

Analyse der NOD2-abhängigen
Transkriptomregulation
und Hemmung der NOD2-Aktivität durch A20

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

vorgelegt von

Susanne Billmann - Born

Diplom- Biologin

Kiel 2006

Referent/in: **Prof. Dr. Karin Krupinska**

Koreferent/in: **Prof. Dr. Stefan Schreiber**

Tag der mündlichen Prüfung: **08. November 2006**

Zum Druck genehmigt: **15. November 2006**

gez. Prof. Dr. J. Grotemeyer (Dekan)

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Einleitung	1
2.1	NOD-Proteine als Elemente der angeborenen Immunität	1
2.2	Die TLR-Familie	1
2.3	Die NOD- <i>like</i> Rezeptorfamilie	2
2.4	Die Domänenstruktur der NOD-Proteine	3
2.4.1	Die NOD-Domäne	3
2.4.2	Die LRR-Domäne	4
2.4.3	Die CARD-Domäne	5
2.5	Funktion, Expression und Regulation von NOD2 in der Zelle	6
2.5.1	Kontakt mit Pathogenen	6
2.5.2	Aktivierung durch Oligomerisierung	7
2.5.3	Bekannte NOD2-abhängige Signalwege	8
2.5.3.1	Der MAP Kinasen-Signalweg	8
2.5.3.2	Caspase-1 und IL-1 β Prozessierung	9
2.5.3.3	Das NF- κ B-System	10
2.5.4	Weitere direkte Interaktionspartner von NOD2	11
2.5.4.1	GRIM19	11
2.5.4.2	TAK1	12
2.5.4.3	ERBIN	12
2.5.4.4	CLAN als Interaktionspartner und das Problem der spontanen Oligomerisierung durch Überexpression	12
2.5.5	Weitere Rezeptoren für MDP	13
2.6	Morbus Crohn und NOD2	13
2.6.1	Weitere mit NOD2 assoziierte Erkrankungen	15
2.7	Funktionsverlust der L1007fsinsC Mutation	15
2.8	Die Microarraytechnologie	16
2.8.1	Bisherige Expressionsstudien	17
2.9	Ziele der Arbeit	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Standardkultur	19
3.1.1	Anlegen und Auftauen von Zellreserven	20
3.1.2	Bestimmung der Zellkonzentration	20
3.1.3	Aussaat und Ernte	20
3.1.4	Isolierung primärer mononukleärer Zellen	21
3.1.5	Stimulation von Zellen	22

3.1.5.1	MDP-Stimulation	22
3.1.5.2	Stimulation mit Bakterien	22
3.1.5.3	Phosphataseinhibition.....	23
3.1.6	Transfektion von Zellen.....	24
3.1.6.1	Lipofektion.....	24
3.1.6.2	Calcium-Phosphat Transfektion.....	24
3.2	Massenspektrometrie.....	25
3.3	Molekularbiologische Methoden	25
3.3.1	Isolierung genomischer DNA	25
3.3.2	Isolierung von RNA.....	25
3.3.3	Qualitätskontrolle der RNA	26
3.3.4	cDNA-Synthese	26
3.3.5	Taqman <i>real-time</i> PCR	27
3.3.6	Amplifikation der benötigten NOD2-Sequenz.....	30
3.3.7	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	31
3.3.8	Aufreinigung von DNA aus Gelbanden.....	31
3.3.9	Topo-Klonierung des PCR-Produktes in ein Plasmid.....	31
3.3.10	Transformation von Plasmiden in kompetente bakterielle Zellen.....	32
3.3.11	Präparative Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen (Minipräp).....	33
3.3.12	Restriktionsverdau	33
3.3.13	Präparative Isolierung von Plasmiden (Maxipräp).....	34
3.3.14	Sequenzierung von DNA	35
3.3.15	Ortsgerichtete Mutagenese	36
3.4	Generierung der stabilen Flp-In Zellen	38
3.4.1	Prinzip der Flp-In Klonierung	38
3.4.2	Transfektion der Flp-In-Zellen.....	40
3.4.3	Selektion positiver Klone	40
3.5	Microarray-Experimente.....	41
3.5.1	Affymetrix Microarrays	41
3.5.2	Übersicht über die Versuchsdurchführung	42
3.5.3	Datenanalyse	43
3.5.3.1	ANOVA-Auswertung	43
3.5.3.2	Klassifizierung des MDP-Effekts (Increased, Decreased und No Change)	44
3.5.3.3	Cluster Analyse.....	45
3.6	Biochemische Methoden	46
3.6.1	Dual Luciferase Assays	46
3.6.2	Isolierung von Proteinen aus verschiedenen Zellkompartimenten.....	47
3.6.3	Silberfärbung.....	48
3.6.4	Coomassie <i>Colloidal Blue</i> Färbung	48
3.6.5	Denaturierende Proteinisolierung	48

3.6.6	Isolierung nativer Proteine	49
3.6.7	Immunpräzipitation.....	49
3.6.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	50
3.6.9	Proteintransfer auf eine Trägermembran (Western-Blot)	51
3.6.10	Immundetektion von Proteinen	51
3.6.11	ELISA.....	53
4	Ergebnisse	54
4.1	Endogenes NOD2 ist cytosolisch lokalisiert	54
4.2	NOD2 wird phosphoryliert.....	56
4.3	Microarrays	58
4.3.1	Überprüfung der stabilen Zellen	58
4.3.2	Statistische Auswertung der Microarrays (ANOVA-Ergebnisse).....	60
4.3.3	Genotypunterschiede.....	61
4.3.3.1	Vergleich Transkriptom- und Proteom-Analysen.....	65
4.3.3.2	NOD2-Interaktionspartner und andere mit Morbus Crohn assoziierte Gene	67
4.3.4	MDP induzierbare Gene	67
4.3.4.1	Die L1007fsinsC Mutation führt zum Funktionsverlust	70
4.3.5	Validierung der Microarray Ergebnisse mittels <i>real-time</i> PCR	70
4.4	Funktionelle Analysen von A20	75
4.4.1	A20-Genexpression in Abhängigkeit von MDP-Stereoisomeren.....	75
4.4.2	A20 ist ein negativer Regulator der durch NOD2 induzierten NF- κ B Antwort.....	76
5	Diskussion	78
5.1	Lokalisation von NOD2	78
5.2	Phosphorylierung von NOD2	79
5.3	Transkriptomanalyse von NOD2wt und L1007fsinsC transfizierten Zellen	80
5.3.1.1	Signifikanzwerte (p-Werte)	80
5.3.1.2	Fold-change	80
5.3.2	Diskussion der Microarray-Ergebnisse	81
5.3.2.1	Die transgenen Zelllinien	81
5.3.2.2	Genotypinduzierte Genregulation.....	82
5.3.2.3	MDP-induzierte Genexpression und Dysfunktion der L1007fsinsC-Mutante	82
5.3.3	NOD2 abhängige Gene	83
5.3.3.1	Chemokine.....	83
5.3.3.2	MAP Kinasen	84
5.3.3.3	Hinweise auf NOD2-abhängige T-Zell-Aktivierung	86
5.3.3.4	Weitere positiv-regulierte entzündungsinduzierende Gene.....	87
5.3.3.5	Verbindung zu anderen Signalwegen.....	87
5.3.3.6	Hitzeschock-Proteine	89
5.3.3.7	Vergleich mit Pathogen-induzierten Aktivierungsprogrammen	89
5.3.3.8	Negative Regulatoren der NF- κ B-Antwort und mögliche Pathogentoleranz	89

5.3.4	A20 als negativer Regulator der MDP-Antwort.....	90
6	Ausblick	92
7	Zusammenfassung	93
	Abstract	95
8	Literatur	96
9	Anhang	103
9.1	Eingesetzte Materialien.....	103
9.1.1	Puffer und Lösungen.....	103
9.1.2	Verwendete Chemikalien, Zusätze und Enzyme.....	104
9.1.3	Verwendete Kits.....	105
9.2	Abkürzungsverzeichnis	106
9.3	Liste der MDP-abhängig regulierten Gene	108
9.4	Tabellenverzeichnis	111
9.5	Abbildungsverzeichnis	112
10	Erklärung	113
11	Lebenslauf	114
12	Danksagung	116

2 Einleitung

2.1 NOD-Proteine als Elemente der angeborenen Immunität

Die Funktion des humanen Immunsystems lässt sich in zwei grundlegende Bereiche unterteilen: angeborene und erworbene, adaptive Immunität.

Die Rezeptoren der angeborenen Immunität erkennen relativ unspezifisch Pathogene oder deren Produkte und leiten unmittelbar über eine Signalkaskade die Produktion von Boten- und Abwehrstoffen ein. In der adaptiven Immunität dagegen wird über Antigenpräsentation eine spezifische Immunantwort eingeleitet. Aber auch die Zellen des adaptiven Immunsystems tragen Rezeptoren der angeborenen Immunität, hier wird durch ihre Stimulierung der Rezeptoren die Aktivierung der Zellen und damit die Initiierung der spezifischeren erworbenen Immunantwort erreicht.

Die angeborene Immunität ist sehr ursprünglich und früh in der Evolution entstanden, homologe Proteindomänen mit der Funktion der Pathogenerkennung sind sowohl bei Pflanzen (R-Gene), Nematoden, Insekten und Vertebraten nachgewiesen. Elemente der adaptiven Immunität findet man dagegen zuerst bei Knorpelfischen. In Vertebraten sind wichtige Rezeptoren der angeborenen Immunität die *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs), aber auch die NOD-Proteine.

2.2 Die TLR-Familie

Die bisher am besten untersuchte Rezeptorfamilie der angeborenen Immunität ist die *Toll-like-Rezeptoren* Familie. Gemeinsam ist den membranständigen TLRs die extrazelluläre Lokalisation der Sensordomäne, der *Leucin-rich-repeats* Domäne. Diese *Leucin-rich-repeats* Domäne (LRR) bildet die Sensordomäne der wichtigsten Rezeptoren der angeborenen Immunität, z.B. den TLRs, den R-Genen und der NOD-Rezeptorfamilie. Die intrazelluläre Effektor-domäne der TLRs ist die Toll/IL-1R (TIR) Domäne. Über homologe Interaktion von nachgeordneten Effektoren mit den TIR-Domänen wird das aktivierende Signal weitergegeben. Spezifität zwischen den Signalen der zehn verschiedenen in Menschen exprimierten TLRs (Lauw et al. 2005) wird durch Variabilität der beteiligten Domänen, aber auch durch die Notwendigkeit der Interaktion mit bestimmten Adaptoren erreicht. So interagiert z.B. TLR4 bei der Erkennung von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS, Endotoxin) mit den Korezeptoren MD2 (LY96, *lymphocyte antigen 96*) * (Shimazu et al. 1999) und CD14 (*Cluster of Differentiation 14*) (Means et al. 1999).

* Die Nomenklatur der Gene richtet sich nach der NCBI Datenbank *Gene*. Ist ein Gen unter einem gebräuchlichen Umgangsnamen bekannt, wird dieser im Text verwendet. In Klammern folgt dann der Datenbankname.

Ein Beispiel: A20 (TNFAIP3, *tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3*)

Intrazellulär kann die Art der Zellantwort durch verschiedene Adaptormoleküle, die ebenfalls TIR-Domänen tragen, variiert werden. Im Falle der LPS-Aktivierung von TLR4 wird über den Adaptor MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) der MAP Kinasen (*mitogen-activated-kinases*) Signalweg und der Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) angeschaltet, über TIRAP (*toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein*) und TRIF (TICAM1, *toll-like receptor adaptor molecule 1*) kann alternativ IRF3 (*interferon regulatory factor 3*) aktiviert werden. ST2 (*interleukin 1 receptor-like 1*) ist als Inhibitor der TLR-Rezeptorantwort beschrieben (Hoebe et al. 2003). Auch können die Rezeptoren selbst durch Heterooligomerbildung ihr Signal variieren, so interagieren z.B. TLR6 und TLR2 (Into et al. 2004). Diese Beispiele sollen zeigen, dass trotz der begrenzten Anzahl von Rezeptoren und Signalwegen eine differenzierte und vielfältig modulierbare Reaktion eingeleitet wird.

Auch für die Proteinfamilie der NOD-Rezeptoren konnte dank Homologie der LRR-Domäne die Funktion der Pathogenerkennung in der angeborenen Immunität aufgeklärt werden (Inohara et al. 2001).

2.3 Die NOD-like Rezeptorfamilie

Die NOD-like Rezeptorfamilie (NLR) alias CATERPILLER (*CARD, transcription enhancer, R(purine)-binding, pyrin, lots of LRRs*) ist durch ihre dreigeteilte Domänenstruktur charakterisiert. Die NOD-Domäne (*nucleotide-binding and oligomerization domain*) ist das gemeinsame Merkmal der Mitglieder dieser Familie. Ebenfalls gemeinsam ist ihnen die cytoplasmatische Lokalisation, ihre Funktion dagegen differiert je nach Typ der Effektor-domänen von Regulation des programmierten Zelltodes (Apoptose) zu verschiedenen Mechanismen in der Entstehung und Regulation von Entzündungen.

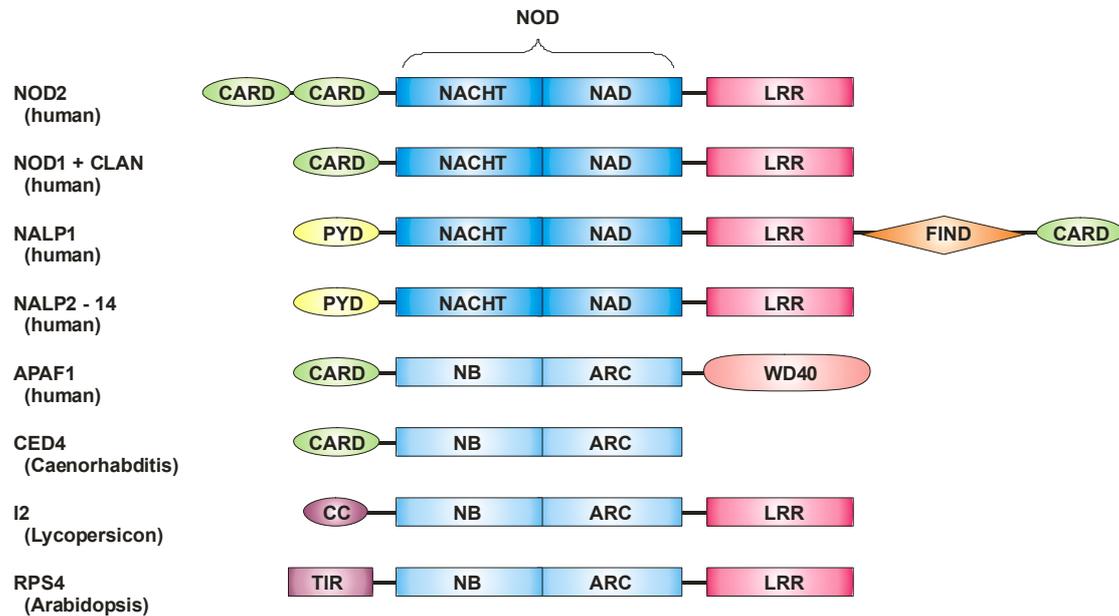


Abbildung 2.1: Beispiele aus der NOD-like-Rezeptorfamilie.

Die zentralen Domänen (blau) bilden zusammen die NOD-Domäne (Nach Schreiber et al. 2005). ARC: *named after APAF1*; CARD: *caspase recruitment domain*; CC: *coiled coil*; FIND: *domain with function to find*; LRR: *leucin rich repeats*; NACHT: *nucleotide-binding domain found in NAIP, CIITA, HET-E and TP1*; NAD: *NACHT-associated domain*; NB: *nucleotide-binding*; NOD: *nucleotide-binding and oligomerization domain*; PYD: *pyrin domain*; TIR: *Toll/IL-1 receptor*; WD40: *Trp-Asp repeats 40*.

2.4 Die Domänenstruktur der NOD-Proteine

2.4.1 Die NOD-Domäne

Die namensgebende NOD-Domäne ist essentiell für die Funktion der NOD-Proteine, da sie die Oligomerisierung und dadurch die Aktivierung vermittelt.

APAF1 (*apoptotic protease-activating factor1*) wurde als erstes Protein dieser Familie beschrieben, es katalysiert den entscheidenden Schritt des mitochondrialen Apoptoseweges (Zou et al. 1997). Wird Cytochrom-C aus den Mitochondrien freigesetzt, bindet es im Cytosol an monomeres APAF1, wodurch die Oligomerisierung von sieben APAF1-Molekülen zu einer Ringstruktur ermöglicht wird. An diese Ringstruktur binden Procaspase-9-Moleküle, die durch diese Komplexierung autoproteolytisch in aktive Caspase-9-Dimere gespalten werden (Acehan et al. 2002).

Eine genauere Analyse zeigte im N-terminalen Bereich der NOD-Domäne eine Bindestelle für ATP/GTP-Nukleotide, den P-loop oder Walker's A-box, und eine Komplexierungsstelle für Mg^{2+} , die Walker's B-box (Inohara und Nunez 2001). Die NOD-Domäne wird in den Subfamilien weiter unterteilt, der N-terminale Teil der Domäne wird NACHT (*nucleotide-binding domain found in*

NAIP, CIITA, HET-E and TP1) und NB- (*nucleotide-binding*) Domäne genannt, die C-terminal angrenzenden Bereiche werden NAD (*NACHT-associated domain*) und ARC (*named after APAF1*) genannt.

Über Sequenzvergleiche wurden nach APAF1 in kurzer Zeit zahlreiche weitere Proteine mit NOD-Domäne gefunden, z.B. die NALP-Gruppe (*NACHT, leucine rich repeat and PYD containing*) mit Pyrin-Effektordomäne und die NOD-Proteine mit CARD- (*caspase recruitment domain*) Effektordomäne. Beide Subfamilien tragen C-terminal als putative ligandenbindende Domäne die LRR-Domäne.

2.4.2 Die LRR-Domäne

Dank der Homologie zu den LRRs der pflanzlichen Resistenzgene wurde für die NOD- und NALP-Proteine neben der Apoptoseregulation ein ganz neuer Funktionsbereich in der Pathogenerkennung entdeckt. Bereits 2001 wurde über die Stimulierbarkeit von NOD1 mit LPS berichtet (Inohara et al. 2001). Später zeigte sich, dass geringe Verunreinigungen mit anderen Bestandteilen der bakteriellen Zellwand, die in der LPS Präparation enthalten waren, die tatsächlich aktiven Substanzen sind. Der minimale Ligand für NOD1 ist das Dipeptid D-Glu-*meso*-Diaminopimelinsäure (DAP), für NOD2 dagegen MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu (Muramyldipeptid, MDP) (Philpott und Girardin 2004).

