., and Karin, M. (1997) A cytokine-responsive I kappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* **388**:548-54
- Diez, E., Yaraghi, Z., MacKenzie, A., and Gros, P. (2000) The neuronal apoptosis inhibitory protein (Naip) is expressed in macrophages and is modulated after phagocytosis and during intracellular infection with *Legionella pneumophila*. *J Immunol* **164**:1470-7
- Diez, E., Lee, S. H., Gauthier, S., Yaraghi, Z., Tremblay, M., Vidal, S., and Gros, P. (2003) Birc1e is the gene within the Lgn1 locus associated with resistance to *Legionella pneumophila*. *Nat Genet* **33**:55-60
- Dowds, T. A., Masumoto, J., Chen, F. F., Ogura, Y., Inohara, N., and Nunez, G. (2003) Regulation of cryopyrin/Pypaf1 signaling by pyrin, the familial Mediterranean fever gene product. *Biochem Biophys Res Commun* **302**:575-80
- Dowds, T. A., Masumoto, J., Zhu, L., Inohara, N., and Nunez, G. (2004) Cryopyrin-induced interleukin 1beta secretion in monocytic cells: enhanced activity of disease-associated mutants and requirement for ASC. *J Biol Chem* **279**:21924-8
- Doyle, S. E., O'Connell, R. M., Miranda, G. A., Vaidya, S. A., Chow, E. K., Liu, P. T., Suzuki, S., Suzuki, N., Modlin, R. L., Yeh, W. C., Lane, T. F., and Cheng, G. (2004) Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *J Exp Med* **199**:81-90

- Dumitru, C. D., Ceci, J. D., Tsatsanis, C., Kontoyiannis, D., Stamatakis, K., Lin, J. H., Patriotis, C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Kollias, G., and Tschlis, P. N. (2000) TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* **103**:1071-83
- Dunne, A., and O'Neill, L. A. (2003) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* **2003**:re3
- Dziarski, R., Jin, Y. P., and Gupta, D. (1996) Differential activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1, ERK2, p38, and c-Jun NH2-terminal kinase mitogen-activated protein kinases by bacterial peptidoglycan. *J Infect Dis* **174**:777-85
- Eckmann, L., Jung, H. C., Schurer-Maly, C., Panja, A., Morzycka-Wroblewska, E., and Kagnoff, M. F. (1993) Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology* **105**:1689-97
- Eckmann, L. (2005) Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol* **21**:147-51
- Elewaut, D., DiDonato, J. A., Kim, J. M., Truong, F., Eckmann, L., and Kagnoff, M. F. (1999) NF-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J Immunol* **163**:1457-66
- Ellis, S. M., Nabeshima, K., and Biswas, C. (1989) Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor. *Cancer Res* **49**:3385-91
- Eisenhauer, P. B., Harwig, S. S., and Lehrer, R. I. (1992) Cryptdins: antimicrobial defensins of the murine small intestine. *Infect Immun* **60**:3556-65
- Enslin, H., Raingeaud, J., and Davis, J. R. (1998) Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem* **273**:1741-8
- Feldmann, J., Prieur, A. M., Quartier, P., Berquin, P., Certain, S., Cortis, E., Teillac-Hamel, D., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (2002) Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIAS1, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. *Am J Hum Genet* **71**:198-203
- Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R. J., Luo, Y., and Han, J. (2002) MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* **295**:1291-4
- Ghosh, D., Porter, E., Shen, B., Lee, S. K., Wilk, D., Drazba, J., Yadav, S. P., Crabb, J. W., Ganz, T., and Bevins, C. L. (2002) Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat Immunol* **3**:583-90
- Ghosh, G., van Duyn, G., Ghosh, S., and Sigler, P. B. (1995) Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. *Nature* **373**:303-10
- Girardin, S. E., Tournbize, R., Mavris, M., Page, A. L., Li, X., Stark, G. R., Bertin, J., DiStefano, P. S., Yaniv, M., Sansonetti, P. J., and Philpott, D. J. (2001) CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* **2**:736-42
- Girardin, S. E., Travassos, L. H., Herve, M., Blanot, D., Boneca, I. G., Philpott, D. J., Sansonetti, P. J., and Mengin-Lecreulx (2003a) Peptidoglycan Molecular Requirements Allowing Detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem* **278**:41702-8

- Girardin, S. E., Hugot, J. P., and Sansonetti, P. J. (2003b) Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol* **24**:652-8
- Gobin, S. J., Peijnenburg, A., Keijzers, V., and van den Elsen, P. J. (1997) Site alpha is crucial for two routes of IFN gamma-induced MHC class I transactivation: the ISRE-mediated route and a novel pathway involving CIITA. *Immunity* **6**:601-11
- Growney, J. D., and Dietrich, W. F. (2000) High-resolution genetic and physical map of the Lgn1 interval in C57BL/6J implicates Naip2 or Naip5 in Legionella pneumophila pathogenesis. *Genome Res* **10**:1158-71
- Guirguis, R., Javadpour, N., Sharareh, S., Biswas, C., El-Amin, W., Mansur, I., and Kim, J. S. (1990) A new method for evaluation of urinary autocrine motility factor and tumor cell collagenase stimulating factor as markers for urinary tract cancers. *J Occup Med* **32**:846-53
- Guo, H., Zucker, S., Gordon, M. K., Toole, B. P. and Biswas, C. (1997) Stimulation of Matrix Metalloproteinase Production by Recombinant Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer from Transfected Chinese Hamster Ovary Cells. *J Biol Chem* **272**:24-7
- Guo, H., Majmudar, G., Jensen, T. C., Biswas, C., Toole, B. P., and Gordon, M. K. (1998) Characterization of the gene for human EMMPRIN, a tumor cell surface inducer of matrix metalloproteinases. *Gene* **220**:99-108
- Gutierrez, O., Pipaon, C., Inohara, N., Fontalba, A., Ogura, Y., Prosper, F., Nunez, G., and Fernandez-Luna, J. L. (2002) Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* **277**:41701-5
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., and Brent, R. (1993) Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**:791-803
- Hambleton, J., Weinstein, S. L., Lem, L., and DeFranco, A. L. (1996) Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:2774-8
- Hampe, J., Cuthbert, A., Croucher, P. J., Mirza, M. M., Mascheretti, S., Fisher, S., Frenzel, H., King, K., Hasselmeyer, A., MacPherson, A. J., Bridger, S., van Deventer, S., Forbes, A., Nikolaus, S., Lennard-Jones, J. E., Foelsch, U. R., Krawczak, M., Lewis, C., Schreiber, S., and Mathew, C. G. (2001) Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* **357**:1925-8
- Hanauer, S. B., Feagan, B. G., Lichtenstein, G. R., Mayer, L. F., Schreiber, S., Colombel, J. F., Rachmilewity, D., Wolf, D. C., Olson, A., Bao, W., and Rutgeerts, P. (2002) Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* **359**:1541-9
- Haq, R., Halupa, A., Beattie, B. K., Mason, J. M., Zanke, B. W., and Barber, D. L. (2002) Regulation of erythropoietin-induced STAT serine phosphorylation by distinct mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **277**:17359-66
- Harton, J. A., Cressman, D. E., Chin, K. C., Der, C. J., and Ting, J. P. (1999) GTP binding by class II transactivator: role in nuclear import. *Science* **285**:1402-5
- Harton, J. A., Linhoff, M. W., Zhang, J., and Ting J. P. (2002) Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J Immunol* **169**:4088-93