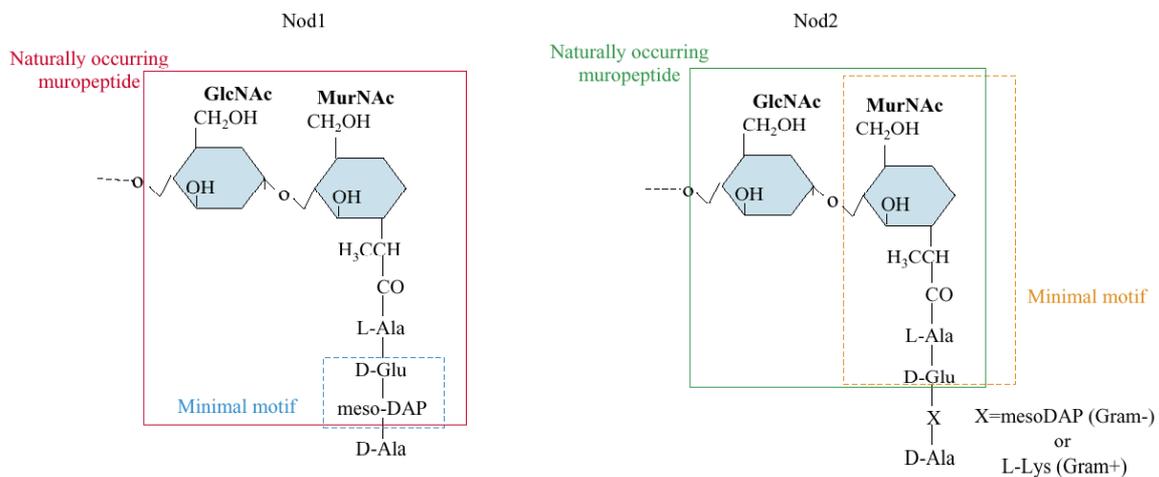


Abbildung 2.2: Pathogenliganden von NOD1 und NOD2.

Natürlich vorkommende und minimale Peptidoglycanmotive, die von NOD1 und NOD2 erkannt werden. NOD1 erkennt das natürlich vorkommende Peptidoglycan (PGN) Motiv bestehend aus N-Acetylglucosamin und N-Acetyl-Muramylsäure verbunden mit einer Seitenkette aus L-Ala- γ -D-Glu-*meso*-DAP (roter Rahmen). Als minimales Motiv reicht D-Glu-*meso*-DAP (blauer Rahmen).

NOD2 bindet an N-Acetylglucosamin und N-Acetyl-Muramylsäure verbunden mit einer Seitenkette aus L-Ala- γ -D-Glu (grüner Rahmen), als minimales Motiv genügt MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu (gelber Rahmen) (aus Philpott und Girardin 2004).

2.5 Funktion, Expression und Regulation von NOD2 in der Zelle

Im vorigen Teil wurde ausführlich die Domänenstruktur von NOD2 beschrieben, da an die Domänen die verschiedenen Funktionen des Proteins gekoppelt sind. Hier sollen diese Funktionen nun im Zusammenhang mit den bekannten NOD2-abhängigen Signalwegen beschrieben werden.

Exprimiert wird NOD2 in Immunzellen wie Monozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen (Gutierrez et al. 2002), die im Darm subepithelial als Bestandteil des mucosaassoziierten lymphoiden Gewebes (*MALT, mucosa-associated-lymphoid-tissue*) vorkommen. Im Epithel der intestinalen Mucosa wird NOD2 im unentzündeten Zustand nur von den Paneth-Zellen an der Basis der Crypten exprimiert (Lala et al. 2003), bei Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ (*tumor necrosis factor*) oder $\text{IFN}\gamma$ (*interferon gamma*) aber auch von anderen intestinalen epithelialen Zellen (IEC) (Rosenstiel et al. 2003). Dieses Expressionsmuster lässt darauf schließen, dass NOD2 eine Aufgabe in der Aufrechterhaltung der intestinalen Barrierefunktion gegen Pathogene hat.

Nach allen bisherigen Untersuchungen liegt NOD2 cytosolisch vor, ebenso wie die anderen NOD- und NALP-Proteine und pflanzliche R-Gene. Möglicherweise ist NOD2 aber membranassoziiert, also an membranständige Proteine gebunden (Barnich, Aguirre et al. 2005; McDonald et al. 2005). Ein membranständiger Interaktionspartner für NOD2 ist Erbin (McDonald et al. 2005) (siehe Kapitel 2.5.4.3)

2.5.1 Kontakt mit Pathogenen

Da NOD2 ein cytosolischer Rezeptor ist, stellt sich zuerst die Frage, wie überhaupt der Kontakt mit pathogenen Produkten entsteht.

Zu dieser Frage werden drei Hypothesen diskutiert.

1. Reaktion auf cytoinvasive Bakterien.

NOD2 hat z.B. einen protektiven Effekt gegen Infektion mit *Salmonella typhimurium*: im *Gentamycin-protection-assay* zeigen NOD2 überexprimierende Zellen eine wesentlich geringere Anzahl intrazellulärer Bakterien (Hisamatsu et al. 2003). Da jede invasive Bakterienspezies ein eigenes, differenziertes System entwickelt hat, um die Zellmembran zu überwinden, ist hier für verschiedene invasive Spezies auch ein anderer Ablauf bei der Pathogenerkennung zu erwarten. *Helicobacter pylori* exprimiert zum Beispiel einen Gencluster (*cagPAI, cag-pathogenicity-island*), das vermutlich ein Typ IV Sekretionssystem codiert, das die Zellmembran der Wirtszelle perforiert. In der Wirtszelle ist *H.pylori* aber in multivesikuläre Vakuolen eingeschlossen, ist also vor Kontakt mit cytosolischen Rezeptoren geschützt. Entsprechend lösen nur *cagPAI* positive Stämme eine NOD1- und NOD2-Antwort aus (durch das Typ IV Sekretionssystem kann auch DAP und MDP in die Zelle gelangen) (Rosenstiel et al. 2006). *CagPAI* Defektmutanten sind zwar invasiv, lösen aber keine $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Reaktion aus (Viala et al. 2004).

2. Transport von Muramyl-dipeptid durch die apikale Membran

Zweite Variante ist, dass MDP durch die apikale Membran der IECs aus dem Darmlumen in die Zellen transportiert wird. Ein in IECs exprimierter Transporter für Dipeptide, hPept1 (*solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1*), wurde als Transporter für MDP beschrieben (Vavricka et al. 2004). Bisher unbeantwortet bleibt hingegen die Frage, wie die Unterscheidung zwischen MDP pathogener Bakterien und MDP nicht-pathogener Bakterien erfolgt. Da das Darmlumen von zahlreichen bakteriellen Kommensalen bevölkert ist, würde ein unkontrollierter Transport einen Zustand ständiger Entzündung hervorrufen. Die normale Darmflora löst aber keine inflammatorische Reaktion aus. Das Problem der pathogen / nicht-pathogen Unterscheidung ist bereits von TLRs bekannt. Auch hier findet keine Entzündungsreaktion statt, obwohl einige TLRs auch an der apikalen Membran von IECs lokalisiert sind (Cario et al. 2002). TLR vermittelte Stimuli durch intakte Darmflora sind sogar notwendig, um epitheliale Schädigungen zu überwinden (Rakoff-Nahoum et al. 2004).

3. Vesikuläre Aufnahme von MDP

Letztlich besteht die Möglichkeit, dass Bakterien oder bakterielle Bruchstücke phagozytiert oder in Vesikeln internalisiert werden und während des Verdaus entweder aus Endosomen oder Lysosomen MDP in die Zelle transportiert wird. Ein Beispiel intrazellulärer Pathogenerkennung liefert z. B. der TLR4-Rezeptor. In einigen epithelialen Zelllinien ist TLR4 nicht an der apikalen Zellmembran lokalisiert, sondern wird im Golgi-Apparat zurückgehalten und internalisiertes LPS entfaltet hier seine Signalwirkung (Hornef et al. 2003). Wie allerdings der Transportmechanismus von MDP durch die Vesikelmembran aussehen könnte, ist unbekannt.

2.5.2 Aktivierung durch Oligomerisierung

Die Bindung von NOD2 an MDP erfolgt an die LRR, und analog zur Funktion von APAF1 nimmt man an, dass durch die so erreichte Konformationsänderung die Autooligomerisierung von NOD2 begünstigt wird. Die systematische Mutagenese und Trunkierung von NOD2 erbrachte Hinweise auf essentielle und regulatorische Bereiche in der Sequenz. Bei den C-terminal trunkierten Mutanten geht die MDP-Stimulierbarkeit sofort mit Verlust der letzten LRR verloren. Die basale Aktivität, also die Aktivität auch ohne Liganden, steigt bei den Mutanten, die im Übergangsbereich zwischen NOD- und LRR-Domäne (Aminosäuren 664 und 854) trunkiert sind, stark an (Tanabe et al. 2004). Durch die Trunkierung kann der Effekt von MDP auf die Konformation des NOD2-Proteins simuliert werden, die Oligomerisierung wird vereinfacht.

Einen weiteren Hinweis auf die Richtigkeit der Oligomerisierungstheorie ergaben Experimente mit erzwungener Oligomerisierung: Für NOD2 wurde eine Aktivierbarkeit von Fpk3-NOD2 Fusionsproteinen durch einen vernetzenden Liganden gezeigt (Ogura et al. 2001), das heißt auch eine künstlich erzwungene Oligomerisierung führte zu NF- κ B Aktivierung.

An das NOD2-Oligomer bindet RIP2, das aus Serin/Threonin Kinase und CARD-Domäne besteht. Durch die räumliche Nähe der Oligomere wird die Aktivierung erreicht, gemäß dem Modell der

„Induced proximity“ (Salvesen und Dixit 1999), das für die Caspasen-Aktivierung entwickelt wurde. RIP2 wiederum copräzipitiert mit NEMO (*NF- κ B essential modulator*). Auch bei RIP2 und NEMO kann die Aktivierung durch erzwungene Oligomerisierung mittels vernetzbarer Fusionsproteine eingeleitet werden (Inohara et al. 2000).

Interessant ist, dass bei NOD1-Aktivierung des NF- κ B Signalweges die Kinasefunktion von RIP2 zwar verstärkend wirkt, aber nicht essentiell ist (Inohara et al. 2000). Die Kinasefunktion von RIP2 ist ebenso unnötig für die Aktivierung von MAP Kinasen in Folge von TLR Aktivierung (Lu et al. 2005), wohl aber bei Aktivierung durch TNF α (Navas et al. 1999).

2.5.3 Bekannte NOD2-abhängige Signalwege

2.5.3.1 Der MAP Kinasen-Signalweg

Die mitogen aktivierten Protein Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK) ermöglichen es der Zelle, auf externe Signale wie Zytokine, Stress und Kontakte mit anderen Zellen mit einer passenden Reaktion zu antworten. Grundsätzliche Entwicklungsrichtungen wie Apoptose oder Proliferation, Entzündung oder Toleranz werden hier mitentschieden.

Die Signalwege der MAP Kinasen-Aktivierung sind nach dem Flaschenhalsprinzip organisiert. Aus einer großen Anzahl möglicher Stimuli z. B. über Zytokinrezeptoren werden über ein dreistufiges System nur vier Typen von MAP Kinasen spezifisch angeschaltet. Nach den MAP Kinasen verzweigen sich die Signalwege wieder auf zahlreiche Transkriptionsfaktoren und andere Kinasen.

Die Kinasekaskade beginnt mit den MAP3 Kinasen (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*), die wiederum die MAP2 Kinasen (*mitogen-activated protein kinase kinase*) phosphorylieren (Serin/Threonin-Phosphorylierung). Die MAP Kinasen werden selber durch Threonin/Tyrosin-Phosphorylierung von den MAP2 Kinasen aktiviert und sind dann im Zellkern genregulatorisch aktiv.

Vier Hauptgruppen von MAP Kinasen wurden bisher in mammalischen Zellen identifiziert: die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK, extracellular signal-regulated kinase), die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK, *c-Jun N-terminal kinase*) oder Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPKs, *stress-activated protein kinases*), die p38 MAP Kinasen und die ERK5/großen MAP Kinasen (ERK5/big MAPK) (Wada und Penninger 2004).

Die Phosphorylierungskaskade findet im Cytoplasma in Proteinkomplexen statt, die durch Proteine mit Gerüstfunktion (Scaffold) organisiert werden. Die Gerüstfunktion kann auch von den beteiligten Kinasen geleistet werden (Chang und Karin 2001).

Auch in der NOD2 induzierten Signaltransduktion spielen MAP Kinasen eine Rolle: ERK 1/2 und p38 werden phosphoryliert (Pauleau und Murray 2003; Martinon et al. 2004; Kobayashi et al. 2005).

Für RIP2 ist bekannt, dass es an der Aktivierung von JNK, p38 und ERK 1/2 in Folge von TLR-Aktivierung beteiligt ist (Kobayashi et al. 2002). Vermutlich wird auch die NOD2 induzierte MAP Kinasen-Reaktion über RIP2 vermittelt.

2.5.3.2 Caspase-1 und IL-1 β Prozessierung

Ein weiterer Signalweg, der von RIP2 aktiviert wird, ist die Prozessierung von Interleukin-1 β (IL-1 β) über Caspase1 (CASP1, *apoptosis-related cysteine peptidase, interleukin 1, beta, convertase*). RIP2 interagiert direkt mit Caspase-1 (Thome et al. 1998), die wiederum durch die Oligomerisation von Procaspase1 in aktive Caspase-1 gespalten wird. Caspase-1 ist für die Prozessierung und Sekretion von IL-1 β verantwortlich. Eine neuere Veröffentlichung stellt diese Sichtweise in Frage: eventuell kann NOD2 auch direkt mit Caspase1 interagieren (Damiano et al. 2004).

Die beteiligte Domäne der Caspase ist die CARD-Domäne, die entweder direkt an die CARDS der NOD2 Oligomere oder aber an den Komplex aus NOD2 und RIP2 bindet. Nicht von NOD2, aber von anderen NOD-Proteinen abhängig ist ein anderer Signalweg zur Sekretion von IL-1 β : das von NALPs gebildete Inflammasom (Martinon et al. 2002).

In einer jüngeren Veröffentlichung ist gezeigt worden, dass MDP auch NALP3 aktiviert. In Zellen, in die alle Komponenten des Inflammasoms als Expressionsplasmide transfiziert wurden, kommt es zur Pro-IL-1 β -Prozessierung nach Stimulation mit MDP. Dass tatsächlich ein funktioneller Inflammasomkomplex gebildet wird, wurde durch ein Ausschlussexperiment gezeigt: wird ASC (PYCARD, *PYD and CARD domain containing*) als essentieller Baustein des Inflammasoms nicht transfiziert, findet keine Aktivierung statt (Martinon et al. 2004). Inwieweit diese Aktivierung mit der NOD2-Aktivierung interferiert, ist nicht untersucht worden.

2.5.3.3 Das NF- κ B-System

Der wichtigste Signalweg, der durch NOD2 aktiviert wird, ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. NF- κ B (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) wird in drei Stufen reguliert: zentrale Schaltstelle ist der IKK- α , - β und - γ Komplex (IKBK, *inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase alpha, beta and gamma*). IKK γ (Synonym auch NEMO, *NF- κ B essential modulator*) ist die regulatorische Untereinheit, die die Kinasefunktion der alpha- und beta-Untereinheiten steuert (Karin und Ben-Neriah 2000).

Nächste regulatorische Stufe ist IKB α (NFKBIA, *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*), das im Komplex mit den NF- κ B Dimeren im Cytosol vorliegt. Wird IKB α von IKK- α und - β phosphoryliert, wird es zum Ziel für Ubiquitin-Ligasen und durch die Polyubiquitinierung zum proteasomalen Abbau markiert. Das freigewordene NF- κ B Dimer enthält ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), wird in den Kern transportiert und wird dort genregulatorisch aktiv. Die NF- κ B Dimere setzen sich aus Homo- und Heterodimeren von fünf verschiedenen Untereinheiten zusammen: RelA, RelB, CRel, p50 und p52 (Karin und Ben-Neriah 2000).

Alle diese regulatorischen Stufen können ihrerseits durch verschiedene zelluläre Prozesse (Phosphorylierung, Ubiquitinierung) modifiziert werden. Auch die Variabilität der Untereinheiten des aktiven Dimers wird eine weitere Feinsteuerung des NF- κ B-Systems möglich. Mittlerweile sind über 400 NF- κ B regulierte Gene beschrieben, aber je nach aktivierendem Stimulus werden nur spezifische Gene transkribiert (Epinat und Gilmore 1999).

Für die MDP Stimulation von NOD2 wurde per EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) gezeigt, dass der p50/RelA Dimer aktiv ist, im Unterschied zur Antwort auf TLR4 Stimulation, die auch RelB und CRel mit einbezieht (Li et al. 2004). Die Aktivierung wird über RIP2 vermittelt, in RIP2 deletierten Fibroblasten ist die NF- κ B-Antwort unterbunden (Kobayashi et al. 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass aktiviertes RIP2 eine über das Lysin 63 des Ubiquitin vernetzte Polyubiquitinierung von NEMO induziert und damit den NF- κ B Signalweg anschaltet (Abbott et al. 2004).

Für die NOD2 induzierte NF- κ B-Antwort sind als Zielgene z.B. IL-8 (Rosenstiel et al. 2003) und IL-1 β (Li et al. 2004) bekannt.

Der klassische NF- κ B Signalweg

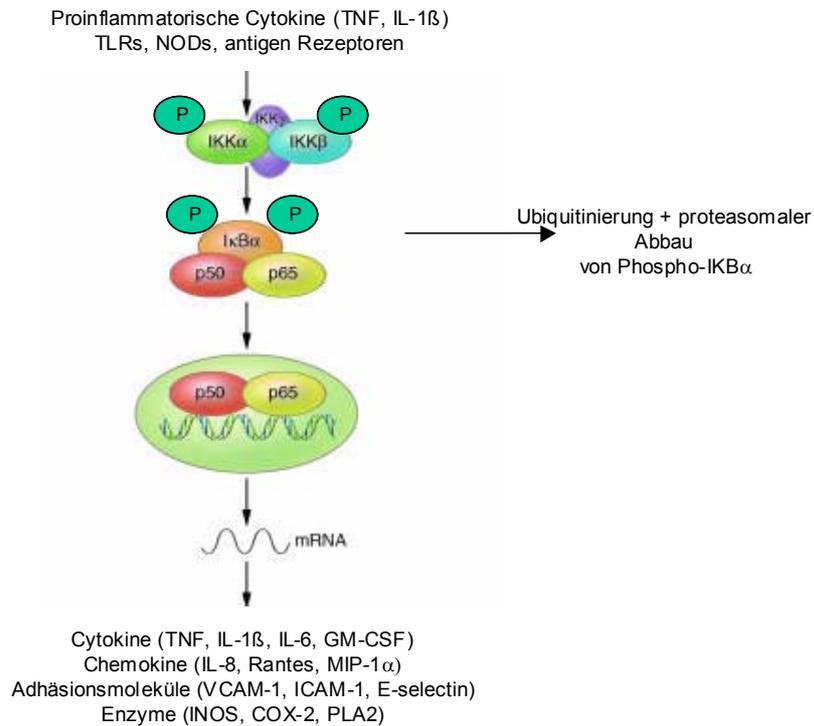


Abbildung 2.4: Der klassische IKK/NF- κ B-Signalweg.