- Heinzelmann, M., Polk, H. C., Jr., Chernobelsky, A., Stites, T. P., and Gordon, L. E. (2000) Endotoxin and muramyl dipeptide modulate surface receptor expression on human mononuclear cells. *Immunopharmacology* **48**:117-28.
- Hlaing, T., Guo, R. F., Dilley, K. A., Loussia, J. M., Morrish, T. A., Shi, M. M., Vincenz, C., and Ward, P. A. Molecular cloning and characterization of DEFCAP-L and -S, two isoforms of a novel member of the mammalian Ced-4 family of apoptosis proteins. *J Biol Chem* **276**:9230-8
- Hoffman, H. M., Mueller, J. L., Broide, D. H., Wanderer, A. A., and Kolodner, R. D. (2001) Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* **29**:301-5
- Holcik, M., Thompson, C. S., Yaraghi, Z., Lefebvre, C. A., MacKenzie, A. E., and Korneluk, R. G. (2000) The hippocampal neurons of neuronal apoptosis inhibitory protein 1 (NAIP1)-deleted mice display increased vulnerability to kainic acid-induced injury. *Proc Natl Acad Sci. U S A* **97**:2286-90
- Holmström, T. H., Schmitz, I., Soderstrom, T. S., Poukkula, M., Johnson, V. L., Chow, S. C., Krammer, P. H., and Eriksson, J. E. (2000) MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly. *EMBO J* **19**:5418-28
- Holtje, J. V. (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:181-203
- Hommes, D., van den Blink, B., Plasse, T., Bartelsman, J., Xu, C., Macpherson, B., Tytgat, G., Peppelenbosch, M., and van Deventer, S. (2002) Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* **122**:7-14
- Hommes, D. W., Peppelenbosch, M. P., and van Deventer, S. J. (2003) Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* **52**:144-51
- Hu, Y., Ding, L., Spencer, D. M., and Nunez, G. (1998) WD-40 repeat region regulates APAF1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem* **273**:33489-94
- Huang, Q., Yang, J., Lin, Y., Walker, C., Cheng, J., Liu, Z. G., and Su, B. (2003) Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3. *Nat Immunol* **5**:98-103
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M., and Thomas, G. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**:599-603
- Inohara, N., Koseki, T., Lin, J., del Peso, L., Lucas, P. C., Chen, F. F., Ogura, Y., and Nunez, G. (2000) An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem* **275**:27823-31
- Inohara, N., and Nunez, G. (2001) The NOD: a signaling module that regulate apoptosis and host defense against pathogens. *Oncogene* **20**:6473-81
- Inohara, N., Ogura, Y., and Nunez, G. (2002) Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol* **5**:76-80
- Inohara, N., and Nunez, G. (2003) NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* **3**:371-82
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S. J., Moran, Fernandez-Luna, J. L., and Nunez, G. (2003) Host recognition of

- bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2: implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* **278**:5509-12
- Ip, Y. T., and Davis, R. J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* **10**:205-19
- Irie, T., Muta, T., and Takeshige, K. (2000) TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor- κ B in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Lett* **467**:160-4
- Irvine, E. J., and Marshall, J. K. (2000) Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* **119**:1740-4
- Jain, A., Ma, C. A., Liu, S., Brown, M., Cohen, J., and Strober, W. (2001) Specific missense mutations in NEMO result in hyper-IgM syndrome with hypohydrotic ectodermal dysplasia. *Nat Immunol* **2**:223-8
- Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J. A., Lin, S., and Han, J. (1996) Characterization of the structure of a new mitogen-activated protein kinase (p38 β). *J Biol Chem* **271**:17920-6
- Jung, H. C., Eckmann, L., Yang, S. K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E., and Kagnoff, M. F. (1995) A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* **95**:55-65
- Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**:240-6
- Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **18**:621-63
- Kasinrerk, W., Fiebiger, E., Stefanova, I., Baumruker, T., Knapp, W., and Stockinger, H. (1992) Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule. *J Immunol* **149**:847-54
- Kataoka, H., DeCastro, R. Zucker, S., and Biswas, C. (1993) Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Res* **53**:3154-8
- Keesler, G. A., Bray, J., Hunt, J., Johnson, D. A., Gleason, T., Yao, Z., Wang, S. W., Parker, C., Yamane, H., Cole, C., and Lichenstein, H. S. (1998) Purification and activation of recombinant p38 isoforms alpha, beta, gamma, and delta. *Protein Expr Purif* **14**:221-8
- Kile, R. L., and Rusk, H. A. (1940) A case of cold urticaria with an unusual family history. *JAMA* **114**:1067-8
- Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Nunez, G., Janeway, C. A., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2002) RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* **416**:194-9
- Kobayashi, K. S., and Flavell, R. A. (2004) Shielding the double-edged sword: negative regulation of the innate immune system. *J Leukoc Biol* **75**:428-33
- Kobayashi, K. S., Chamailard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G., and Flavell, R. A. (2005) Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **307**:731-4
- Kontinen, Y. T., Li, T. F., Mandelin, J., Liljestrom, M., Sorsa, T., Santavirta, S., and Virtanen, I. (2000) Increased expression of EMMPRIN in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* **43**:275-80
- Koonin, E. V., and Aravind, L. (2000) The NACHT family – a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem Sci* **25**:223-4

- Kucharzik, T., Lugerling, N., Weigelt, H., Adolf, M., Domschke, W., and Stoll, R. (1996) Immunoregulatory properties of IL-13 in patients with inflammatory bowel disease; comparison with IL-4 and IL-10. *Clin Exp Immunol* **104**:483-90
- Kumar, S., McDonnell, P. C., Gum, R. J., Hand, A. T., Lee, J. C., and Young, P. R. (1997) Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun* **235**:533-8
- Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (1996) Sounding the alarm: protein kinases cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem* **271**:24313-6
- Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**:807-69
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5
- Lechner, C., Zahalka, M. A., Giot, J. F., Moller, N. P., and Ullrich, A. (1996) ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:4355-9
- Lee, J., Mira-Arbibe, L., and Ulevitch, R. J. (2000) TAK1 regulates multiple protein kinase cascades activated by bacterial lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* **68**:909-15
- Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., et al. (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**:739-46
- Lew, E. A., and Stoffel, E. M. (2003) Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med* **348**:1599
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**:491-501
- Li, X., and Stark, G. R. (2002) NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* **30**:285-96
- Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R. J., and Han, J. (1996) The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* **228**:334-40
- Lin, L., and Ghosh, S. (1996) A glycine rich-region in NF- κ B p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol Cell Biol* **16**:2248-54
- Lin, L., DeMartino, G. N., and Greene, W. C. (2000) Cotranslational dimerization of the Rel homology domain of NF- κ B1 generates p50-p105 heterodimers and is required for effective p50 production. *EMBO J* **19**:4712-22
- Lin, L. L., Wartmann, M., Lin, A. Y., Knopf, J. L., Seth, A., and Davis, R. J. (1993) cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **72**:269-78
- Linhoff, M. W., Harton, J. A., Cressman, D. E., Martin, B. K., and Ting, J. P. (2001) Two distinct domains within CIITA mediate self-association: involvement of the GTP-binding and leucine-rich repeat domains. *Mol Cell Biol* **21**:3001-11
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J. E., MacKenzie, A., and Korneluk, R. G. (1996) Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* **379**:349-53
- Ma, J., and Ptashne, M. (1988) Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* **55**:443-6

- MacDonald, T. T., Hutchings, P., Choy, M. Y., Murch, S., and Cooke, A. (1990) Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clin Exp Immunol* **81**:301-5
- Maier, J. K., Lahoua, Z., Gendron, N. H., Fetni, R., Johnston, A., Davoodi, J., Rasper, D., Roy, S., Slack, R. S., Nicholson, D. W., and MacKenzie, A. E. (2002) The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7. *J Neurosci* **22**:2035-43
- Manji, G. A., Wang, L., Geddes, B. J., Brown, M., Merriam, S., Al-Garawi, A., Mak, S., Lora, J. M., Briskin, M., Jurman, M., Cao, J., DiStefano, P. S., and Bertin, J. (2002) PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B. *J Biol Chem* **277**:11570-5
- Martin, B. K., Chin, K. C., Olsen, J. C., Skinner, C. A., Dey, A., Ozato, K., and Ting, J. P. (1997) Induction of MHC class I expression by the MHC class II transactivator CIITA. *Immunity* **6**:591-600
- Martinon, F., Hofmann, K., and Tschopp, J. (2001) The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Curr Biol* **11**:118-20
- Matsunaga, T., Ishida, T., Takekawa, M., Nishimura, S., Adachi, M., and Imai, K. (2002) Analysis of gene expression during maturation of immature dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Scand J Immunol* **56**:593-601
- Mercer, E. A., Korhonen, L., Skoglosa, Y., Olsson, P. A., Kukkonen, J. P., and Lindholm, D. (2000) NAIP interacts with hippocalcin and protects neurons against calcium-induced cell death through caspase-3-dependent and -independent pathways. *EMBO J* **19**:3597-607
- Mercurio, F., and Manning, A. M. (1999a) Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr Opin Cell Biol* **11**:226-32
- Mercurio, F., and Manning, A. M. (1999b) NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* **18**:6163-71
- Meskiene, I., and Hirt, H. (2000) MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Mol Biol* **42**:791-806
- Miceli-Richard, C., Lesage, S., Rybojad, M., Prieur, A. M., Manouvrier-Hanu, S., Hafner, R., Chamailard, M., Zouali, H., Thomas, G., and Hugot, J.P. (2001) CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat Genet* **29**:19-20
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., and Tschopp, J. (2001) NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* **21**:5299-305
- Mizukami, J., Takaesu, G., Akatsuka, H., Sakurai, H., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., and Sakurai, N. (2002) Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. *Mol Cell Biol* **22**:992-1000
- Mullis, K. B., and Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**:335-50
- Nabeshima, K., Lane, W. S., and Biswas, C. (1991) Partial sequencing and characterization of the tumor cell-derived collagenase stimulatory factor. *Arch Biochem Biophys* **285**:90-6
- Nam, Y. J., Mani, K., Ashton, A. W., Peng, C. F., Krishnamurthy, B., Hayakawa, Y., and Lee, P., Korsmeyer, S. J., and Kitsis, R. N. (2004) Inhibition of both the extrinsic and intrinsic death pathways through nonhomotypic death-fold interactions. *Mol Cell* **15**:901-12

- Naser, S. A., Ghobrial, G., Romero, C., and Valentine, J. F. Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* **364**:1039-44
- Nau, G. J., Richmond, J. F., Schlesinger, A., Jennings, E. G., Lander, E. S., and Young, R. A. (2002) Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:1503-8
- Neven, B., Callebaut, I., Prieur, A. M., Feldmann, J., Bodemer, C., Lepore, L., Derfalvi, B., Benjaponpitak, S., Vesely, R., Sauvain, M. J., Oertle, S., Allen, R., Morgan, G., Borkhardt, A., Hill, C., Gardner-Medwin, J., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (2004) Molecular basis of the spectral expression of CIAS1 mutations associated with phagocytic cell-mediated autoinflammatory disorders CINCA/NOMID, MWS, and FCU. *Blood* **103**:2809-15
- Nickerson, K., Sisk, T. J., Inohara, N., Yee, C. S., Kennell, J., Cho, M. C., Yannie, P. J. 2nd, Nunez, G., and Chang, C. H. (2001) Dendritic cell-specific MHC class II transactivator contains a caspase recruitment domain that confers potent transactivation activity. *J Biol Chem* **276**:19089-93
- Nielsen, O. H., Koppen, T., Rudiger, N., Horn, T., Eriksen, J., and Kirman (1996) Involvement of interleukin-4 and-10 in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* **41**:1786-93
- Nikolaus, S., Bauditz, J., Gionchetti, P., Witt, C., Lochs, H., and Schreiber, S. (1998) Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin-10 during intestinal inflammation. *Gut* **42**:470-6
- Nikolaus, S., Raedler, A., Kuhbacher, T., Sfikas, N., Folsch, U. R., and Schreiber, S. (2000) Mechanisms in failure of infliximab for Crohn's disease. *Lancet* **356**:1475-9
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., and Matsumoto, K. (1999) The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* **398**:252-6
- O'Connor, W., Jr., Harton, J. A., Zhu, X., Linhoff, M. W., and Ting, J. P. (2003) Cutting edge: CIAS1/cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF-kappa B suppressive properties. *J Immunol* **171**:6329-33
- Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F. F., Yamaoka, S., and Nunez, G. (2001a) Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* **276**:4812-8
- Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nunez, G., and Cho, J. H. (2001b) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**:603-6
- 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**:1054-70
- Pahl, H. L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**:6853-66
- Parronchi, P., Romagnani, P., Annunziato, F., Sampognaro, S., Becchio, A., Giannarini, L., Maggi, E., Pupilli, C., Tonelli, F., and Romagnani, S. (1997) Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* **150**:823-32
- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2003) Toll-like receptors: balancing host resistance with immune tolerance. *Curr Opin Immunol* **15**:677-82
- Pauleau, A. L., and Murray, P. J. (2003) Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. *Mol Cell Biol* **23**:7531-9