Durch Phosphorylierung von IKK wird die Kinaseaktivität angeschaltet und nachfolgend I κ B α phosphoryliert und mit Ubiquitin zum proteasomalen Abbau markiert. Das so freigewordene p50/p65 Dimer wandert in den Zellkern und bindet an NF- κ B-Konsensussequenzen (verändert nach Luo et al. 2005).

2.5.4 Weitere direkte Interaktionspartner von NOD2

Neben dem Liganden MDP und den Effektoren RIP2 und Caspase-1 sind einige weitere Interaktionspartner von NOD2 gezeigt worden, die die NF- κ B Aktivität mit beeinflussen sollen:

Grim19, TAK1, Erbin und CLAN.

2.5.4.1 GRIM19

Als weiterer Interaktionspartner für NOD2 ist GRIM19 (*gene associated with retinoid-IFN-induced mortality 19*) beschrieben. Es kopräzipitiert mit NOD2, wobei die beteiligte Domäne nicht eingegrenzt wurde (Barnich, Hisamatsu et al. 2005).

Die Funktion von GRIM19 ist trotz einiger Forschungsarbeiten nicht klar. Induzierbar durch Retinolsäure und IFN β , führt GRIM19 in Tumorzelllinien zu programmiertem Zelltod. GRIM19 wurde nukleär und zytoplasmatisch nachgewiesen, wo es jeweils mit größeren Proteinkomplexen kolokalisiert. Primär ist GRIM19 aber ein Bestandteil des mitochondrialen respiratorischen

Komplexes I, wo es mit der NADPH-Ubiquinone-Oxidoreduktase interagiert. Da dieser Komplex I die Hauptquelle für endogene Superoxidanionen ist, wird spekuliert ob GRIM19 die Bildung von ROS (*reactive oxygen species*) beeinflusst (Barnich, Hisamatsu et al. 2005). Tatsächlich nachgewiesen ist aber bisher nur eine verminderte NF- κ B-Antwort bei Transfektion von GRIM19 siRNA. Wie die funktionelle Interaktion mit NOD2 aussieht, ist unbekannt.

2.5.4.2 TAK1

Eine andere Veröffentlichung berichtet von TAK1 (MAP3K7, , *mitogen activated protein kinase kinase kinase 7*) als essentiellen Interaktionspartner von NOD2 (Chen et al. 2004).

Durch eine dominant negative Mutante von TAK1 ließ sich die NF- κ B-Antwort nach MDP-Stimulation dosisabhängig reduzieren. Umgekehrt inhibiert NOD2 die von TAK1 über MKK6 (MAP2K6, *mitogen activated protein kinase kinase 6*) induzierte NF- κ B-Antwort in RIP2 defizienten Fibroblasten. Die Interaktion findet über die intakte LRR-Domäne von NOD2 statt. Bei der L1007fsinsC Mutante ist keine Interaktion und gegenseitige Regulation beobachtbar.

2.5.4.3 ERBIN

Über Kopurifikation wurde ein weiterer möglicher Interaktionspartner von NOD2 gefunden: ERBIN (ERBB2IP, *erb2 interacting protein*) ist bekannt als Regulator des ERK-Signalweges und hat Funktionen in der Organisation der Zellpolarität. ERBIN ist membranlokalisiert und interagiert mit der CARD-Domäne von NOD2 (McDonald et al. 2005; Kufer et al. 2006). Dass für die L1007fsinsC Mutante keine Kopräzipitation nachweisbar ist, wird mit der fehlenden Membranassoziation dieser NOD2-Mutation erklärt. Funktionell wirkt ERBIN als Suppressor der NOD2 induzierten NF- κ B-Aktivität (McDonald et al. 2005).

2.5.4.4 CLAN als Interaktionspartner und das Problem der spontanen Oligomerisierung durch Überexpression

Ebenfalls negativ regulatorische Wirkung auf NOD2 soll CLAN (*CARD, LRR and NACHT domain containing protein*) haben (Damiano et al. 2004). CLAN wird auch mit den Synonymen CARD12 oder IPAF bezeichnet. Über Kopurifikation wurde eine Interaktion von überexprimiertem CLAN mit NOD1, NOD2, NAIP (BIRC1, *baculoviral IAP repeat-containing 1*) und CRYOPYRIN (CIAS1, *cold autoinflammatory syndrome 1*) gezeigt. Das Verhalten von überexprimiertem CLAN wurde auch mittels Gelfiltrationschromatographie untersucht. Hier ergab sich, dass CLAN nur in hochmolekularen Komplexen in der Zelle vorliegt, nicht als Monomer (Damiano et al. 2004). Entweder CLAN bindet an andere Proteine des Zelllysates, oder es kommt zu spontaner Selbstassoziation.

Auch von anderen Proteinen mit NOD-Domäne ist bekannt, dass sie bei Überexpression mit Autooligomerisierung reagieren. So führt z.B. bei NOD2 allein die Überexpression zu einer NF- κ B-Aktivierung, der sogenannten basalen Aktivität (Chamaillard et al. 2003; Tanabe et al. 2004). Nicht nur

die NOD-, auch die CARD-Domäne kann autooligomerisieren. Die Überexpression der CARD-Domäne von NOD2 kann Apoptose induzieren (McDonald et al. 2005). Ein weiteres CARD-Protein, ASC (PYCARD, *PYD and CARD domain containing*), bildet bei Überexpression hochmolekulare Komplexe, die Specks genannt werden (Martinon et al. 2001).

Wenn nun aber NOD-Proteine bei Überexpression oligomerisieren, ist es nicht auszuschließen, dass sich bei gleichzeitiger Überexpression verschiedener NOD-Proteine auch Heterodimere bilden können, z.B. zwischen CLAN und NOD2. Ob diese Komplexbildung eine physiologische Relevanz hat, muss erst durch weitere Versuche bestätigt werden.

2.5.5 Weitere Rezeptoren für MDP

MDP wurde erst spät als Ligand für NOD2 beschrieben, aber seine Wirkung als Adjuvans und seine Eigenschaft, Fieber zu induzieren, sind schon länger Gegenstand der Forschung (Riveau et al. 1980). Neben zahlreichen Untersuchungen zu den Wirkungen von MDP sind auch einige Bindungspartner bekannt, die entweder den Dipeptid- oder Muramylteil von MDP binden.

MDP bindet auch an membranständiges Calretikulin (srCRT, *surface calreticulin*) und induziert durch Hochregulation des TNF-Rezeptor-1 Apoptose in RK13 Zellen (*rabbit kidney 13*) (Chen et al. 2005). Diese Reaktion lässt sich durch EGTA (*ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether) tetraacetic acid*) hemmen, da srCRT calciumabhängig ist. Dies spricht für eine spezifische Beteiligung von srCRT, ohne entscheidenden Anteil von NOD2 oder TLR2.

2.6 Morbus Crohn und NOD2

2001 veröffentlichten drei Arbeitsgruppen umfangreiche Studien, nach denen Mutationen von NOD2 mit Morbus Crohn assoziiert sind (Hampe et al. 2001; Hugot et al. 2001; Ogura et al. 2001).

Morbus Crohn (Crohn's disease, CD) zählt zusammen mit Ulcerativer Colitis zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (*inflammatory bowel disease*, IBD). Die Prävalenz von IBD liegt in der westlichen Kultur bei 100 bis 200 Betroffenen auf 100.000 Einwohner. Die Erstmanifestation betrifft bereits junge Erwachsene, die Krankheit kann über mehrere Lebensjahrzehnte immer wieder zu Entzündungsschüben führen. Morbus Crohn ist daher von hoher sozioökonomischer Relevanz.

Bei Morbus Crohn ist die Entzündung diskontinuierlich meist im Bereich von Ileum und Colon angesiedelt, kann aber auch auf den gesamten Gastrointestinaltrakt übergreifen. Nicht nur das Epithel ist entzündet, auch tiefere Zellschichten werden angegriffen. Als Komplikation entstehen häufig Stenosen und Fisteln, die operativ behandelt werden müssen. In einigen Fällen kommt es auch zu Manifestationen in Gelenken und Lungen. Auf Zellebene zeichnet sich Morbus Crohn durch erhöhte NF- κ B-Aktivität und TNF α -Konzentrationen aus.

Morbus Crohn ist eine multifaktorielle Erkrankung, bestimmte Umweltfaktoren wirken auf Personen mit genetischer Prädisposition krankheitsauslösend. Mindestens sieben unabhängige Genloci sind mit der Erkrankung assoziiert, so auch NOD2 bzw. sein Gen *CARD15*. Die drei häufigsten Mutationen von NOD2 (R702W, G908R und L1007fsinsC) liegen unmittelbar vor oder im Bereich der LRRs. Zusammen tragen diese drei Mutationen etwa 20 % zur genetischen Prädisposition für Morbus Crohn bei. Das Risiko ist dosisabhängig: Heterozygote sind weniger betroffen als Homozygote oder compound (mehrfach) Heterozygote. Die Odd's Ratio für einfach Mutierte beträgt 1-3, für Träger mehrerer mutierter Allele dagegen 20 – 40 (Odd's Ratio: $(a/b) / (c/d)$, a: erkrankt, nicht mutiert; b: gesund, nicht mutiert; c: erkrankt, mutiert; d: gesund, mutiert) (Girardin, Hugot et al. 2003).

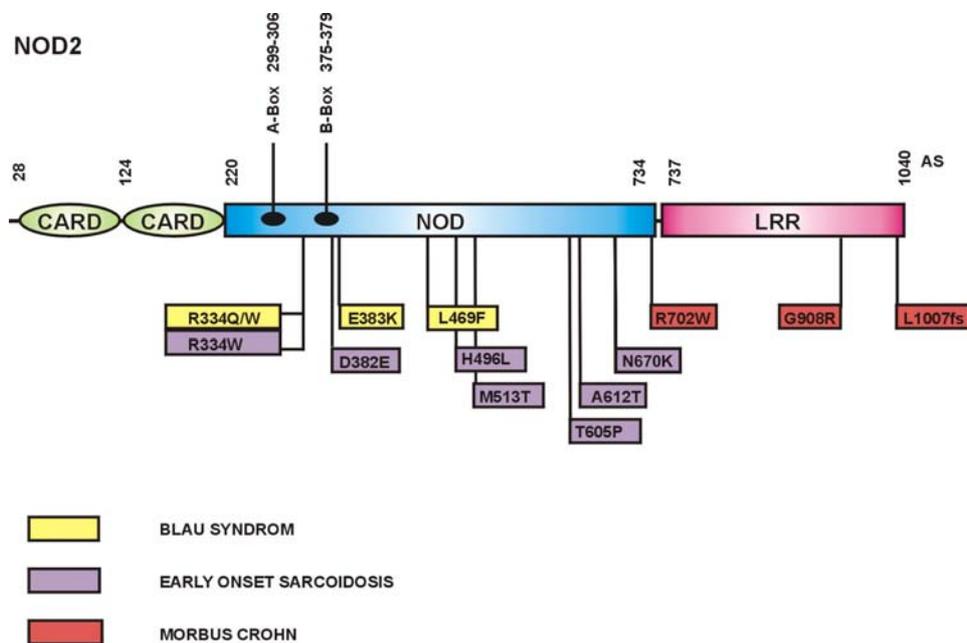


Abbildung 2.5: Krankheitsassoziierte Mutationen von NOD2 (nach Schreiber et al. 2005 und Tanabe et al. 2004).

2.6.1 Weitere mit NOD2 assoziierte Erkrankungen

Weitere autoinflammatorische Erkrankungen mit einer Beteiligung von NOD2 sind Blau Syndrom und eine früh einsetzende Form der Sarkoidose. (Miceli-Richard et al. 2001; Kambe et al. 2005). Beide Krankheiten äußern sich in ähnlichen Symptomen, besonders typisch ist die Bildung von Granulomen in verschiedenen Organen, die zu Arthritis und Uveitis bei Blau Syndrom und Befall der Lunge bei Sarkoidose führen. Interessanterweise induzieren die mit diesen Krankheiten assoziierten Mutationen eine erhöhte basale NF- κ B-Aktivierung (Chamaillard et al. 2003). Im Gegensatz zu den Morbus Crohn assoziierten Mutationen sind sie auch nicht im Bereich der LRRs lokalisiert, sondern beschränken sich auf die NOD-Domäne. Einige Mutationen befinden sich unmittelbar im Bereich der Walker's B-box (Abbildung 2.5). Möglicherweise wird dadurch die Oligomerisation von NOD2 begünstigt und so die Überaktivierung induziert.

Mutationen von NOD2 sind auch mit allergischen Erkrankungen wie Asthma und Atopischem Ekzem assoziiert (Weidinger S. et al. 2005; Kabesch M. 2003) und auch eine Prädisposition zur Entstehung von Colonkarzinom lässt sich mit NOD2 assoziieren (Roberts R. et al. 2006).

2.7 Funktionsverlust der L1007fsinsC Mutation

Detaillierte Studien haben die funktionellen Auswirkungen der Mutationen in der LRR von NOD2 sind vielfach untersucht. Für die L1007fsinsC-Mutation wurde von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben, dass zwar die basale Aktivierung bei Überexpression erhalten bleibt, aber die Stimulierbarkeit durch den Liganden MDP verloren geht, also eine loss-of-function Mutation vorliegt (Chamaillard et al. 2003; Girardin, Boneca et al. 2003; Hisamatsu et al. 2003; Pauleau und Murray 2003; Li et al. 2004; Tanabe et al. 2004).

Widersprüchliche Ergebnisse erbrachte eine Arbeit, die in Makrophagen von L1007fsinsC mutierten Mäusen nach Stimulation mit MDP eine erhöhte Produktion von IL-1 β feststellte (Maeda et al. 2005). Eine weitere Arbeitsgruppe hat in BMDC (*bone-marrow derived dendritic cells*) von Mäusen einen Funktionsverlust der L1007fsinsC-Mutation festgestellt (Kobayashi et al. 2005). Da der Verlust der Funktion aber auch *in vivo* an humanen Monozyten von Crohn-Patienten mit der L1007fsinsC-Mutation gezeigt wurde, ist der Funktionsverlust im Menschen unbestritten (Li et al. 2004; Netea et al. 2005).

Das Krankheitsbild von Morbus Crohn zeichnet sich durch eine erhöhte Aktivierung von NF- κ B aus. Wieso ausgerechnet Mutationen von NOD2, die den Verlust der NF- κ B-Aktivierbarkeit verursachen, insgesamt zu einer Krankheit mit erhöhter NF- κ B-Aktivität führen, ist bislang ungeklärt. Dieses auf den ersten Blick paradoxe Ergebnis kann nur erklärt werden, wenn man die Immunantwort komplexer betrachtet und primäre und sekundäre Reaktionen und vor allem auch die Reaktion verschiedener Zelltypen differenziert.

1. Hypothese: Verlust der primären epithelialen Abwehr

Durch Verlust der sofortigen Verteidigungsreaktion der epithelialen Zellen (Defensinproduktion, andere Pathogenscavenger) bei mutiertem NOD2 können Pathogene vermehrt das Epithel durchdringen und schädigen. Sekundär wird über nun involvierte Immunzellen der Basallamina z.B. durch TLR-Rezeptoren eine starke Entzündung ausgelöst. Für die Relevanz dieser Hypothese sprechen einige Forschungsarbeiten, z.B. die verminderte Resistenz gegen cytoinvasive Bakterien (Hisamatsu et al. 2003) und die Arbeiten zur verminderten Produktion von Defensinen (Wehkamp et al. 2004; Kobayashi et al. 2005) in NOD2 mutierten Zellen.

2. Hypothese: Interferenz von NOD2 mit dem TLR-Signalweg

Eine Arbeitsgruppe veröffentlichte eine negative Regulation der TLR2-Antwort durch NOD2 (Watanabe et al. 2004) und postuliert daraus eine überschießende TLR-Antwort bei mutiertem NOD2. Andere Arbeitsgruppen konnten dieses Ergebnis nicht wiederholen (Kobayashi et al. 2005; Maeda et al. 2005) beziehungsweise kommen zu einem entgegengesetzten Ergebnis (Tada et al. 2005).

3. Hypothese: Interaktion von NOD2 und adaptiver Immunantwort

Es konnte gezeigt werden, dass in NOD2 aktivierten Zellen eine höhere Produktion von IgG1 Antikörpern stattfindet als in NOD2 mutierten Zellen (Kobayashi et al. 2005). Da NOD2-Stimulation auch zu einer Aktivierung von Immunzellen der adaptiven Immunität führt, kann eine veränderte Aktivierung in NOD2 mutierten Patienten zur Krankheitsentstehung beitragen, z.B. durch Induzierung einer Th1-Polarisierung der T-Zellantwort. Über einen konkreten Mechanismus ist hier aber noch nichts bekannt.

2.8 Die Microarraytechnologie

Trotz zahlreicher Arbeiten über NOD2 ist das zelluläre Aktivierungsprogramm nur unvollständig bekannt. Um in dieser Situation zu einem neuen Forschungsansatz zu kommen, bietet sich die Methode der genomweiten Microarrays an.

Affymetrix bietet einen Microarraychip an, der mit über 54.000 Proben jedes der 20.000 bis 25.000 menschlichen Gene mindestens einmal anspricht. Dazu werden Oligomere mit passender (*match*) oder als Kontrolle mit geringfügig abweichender Sequenz (*mismatch*) direkt auf den Chip synthetisiert.

Für die Probenaufarbeitung wird RNA aus einem definierten experimentellen Ansatz prozessiert, mit Fluoreszenzfarbstoff markiert und auf dem Microarraychip hybridisiert. Ein Laserscanner liest die Farbintensität der einzelnen Proben aus. Über den Vergleich mit Kontrollproben und statistische Verfahren wird ein relativer Expressionswert errechnet, die Signalstärke. Dank der Normalisierungsverfahren sind die Microarraydaten verschiedener Chips untereinander vergleichbar,

verschiedene experimentelle Bedingungen können nebeneinander gestellt und die Signalstärken direkt in Bezug gesetzt werden.

Die Microarraysignalstärke liefert also eine Information über die Häufigkeit einer bestimmten RNA. Ob diese Quantität auch vollständig in Protein translatiert wird, kann daraus allerdings nicht abgelesen werden. Die Expressionsdaten der Microarrays liefern einen Blick auf das Transkriptom der Zelle, eventuelle Ergebnisse müssen zusätzlich auf Proteinebene verifiziert werden.

2.8.1 Bisherige Expressionsstudien

In den meisten bisher vorliegenden Arbeiten wurde nur gezielt die Expression bekannter NF- κ B Zielgene untersucht (Maeda et al. 2005).

Microarray-Studien wurden erst von wenigen Arbeitsgruppen veröffentlicht: Kobayashi et al. verwendeten cDNA Microarrays mit 16500 Genen, die sie mit Proben von NOD2-knock-out Mäusen spotteten (Kobayashi et al. 2005). Auf den Ergebnissen dieser Microarrays fundiert ihre Arbeit über Cryptidine. Diese antibakteriellen Peptide sind in den knock-out Mäusen schwächer exprimiert und können auch nicht durch Stimulation induziert werden. Dieses Ergebnis wurde auch im Menschen gefunden: humanes Homolog der Cryptidine sind die α -Defensine. Die intestinal exprimierten α -Defensine HD-5 und HD-6 sind bei Crohn Patienten schwächer exprimiert als bei Gesunden (Wehkamp et al. 2004).