- Pawson, T., and Scott, J. D. (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* **278**:2075-80
- Pender, S. L., Lionetti, P., Murch, S. H., Wathan, N., and MacDonald, T. T. (1996) Proteolytic degradation of intestinal mucosal extracellular matrix after lamina propria T cell activation. *Gut* **39**:284-90
- Pender, S. L., Tickle, S. P., Docherty, A. J., Howie, D., Wathen, N. C., and MacDonald, T. T. (1997) A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol* **158**:1582-90
- Pender, S. L., Breese, E. J., Gunther, U., Howie, D., Wathen, N. C., Schuppan, D., and MacDonald, T. T. (1998) Suppression of T cell-mediated injury in human gut by interleukin 10: role of matrix metalloproteinases. *Gastroenterology* **115**:573-83
- Pender, S. L., Croucher, P. J., Mascheretti, S., Prothero, J. D., Fisher, S. A., MacDonald, T. T., Schreiber, S., and Ye, S. (2004) Transmission disequilibrium test of stromelysin-1 gene variation in relation to Crohn's disease. *J Med Genet* **41**:112
- Philpott, D. J., Yamaoka, S., Israel, A., and Sansonetti, P. J. (2000) Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol* **165**:903-14
- Podolsky, D. K. (2002) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **347**:417-29
- Quan, V., Towey, M., Sacks, S., and Kelly, A. P. (1999) Absence of MHC class II gene expression in a patient with a single amino acid substitution in the class II transactivator protein CIITA. *Immunogenetics* **49**:957-63
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **118**:229-41
- Rao, K. M. (2001) MAP kinase activation in macrophages. *J Leukoc Biol* **69**:3-10
- Raval, A., Howcroft, T. K., Weissman, J. D., Kirshner, S., Zhu, X. S., Yokoyama, K., Ting, J., and Singer, D. S. (2001) Transcriptional coactivator, CIITA, is an acetyltransferase that bypasses a promoter requirement for TAF(II)250. *Mol Cell* **7**:105-15
- Read, M. A., Whitley, M. Z., Gupta, S., Pierce, J. W., Best, J., Davis, R. J., and Collins, T. (1997) Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* **272**:2753-61
- Read, M. A., Brownell, J. E., Gladysheva, T. B., Hottelet, M., Parent, L. A., Coggins, M. B., Pierce, J. W., Podust, V. N., Luo, R. S., Chau, V., and Palombella, V. J. (2000) Nedd8 modification of cul-1 activates SCF(betaTrCP)-dependent ubiquitination of IkappaBalpha. *Mol Cell Biol* **20**:2326-33
- Reinecker, H. C., Steffen, M., Witthoeft, T., Pflueger, I., Schreiber, S., MacDermott, R. P., and Raedler, A. (1993) Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, Il-6, and Il-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* **94**:174-81
- Reith, W., and Mach, B. (2001) The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. *Annu Rev Immunol* **19**:331-73
- Riley, J. L., Westerheide, S. D., Price, J. A., Brown, J. A., and Boss, J. M. (1995) Activation of class II MHC genes requires both the X box region and the class II transactivator (CIITA). *Immunity* **2**:533-43
- Robinson, M. J., and Cobb, M. H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**:180-6

- Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P. A., Scholmerich, J., and Gross, V. (1998) Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* **115**:357-69
- Rose, D. M., Winston, B. W., Chan, E. D., Riches, D. W., Gerwins, P., Johnson, G. L., and Henson, P. M. (1997) Fc gamma receptor cross-linking activates p42, p38, JNK/SAPK mitogen-activated protein kinases in murine macrophages: role for p42MAPK in Fc gamma receptor-stimulated TNF-alpha synthesis. *J Immunol* **158**:3433-8
- Rosenstiel, P., Fantini, M., Brautigam, K., Kuhbacher, T., Waetzig, G. H., Seeger, D., Schreiber, S. (2003) TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**:1001-9
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A. R. (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of small heat shock proteins. *Cell* **78**:1027-37
- Roy, N., Mahadevan, M. S., McLean, M., Shutler, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., Baird, S., Besner-Johnston, A., Lefebvre, C., Kang, X., *et al.* (1995) The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* **80**:167-78
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1997) The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* **16**:6914-25
- Rückert, Y., Schindler, U., Heinig, T., Nikolaus, S., Raedler, A., and Schreiber, S. (1996) IL-4 Signaling mechanisms in inflammatory bowel disease mononuclear phagocytes. *Inflamm Bowel Dis* **2**:244-52
- Saccani, S., Pantano, S., and Natoli, G. (2002) p38-dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nat Immunol* **3**:69-75
- Saklatvala, J. (2004) The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. *Curr Opin Pharmacol* **4**:372-7
- Sakurai, H., Miyoshi, H., Toriumi, W., and Sugita, T. (1999) Functional interactions of transforming growth factor beta-activated kinase 1 with IkappaB kinases to stimulate NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **274**:10641-8
- Saleh, A., Srinivasula, S. M., Acharya, S., Fishel, R., and Alnemri, E. S. (1999) Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem* **274**:17941-5
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-7
- Sanghera, J. S., Weinstein, S. L., Aluwalia, M., Girn, J., and Pelech, S. L. (1996) Activation of multiple proline-directed kinases by bacterial lipopolysaccharide in murine macrophages. *J Immunol* **156**:4457-65
- Sanna, M. G., da Silva Correia, J., Ducrey, O., Lee, J., Nomoto, K., Schrantz, N., Deveraux, Q. L., and Ulevitch, R. J. (2002) IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Mol Cell Biol* **22**:1754-66
- Schreiber, S., MacDermott, R. P., Raedler, A., Pinnau, R., Bertovich, M. J., and Nash, G. S. (1991) Increased activation of isolated intestinal lamina propria mononuclear cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **101**:1020-30