Eine weitere Studie zeigte transkriptionelle Muster in humanen primären Makrophagen von NOD2wt- und L1007fsinsC-Patienten. Für den NOD2-Wildtyp wurden 2518 regulierte Gene bei MDP-Stimulation beschrieben, für die L1007fsinsC-Mutation dagegen nur 165 regulierte Gene. Detailergebnisse veröffentlichten sie für mehrere Cytokine, die die Dysfunktion der L1007fsinsC Mutante bestätigen (Li et al. 2004).

Eine umfassende Arbeit wurde von Costello et al. veröffentlicht (Costello et al. 2005). Auf cDNA-Arrays mit 33792 Genen wurde cDNA aus Biopsien von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa hybridisiert und mit Biopsien von gesunden Kontrollpersonen verglichen. Nur eine der erkrankten Personen trug die L1007fsinsC-Mutation, daher ist keine Auswertung der Daten nach diesem Kriterium durchgeführt worden. Zu Genregulation bei Morbus Crohn liefert diese Arbeit aber zahlreiche Ergebnisse.

Eine weitere Arbeit mit cDNA Arrays liegt von Mannick et al. vor (Mannick et al. 2004). In PBMCs von Crohn Patienten im Vergleich mit anderen entzündlichen Erkrankungen wurde die Transkription von 2400 Genen untersucht. Dabei wurden 52 differentiell regulierte Gene gefunden, z. B. waren bei den Morbus Crohn Patienten CRel (REL) und Peroxiredoxin 2 hochreguliert.

2.9 Ziele der Arbeit

In den vorangegangenen Kapiteln wurde ausführlich über die bisherigen Ergebnisse der Forschung zu NOD2 berichtet. Auf molekularer Ebene gibt es stringente Modelle zur Proteinfunktion, und auch die wichtigsten beteiligten Signaltransduktionswege sind bekannt.

Trotzdem ist die entscheidende Frage aus medizinischer Sicht noch nicht geklärt: wie entstehen aus einer gestörten Funktion von NOD2 chronisch entzündliche Krankheiten?

Die noch ungeklärten Fragen zur Proteinfunktion werden daher in dieser Arbeit weiter untersucht. Folgende Aspekte der zellulären Funktion von NOD2 werden in dieser Arbeit näher betrachtet:

- Lokalisation von NOD2 in der Zelle
- Phosphorylierung von NOD2
- NOD2-abhängige Transkriptomregulation

Die Verwendung genomweiter Microarrays als quantitative Methode zur Analyse der differentiellen Genexpression bietet die Möglichkeit, neue Ansätze zur Proteinfunktion aufzudecken. Besonders der direkte Vergleich von NOD2-Wildtyp und der L1007fsinsC-Variante bietet die Chance, eventuell abweichende Funktionen der Mutation zu erkennen und Krankheitsgene zu identifizieren.

Der Hauptteil der vorliegenden Arbeit stellt daher die Ergebnisse eines umfangreichen Microarrayexperimentes dar. Einen genaueren Einblick in das NOD2-spezifische Aktivierungsprofil zu gewinnen ist das Ziel der hier vorgestellten Untersuchung.

3 Material und 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 bekanntgegeben.

3.1 Standardkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten HEK-293 (*human embryo kidney*) Zellen (ACC 305), HeLa S3 Cervix-Adenokarzinomzellen (ACC 161) und THP-1-Zellen (*human acute monocytic leukemia*) (ACC 16) stammten von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig). FLP-IN-Hek-293 wurden von Invitrogen (Karlsbad) bezogen.

THP-1-Zellen und primäre Monocyten wurden in RPMI-Medium (Gibco BRL Life Technology, Eggenstein), HELA- und HEK-Zellen in DMEM-Medium (Gibco, Eggenstein) kultiviert, jeweils ergänzt mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin) (je 50 µg/ml). Inkubiert wurden die Zellen in einem Brutschrank (Heraus, Hanau) bei 37°C und 5 % CO₂. Alle Zellen wurden zwei- bis dreimal pro Woche mittels eines Inversmikroskops (h500, Hund, Wetzlar) optisch überprüft und bei etwa 80 %iger Konfluenz passagiert. HELA Zellen wurden mittels Trypsinierung abgelöst: Die Zellen wurden mit vorgewärmten PBS gewaschen und nach Überschichtung mit 1X Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) 5 min bei 37°C abgelöst. Nach dem Abstoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von FCS-haltigem Medium wurden die Zellsuspensionen in 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg) überführt und für 5 min bei 1700rpm (626 x g) in einer Zentrifuge (Varifuge3.0R, Heraeus, Hannover) sedimentiert. Bei den HEK-Zellen wurde das Medium abgenommen und durch 10 ml PBS ersetzt, danach wurden die Zellen durch Klopfen gegen die Kulturflasche abgelöst. THP1 Zellen wachsen als Suspensionskultur und konnten direkt in Zentrifugenröhrchen überführt werden. Wegen der höheren Empfindlichkeit wurden THP1 und PBMC nur bei 1200 rpm (250 x g) sedimentiert.

Nach Resuspendieren der Zellen in 1-2 ml Medium wurde ein entsprechender Anteil an Zellen zur weiteren Kultivierung in die 25-ml-Kulturflaschen (Falcon) überführt bzw. ein Aliquot der Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer (VWR International GmbH, Darmstadt) ausgezählt und in entsprechender Konzentration für weitere Experimente über Nacht kultiviert. Für die Experimente wurden nur Zellen bis zur maximal 25. Passage verwendet, zudem wurden die Zellen routinemäßig einmal pro Monat, bei neu in Kultur genommenen Zelllinien sofort nach Eintreffen auf Kontamination mit Mykoplasmen untersucht.

3.1.1 Anlegen und Auftauen von Zellreserven

Von den selbst klonierten stabilen Zelllinien wurden Reserven angelegt, die bei -80°C gelagert wurden. Zum Einfrieren wurden die Zellen expandiert, geerntet und in 1 ml Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Kammer bestimmt (siehe unten) und mit Dimethylsulfoxid (DMSO)-haltigem Einfriermedium (Cell Culture Freezing Medium-DMSO, Invitrogen) auf eine Dichte von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. DMSO wirkt kryoprotektiv, ist aber bei höheren Temperaturen toxisch. Die Zellsuspension wurde daher möglichst schnell für das Einfrieren aliquotiert. Ein mit Isopropanol gefüllter Kryokontainer sorgte für ein langsames und kontinuierliches Abkühlen der Zellen bei -80°C .

Zur Inkulturnahme wurden die Zellreserven in einem Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut, im Anschluss rasch in ein mit warmem Medium + 10% FCS gefülltes 50-ml-Röhrchen überführt und bei $626 \times g$ abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet im Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellen expandiert.

3.1.2 Bestimmung der Zellkonzentration

Zum Bestimmen der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Dabei wurde ein $10 \mu\text{l}$ -Aliquot der Zellsuspension mit $90 \mu\text{l}$ 0,4% Trypan-Blau (Sigma, München) versetzt und von dieser Verdünnung $10 \mu\text{l}$ in die Zählkammer eingebracht. Anschließend wurden die Zellen unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro ml wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl der ausgezählten Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadranten}} \times 10.000$$

3.1.3 Aussaat und Ernte

Die Zellzahl pro *well* und das Mediumvolumen variierte je nach Zellkulturformat und Experiment. Für Transfektionsexperimente wurden geringere Zelldichten ausgesät, um die Transfektionseffizienz zu optimieren. Die für die verschiedenen Experimente eingesetzten Zellzahlen und Zellkulturplattenformate sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Ausgesäte Zelldichten für die verschiedenen Experimente

Experiment	Zellkulturformat	Zellzahl/well	Mediumvolumen [ml]
Immunpräzipitation	10-cm-Schale	5×10^6	10
Transfektion und Immunpräzipitation	10-cm-Schale	2×10^6	10
RNA (Microarray)	10-cm-Schale	5×10^6	10
RNA (sonstige), DNA	6-well-Platte	4×10^5	2
Proteinisolierung	6-well-Platte	8×10^5	2
Transfektion und Proteinisolierung	6-well-Platte	4×10^5	2
Dual Luciferase Assay (DLA)	96-well-Platte	20000	0,1
ELISA	96-well-Platte	20000	0,1

Zum Ernten adhärenter Zellen wurde das Kulturmedium gegen 4°C kaltes PBS ausgetauscht. Sofern die Zellen noch nicht durch den Temperaturwechsel von der Kulturschale gelöst waren, wurden sie mit einem Gummischaber abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 – 1800 rpm (Varifuge 3.0R von Heraeus, Hanau) sedimentiert. Suspensionskulturen wurden erst in ein Reaktionsgefäß überführt, sedimentiert, dann das Pellet in kaltem PBS aufgenommen und erneut sedimentiert. Danach wurden die Zellpellets je nach weiterer Versuchsplanung entweder in die verschiedenen Lysepuffer aufgenommen oder bei -80°C eingefroren.

3.1.4 Isolierung primärer mononukleärer Zellen

Primäre mononukleäre Zellen (PBMC, *peripheral blood mononuclear cell*) aus humanem Blut wurden per Dichtezentrifugation in zwei Schritten gewonnen. Ausgangsmaterial waren je 100 ml EDTA-Blut von Patient und Kontrollperson, das durch kurzes Lagern auf Raumtemperatur gebracht wurde. Alle weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Leuko-Sep bio-one Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) mit Filtermembran wurden mit 15 ml Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Freiburg) gefüllt und 30 s bei 1000 x g zentrifugiert, um das Ficoll unter die Scheibenmembran zu drücken. Je 15 ml Blut wurden auf die Filtermembran geschichtet und zentrifugiert (15 min; 260 x g; 20 °C). Danach ergab sich folgende Schichtung: zuoberst Plasma (gelblich-klar) - darunter PBMCs (inkl. Monozyten; weiß, schmale Schicht) – Ficoll (weißlich) – Filtermembran – Ficoll – Erythrocyten (rot). Nach Absaugen des Plasmas wurde mit einer Pipette die PBMC-Schicht aufgenommen und in einem neuen Röhrchen mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach Pelletieren (10 min; 260 x g) der Zellen und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml PBS resuspendiert und in ein Röhrchen mit 15 ml vorbereiteter Percollverdünnung (Percoll

Separating Solution, Biochrom AG, Berlin) geschichtet (Percoll/PBS Verdünnung 50,4 ml : 49,6 ml; resultierende Dichte: 1.065 g/mL.). Nun erfolgte die zweite Dichtezentrifugation bei 400 x g für 35 Minuten, wonach die mononukleären Zellen in den obersten 5 ml der Lösung angereichert waren und abgenommen wurden. Nach erneutem waschen mit PBS (ad 50 ml; 10 min; 250 x g) wurde das Zellpellet in Medium resuspendiert (RPMI-Medium (Gibco BRL Life Technology, Eggenstein) + 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin)) und je 5 x 10⁶ Zellen pro well in 6-well-Platten ausgesät. Eine Anreicherung von Monozyten wurde durch Adhäsionsselektion erreicht: nach 90 min. wurden das Medium der Zellkulturschalen vorsichtig gewechselt, um schwimmende und abgestorbene Zellen zu entfernen. Nach Ruhezeit über Nacht wurden die Zellen entsprechend den Versuchsbedingungen stimuliert und geerntet.

3.1.5 Stimulation von Zellen

Für die einzelnen Versuche wurden die Zellen in den gewünschten Formaten ausgesät (siehe Tabelle 3.1) und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde entweder die Transfektion oder Stimulation durchgeführt.

3.1.5.1 MDP-Stimulation

In den Microarrayexperimenten wurde zu Beginn der Stimulation das Zellkulturmedium abgenommen und gegen frisches Medium ohne FCS ausgewechselt. Dies sollte eine Beeinflussung der Stimulation durch im Kälberserum enthaltene Wachstumsfaktoren verringern.

Das Muramyldipeptid MurNAc-L-Ala-D-Glu (MDP) wurde von der Firma Bachem (Weil am Rhein) bezogen. Das lyophilisierte Material wurde in PBS gelöst und auf eine Konzentration von 5 mg/ml eingestellt. Aus dieser Stammlösung wurden alle MDP-Stimulationen durch direkte Zugabe in das Zellkulturmedium durchgeführt. Die für die Zellen aktive Endkonzentration im Zellkulturmedium betrug immer 10 µg/ml.

3.1.5.2 Stimulation mit Bakterien

Alternativ zur Stimulation der Zellen mit MDP wurden lebende Bakterien der Art *Listeria monocytogenes*, Serotyp 1/2a, Stamm EGD und *Listeria innocua* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Trinad Chakraborty, Justus-Liebig-Universität, Giessen) verwendet. Bei *L. monocytogenes* handelt es sich um Gram-positive, aerobe, fakultativ intrazelluläre Pathogene, die in nicht-phagozytierende Zellen eindringen können und deshalb häufig als Modell für intrazelluläre Detektion von Bakterien benutzt werden. *L. innocua* ist nicht cytoinvasiv (Opitz et al. 2006).

Listerien wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 1:10 in frischem LB-Medium verdünnt und für 4 - 6 h inkubiert. Das Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurde durch stündliche Messung der optischen Dichte bei 600 nm gegen LB-Medium kontrolliert. Bei einer OD von 0.2 (entsprechend einer

Bakteriendichte von 200×10^6 colony forming units / ml) wurde die Inkubation beendet, die Zellen wurden durch Zentrifugation (3000g, 10 min, RT) pelletiert und in dem gleichen Volumen Zellmedium DMEM + 10% (v/v) FCS aufgenommen. Zur Stimulation der HEK-293 wurde das Zellmedium gegen DMEM + 10% (v/v) FCS ausgetauscht. Nach einer einstündigen Vorinkubation wurden die Bakterien mit einem MOI (*multiplicity of infection*) – Wert von 100 (d.h. 100 Bakterien pro ausgesäeter Zelle) zu den HEK-Zellen gegeben. Die Infektion erfolgte bei 37°C für eine Stunde. Im Anschluss wurde das Medium mit den Bakterien entfernt, die Zellen mit warmem PBS gewaschen und für 2 h in Medium + 10% (v/v) FCS + 100 µg/ml Gentamycin (Sigma, G 1264) inkubiert, um extrazelluläre Listerien abzutöten. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS wurden die Zellen in DMEM + 10% (v/v) FCS + Penicillin/Streptomycin (jeweils 50 µg/ml) für weitere 2 h, 4h oder 8 h inkubiert. Als Kontrollen dienten HEK-293-Zellen, die identisch behandelt wurden, ohne mit Listerien infiziert worden zu sein.

3.1.5.3 Phosphataseinhibition

Die Unterdrückung von Phosphatasereaktionen wurde mit verschiedenen Inhibitoren durchgeführt.

Calyculin A ist ein potenter und hochspezifischer Inhibitor der PP-1 und PP-2 Klassen der Serin/Threonin Phosphatasen ($K_i = \sim 0.1$ nM). Dieser Inhibitor wurde von Upstate (Lake Placid, NY) bezogen und in DMSO eine Stammlösung angesetzt (10 µM, 10µg/ml). Die Stammlösung wurde im Dunkeln gehalten und bei -20°C gelagert.

Zur Inhibition von Tyrosin-Phosphatasen wurde der Phosphatase-Inhibitor Coctail II (PIC II) von Sigma (München) entsprechend der Herstellerempfehlung in einer Verdünnung von 1:100 als Endkonzentration eingesetzt. Dieses Gemisch aus Na-Orthovanadat, Na-Molybdat, Na-Tartrat und Imidazol hemmt eine Reihe von Tyrosin-Phosphatasen und zusätzlich saure und alkalische Phosphatasen.

Zur Gewinnung von phosphoryliertem NOD2 wurden Zellen in 10 ml Schalen per Calcifektion mit dem Plasmid pCEV-NOD2 transfiziert, das N-terminal eine FLAG-Sequenz enthält. Nach 48 h wurde dem Zellkulturmedium Calyculin A entsprechend der Herstellerempfehlung zu einer Enkonzentration von 100 nM zugegeben, gleichzeitig mit MDP (10 µg/ml). Die Wirkung des Lösemittels DMSO auf die Zellen konnte vernachlässigt werden, da das Ziel des Experimentes nur die Gewinnung von p-NOD2 war und kein Vergleich mit unstimulierten Zellen vorgenommen wurde. Nach maximal 60 Minuten wurden die Zellen geerntet, da Calyculin A stark toxisch wirkt und bei längerer Inkubation die Zellen absterben. Entsprechend wurde mit dem Phosphataseinhibitor Coctail II verfahren, der in einer Endverdünnung von 1:100 eingesetzt wurde. Nach 60 Minuten wurden die Zellkulturschalen auf Eis transferiert und geerntet.

Dem Lysepuffer (cell free lysis buffer) für die schonende Extraktion von cytosolischen Proteinen wurde ebenfalls Calyculin A (100 nM) beziehungsweise PIC II (1:100) beigelegt. Dieses Lysat wurde, wie im Kapitel 3.6.7 beschrieben, einer schonenden Immunpräzipitation unterzogen und dann per Gelelektrophorese aufgereinigt.

3.1.6 Transfektion von Zellen

3.1.6.1 Lipofektion

Für Luciferase-Assays und alle für die Herstellung der stabilen Zellen notwendigen Transfektionen wurde die Lipofektion eingesetzt. Dabei wird DNA an Liposomen komplexiert, die mit der Zellmembran fusionieren und so die DNA in die Zelle transferieren. Als Transfektionsreagenz wurde FuGENE 6 (Roche, Mannheim) verwendet.

Für die Transfektion wurde zuerst DNA in FCS-freiem Medium vorgelegt und in diese Mischung vorsichtig das FuGENE-Reagenz zugegeben. Nach 15 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mischung in die Zellkulturschalen mit normaler Mediummenge überführt. Die für die verschiedenen Formate verwendeten Mengen pro *well* sind aus Tabelle 3.2 ersichtlich.

Tabelle 3.2: Mengen und Volumina für die Lipofektion.

Format	Medium [μ l]	DNA [μ g]	Fugene [μ l]
10 cm-Schale	400	4	12
6- <i>well</i>	100	1	3
96- <i>well</i>	50	50	0,15

3.1.6.2 Calcium-Phosphat Transfektion

Für alle Transfektionen, bei denen eine hohe Transfektionsrate wünschenswert war, wurde die Calcium-Phosphat Methode angewendet. Dies galt insbesondere für die Immunpräzipitationen für die Phospho-NOD2 Untersuchungen, wo eine hohe Proteinausbeute notwendig für die weitere Analyse war. Bei der Calcium-Phosphat Transfektion in einer gepufferten Lösung ein feines Calcium-Phosphat Präzipitat erzeugt, an dessen Oberfläche DNA bindet. Ein Teil dieser Kristalle wird von den Zellen aufgenommen.