- Schreiber, S., Heinig, T., Panzer, U., Reinking, R., Bouchard, A., Stahl, P. D., and Raedler, A. (1995a) Impaired response of activated mononuclear phagocytes to interleukin 4 in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **108**:21-33
- Schreiber, S., Heinig, T., Thiele, H. G., and Raedler, A. (1995b) Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **108**:1434-44
- Schreiber, S., Nikolaus, S., and Hampe, J. (1998) Activation of nuclear factor kappa B in inflammatory bowel disease. *Gut* **42**:477-84
- Schreiber, S., Nikolaus, S., Hampe, J., Hamling, J., Koop, I., Groessner, B., Lochs, H., and Raedler, A. (1999) Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. *Lancet* **353**:459-61
- Schreiber, S., Rosenstiel, P., Hampe, J., Nikolaus, S., Groessner, B., Schottelius, A., Kuhbacher, T., Hamling, J., Folsch, U. R., and Seegert, D. (2002) Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease. *Gut* **51**:379-85
- Selby, W. S. (2004) Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis bacteraemia in patients with inflammatory bowel disease. *Lancet* **364**:1013-4
- Selsted, M. E., Miller, S. I., Henschen, A. H., and Ouellette, A. J. (1992) Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense. *J Cell Biol* **118**:929-36
- Sen, R., and Baltimore, D. (1986a) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**:921-8
- Sen, R., and Baltimore, D. (1986b) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**:705-16
- Shuto, T., Xu, H., Wang, B., Han, J., Kai, H., Gu, X. X., Murphy, T. F., Lim, D. J., and Li, J. D. (2001) Activation of NF-kappa B by nontypeable Hemophilus influenzae is mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK alpha /beta-I kappa B alpha and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:8774-9
- Siebenlist, U., Franzoso, G., and Brown, K. (1994) Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* **10**:405-55
- Silverman, N., and Maniatis, T. (2001) NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev* **15**:2321-42
- Sinha, A., Nightingale, J., West, K. P., Berlanga-Acosta, J., and Playford, R. J. (2003) Epidermal growth factor enemas with oral mesalamine for mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis or proctitis. *N Engl J Med* **349**:350-7
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (1998) Autoactivation of procaspase-9 by APAF1-mediated oligomerization. *Mol Cell* **1**:949-57
- Stehlik, C., Lee, S. H., Dorfleutner, A., Stassinopoulos, A., Sagara, J., and Reed, J. C. (2003) Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain is a regulator of procaspase-1 activation. *J Immunol* **171**:6154-63
- Steimle, V., Otten, L. A., Zufferey, M., and Mach, B. (1993) Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* **75**:135-46
- Stein, B., Yang, M. X., Young, D. B., Janknecht, R., Hunter, T., Murray, B. W., and Barbosa, M. S. (1997) p38-2, a novel mitogen-activated protein kinase with distinct properties. *J Biol Chem* **272**:19509-17

- Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., Loening-Baucke, V., Ortner, M., Weber, J., Hoffmann, U., Schreiber, S., Dietel, M., and Lochs, H. (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**:44-54
- Takada, H., and Kotani, S. (1995) The theory and practical application of adjuvants. (ed. Stewart, D. E. S.) 172-202 (Wiley, Chichester)
- 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**:649-58
- Takaesu, G. Ninomiya-Tsuji, J. Kishida, S., Li, X., Stark, G. R. and Matsumoto, K. (2001) Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* **21**:2475-84
- Tang, G., Minemoto, Y., Dibling, B., Purcell, N. H., Li, Z., Karin, M., and Lin, A. (2001) Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* **414**:313-7
- Targan, S. R., Hanauer, S. B., van Deventer, S. J., Mayer, L., Present, D.H., Braakman, T., DeWoody, K. L., Schaible, T. F., and Rutgeerts, P. J. (1997) A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* **337**:1029-35
- Thomassen, E., Renshaw, B. R., and Sims, J. E. (1999) Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the IL-1R superfamily. *Cytokine* **11**:389-99
- Thome, M., Hofmann, K., Burns, K., Martinon, F., Bodmer, J. L., Mattmann, C., Tschopp, J. (1998) Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr Biol* **8**:885-8
- Tibbles, L. A., and Woodgett, J. R. (1999) The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* **55**:1230-54
- Tindall, J. P., Beeker, S. K., and Rosse, W. F. (1969) Familial cold urticaria. A generalized reaction involving leukocytosis. *Arch Intern Med* **124**:129-34
- Ting, J. P., and Davis, B. K. (2004) Caterpillar: A Novel Gene Family Important in Immunity, Cell Death, and Diseases. *Annu Rev Immunol* [Epub ahead of print]
- Todate, A., Suda, T., Kuwata, H., Chida, K., and Nakamura, H. (2001) Muramyl dipeptide-Lys stimulates the function of human dendritic cells. *J Leukoc Biol* **70**:723-9
- Tomita, T., Nakase, T., Kaneko, M., Shi, K., Takahi, K., Ochi, T., and Yoshikawa, H. (2002) Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **46**:373-8
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4
- Tschopp, J., Martinon, F., and Burns, K. (2003) NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:95-104
- Van der Biezen, E. A., and Jones, J. D. (1998) The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Curr Biol* **8**:226-7
- Van der Bruggen, T., Nijenhuis, S., van Raaij, E., Verhoef, J., and van Asbeck, B. S. (1999). Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor α production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. *Infect Immun* **67**:3824-9

- Van Dullemen, H. M., van Deventer, S. J., Hommes, D. W., Bijl, H. A., Jansen, J., Tytgat, G. N., and Woody, J. (1995) Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* **109**:129-35
- Vidal, M., and Legrain, P. (1999) Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems. *Nucleic Acids Res* **27**:919-29
- Waetzig, G. H., Seegert, D., Rosenstiel, P., Nikolaus, S., and Schreiber, S. (2002) p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Activated and Linked to TNF- α Signaling in Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol* **168**:5342-51
- Waetzig, G. H., Rosenstiel, P., Nikolaus, S., Seegert, D., and Schreiber, S. (2003) Differential p38 mitogen-activated protein kinase target phosphorylation in responders and nonresponders to infliximab. *Gastroenterology* **125**:633-4
- Wald, D., Commane, M., Stark, G. R., and Li, X. (2001) IRAK and TAK1 are required for IL-18-mediated signaling. *Eur J Immunol* **31**:3747-54
- Wald, D., Qin, J., Zhao, Z., Qian, Y., Naramura, M., Tian, L., Towne, J., Sims, J. E., Stark, G. R., and Li, X. (2003) SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* **4**:920-7
- 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**:346-51
- Wang, X., Kuivaniemi, H., Bonavita, G., Mutkus, L., Mau, U., Blau, E., Inohara, N., Nunez, G., Tromp, G., and Williams, C. J. (2002) CARD15 mutations in familial granulomatosis syndromes: a study of the original Blau syndrome kindred and other families with large-vessel arteritis and cranial neuropathy. *Arthritis Rheum* **46**:3041-5
- Wang, X. S., Diener, K., Manthey, C. L., Wang, S., Rosenzweig, B., Bray, J., Delaney, J., Cole, C. N., Chan-Hui, P. Y., Mantlo, N., Lichtenstein, H. S., Zukowski, M., and Yao, Z. (1997) Molecular cloning and characterization of a novel p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **272**:23668-74
- Wang, X. Z., and Ron, D. (1996) Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP kinase. *Science* **272**:1347-9
- Wasserman, J. D., and Freeman, M. (1998) An autoregulatory cascade of EGF receptor signalling patterns the *Drosophila* egg. *Cell* **95**:355-64
- Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P. J., and Strober, W. (2004) NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* **5**:800-8
- Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schaffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K. R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., Schroder, J. M., Bevins, C. L., Fellermann, K., and Stange, E. F. (2004) NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* **53**:1658-64
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., and Johnson, G. L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**:143-80
- Wilson, C. L., Ouellette, A. J., Satchell, D. P., Ayabe, T., Lopez-Boado, Y. S., Stratman, J. L., Hultgren, S. J., Matrisian, L. M., and Parks, W. C. (1999) Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* **286**:113-7
- Winston, B. W., Chan, E. D., Johnson, G. L., and Riches, D. W. (1997) Activation of p38 MAPK, MKK3, and MKK4 by TNF- α in mouse bone marrow-derived macrophages. *J Immunol* **159**:4491-7