Folgende Lösungen wurden steril vorbereitet:

- 2x Hanks balanced salt solution (HBS): Hepes 11,9 gr; NaCl 16,4 gr; Na₂HPO₄ 0,21 gr; H₂O ad 1L, pH 7,05
- CaCl₂ 2,5 M

Für die Transfektion wurde zuerst das Zellkulturmedium von 10 cm Schalen gegen 8 ml neues Medium mit 10 % FCS und 1% P/S ersetzt. Für jede 10 cm Schale wurde folgende Mischung angesetzt: 20 μ g DNA, 100 μ l CaCl₂ und 875 ml H₂O. In ein weiteres Röhrchen wurde 1 ml/10cm Schale 2 x HBS vorgelegt. Um eine homogene Durchmischung und damit eine feine Kristallbildung zu erreichen, wurde mit einer Pipette Luft durch die HBS-Lösung geblasen, während das DNA-Gemisch

tropfenweise zugegeben wurde. Die 2 ml fertige Transfektionslösung wurden in die Zellkulturschalen gegeben. Nach 8 -10 h erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel und nach 48 h die Zellernte.

3.2 Massenspektrometrie

Die Extraktion der Proteine aus den ausgeschnittenen Gelbanden, die Verdau und Anreicherung der Phosphopeptide und die abschließende Massenspektrometrie wurden durchgeführt von der Protein Research Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark in Odense. Die Methodik wird daher nur schematisch beschrieben:

NOD2 enthaltende Gelbanden wurden ausgeschnitten, reduziert und alkyliert und anschließend mit Trypsin verdaut. Aus den so gewonnenen Peptiden wurden Phosphopeptide durch Affinitätschromatographie angereichert (IMAC, Immobilized Metal Affinity Chromatography). Die eluierten Proben wurden mittels Massenspektrometrie (LC-MS, *liquid chromatography mass spectrometry*) auf einem LTQ-FT Instrument (Thermo Finnigan, Waltham, USA) analysiert wie beschrieben (Gruhler et al. 2005).

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung genomischer DNA

Zur Überprüfung des Inserts in den stabilen FLP-IN Zellen wurde genomische DNA isoliert, um anschließend das Insert amplifizieren und sequenzieren zu können.

Verwendet wurde das Wizard SV Genomic DNA Purification System von Promega (Madison, USA) gemäß dem Herstellerprotokoll. 1×10^6 Zellen wurden nach einem Waschschrift in PBS in 150 µl of Wizard SV Lysis Buffer lysiert. Dieses Lysat wurde auf eine Minisäule gegeben und zentrifugiert (3 min; 13.000 x g) um die DNA an die Silicamembran zu binden. Darauf erfolgten vier Waschschriffe mit je 650 µl SV Wash Solution. Eluiert wurde schließlich mit 250 µl Nuklease-freiem Wasser (1 min; 13.000 x g) in ein sauberes Reaktionsgefäß. Die Konzentration wurde mit einem UV-Photometer bestimmt, anschließend wurde die isolierte DNA bei -20°C gelagert.

3.3.2 Isolierung von RNA

Die RNA-Isolierung aus humanen Zellen erfolgte mit Silicamembransäulen. In Gegenwart chaotroper Salze, die die Polarität der Wassermoleküle vermindern und die negativen Ladungen auf der Glasoberfläche absättigen, können Nukleinsäuren an die Silicamembran binden.

Verwendet wurde das System von Qiagen (Hilden), mit den Komponenten QIAshredder Homogenizer Kit, RNeasy Mini Kit und RNase-Free DNase Set. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Der erste Schritt, Lyse der Zellen und Deaktivierung aller endogenen RNasen erfolgte mit 640 µl RLT-Puffer + 1% (v/v) β -Mercaptoethanol. Dieses Lysat wurde auf eine QIAshredder-Säule aufgebracht

und zentrifugiert (2 min; 12.000 rpm, Tischzentrifuge Centrifuge5415 C, Eppendorf, Hamburg), um die langkettige DNA zu zerkleinern. Das Zentrifugat wurde mit einem Volumen 70% Ethanol versetzt und in die RNeasy-Säule überführt, wo durch einen Zentrifugationsschritt (15 s; 8000 rpm) die RNA an die Membrane gebunden und das übrige Lysat entfernt werden konnte. Nach einem Waschschrift mit 350 µl Puffer RLT (15 s; 8000 rpm) wurde der erste DNA-Verdau auf der Membran durchgeführt. 80µl der DNase-Lösung (10 µl DNase I in 70 µl RDD-Puffer, Qiagen) wurden aufgetragen und 15 Minuten inkubiert. Danach wurden Waschen und DNase-Verdau nochmals wiederholt. Es folgten drei weitere Waschschriffe mit 700 µl RW1-Puffer und 2 x 500 µl RPE-Puffer und anschließender Zentrifugation. Zuletzt wurde die Membran durch zweiminütiges Leerzentrifugieren bei 12.000 rpm getrocknet und die RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser in ein neues Röhrchen eluiert (1 min; 12.000rpm).

Die Konzentrationsmessung der RNA wurde mit einem UV-Photometer (Ultrospec 3100 pro, UV/visible Spectrophotometer, Amersham Biosciences Europe, Freiburg) bei 260 nm durchgeführt und mit dem spezifischen Umrechnungsfaktor von 40 ng/µl (für OD=1,0) errechnet. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm wurde herangezogen, um Proteinverunreinigungen auszuschließen. Nur Proben mit einem A260/A280 Verhältnis zwischen 1,6 und 2,0 wurden verwendet.

3.3.3 Qualitätskontrolle der RNA

Um verbleibende Kontamination mit DNA auszuschließen, wurde die RNA einer Kontroll-PCR mit Primern für GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat dehydrogenase) unterzogen. Nur Proben, die keine Amplifikation von GAPDH zeigten, wurden weiterverwendet.

Die Intaktheit der RNA wurde mit Agilent RNA 6000 nano chips auf einem Agilent 2100 bioanalyzer gemessen (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Dazu wurde 1 µl der RNA per Kapillarelektrophorese und anschließender UV-Detektion der Banden vermessen. Das Spektrum zeigte für alle Proben sehr scharfe 18s und 28s rRNA Banden, wodurch eine Degradation der RNA ausgeschlossen werden kann.

3.3.4 cDNA-Synthese

Für die Taqman-Assays wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Verwendet wurde dazu Reverse Transkriptase aus dem Retrovirus MMLV (*moloney-murine leukemia virus*) von Promega (Madison, USA) und Random Hexamer Primer (Biotex, Berlin), die zufällig an die RNA binden und so einen Transkriptionsbeginn ermöglichen. Um die Integrität der RNA zu schützen, wurde zusätzlich RNasin Plus RNase Inhibitor der Firma Promega verwendet.

Die eingesetzte RNA wurde zuerst durch Verdünnen mit Nuklease-freiem Wasser oder durch eindampfen an einer Vakuum-Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg) auf 1 µg in 20 µl H₂O eingestellt. Zusammen mit dem RNaseinhibitor und den Random Hexamer Primern wurde die RNA vorinkubiert (5min; 70°C), um eine Denaturierung eventueller Sekundärstrukturen der RNA und damit gute Bindung der Primer zu erreichen. Danach wurde der *Mastermix* mit der MMLV-Reversen

Transkriptase zugegeben und für eine Stunde bei 42°C amplifiziert. Abschließend wurde das Enzym durch kurzes Erhitzen auf 95°C deaktiviert. Einen Überblick über den Reaktionsansatz gibt Tabelle 3.3.

Tabelle 3.3: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.

Komponente	Volumen [µl]	Reaktion
RNA 1 µg	20	70°C, 5 min 4°C, 2 min
RNaseinhibitor	2	
Random Hexamer Primer	10	
Nuklease-freies Wasser	113	42°C, 2 h 95°C, 5 min
RNaseinhibitor	3	
MMLV-Puffer	40	
dNTPs	10	
MMLV-RT	2	

Zur weiteren Verwendung wurde die cDNA der Proben mit TE-Puffer auf 1000 µl aufgefüllt (Verdünnung 1:5), nur für den Standard der Taqman *real-time* PCR wurde unverdünnte cDNA eingesetzt. Die fertige cDNA wurde bei –20 °C gelagert.

3.3.5 Taqman *real-time* PCR

Um eine quantitative Aussage über die RNA-Transkripte eines bestimmten Genes machen zu können, wurde die Taqman *real-time* PCR Technik eingesetzt. Das Prinzip der *real-time* PCR besteht darin, bei jedem PCR-Zyklus die Menge des entstehenden Amplifikates zu messen. Liegt die cDNA, an die die Primer hybridisieren können, in einer hohen Abundanz vor, erreicht die Amplifikation in einem relativ frühen Zyklus die exponentielle Phase. Bei geringerer Abundanz wird diese Phase erst später erreicht. Mit einer willkürlich gesetzten Grenze (Threshold), die die Amplifikationskurven schneidet, kann als Maß der Threshold-Cycle (C_t) bestimmt werden. Lässt man in der PCR eine Reihe von Standardkonzentrationen mitlaufen, kann man später anhand einer Eichkurve die C_t -Werte in relative Konzentrationen umrechnen.

Um die Menge des Amplifikates genau bestimmen zu können, macht sich die Taqman-Technologie die der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase zunutze. Zusätzlich zu den beiden Primern wird in die Reaktion eine Oligonukleotidsonde (auch Taqman-Probe genannt) zugegeben. Diese Sonde hybridisiert zwischen den Primern an die cDNA. Am 5'-Ende trägt die Sonde einen

Fluoreszenzfarbstoff, am 3'- Ende einen Quencher. Der Quencher ist dem Fluoreszenzfarbstoff räumlich nahe genug, um dessen emittiertes Farbspektrum zu verändern (FRET, Fluoreszenz Resonanz Emissions Transfer). In der Transkriptionsphase wird die Sonde durch die Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase in einzelne Nukleotide zerlegt, der Farbstoff entfernt sich vom Quencher und kann getrennt detektiert werden. Die Intensität der Fluoreszenz korreliert also mit der Anzahl der Amplifikate.

Da die Optimierung einer spezifischen Taqman-Sonde sehr aufwendig ist, wurde hier auf geprüfte fertige Assays (*assays on demand*) der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) zurückgegriffen. Eine Übersicht über die verwendeten Assays gibt Tabelle 3.4. Lediglich der Assay für NOD2 wurde selbst entworfen, die Sequenzen sind ebenfalls in der Tabelle angegeben. Die Taqman-PCR wurde im 384-*well* Format durchgeführt, dabei wurde jeder Standard und jede Probe viermal pipettiert: eine Doppelbestimmung für das Zielgen und eine weitere Doppelbestimmung mit Taqman Primern und Sonde für das Haushaltsgen β -Actin. Die PCR-Reaktion mit einem ABI 7900 ABI PRISM® (Applied Biosystems, Foster City, USA) gemessen und mit der dazugehörigen Software *Sequence Detection System* ausgewertet.

Tabelle 3.4: Taqman Assays (Applied Biosystems).

Assay	RefSeq	Gene Symbol	Gene Name
Hs00154192_m1	NM_001200	BMP2	<i>bone morphogenetic protein 2</i>
Hs00277234_s1	NM_052815	IER3	<i>immediate early response 3</i>
Hs00986759_m1	NM_005531.1	IFI16	<i>interferon, gamma-inducible protein 16</i>
Hs00178297_m1	NM_005204	MAP3K8	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8</i>
Hs00220393_m1	NM_145791.1	MGST1	<i>microsomal glutathione S-transferase</i>
Hs00745167_sH	NM_005952.2	MT1X	<i>metallothionein 1X</i>
Hs00234712_m1	NM_006290	TNFAIP3	<i>tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3</i>
Hs00155512_m1	NM_001561	TNFRSF9	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9</i>
Hs00602754_mH	NM_003430.1	ZNF91	<i>zinc finger protein 91</i>

NOD2_E3_sonde_6 FAM_TGCCTTCCTT CTACAAC			
NOD2_E3_s_GATC TTGCCACGGTGAA AGC		NOD2	<i>nucleotide-binding and oligomerization domain 2</i>
NOD2_E3_a_ATGG GACTGGTAATTCC TGAA			

Außer den Assays wurde auch ein Mastermix mit den üblichen PCR Reagenzien von Applied Biosystems bezogen. Tabelle 3.5 gibt die Zusammensetzung der einzelnen Reaktionen an. Temperaturen und Reaktionszeiten der PCR folgten den Herstellerempfehlungen.

Tabelle 3.5: Zusammensetzung der Taqman-PCR-Reaktion.

Komponente	Volumen [μ l]
cDNA (1:5 vorverdünnt)	5
Taqman Primer und Sonde 20 x Mix	0,5
Mastermix	4,5

Für die Standardkurve wurde von einer Probe für β -Actin und Zielgen jeweils folgende Verdünnungen in TE-Puffer in Doppelbestimmung mit amplifiziert:

Tabelle 3.6: Verdünnungen für die Standardkurve der Taqman-PCR.

Standard	Verdünnung
A	Unverdünnte cDNA
B	1:2,5
C	1:5 (entspricht den Proben)
D	1:10
E	1:20
F	1:40
G	1:60
H	1:80
I	1:100

In der Auswertung wurde aus den relativen Quantitäten der Quotient von Probe und β -Actin-Wert ermittelt. Danach wurde aus den Doppelbestimmungen der Mittelwert errechnet.

3.3.6 Amplifikation der benötigten NOD2-Sequenz

Für die Klonierung des pcDNA5-Vektors musste zuerst die kodierende NOD2-Sequenz von einem bereits vorhandenen Plasmid (pcDNA3.1-NOD2) kopiert werden. Der verwendete *Sense*-Primer beginnt mit einer Kozak-Translations Initiationssequenz (entscheidend sind ein G oder A in Position -3 und ein G in Position +4 (**G/A**)NNAT**GG**), um die Expression in eukaryontischen Zellen zu vereinfachen, und ein Start-Codon (ATG). Der *Antisense*-Primer enthält ein Stop-Codon (TGA), der C-terminale V5-Tag des Vektors wird nicht mit exprimiert.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Tm
pcDNA5_NOD2_s	ATAATGGGGGAAGAGGGTGGTTCA	64
pcDNA5_NOD2_a	TCAAAGCAAGAGTCTGGTGTCCCT	62

Da eine fehlerfreie Amplifikation des Templates angestrebt wurde, kam eine Polymerase mit 3'-5' *Proofreading*-Exonukleaseaktivität zum Einsatz. Das *Platinum Taq DNA Polymerase high fidelity Kit* von Invitrogen (Carlsbad) enthält außer der Polymerase auch den abgestimmten Reaktionspuffer. Das Reaktionsprotokoll ist in Tabelle 3.7 wiedergegeben.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung und Programm der PCR-Reaktion

Komponente	Volumen [μ l]
PCR-H ₂ O	ad 50
10X Reaktionspuffer	5
Primer mix je 10 μ M	1
MgSO ₄ 50 mM	2
dNTPs je 10 mM	1
Template-Plasmid 1 μ g/ μ l	1
Platinum-TaqDNA- Polymerase	0,2

Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
95	30 sec	} 30 x
95	30 sec	
62	1 min	
68	4 min	
4	Pause	

3.3.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. DNA-Moleküle wandern aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste im elektrischen Feld zur Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit durch die Agarosematrix von der Fragmentgröße bestimmt wird. Die Prozentigkeit der verwendeten Agarosegele war abhängig von der erwarteten Fragmentlänge und lag zwischen 1% und 2% (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer. Für die Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Anregung wurde das in DNA-Doppelstränge interkalierende Ethidiumbromid eingesetzt (Endkonzentration 0,6 µg/ml). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 mV für 30 min (Power Pack Basic, BIORAD, München). Durch die Verwendung eines Markers (Smart Ladder, Eurogentec) konnte die Größe sowie die Konzentration von DNA-Banden mittels UV-Licht im BioDocAnalyse-Transilluminator (Biometra, Göttingen) ermittelt werden.

3.3.8 Aufreinigung von DNA aus Gelbanden

Die identifizierten DNA-Banden in den richtigen Größe wurden aus dem Agarosegel mit dem Quiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) eluiert. Dazu wurden die gewünschten Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten, in ein tariertes Reaktionsröhrchen überführt und gewogen. Pro mg Gel wurden 3 µl Puffer QG zugegeben und auf 50°C erwärmt, bis die Agarose vollständig geschmolzen war. Nach Zugabe von 1µl Isopropanol/ 1mg Gel wurde das Gemisch auf eine Minisäule mit DNA-bindender Silica-Gel Membran gegeben und zentrifugiert (1 min; 12.000 rpm, Tischzentrifuge Centrifuge5415 C, Eppendorf, Hamburg). Danach wurde die Säule mit 750 µl Puffer PE gewaschen (1 min; 12.000 rpm) und schließlich trocken zentrifugiert (1 min; 12.000 rpm). Mit 50 µl Nuklease-freiem Wasser wurde die DNA schließlich in ein sauberes Röhrchen eluiert (1 min; 12.000 rpm).

3.3.9 Topo-Klonierung des PCR-Produktes in ein Plasmid

Die Klonierung der NOD2-Sequenz in ein FRT-Plasmid erfolgte mit dem pcDNA5/FRT/V5-HIS TOPO TA Expression Kit von Invitrogen (Carlsbad, USA). Das TOPO-Cloning nutzt die Eigenschaft der Taq-Polymerase, an alle 3'-Enden ein Deoxyadenosin (A) anzuhängen, jedes PCR-Produkt trägt diesen Überhang. Der Vektor wird von Invitrogen linearisiert und mit einem 3'-Deoxythymidin (T) Überhang

geliefert. Zusätzlich ist an das terminale Thymidin das Enzym Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus angehängt. Die Phosphotyrosylbindung der Topoisomerase enthält genug Energie, um eine Ligationsreaktion des PCR-Produktes in den Vektor zu katalysieren, die Topoisomerase wird bei dieser Reaktion frei und es entsteht ein zyklisches Plasmid. Diese Methode ist schnell und effizient, nach 15 Minuten bei Raumtemperatur ist die Ligationsreaktion abgeschlossen. Tabelle 3.8 gibt die Zusammensetzung der Reaktion an, Salzlösung und Vektor sind Bestandteile des verwendeten Kits.

Tabelle 3.8: Komponenten der TOPO-Klonierreaktion.

Komponente	Volumen [μ l]	Reaktion
PCR-Produkt	2	Vorsichtig mischen, bei Raumtemp. 15 min inkubieren, dann auf 4°C
Salzlösung	1	
PCR-Wasser	ad 5 μ l	
pcDNA5/FRT/V5-HIS Vector	1	

3.3.10 Transformation von Plasmiden in kompetente bakterielle Zellen

Bei der Transformation werden Plasmide stabil in Bakterien integriert. Durch einen Temperaturschock wird die bakterielle Zellwand permeabilisiert. Ist das Plasmid integriert, kann es dank seiner Replikationssequenz (pUC ORI) stabil bei der Zellteilung weitergegeben werden. Positive Bakterienklone können über ein ebenfalls im Plasmid lokalisiertes Resistenzgen (*Ampicillin (bla) resistance gene*) selektioniert werden.

Verwendet wurden *One shot Top 10 Escherichia coli* Zellen von Invitrogen (Carlsbad, USA), die vorsichtig auf Eis aufgetaut wurden. Zu den Zellen wurden 2 μ l der Topo-Klonierreaktion zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz genau 30 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock im Wasserbad ausgesetzt und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Damit sich die Zellen erholen und mit dem Wachstum beginnen konnten, wurden sie in 250 μ l SOC-Medium (Invitrogen, Carlsbad) aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C auf dem Bakterienrührer inkubiert (200rpm, Orbital Incubator SI50, Stuart Scientific, Watford Herts, GB). Anschließend wurde der Ansatz auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Waren auf den LB-Platten Kolonien gewachsen, wurden aus einigen dieser Kolonien die Plasmide isoliert und auf eine korrekte Insertion des gewünschten PCR-Produktes untersucht.

3.3.11 Präparative Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen (Minipräp)

Die Plasmidisolierung wurde mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Das Prinzip der Isolierung beruht auf alkalischer Lyse, wobei die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen durch den stark alkalischen pH-Wert gelöst werden. Bei der genomischen DNA lösen sich dabei die Einzelstränge voneinander und die DNA wird vollständig denaturiert. Die supercoiled-Konformation der Plasmid-DNA bewirkt, dass sich die Einzelstränge nach Lösen in räumlicher Nähe befinden. Nach Neutralisation können die Plasmid-DNA-Einzelstränge korrekt renaturieren, während die genomischen DNA-Einzelstränge nicht sequenzkonform hybridisieren. Durch einen Zentrifugationsschritt kann die genomische DNA zusammen mit den Zelltrümmern pelletiert und aus der Lösung entfernt werden. Die Plasmid-DNA kann nun über eine Silica-Gel-Säule isoliert und gereinigt werden.

Für einen Minipräp wurde von den Agarplatten eine Kolonie gepickt und über Nacht in ca. 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin inkubiert. Diese Bakteriensuspension wurde sedimentiert (2min, 12.000 rpm, Tischzentrifuge Centrifuge5415 C, Eppendorf, Hamburg) und in 250 µl RNase-haltigem Puffer P1 resuspendiert. Nach Lyse mit 250 µl Puffer P2 und Zugabe von 350 µl Puffer N3 wurden Zelltrümmer und genomische DNA abzentrifugiert (10 min; 12.000 rpm). Der Überstand wurde auf eine Minipräp-Säule gegeben, die Plasmid-DNA in die Membrane zentrifugiert (1 min; 12.000 rpm) und mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Nach dem trocken zentrifugieren der Membran (1min; 12.000 rpm) wurde mit 30 µl Puffer EB eluiert. Die Plasmidlösung wurde bei -20°C gelagert.

3.3.12 Restriktionsverdau

Eine Möglichkeit, die gewonnenen Plasmide auf das korrekte Insert zu testen, ist ein Kontrollverdau mit Restriktionsenzymen. Spezifisch die DNA-Sequenz schneidende Enzyme werden so ausgewählt, dass ein im Agarosegel gut zu erkennendes Fragment aus dem Plasmid ausgeschnitten werden kann.

Für die Überprüfung des pcDNA5/FRT/ NOD2-Plasmids wurde das gesamte Insert mit den Enzymen BamH I und Nhe I ausgeschnitten. Enzyme und für die Enzyme optimierte Reaktionspuffer wurden von New England Biolabs (NEB, Bad Schwalbach) bezogen. Da die Enzyme unterschiedliche Puffer benötigten, wurde in zwei Schritten nacheinander verdaut. Zwischen den Verdauansätzen wurde das einmal geschnittene Plasmid mit dem PCR-Purification Kit von Qiagen (Hilden) aufgereinigt. Nach dem zweiten Verdau wurde der Reaktionsansatz mit DNA-Ladepuffer versehen und in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

Tabelle 3.9: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau.

Stufe	Komponente	Volumen [μ l]	Reaktion
1. Verdau	Plasmid (Minipräp)	2	Vorsichtig mischen, 37°C, 1 h
	NEBuffer BamH I	1	
	BSA 10 x	1	
	BamH I	1	
	PCR-Wasser	ad 10 μ l	
2. Verdau	Plasmid (gereinigt)	2	Vorsichtig mischen, 37°C, 1 h
	NEBuffer 2	1	
	BSA 10 x	1	
	Nhe I	1	
	PCR-Wasser	ad 10 μ l	

3.3.13 Präparative Isolierung von Plasmiden (Maxipräp)

Von den im Restriktionsverdau positiven Bakterienklonen wurde eine größere Plasmidmenge aufgereinigt. Dafür kam das QIAfilter Maxiprep Kit (Qiagen, Hilden) zur Verwendung. Die Prinzipien der Aufreinigung entsprechen den im Kapitel 3.3.11 für den Minipäp beschriebenen, nur werden die einzelnen Schritte in größerem Maßstab durchgeführt und die Aufreinigung ist aufgrund der besseren Waschschrte sauberer.

Für eine Präparation wurden 250 ml LB-Medium mit 1 μ g/ml Ampicillin versetzt und mit dem gewünschten Bakterienklon angeimpft. Dieser Ansatz wurde über Nacht im Schüttler inkubiert (200rpm, Orbital Incubator SI50, Stuart Scientific, Watford Herts, GB) und dann in 50 ml Zentrifugenröhrchen abgefüllt. Dann wurden die Bakterien sedimentiert (15 min; 4.000 rpm; 4°C; Varifuge3.0R, Heraeus, Hannover) und das Pellet in 10 ml Puffer P1 regsuspendiert. Nach Zugabe von je 10 ml Puffer P2 und Puffer P3 und mehrfachem mischen durch Überkopf-drehen wurden die Ansätze 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach konnte durch zentrifugieren (30 min; 4.000 rpm; 4°C) Sediment abgetrennt werden. Um eine Verschleppung von Sediment zu vermeiden, wurde der Überstand durch eine Filterspritze auf eine equilibrierte Säule gegeben. Per Gravitationsfluss durchlief das geklärte Lysat die Silica-Gel Membran, wobei die Plasmide an die Membran banden. Danach wurde zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen und mit 15 ml Puffer QF in ein neues Röhrchen eluiert. Die eluierte Plasmid-DNA wurde mit 10,5 ml Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (60 min;

4000 rpm; 4°C). Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellet in 5 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach erneutem abzentrifugieren (10 min; 4000 rpm; 4°C) wurde das Pellet in 250 µl Puffer EB gelöst und die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt.

3.3.14 Sequenzierung von DNA

Um die insertierten Sequenzen der hergestellten Konstrukte und die Sequenz des eukaryotisch insertierten FRT-Plasmides zu überprüfen, wurde eine vollständige Sequenzierung der NOD2-Sequenz durchgeführt. Die Sequenz wurde nach der „Taq-Cycle-Sequencing“ Methode, einer Modifikation der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al. 1977), überprüft. In einer PCR Reaktion mit nur einem Primer werden farbstoffmarkierte Didesoxynukleotidtriphosphate zu der normalen dNTP-Mischung zugegeben. Wird ein solches Didesoxynukleotid eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch. Im Kapillarsequenzierer werden die amplifizierten DNA-Fragmente aufgetrennt und als einzelne Farbbanden detektiert.

Für die Sequenzierreaktion wurde das „Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ von Applied Biosystems (Foster City, USA) eingesetzt. Nach der Reaktion wurde jeder Ansatz mit einer DyeEx® -Säule (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und im Kapillarsequenzierer (ABI PRISM® 3700 Kapillarsequenzierer von Applied Biosystems, Foster City, USA) analysiert. Da pro Primer ca. 800 Basen sequenziert werden können, sind für die 3140 Basen zählende NOD2-Sequenz insgesamt 12 Primer zum Einsatz gekommen, um jeden Bereich der Sequenz doppelt abdecken zu können (siehe Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10: Übersicht über die Verwendeten NOD2-Sequenzierprimer

Primer	Sequenz 5' → 3'	Tm
T7	TAATACGACTCACTATAG	
Nod2_Seq1_s	CATTGTCAGGAGGCTCC	50
Nod2_Seq2_s	CCTCAATGACGATGCG	51
Nod2_Seq3_s	CTGTGTCGGCGTTCC	50
Nod2_Seq4_s	CAGCCCTGATGACATTTTC	51
Nod2_Seq5_s	CATCCCGCCAGCTG	51
Nod2_Seq6_s	TGCAGGCAGAACTTCTTG	52
Nod2_Ex2_a	GCGAGCACATTTTACAAC	52
Nod2_Ex4_s	CAGTCTCGCTTCTCAGTAC	51
Nod2_Ex4_a	GTAAGGAGGAAGCGAGACTG	51
Nod2_Ex7_a	CAAGGAGGTGTTGCCTC	51
BGH	TAGAAGGCACAGTCGAGG	

Tabelle 3.11: Sequenzierreaktion

Komponente	Volumen [μl]
PCR-H ₂ O	ad 10
Big Dye V.5	2
Primer 5 pmol/ μl	1
Template-Plasmid 500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	3

Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
95	60 sec	} 25 x
95	10 sec	
50	5 sec	
60	4 min	
4	Pause	

3.3.15 Ortsgerichtete Mutagenese

Die Herstellung des Konstruktes pcDNA5/FRT/NOD2-L1007fsinsC wurde durch Mutagenese des Wildtyp-Konstruktes pcDNA5/FRT/NOD2wt mit sequenzspezifischen Primern und dem Mutagenese-Kit QuickChange® Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Hierfür wurde ein Primerpaar hergestellt, das die zu mutierende Region überspannte und innerhalb der 31 bp Gesamtsequenz auf beiden Strängen die zusätzliche Base zur Insertion von Cytosin enthielt. Nach Amplifikation des gesamten Plasmids mit *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim), die im Vergleich zu herkömmlicher *Taq*-DNA-Polymerase eine deutlich höhere Temperaturstabilität und eine zusätzliche 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt, wurde die unmutierte Template-DNA durch die Restriktionsendonuklease *Dpn* I, die nur die methylierte bakterielle DNA erkennt, verdaut.

Tabelle 3.12: Primer für die ortsgerechte Mutagenese.

Aus NOD2wt wird durch Insertion NOD2-L1007fsinsC. Der kursive Buchstabe entspricht der zusätzlichen Base zur Insertion des Cytosin an Position 3020.

Primer	Sequenz 5' → 3'	bp
Muta_L1007fsinsC_s	GAAGCCCTCCTGCAGGCCCTTGAAAGGAAT	31
Muta_L1007fsinsC_a	GGTGTTCATTCCTTTCAAGGGGCCTGCAGGAG	31

Tabelle 3.13.: Reaktionsansatz für die Mutagenese.

Oben: Zusammensetzung der PCR-Reaktion. Als Template wurde das Konstrukt pcDNA5/FRT/NOD2wt eingesetzt. Unten: PCR-Programm. Die Elongationszeit betrug 1 min pro kb Plasmid, in diesem Fall 8 min.

Komponente	Volumen [μl]
PCR-H ₂ O	ad 50
10X Reaktionspuffer	5
sense-Primer 10 ng/ μl	12,5
antisense-Primer 10 ng/ μl	12,5
dNTPs je 10 mM	1
Template-Plasmid 10 ng/ μl	5
<i>Pfu</i> -DNA- Polymerase	1

Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
95	30 sec	} 16 x
95	30 sec	
55	1 min	
68	8 min	
4	Pause	

Im Anschluss an die Amplifikation wurde der Reaktionsansatz mit 1 μl *Dpn* I (10 U/ μl) versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Das unverdaute mutierte Plasmid wurde wie in Kapitel 3.3.10 beschrieben durch Transformation in *E. coli* kloniert.

3.4 Generierung der stabilen Flp-In Zellen

3.4.1 Prinzip der Flp-In Klonierung

Stabile eukaryotische Zellen, die entweder NOD2wt oder NOD2L1007fsinsC exprimieren, wurden mittels des Flp-In-Systems von Invitrogen (Carlsbad) generiert. Dabei werden die Ausgangszellen zuerst mit einer Konsensussequenz für die Flp-Reombinase transfiziert, dem FRT-*site*. Als Ausgangszellen dienten HEK-293 Zellen (*human embryonal kidney*), die fertig mit integriertem FRT-*site* von Invitrogen bezogen wurden. Zusammen mit dem FRT-*site* wurde eine Zeocin-Resistenz kloniert, mit deren Hilfe positive Zellen selektioniert wurden. Danach wurde das NOD2wt Insert in einen FRT-Vektor kloniert, der ebenfalls die FRT-Konsensussequenz trug. Diese Klonierung der NOD2-Sequenz in das Plasmid pcDNA5/FRT ist in den obigen Kapiteln beschrieben. Das fertig klonierte Plasmid wurde als Ausgangsvektor für eine Mutagenesereaktion eingesetzt, um die L1007fsinsC Mutation zu generieren. Schließlich wurden die fertigen Vektoren, inklusive eines leeren Vektors als Kontrolle, in den FRT-Site der HEK-293 Zellen inseriert. Der FRT-*site* ist eine teilweise palindromische Sequenz von 34 bp Länge, die ursprünglich aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert wurde. Die gegengleichen Sequenzen von genomischer DNA und Plasmid-DNA können hybridisieren.

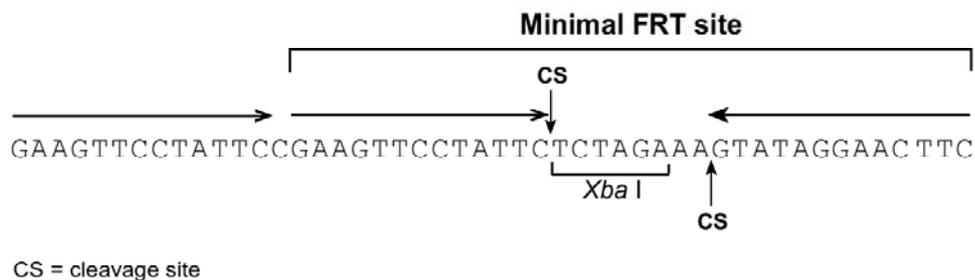


Abbildung 3.1: Die FRT-Sequenz aus dem Genom von *Saccharomyces cerevisiae*

Die genomische Integration wird schließlich durch Öffnung der DNA-Helices durch die Flp-Rekombinase am FRT-*site* ermöglicht. Praktisch wird die Integration durch gleichzeitiges transfizieren des pcDNA/FRT-Vektors und eines Flp-Rekombinase produzierenden Expressionsplasmides (pOG-44) erreicht. Durch die Insertion wird das Zeocin-Resistenzgen der Flp-In Zellen von seinem Startkodon abgeschnitten und damit inaktiviert, dagegen wird das Hygromycin-Resistenzgen des pcDNA/FRT-Vektors aktiviert. Über die Hygromycinresistenz lassen sich erfolgreich inserierte Klone selektionieren.

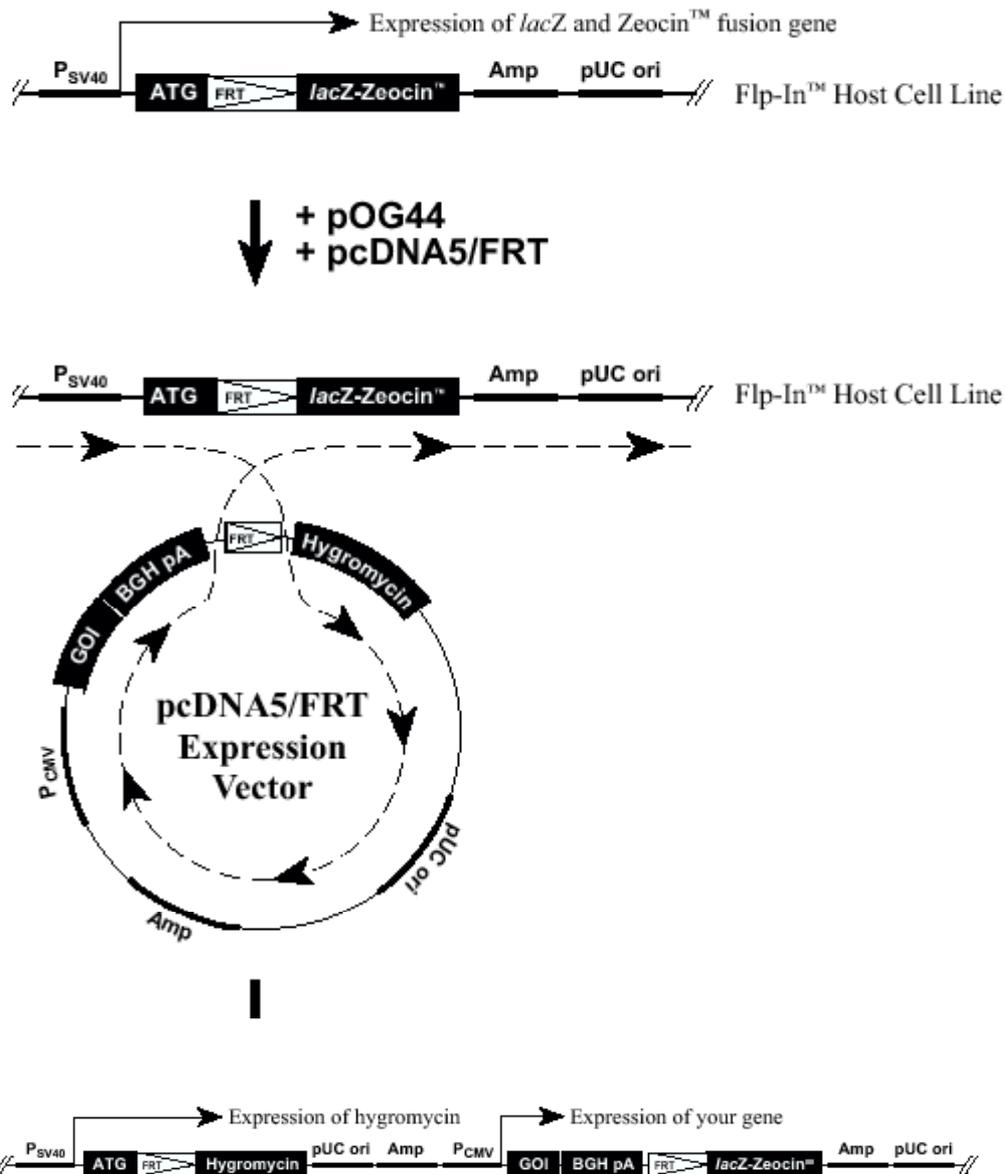


Abbildung 3.2: Schema der FLP-In Klonierung (Quelle: Invitrogen)

Sowohl die Vektoren als auch nochmals die genomischen Inserts wurden in voller Länge sequenziert, um das Einschleppen kodierender Mutationen ausschließen zu können. Für die Sequenzierung des genomischen Inserts wurde zuerst genomische DNA isoliert. Mit dieser DNA als Template wurde mit den Primern T7 und BGH eine PCR durchgeführt, das PCR-Produkt wurde sequenziert.