- Wiszniewski, W., Fondaneche, M. C., Le Deist, F., Kanariou, M., Selz, F., Brousse, N., Steimle, V., Barbieri, G., Alcaide-Loridan, C., Charron, D., Fischer, A., and Lisowska-Grospierre, B. (2001) Mutation in the class II trans-activator leading to a mild immunodeficiency. *J Immunol* **167**:1787-94
- Wong, A. W., Brickey, W. J., Taxman, D. J., van Deventer, H. W., Reed, W., Gao, J. X., Zheng, P., Liu, Y., Li, P., Blum, J. S., McKinnon, K. P., and Ting, J. P. (2003) CIITA-regulated plexin-A1 affects T-cell-dendritic cell interactions. *Nat Immunol* **4**:891-8
- Wright, K. L., Chin, K. C., Linhoff, M., Skinner, C., Brown, J. A., Boss, J. M., Stark, G. R., and Ting, J. P. (1998) CIITA stimulation of transcription factor binding to major histocompatibility complex class II and associated promoters in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:6267-72
- Wright, E. K., Goodart, S. A., Gowney, J. D., Hadinoto, V., Endrizzi, M. G., Long, E. M., Sadigh, K., Abney, A. L., Bernstein-Hanley, I., and Dietrich, W. F. (2003) Naip5 affects host susceptibility to the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Curr Biol* **13**:27-36
- Wyatt, J., Vogelsang, H., Hubl, W., Waldhoer, T., and Lochs, H. (1993) Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* **341**:1437-9
- Xiao, G., Harhaj, E. W., and Sun, S. C. (2001) NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* **7**:401-9
- Xu, S. Y., and Fomenkov, A. (1994) Construction of pSC101 derivatives with Camr and Tetr for selection or LacZ' for blue/white screening. *Biotechniques* **17**:57
- 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**:2008-11
- 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 IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* **93**:1231-40
- Yang, D. D., Kuan, C. Y., Whitmarsh, A. J., Rincon, M., Zheng, T. S., Davis, R. J., Rakic, P., and Flavell, R. A. (1997) Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* **389**:865-70
- Yang, D. D., Conze, D., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Davis, R. J., Rincon, M., and Flavell, R. A. (1998) Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity* **9**:575-85
- Yang, H., Young, D. W., Gusovsky, F., and Chow, J. C. (2000) Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. *J Biol Chem* **275**:20861-6
- Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z., and Su, B. (2001) The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol* **2**:620-4
- Yang, X., Chang, H. and Baltimore, D. (1998) Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* **281**:1355-7
- Zhong, H., Voll, R. E., and Ghosh, S. (1998) Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* **1**:661-71

Zou, T., Rao, J. N., Guo, X., Liu, L., Zhang, H. M., Strauch, E. D., Bass, B. L., and Wang, J. Y. (2004) NF-kappaB-mediated IAP expression induces resistance of intestinal epithelial cells to apoptosis after polyamine depletion. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**:C1009-18

Anhang – verwendete Materialien

Chemikalien/Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
6-Amino-Capronsäure	Sigma-Aldrich, München
Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)	Bio-Rad, München
Agar Agar	Serva, Heidelberg
Agarose SeaKem LE	Biozym, Oldendorf
Ammoniumpersulfat	Sigma, München
Ampicillin	Sigma, München
β -Mercaptoethanol	Sigma, München
Bacto-Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto-Yeast Extract	BD Biosciences, Heidelberg
Broad range, Proteingrößenmarker	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Sigma, München
BSA	New England Biolabs, Bad Schwalbach
Carbenicillin	Sigma, München
Chloramphenicol	Sigma, München
EDTA	Sigma, München
Ethanol (p.a.)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Gibco BRL Life Technology, Eggenstein
FCS Gold	PAA, Linz, Österreich
Glycerol	Sigma, München
HCl	Sigma, München
IFN γ	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Merck, Darmstadt
LPS	Sigma, München
Magermilchpulver (MMP)	Bio-Rad, München
MDP	Bachem, Weil am Rhein
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Sigma, München
MgSO ₄	Sigma, München
Na ₂ HPO ₄	Sigma, München
NaCl	Sigma, München
Natriumazid	Sigma, München
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS	Gibco, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
PETG	Sigma, München
Phosphatase Inhibitor Cocktail (100 X)	Sigma, München
Protease Inhibitor Cocktail (50 X)	Sigma, München
ProteinA/G-Agarose-Beads	SantaCruz, Heidelberg
SDS	Sigma, München
Smart ladder	Eurogentec, Köln
TEMED	Sigma, München
Tetracyclin	Sigma, München
TNF α (human, rekombinant)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

Tris	Merck, Darmstadt
TritonX-100	Sigma, München
Tween20	Sigma, München
Trypsin/EDTA (1 X)	Invitrogen , Karlsruhe
X-Gal	Sigma, München
Xylencyanol	Sigma, München

Puffer, Lösungen und Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit A.bidest. angesetzt, Medien für die Bakterienkultur wurden nach Ansetzen autoklaviert und bis zur Benutzung gekühlt und unter Luftabschluss gelagert.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Anodenpuffer 1	30 mM Tris-Base, 20 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer 2	300 mM Tris-Base, 20 % (v/v) Methanol
2 X DLB	20 mM Tris/HCl (pH 7,4), 2 % (w/v) SDS
10 X DNA-Ladepuffer	50% (v/v) Glycerol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) Xylencyanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base, 20 % (v/v) Methanol, 40 mM 6-Amino-Caprinsäure
LB-Agarplatten	10 g/l Trypton, 5 g/l Yeast Extract, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar Agar
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Yeast Extract, 5 g/l NaCl
5 X Ligationspuffer	[250 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM MgCl ₂ , 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 % (w/v) polyethylene glycol-8000].
RIPA/IP-Lysepuffer	1 X PBS, 0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Nonidet, 0,5 % (w/v) Deoxycholat, 0,05 % (w/v) Natriumazid
NZY-Medium	5 g/l NaCl, 2 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O, 5 g/l Yeast Extract, 10 g/l NZ amine (Casein-Hydrolysat), pH 7,5
5 X PBS	40 g/l NaCl, 5,8 g/l Na ₂ HPO ₄ , 1 g/l KH ₂ PO ₄ , 1 g/l KCl
Salzlösung	1,2 M NaCl, 0,06 MgCl ₂
4 X Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,4 % (w/v) SDS
5 X SDS-Ladepuffer	312,5 mM Tric/HCl (pH 6,8), 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerol, 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
S. O. C. -Medium	2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 2 % (w/v) SDS, 0,7 % (v/v) β-Mercaptoethanol
25 X TAE	1 M Tris/HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA, 500 mM Essigsäure
TE (pH 7,6; pH 8,0)	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA
4 X Trenngelpuffer	1,5 M Tric/HCl (pH 8,8), 0,4 % (w/v) SDS
TTBS	20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween20