3.4.2 Transfektion der Flp-In-Zellen

Die Transfektion der Vektoren pcDNA5/FRT/NOD2wt, pcDNA5/FRT/NOD2-L1007fsinsC pcDNA5/FRT/Kontrolle erfolgte jeweils zusammen mit dem Flp-Rekombinase Expressionsplasmid pOG-44 in einem Verhältnis von 1:9. Die Rekombinase wurde im Überschuss transfiziert, um trotz der Reaktionsträgheit des Enzyms eine erfolgreiche Integration zu erreichen.

Generell erfolgte die Transfektion wie im Kapitel 3.1.6.1 über Lipofektion beschrieben. Es wurden 10 cm Schalen HEK-293/FRT Zellen mit je 3,6 µg pOG-44 und 0,4 µg pcDNA/FRT-Plasmid transfiziert.

3.4.3 Selektion positiver Klone

Für die Transfektion waren die Zellen in Medium ohne Zeocin passagiert worden. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium vollständig ausgetauscht, am 2. Tag nach Transfektion wurden die 10 cm Schalen geteilt, so dass die transfizierten Zellen in den neuen Kulturschalen maximal eine Konfluenz von 25 % erreichten. Nach einer Ruhephase von 4 Stunden, in der die Zellen adherieren konnten, wurde dem Kulturmedium das Antibiotikum HygromycinB (Invitrogen, Carlsbad, USA) zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml beigegeben. Das Verhalten der HEK-293/FRT unter HygromycinB war in einem Vorversuch mit den Konzentrationen 0 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, und 200 µg/ml ausgetestet worden. Dabei hatte sich für die Konzentration 100 µg/ml bei regelmäßigem Mediumwechsel nach 7 Tagen eine Wachstumsverzögerung von 50% im Vergleich zur Kontrolle und ein vollständiges Absterben der Zellen nach 14 Tagen gezeigt.

Die transfizierten Zellen reagierten aber empfindlicher auf HygromycinB, deshalb wurde die Konzentration am 6. Tag nach Transfektion auf 90 µg/ml reduziert. Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen nicht mehr flächig adhärent, sondern stark abgekugelt. Daher wurde am 7. Tag nach Transfektion die Dosis von HygromycinB auf 70 µg/ml verringert. Am 10. Tag nach Transfektion waren fast alle Zellen schwimmend, das Medium wurde vollständig ausgetauscht und die Hygromycinkonzentration auf 50 µg/ml herabgesetzt.

Am 14. Tag nach Transfektion konnten die ersten monoklonalen Zellkolonien erkannt werden und mit einer Pipette in einzelne *wells* einer 96-*well*-Platte transferiert werden. Die stabilen Zellen wurden auch weiterhin in der Kultur mit einer Konzentration von 50 µg/ml HygromycinB gezogen.

Nach gelungener Expandierung einzelner Klone wurden Zellen eingefroren und die Expression des genomischen Inserts per Western-Blot getestet.

3.5 Microarray-Experimente

3.5.1 Affymetrix Microarrays

Affymetrix Gene Chips bieten die Möglichkeit, mit einem einzigen wenige Zentimeter großen Chip die Expression von ca. 54.000 Transkripten zu quantifizieren. Auf den Chip gespottete Oligonukleotide dienen als Köder, an den die Ziel-Oligonukleotide hybridisieren.

Hergestellt werden die Chips mit einer Technologie, die Photolithographie und chemische Methoden kombiniert. Bis zu 1,3 Millionen verschiedene Oligonukleotide können auf einen Array synthetisiert werden. Jedes Oligonukleotid findet sich auf einer definierten Stelle des Arrays, der sogenannten Proben-Zelle, und kann dort mit bis zu einer Millionen Kopien vorhanden sein.

Um die Oligos zu synthetisieren, wird ein zyklisches Verfahren angewendet. Zuerst wird ein Glasobjektträger mit Basismolekülen beschichtet, die schützende, aber photolabile Seitenketten tragen. Danach wird eine Maske über den Glasträger gebracht, die ausgewählte Zellen des Arrays offen lässt und der Bestrahlung mit UV-Licht zugänglich macht. Dadurch werden die protektiven Gruppen in diesen Zellen zerstört, und anschließend wird nur in diesen Zellen ein bestimmtes Nukleotid addiert. Danach erfolgt der nächste Zyklus mit einer anderen Maske, Bestrahlung und Nukleotidaddition werden wiederholt. Diese Zyklen werden solange wiederholt, bis alle Oligonukleotide zusammengesetzt sind. Dank der Masken ist jedem Oligonukleotid eine definierte Zelle des Arrays zugeordnet.

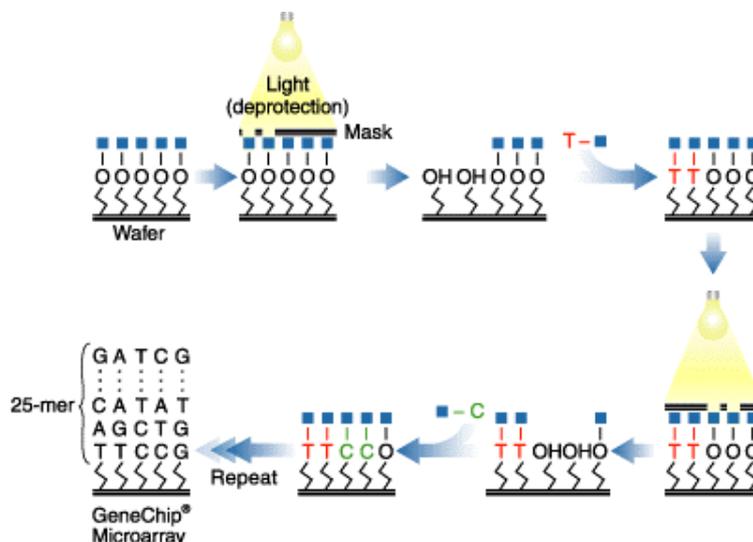


Abbildung 3.3: Schema der Photolithographie (Quelle: Affymetrix)

Für jedes untersuchte Transkript werden 20 Zellen aufgetragen. Davon sind 10 Zellen mit genau passenden Oligonukleotiden aus der Sequenz des untersuchten Transkriptes gespottet, diese Zellen nennt man *perfect match* (PM). Die jeweils danebenliegenden Zellen tragen Oligonukleotide, in denen die Sequenz der PM-Oligos um eine Base verändert ist. Diese Zellen nennt man *mismatch* (MM). PM und MM zusammen ergeben ein Probenpaar, die Gesamtheit der 10 PM und 10 MM Zellen nennt man Probe-Set. Mit den MM-Kontrollen soll der unspezifische Hintergrund einer Probe gemessen werden. Aus dem Verhältnis von PM zu MM ergibt sich der Discrimination Score R, der ein Maß für die Spezifität des Probe-Sets liefert. Vergleicht man R gegen einen Grenzwert, ergibt sich bei Auswertung mit dem einseitigen Wilcoxon Rangkorrelationstest ein Wahrscheinlichkeitswert, der *detection-p-value*. Aus diesem *detection-p-value* wird über Grenzwerte die Einteilung in *present* und *absent* durchgeführt. „*present*“ bedeutet also, dass ein Transkript detektiert wurde und eindeutig gegen den Hintergrund der Hybridisierung abgrenzbar ist.

In dieser Arbeit wurden Affymetrix HG-U133Plus 2.0 Chips verwendet, die mit ca. 54.000 Probe-sets gespottet sind. Die Sequenzen stammen aus den Datenbanken UniGene, dbEST, Genebank und RefSeq. Dies bedeutet, dass sowohl von bekannten Genen als auch von ESTs jeweils mehrere Varianten auf dem Chip zu finden sind. Teilweise mögen diese Varianten physiologischen Splice-Varianten entsprechen, teilweise spiegeln sich aber auch unvollständige Sequenzen, die sich in den Datenbanken befinden.

3.5.2 Übersicht über die Versuchsdurchführung

HEK-293-NOD2wt, HEK-293-NOD2L1007fsinsC und HEK-293-Control Zellen wurden auf 0 % FCS Medium gesetzt und mit 10 µg/ml MDP (Bachem, Bubendorf) für null, zwei oder sechs Stunden stimuliert. Die Zellen wurden gleichzeitig geerntet, die Überstände für ELISA-Tests aufgehoben und aus den Zellen wurde mit dem RNeasy Kit von Qiagen RNA isoliert. Die Qualität der RNA wurde mit Agilent RNA 6000 nano chips überprüft, danach wurde die RNA zur einem Teil für die Microarray-Hybridisierung eingesetzt, zum anderen Teil in cDNA umgeschrieben. Der beschriebene Versuchsansatz wurde dreimal unabhängig durchgeführt, wodurch sich eine Gesamtzahl von 27 Microarrays ergab.

Die Hybridisierung der Chips wurde durchgeführt vom *Department of Biology, Boehringer-Ingelheim Pharmaceuticals, Ridgefield USA*. Das Vorgehen wird daher nur schematisch beschrieben. Alle Schritte erfolgten nach Herstellerprotokoll und unter Verwendung folgender Affymetrix-Kits:

- One-Cycle Target Labeling and Control Reagents, Affymetrix, P/N 900493
- GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit, Affymetrix, P/N 900454

Ausgangsmaterial war 1µg Gesamt-RNA pro Array. Von dieser RNA wurde mit T7-Oligo(dT) Primern der erste Strang der cDNA geschrieben. Nach Zugabe von RNaseH konnte auch der zweite cDNA-Strang synthetisiert werden und die doppelsträngige cDNA aufgereinigt werden. Diese cDNA wiederum diente als Template für eine *in-vitro* Transkription mit RNA Polymerase, wobei biotinylierte

Ribonukleotide eingesetzt wurden. Die biotinylierte cRNA wiederum wurde durch Metall-katalysierte Hydrolyse in Abschnitte mit 25-200 Basen fragmentiert und für die Hybridisierung der Chips eingesetzt.

Für die Hybridisierung der Chips wurde ein Coctail aus fragmentierter cRNA, den standardisierten Kontrollproben, BSA und Heringsperma eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte über 16 Stunden bei gleichmäßiger Durchmischung in einem *Affymetrix Hybridization Oven 640*. Anschließend erfolgte ein automatisiertes Wasch- und Färbeprogramm auf der *Affymetrix fluidics station*. Gefärbt wurde mit einem Streptavidin-Phycoerythrin Conjugat, das bei 570 nm mit *einem Affymetrix GeneChip® Scanner 3000* ausgelesen wurde.

3.5.3 Datenanalyse

Das Scannen der hybridisierten Arrays, die Interarray-Normalisierung und die Einteilung in *absent/present* wurde nach den Standardeinstellungen der Gene Chip Operating Software 1.1 durchgeführt. Die Normalisierung wurde mit der Software „R“ (Version 2.0) überprüft. Spotfire Decision Site 8.0 wurde für eine IL-8-Ähnlichkeits Suche und die Selektierung bestimmter Gengruppen eingesetzt.

3.5.3.1 ANOVA-Auswertung

Alle Gene, die nicht in mindestens zwei Microarrays als „*present*“ klassifiziert wurden, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Dieser Schritt eliminierte 23973 Gene, 30702 wurden in die ANOVA Analyse aufgenommen. Die normalisierten Daten wurden in „R“ (Version 2.0) in Verbindung mit den „bioconductor“ (Gentleman et al. 2004) Anwendungen „*daMA*“ (Version 1.01) (Landgrebe et al. 2004) und „*limma*“ (Version 1.8.10) (Smyth 2004) analysiert.

Die Datenanalyse war fokussiert auf den Genexpressionseffekt, der entweder auf den drei verschiedenen Genotypen beruhte und auf den Effekt der Stimulation der verschiedenen Genotypen mit MDP. Daher wurde die Methode der Analysis of Variance (ANOVA) ausgewählt. Wie von (Kerr 2000) vorgeschlagen, wurde ein Modell entwickelt um Expressionsunterschiede in Bezug auf verschiedene Fragestellungen zu erfassen. Für jedes Transkript auf dem Array wurde das Modell wie folgt berechnet:

$$Y = \sum_{i=1}^n C_i + e$$

wobei Y die normalisierte Signalintensität darstellt, C die 1....n möglichen Faktorkombinationen und e eine unabhängige Fehlergröße mit $E(e) = 0$ and $Var(e) = d2$. Die Fragestellungen wurden durch die Formulierung von Kontrasten bearbeitet.

Die p-Werte, die in der F-Statistik der „bioconductor“ Anwendung „daMA“ generiert wurden, sind durch multiples Testen nach der Methode von (Benjamini 1995) so justiert worden, dass die Rate der falsch positiven Gene bei einem Level von $\alpha = 0.05$ lag.

3.5.3.2 Klassifizierung des MDP-Effekts (Increased, Decreased und No Change)

Zur Charakterisierung der MDP-Effekte innerhalb eines Genotyps wurden zuerst die *fold-changes* aus den Mittelwerten für die drei biologischen Replikate für die Vergleiche 2h versus 0h (FC 1: 2hvs.0h), 6h versus 2h (FC 2: 6hvs.2h) und 6h versus 0h (FC 3: 6hvs.0h) berechnet. Um übersichtliche Profile erstellen zu können, wurde ein Grenzwert von $\pm 1,4$ ausgewählt, alle Werte über 1,4 wurden als Increased (I) klassifiziert, alle Werte zwischen 1,399 und $-1,399$ als No Change (N) und alle Werte unter $-1,4$ als Decreased (D) Abbildung 3.4.

Um die drei möglichen *fold-changes* der MDP-Stimulation zu einer Aussage zusammenzufassen zu können, wurden die einzelnen Profile bewertet.

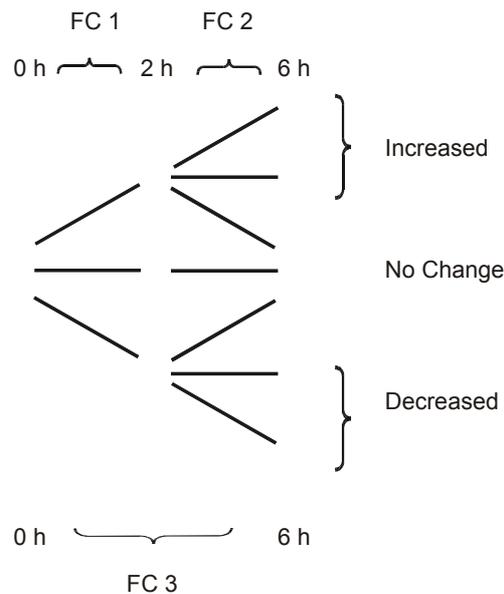


Abbildung 3.4: Klassifizierung der möglichen Profile in der Kinetik.

Tabelle 3.14.: Einteilung der Profile der MDP-Stimulation in Increased (I), No Change (N) und Decreased (D).

Die erste Stelle der Dreierkombination entspricht der Klassifizierung des FC 2h vs .0h, die zweite Stelle dem FC 6h vs. 2h und die dritte Stelle FC-Klasse 6h vs. 0h. Grenzwert für die Klassifizierung war ein FC von +/- 1,4.

INCREASED			NO CHANGE			DECREASED		
FC 1	FC 2	FC 3	FC 1	FC 2	FC 3	FC 1	FC 2	FC 3
I	I	I	N	N	N	D	D	D
I	N	I				D	N	D
I	N	N				D	N	N
I	D	N				D	I	N
D	I	I				I	D	D
I	D	I				D	I	D
N	I	I				N	D	D
N	I	N				N	D	N
N	N	I				N	N	D

3.5.3.3 Cluster Analyse

Die Cluster-Analyse wurde durchgeführt mit Cluster 3.0 (Eisen et al. 1998). Die Signalwerte wurden in das Programm geladen und adjustiert mit den Einstellungen „Median Center Genes“, danach „Median Center Arrays“ und „Normalize Genes“. Hierarchisches Clustern wurde durchgeführt für „Genes“ mit den Einstellungen „Cluster“, „Correlation (uncentered)“ und „Centroid Linkage“. Für das *k-means* Clustering wurde eine Vorgabe von 6 Clustern gemacht. Visualisiert wurden die Ergebnisse mit dem Programm „Tree View“.

3.6 Biochemische Methoden

3.6.1 Dual Luciferase Assays

Für die Quantifizierung der Aktivierung des NF- κ B Signalweges wurden Reporter-Gen-Assays durchgeführt. Das Prinzip der Reporter-Gen-Assays beruht auf der Co-Transfektion von zwei Reporter-Luziferasegenen, die von verschiedenen Promotoren kontrolliert werden. Die *Firefly*-Luziferase stammt aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) und ist unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors. Der Kontrollvektor pRL-TK codiert für die *Renilla*-Luziferase aus dem marinen Cnidarier *Renilla reniformis* unter einem moderat konstitutiven Promoter (Thymidinkinase-Promoter) und wird zur Normalisierung der Transfektionseffizienz eingesetzt. Da die *Firefly*-Luziferase und die *Renilla*-Luziferase unterschiedliche Substrate für die Lumineszenzreaktion benötigen, kann in einem Ansatz die Expression der beiden Luziferasen hintereinander gemessen werden. Für die Messungen wurde der *Dual-Luciferase-Assay* (Promega, Madison, USA) eingesetzt, der nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde.

Für die Assays wurden Zellen im 96-well Format ausgesät und mit 40 ng Reportervektor pNF- κ B-LUC (Clontech) und 10 ng Kontrollvektor pRL-TK (Promega) zur Normalisierung der Transfektionseffizienz transfiziert. Wurden zusätzliche Gene transfiziert (z.B. NOD2 und A20), wurde die Gesamtmenge der transfizierten DNA ebenfalls auf 50 ng eingestellt (z.B. pNF- κ B-LUC 12 ng; pRL-TK 3 ng; pUNO-TNFAIP3 und Leervektor zusammen 35 ng). Die Transfektion erfolgte nach dem in Kapitel 3.1.6.1 beschriebenen Protokoll mit FuGene6 Transfektionsreagenz. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit 10 μ g/ml MDP stimuliert und nach 24 h in 25 μ l 1X PLB (Promega) lysiert. Die Messung der Luziferase-Aktivitäten erfolgte mit Hilfe eines MicroLumatPlus-Luminometers (Berthold, Deutschland) durch automatisierte Zugabe von 75 μ l Firefly- Luziferase-Substrat (Promega) mit anschließender Messzeit von 10 sec, gefolgt von Zugabe von 75 μ l Stop-and-Glow-Lösung (Promega) und Messung für weitere 10 sec.

Als Leerkontrollen dienten untransfizierte Zellen. Die relative Luziferase-Aktivität (RLU) wurde nach Abzug der Leerkontrollwerte als Quotient aus LUCfirefly und LUCrenilla berechnet und aus den Parallelexperimenten gemittelt.