Kits und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
<i>Advantage</i> ® RT-for-PCR-Kit	Clontech, Heidelberg
<i>Advantage2</i> ® -PCR Reagent Kit	Clontech, Heidelberg
<i>Advantage2</i> ® Polymerase-Mix	Clontech, Heidelberg
<i>AmpliTaq</i> ® -Polymerase	Perkin Elmer, Weiterstadt
Alkalische Phosphatase (CIP)	NEB, Bad Schwalbach
BacterioMatch™Two-Hybrid System Kit	Stratagene, Heidelberg
	NEB, Bad Schwalbach
<i>Bam HI</i>	
Big Dye™Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
Cytoset ELISA Kit IL-8 (human)	R&D-Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
DC Protein Assay	BioRad, München
DLA Kit	Promega, Mannheim
DNase I	Qiagen, Hilden
<i>Dpn I</i>	NEB, Bad Schwalbach
DyeEx® Kit	Qiagen, Hilden
ECL™ PLUS	Amersham Biosciences, Freiburg
<i>Eco RI</i>	NEB, Bad Schwalbach
FuGENE 6-Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
<i>GeneAmp</i> ® PCR Reagent-Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
<i>Hind III</i>	NEB, Bad Schwalbach
MiniElute DNA Kit	Qiagen, Hilden
	NEB, Bad Schwalbach
<i>Not I</i>	
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Qiagen® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QiaPrep® Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QiaShredder®	Qiagen, Hilden
QuickChange® Site-directed-Mutagenesis Kit	Stratagene, Heideleberg
RNAiFect™ Transfection-Kit	Qiagen, Hilden
Rnase A	Qiagen, Hilden
RNeasy®-Kit	Qiagen, Hilden
	NEB, Bad Schwalbach
<i>Sal I</i>	
T4 Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO™ TA Cloning ® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TransMessenger™ Transfection Reagent-Kit	Qiagen, Hilden
	NEB, Bad Schwalbach
<i>Xho I</i>	

Primärantikörper

Die Verdünnung der Antikörper für Westernblotanalysen wurde wie in folgender Tabelle angegeben in TTBS vorgenommen.

Zielprotein	Bezeichnung	Spezies , Verdünnung	Hersteller
β-Actin (phospho-) cJun	anti-β-Actin	ms, 1:5000 (5 % MMP)	Sigma, München
	anti- (phospho-) cJun	rb, 1:1000 (5 % BSA)	
(phospho-) ERK1/2	anti- (phospho-) ERK1/2	rb, 1:1000 (5 % MMP)	CST, Frankfurt
(phospho-) IκBα	anti- (phospho-) IκBα	rb, 1:1000 (5 % BSA)	CST, Frankfurt
GFP	anti-GFP	ms, 1:5000 (5 % MMP)	Clontech, Heidelberg
XPress	anti-XPress		Invitrogen, Karlsruhe
Emmprin	anti-Emmprin K-20	gt, 1:1000 (5 % MMP)	Santa Cruz, Heidelberg
Emmprin	anti-hEmmprin	ms, 1:5000 (5 % MMP)	R&D-Systems, Wiesbaden- Nordenstadt
NOD2	anti-NOD2	rb, 1:500 (5 % MMP)	Alexis Corp., Axxora, Grünberg

(ms, rb, gt bezeichnet die Spezies des IgG, ms = Maus, rb = Kaninchen, gt = Ziege, die Prozentangabe (w/v) bezieht sich auf die Blocking-Substanz; MMP = Magermilchpulver, BSA = *bovine serum albumine*,)

Sekundärantikörper

Bezeichnung	Hersteller
anti-Rabbit-HRP	Amersham Biosciences, Freiburg
anti-Mouse-HRP	Amersham Biosciences, Freiburg
anti-Goat-HRP	Sigma, München

Vektoren

Bezeichnung	Hersteller
pAP1-LUC	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Conaris, Kiel
pBT	Stratagene, Heidelberg
pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA4/HisMax	Invitrogen, Karlsruhe
pCEV-Vektor	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. Rosenstiel
pEGFP-C3	Clontech, Heidelberg
pFA2-c-Jun	Stratagene, Heidelberg
pFA2-Elk-1	Stratagene, Heidelberg
pFR-GAL4RE-Luc	Stratagene, Heidelberg
pGL3B-Promoter	Promega, Mannheim
pNFκB-LUC	Clontech, Heidelberg
pRL-TK	Promega, Mannheim
pTRG	Stratagene, Heidelberg

Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft	ACC.- Nr. / DSMZ
HeLa S3	Cervix-Adenokarzinom	ACC 161
HEK 293	<i>human embryo kidney</i>	ACC 305
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. S. Rose-John, Kiel
HT-29	kolorektales Adenokarzinom	ACC 299
THP-1	<i>human acute monocytic leukemia</i>	ACC 16
SW620	kolorektales	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. H. Kalthoff, Kiel
SW948	Doppelpunkt-Adenokarzinom	

Bakterien

Bezeichnung	Hersteller
BacterioMatch™ Two-Hybrid System Reporter Strain Competent Cells	Stratagene, Heidelberg
JM 109 <i>E. coli</i>	Stratagene, Heidelberg
One Shot® TOP10 Chemically Competent Cells <i>E. coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe
XL1-Blue Supercompetent Cells MRF´Kan <i>E. coli</i>	Stratagene, Heidelberg

Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide (*Primer*) wurden zur Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR benutzt:

Primernamenname	Sequenz (5' → 3')	T _{anneal} (°C)	Zyklen	Amplikon (bp)	Acc.No. (GenBank)
β-Actin_s β-Actin_a	GATGGTGGGCATGGGTCAG CTTAATGTCACGCACGATTTCC	55	30	518	NM001101
NOD2_s NOD2_a	CGTTCTGCACAAGGCCTACC TCCATTGCTTTCACCGTG	60	32/39	642	NM022162
GAPDH_s GAPDH_a	CCAGCCGAGCCACATCGC ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT	56	40	360	BC029618

Folgende Oligonukleotide wurden für die Reportergenkonstruktion und Mutagenese des NOD2-Promotors verwendet:

Primernamenname	Sequenz (5' → 3')	T _{anneal} (°C)	Zyklen	Amplikon (bp)	Acc.No. (GenBank)
pNOD2_s(<i>KpnI</i>) pNOD2_a(<i>MluI</i>)	CGGGTACCGTGACAGTTTCAC TGGAGC GCACGCGTAGAACGCCAAAA GCC	55	35	1367	NM022162
NOD2(ΔκB1)_s	GACTGACAGATTTTCGCCTGAA GAGACCAGGTAATAAAGGAG TAAGAGGAAG	60	12	1367	NM022162
NOD2(ΔκB2)_s	CGAGTCACGTGGCTTGGGCTT CCTGGTGTCCACAGAAG	60	12	1367	NM022162
NOD2(ΔκB3)_s	GGCCTCCGGCTTTTCCTTTCTT GAAGGTGGGGTTGGTAG	60	12	1367	NM022162

Die verwendeten *antisense*-Primer der Mutagenese-Reaktion entsprachen der komplementären Sequenz in 3' → 5'-Orientierung

Folgende Oligonukleotide wurden für Klonierungen verwendet:

Primernamen	Sequenz (5' → 3')	T _{anneal} (°C)	Zyklen	Amplikon (bp)	Acc.No. (GenBank)
rNOD2B_s rNOD2B_a	CGTTCTGCACAAGGCCTACC AAACTGAGCGAACATCCTCCC	58	40	3340	NM022162
pBT-NOD2_s pBT-NOD2_a	CGGCGGCCGGGGAAGAG CGCTCGAGTCAAAGCAAGAG	61	35	3120	NM022162
pBT-CARDs_s pBT-CARDs_a	CGGCGGCCATGTGCTCGC CGCTCGAGCTTGCATGTGGC	60	35	630	NM022162
pBT-LRR_s pBT-LRR_a	CGGCGGCCCGGAGCCTG CGCTCGAGCCCTCGGAGC	61	35	880	NM022162
pcDNA4-C1_s pcDNA4-C1_a	ATGTGCTCGCAGGAGGCTT GTCCCAGCAGCCATGCAG	59	35	240	NM022162
pcDNA4-C2_s pcDNA4-C2_a	TCGCTCCACCCAGCCC CTTGCATGTGGCAGCTTCC	59	35	210	NM022162
pcDNA4-NOD_s pcDNA4-NOD_a	CCAGCCACCCTGGGCC AGGGCTGACCTGTGCTGCC	62	35	910	NM022162
pcDNA4-LRR_s pcDNA4-LRR_a	CGGAGCCTGTACGAGATGCA CCCTCGGAGCCAGACTTCC	61	35	880	NM022162
pcDNA4-NOD2_s pcDNA4-NOD2_a	GGGGAAGAGGGTGGTTCAGC TCAAAGCAAGAGTCTGGTGTC CC	61	35	3120	NM022162
pEGFP-NOD2_s pEGFP-NOD2_a	CGAAGCTTGGGGAAGAGGGT CGGGATCCTCAAAGCAAGAG TCT	58	35	3120	NM022162
pEGFP-CARDs_s pEGFP-CARDs_a	CGAAGCTTATGTGCTCGCAGG CGGGATCCCTTGCATGTGGC	59	35	630	NM022162
pEGFP-Emmprin- IC_s pEGFP-Emmprin- IC_a	GACTCGAGGAGAAGCGCCG GACCCGGGTCAGGAAGAGTT CC	62	35	123	NM198589
pCEV-Emmprin_s pCEV-Emmprin_a	CGGGATCCGCGGCTGCGC GCGTCGACTCAGGAAGAGTT CCTCTGG	68	35	810	NM198589

Folgende Oligonukleotide wurden für Sequenzierungsreaktionen verwendet:

Primername	Sequenz (5' → 3')	T _{anneal} (°C)	Zyklen	Acc.No. (GenBank)
Nod2_Seq1_s	CATTGTCAGGAGGCTCC	50	25	NM022162
Nod2_Seq2_s	CCTCAATGACGATGCG	51	25	NM022162
Nod2_Seq3_s	CTGTGTCGGCGTTCC	50	25	NM022162
Nod2_Seq4_s	CAGCCCTGATGACATTTTC	51	25	NM022162
Nod2_Seq5_s	CATCCCGCCAGCTG	51	25	NM022162
Nod2_Seq6_s	TGCAGGCAGAACTTCTTG	52	25	NM022162
Nod2_Ex2_a	GCGAGCACATTTCAACAAC	52	25	NM022162
Nod2_Ex4_s	CAGTCTCGCTTCCTCAGTAC	51	25	NM022162
Nod2_Ex4_a	GTACTGAGGAAGCGAGACTG	51	25	NM022162
Nod2_Ex7_a	CAAGGAGGTGTTGCCTC	51	25	NM022162
pBT_s	CGTTGTGGGGAAAGTTATC	52	25	AF361440
pBT-a	GGTAGCCAGCAGCATCC	54	25	AF361440
pTRG_s	CGTGATGTACGTCAGCC	50	25	AF361441
pTRG_s	GCCATAAACTGCCAAGC	51	25	AF361441
XPress-fw	TATGGCTAGCATGACTGGT	50	25	X90639
XPress-rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG	51	25	X90639
Emmprin_s	GTCACTGACTGGGCCTG	51	25	NM198589
Emmprin_a	CAGGCCAGTCAGTGAC	51	25	NM198589

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Die Arbeit wurde bis jetzt weder vollständig noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, den

.....

(Karen Bräutigam)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit ergreifen, mich bei all denjenigen zu bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei dem Leiter unserer Arbeitsgruppe, Herrn Prof. Dr. med. Schreiber für die Bereitstellung des interessanten Themas und der Arbeitsmöglichkeiten bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schulz-Friedrich vom Botanischem Institut der CAU Kiel für die formelle Betreuung dieser Arbeit, für das ausgesprochene Interesse, die konstruktive Kritik und die vielen aufmunternden Worte und Ratschläge bedanken.

Zu sehr großem Dank bin ich meinen fachlichen Betreuern, Herrn Dr. med. Philip Rosenstiel und Herrn Dr. rer. nat. Dirk Seegert verpflichtet. Ihre engagierte fachliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft war für die Erstellung dieser Arbeit von sehr hohem Wert. In den letzten Monaten trugen vor allem die wertvollen Anregungen und Hinweise von Philip zum Gelingen dieser Doktorarbeit bei. Vielen Dank!

Ein herzlicher Dank geht an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Mucosaimmunologie bzw. des Instituts für Klinische Molekularbiologie der CAU Kiel, im besonderen meinen Kollegen der Projektgruppe Zellbiologie und den Mitbewohnern „unter der 8“, der Projektgruppe *Expression-Screening*. Die freundschaftliche Atmosphäre während der Arbeit, auf unserem „Wohnflur“ sowie bei privaten Unternehmungen konnte für so manches Misslingen hinwegtrösten.

Besonders danken möchte ich Andi, der mich vor allem in den letzten Wochen durch seine unnachahmliche Art sowohl fachlich, als auch menschlich unterstützt hat und unserem Küken Tanja, die immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Kai, der geduldig die Wochen der Fertigstellung dieser Arbeit miterlebt und sich um Alles, was nicht diese Arbeit anging, gekümmert hat. Schatzi, danke, dass Du da bist!