3.6.2 Isolierung von Proteinen aus verschiedenen Zellkompartimenten

Für die subzelluläre Fraktionierung von Proteinlysaten wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Die erste Methode basiert auf hypotoner Lyse der Zellen und anschließendem Abzentrifugieren aller Membranstrukturen inklusive Vesikeln, Zellkernen und Zellmembranfragmenten (Barnich, Aguirre et al. 2005). Dafür wurden folgende Puffer vorbereitet:

Puffer 1:	Hepes KOH	10 mM	pH 5,6	
	NaCl	100 mM		
	TritonX	1% v/v		
	EDTA	2 mM		
	Na ₃ VO ₄	4 mM		
	NaF	40 mM		
	Complete Protease Inhibitor Coctail (Roche, Grenzach-Wyhlen)			

Puffer 2: wie Puffer 1 plus 1% w/v SDS

Zum Ernten einer 10 ml Schale (ca. 6×10^6 Zellen) wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis oder in auf 4°C gekühlten Geräten durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 900 µl Puffer 1 resuspendiert und 10 mal durch eine Infusionsnadel der Stärke 21-gauge gezogen, um die Zellen durch Scherkräfte zu öffnen. Danach wurde zentrifugiert (10.000 x g; 30 min) und der Überstand als Cytosolfraktion aufgehoben. Das Pellet wurde in 600 µl Puffer 2 aufgenommen und 2 x 20 s sonifiziert. Nach Abzentrifugieren von Zelltrümmern (10.000 x g; 5 min) wurde der verbleibende Überstand als Membranfraktion gesichert. Nach einer Proteinbestimmung wurden die Fraktionen bei – 20°C gelagert.

Als weitere Methode wurde ein kommerzielles Kit verwendet, dessen Funktionsmechanismen nicht bekanntgegeben wurden. Zum Einsatz kam das Proteo-Extract *subcellular proteome extraction Kit* von Calbiochem (Darmstadt). Alle erwähnten Puffer und Reagenzien sind im Kit enthalten. Für diese Isolierung wurde ein Pellet 3-5 x 10⁶ Zellen mit 2 ml Wash Buffer resuspendiert und anschließend sedimentiert (150 x g; 4°C; 10 min). Mit 1 ml Extraction Buffer I und 5 µl Inhibitor Coctail wurde bei 10 min Inkubation bei 4°C und sanftem Schwenken die Lyse durchgeführt. Nach Zentrifugation (1000 x g; 4°C; 10 min) wurde der Überstand I als Cytosolfraktion sichergestellt und das Pellet resuspendiert mit 1ml Extraction Buffer II + 5 µl Inhibitor Coctail. Nach Inkubation für 30 min bei 4°C und sanftem Schwenken wurde erneut zentrifugiert (5000 x g; 4°C; 10 min) und der Überstand II als Membran- und Organellenfraktion aufgehoben. Das Pellet wurde resuspendiert mit 500 µl Extraction Buffer III + 5 µl Inhibitor Coctail + 1,5 µl Benzonase Endonuklease (375 Units). Nach Inkubation für 10 min bei 4°C und sanftem Schwenken wurden die Zellkerne abzentrifugiert (7000 x g; 4°C; 10 min). Der Überstand III wurde als Kernfraktion sichergestellt, das Pellet mit 500 µl Extraction Buffer III + 5 µl Inhibitor Coctail gelöst und als Cytoskelettfraktion sichergestellt. Die Fraktionen wurden einer Proteinbestimmung unterzogen und bei – 20 °C gelagert.

3.6.3 Silberfärbung

Für den Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen mit hoher Sensitivität (unter 1 ng Protein nachweisbar) wurde die Silberfärbung verwendet. Nach Fixierung im Gel durch Essigsäure und Methanol wird mit Silbernitratlösung inkubiert. Dabei lagern sich Ag^+ -Ionen an die Proteine an. Im Entwicklungsschritt werden diese Silberionen durch Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert.

Da die silbergefärbten Gelbanden teilweise zur massenspektrometrischen Untersuchung eingeschickt wurden, wurde auf die sonst übliche proteinvernetzende Fixierung mit Glutaraldehyd verzichtet.

Die Fixierung der Gele wurde mit Methanol und Essigsäure (MeOH 45% v/v; Acetic Acid 10% v/v; H_2O 45% v/v) für 30 min vorgenommen. Danach wurde mit Wasser für mindestens 60 min oder über Nacht gewaschen um Säurereste zu entfernen. Anschließend wurde mit 0,02% w/v Natrium-Thiosulfatlösung für 10 min sensitiviert. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser für je eine Minute wurden die Gele mit 0,1% w/v Silbernitratlösung (AgNO_3) 30 min inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit Wasser wurden die Gele in einer Lösung aus 0,04% v/v Formalin und 2% w/v Natriumcarbonat (Na_2CO_3) bei ständigem Schwenken entwickelt. Sobald die Proteinbanden gut sichtbar waren, wurde die Reaktion mit 1% v/v Essigsäure abgestoppt und bei 4°C gelagert.

3.6.4 Coomassie Colloidal Blue Färbung

Um auch bei der Färbung mit dem Farbstoff Coomassie G-250 eine hohe Sensitivität zu erreichen, wurde das *Colloidal Blue Staining Kit* von Invitrogen (Carlsbad) verwendet. Mit dieser Methode kann eine Detektion von unter 10 ng Protein erreicht werden, im Gegensatz zu 50 ng bei der herkömmlichen Coomassie-Färbung. Diese Methode nutzt die Eigenschaft des Coomassie-Farbstoffes, in bestimmten Salzpuffern Kolloide zu bilden. Nicht kolloidal gebundener Farbstoff kann effektiv entfernt werden.

Entsprechend den Herstellerangaben wurden SDS-PAGE-Gele einer fixierenden Lösung aus Methanol, Wasser, *Stainer A* und *Stainer B* für 3 – 12 Stunden inkubiert. Danach wurde für mindestens 7 Stunden mit mehrfachem Wechsel mit *aqua bidest* gewaschen.

3.6.5 Denaturierende Proteinisolierung

Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden Zellen wie beschrieben geerntet und mit PBS gewaschen. Ein Pellet von circa 1×10^6 Zellen wurde in 70 – 100 μl DLB-Puffer + 1% Phosphatase-Inhibitor Cocktail II (Sigma) + 2% 50X Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma) lysiert. Nach Aufkochen für 5 Minuten bei 95 °C und einer Ultraschallbehandlung (2 x 5 sec) wurden die Lysate zentrifugiert (16.000 x g; 15 min; 4°C, Sigma 3K30 Zentrifuge, Braun Biotech), um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde einer Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford unter Verwendung des DC (*detergent compatible*) Protein Assay von Biorad (München) unterzogen.

3.6.6 Isolierung nativer Proteine

Zur Isolierung von nativen Proteinlysaten, die Dank intakter Sekundär- und Tertiärstruktur auch für funktionelle Folgeanwendungen wie Immunpräzipitation geeignet sind, wurde eine Lyse mittels hypotonem Lysepuffer angewendet. Da NOD2 cytosolisch lokalisiert ist, wurden keine weiteren Lösungsmittel verwendet.

Verwendet wurde das Lyseprotokoll nach Martinon et al. (2002). Folgender Lysepuffer wurde vorbereitet:

Nativer Lysepuffer:	Hepes KOH	20 mM	pH 7,5
	KCl	10 mM	
	MgCl ²	1,5 mM	
	EDTA	1 mM	
	EGTA	1mM	
	PMSF	0,1 mM	
	Complete Protease Inhibitor Coctail (Roche, Grenzach-Wyhlen)		

Circa 1×10^7 Zellen wurden mit 900 μ l nativem Lysepuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Lysat 10 x durch eine 21 G Nadel gezogen und anschließend zentrifugiert (16.000 x g; 15 min; 4°C, Sigma 3K30 Zentrifuge, Braun Biotech). Der Überstand wurde einer Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford unterzogen unter Verwendung des DC (*Detergent Compatible*) Protein Assay von Biorad (München).

3.6.7 Immunpräzipitation

Die Technik der Immunpräzipitation wurde angewendet, um überexprimiertes NOD2 aus Proteinlysaten für die Phosphoanalyse aufzureinigen. In der Immunpräzipitation wird ein Antikörper gegen das Zielprotein an eine Agarosematrix gebunden und damit immobilisiert. Nach Inkubation mit dem Proteinlysate kann der Agarose-Antikörper-Zielproteinkomplex sedimentiert und gewaschen werden. Abgelöst wird das Zielprotein durch Erhitzen mit einem denaturierenden Puffer.

Proteinlysate mit 500 – 1000 μ g Gesamtprotein wurden mit 1 μ g Antikörper versetzt und für eine Stunde bei 4°C und leichter Bewegung inkubiert. Zur Isolierung von überexprimiertem NOD2 mit C-terminalem Flag-tag wurde der Anti-Flag-M2 Antikörper verwendet. Danach wurden 20 μ l ProteinA/G-Agarose-Beads (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) zu der Mischung gegeben und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Agarose-Beads durch einen kurzen Zentrifugationspuls sedimentiert (5 sec; 12.000 rpm) und der Überstand verworfen. Das Agarosepellet wurde drei Mal mit PBS gewaschen. Danach wurde das Pellet mit 20 μ l 2 x SDS-Ladepuffer versetzt und für 3 min bei 95°C erhitzt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und in der SDS-PAGE Gelelektrophorese analysiert.

3.6.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Das Prinzip der denaturierenden Polyacrylamidelektrophorese beruht auf Auftrennung nach Proteingröße. Die Eigenladung, Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine werden maskiert bzw. aufgelöst und die Separation erfolgt durch die Porenweite des Polyacrylamidgeles. Die Porenweite kann variiert werden durch den Anteil des vernetzenden Bisacrylamid und der Acrylamidmonomere bei der Polymerisationsreaktion.

Das anionischen Detergenz Natrium-dodecyl-sulfat (SDS), das den Proben zugesetzt wird, legt sich als Hülle um die Proteinketten und sorgt für eine starke negative Ladung, bei angelegter elektrischer Spannung wandern die Proteine zur Anode. Um eine gleichmäßige Proteinfrent zu erreichen, wird dem Trenngel ein Sammelgel vorgeschaltet. Im Sammelgel sind die Proteine in einer Zone geringer Leitfähigkeit und hoher Spannung zwischen vorwegaufenden Chloridionen und nachfolgenden langsam wandernden Glycin-Zwitterionen gewissermaßen eingesperrt. Durch den pH-Wechsel an der Grenze von Sammelgel und Trenngel wird das Glycin deprotoniert und überholt dank seiner nun negativen Ladung die Proteine, deren Auftrennung nun aufgrund der Porengröße des Gels geschieht.

Die Herstellung eines Polyacrylamidgeles erfolgt über Copolymerisation von Acrylamidmonomeren mit vernetzendem Bisacrylamid in einem Verhältnis von 30: 0,8 (w/v) (Biorad, München). Die Zugabe des Radikalstarters Ammoniumpersulfat (APS) und des Katalysators TEMED löst die Polymerisation des Gels aus. Tabelle 3.15 gibt die Zusammensetzung des Polymerisationsansatzes für verschiedene Proteinzielgrößen, Tabelle 3.16 die Zusammensetzung des Sammelgels.

Tabelle 3.15: Zusammensetzung des Trenngelansatzes

Proteingröße des Zielproteins [kDa]	10-60	20-100	30-120	50-200
Acrylamid	15%	12%	10%	7,5%
(Bis)Acrylamid	5 ml	4,15 ml	3,5 ml	2,5 ml
4 x Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
A.bidest.	2,5 ml	3,5 ml	4,15 ml	5 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
10% (v/w) APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Tabelle 3.16: Zusammensetzung des Sammelgelansatzes

Sammelgel: 3% Acrylamid	
(Bis)Acrylamid	0,3 ml
4 x Sammelgelpuffer	0,75 ml
A.bidest.	1,95 ml
TEMED	3 µl
10% (v/w) APS	30 µl

Die Proteinproben werden mit SDS-Ladepuffer versetzt, 3 min bei 95 °C denaturiert und anschließend Aliquots von 10 µg bis 20µg Gesamtprotein in die Ladetaschen des Gels pipettiert. In einer Gelkammer (Multigel G44, Biometra) wurde zuerst der Lauf durch das Sammelgel (30 min; 15 mA/Gel) und danach der Lauf durch das Trenngel durchgeführt (60 min bis 120 min; 30 mA/Gel). Als Spannungsquelle diente ein PP 3000 High Voltage Power Pack von Biometra.

3.6.9 Proteintransfer auf eine Trägermembran (Western-Blot)

Um die Proteine aus dem Gel für eine Immundetektion zu immobilisieren, wurden sie per Elektrophorese auf eine proteinbindende Membran aus Polyvenyldifluorid (PVDF) übertragen. Es wurde die Methode des *semi-dry-western-blot* angewendet, in der die Membran und das Gel in puffergetränkte Filterpapiere eingebettet und zwischen Anoden- und Kathodenplatte eingespannt werden.

Die PVDF-Membran wurde in Gelgröße zugeschnitten, in Methanol für 10 sec befeuchtet und anschließend in Aqua bidest für 5 min und Anodenpuffer I für weitere 5 min äquilibriert. Filterpapier (Whatman, Dicke 3 mm, Biometra, Göttingen) wurde mit den entsprechenden Puffern getränkt und daraus ein Päckchen mit folgendem Aufbau geschichtet: Filterpapier Anodenpuffer II – Filterpapier Anodenpuffer I – PVDF-Membran – Gel – Filterpapier Kathodenpuffer. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte bei 11 mA/cm² für 1 h mit Hilfe einer Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, München).

3.6.10 Immundetektion von Proteinen

Zur Detektion der membrangebundenen Proteine wurde die Methode der doppelten Antikörpermarkierung mit angeschlossener Lichtreaktion genutzt. Dazu wird das Zielprotein auf der Membran zuerst mit einem spezifischen Antikörper (Primärantikörper) markiert. Danach wird ein Sekundärantikörper, der gegen die Wirtsart des Primärantikörpers gerichtet ist, aufgebracht. Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP)

konjugiert. Bei Zugabe eines geeigneten Reagenzes katalysiert die HRP eine chemilumineszente Reaktion, die mit photochemischen Filmen sichtbar gemacht und dokumentiert werden kann.

Nach dem Western-Blot wurde die PVDF Membran für mindestens eine Stunde in Magermilchlösung (5% Magermilchpulver (MMP) w/v in TTBS) inkubiert, um ungesättigte Proteinbindungsstellen der Membran abzublocken. Anschließend wurde der Primärantikörper in der gewünschten Verdünnung (in 5% MMP in TTBS) aufgebracht und über Nacht inkubiert (4°C; leichte Bewegung). Nach dreimaligem Waschen in TTBS für jeweils 10 min wurde der Sekundärantikörper für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Membran mit ECL-Reagenz (ECL PLUS, Amersham Biosciences, Freiburg) überschichtet und 3 min bei RT inkubiert. Danach wurde mit Belichtungszeiten von 5 sec bis 15 min ein Spezialfilm belichtet (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) und der Film mit einer Entwicklermaschine (Curix 60, AGFA, Leverkusen) entwickelt.

Tabelle 3.17: In der Immundetektion verwendete Antikörper und Verdünnungen.

Antikörper	Spezies, Typ	Verdünnung	Hersteller
Anti-NOD2	Kaninchen, polyklonal	1:500	Cayman Chemical
Anti-A20	Maus, monoklonal	1:200	Stressgen
phospho-(Ser/Thr) PKA	Kaninchen, polyklonal	1:500	Cell Signaling Technology
phospho-Tyr-100	Maus, monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology
Anti-p38	Kaninchen, monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology
Anti-Flag M2	Maus, monoklonal	1:1000	Sigma
Anti-β-Actin	Maus, monoklonal	1:5000	Sigma
Anti-mouse-HRP		1:2000	Amersham Biosciences
Anti-rabbit-HRP		1:2000	Amersham Biosciences

Um Vergleichbarkeit der aufgetragenen Proteinmengen und gleichmäßigen Transfer der Proteine auf die Membran zu überprüfen, wurden die gebundenen Antikörper durch „Strippen“ von der Membran entfernt und anschließend die Membran erneut dem Inkubationsprozess unterzogen. Das Strippen erfolgte durch Inkubation der PVDF-Membran für 45 min bei 55°C in Stripping-Puffer, gefolgt von mehrmaligem Waschen in TTBS. Für die zweite Inkubation wurde entweder Anti-β-Actin oder ein anderer der Fragestellung entsprechender Primärantikörper verwendet.

3.6.11 ELISA

Zum Nachweis des sekretierten IL-8 im Zellkulturüberstand wurde ein *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) durchgeführt. Das Prinzip des ELISA beruht auf der Immobilisierung des Antigens durch einen an eine Oberfläche gebundenen spezifischen Antikörper und einem Antigennachweis durch weitere Antikörperbindung. Dafür wird ein weiterer spezifischer Primärantikörper eingesetzt, der ein anderes Epitop des Antigens erkennt, und der seinerseits von einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper erkannt wird. Die Peroxidase setzt eine Farbstoffvorstufe zu einem kolorimetrisch messbaren Farbstoff um.

Für die Detektion von IL-8 wurde das Interleukin-8-ELISA KIT (Human IL-8 CytoSets) von Biosource (Solingen) verwendet. Die ELISA-Platten wurden nach Herstellerangaben mit dem Capture-Antikörper beschichtet. Die Mediumüberstände aus den Versuchen wurden zellfrei zentrifugiert und unverdünnt jeweils 100 oder 200 µl pro *well* in Doppelbestimmung eingesetzt. Ebenso wurde eine Standardverdünnungsreihe von rekombinantem IL-8 aufgebracht. Danach wurde die weitere Detektion ebenfalls 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.

4 Ergebnisse

4.1 Endogenes NOD2 ist cytosolisch lokalisiert

In der Einleitung wurde beschrieben, dass NOD2 analog zu den anderen Vertretern der NOD-Proteine als cytosolisch lokalisiert galt. In jüngerer Zeit sind zwei Arbeiten erschienen, die NOD2 als membranassoziiert beschreiben (Barnich, Aguirre et al. 2005; McDonald et al. 2005). Um diese These zu überprüfen, wurden nach zwei verschiedenen Protokollen Lysate hergestellt, bei denen Cytosol- und Membranfraktion getrennt gewonnen wurden. Nach diesen Protokollen wurden jeweils THP1-Extrakte auf endogenes NOD2, und mit NOD2-Vektor (pCEV-NOD2) transfizierte HEK-293 Zellextrakte auf das überexprimierte NOD2 getestet. Abbildung 4.1 A zeigt das Ergebnis nach dem Fraktionierungsprotokoll, das Barnich et al. verwendeten. Abbildung 4.1 B gibt die Ergebnisse, die sich bei Verwendung von *Proteo-Extract – subcellular proteome extraction kit* (Calbiochem, Darmstadt) zeigten. Zur Kontrolle wurde die Western-Blot-Membran nicht nur mit NOD2-Antikörper entwickelt, sondern auch mit p38-Antikörper. Diese MAP Kinase ist cytosolisch und nukleär lokalisiert, darf also in der Membranfraktion nicht nachweisbar sein.

Bei beiden Methoden bestätigen die Ergebnisse des überexprimierten NOD2 die These der Membranassoziation. Allerdings zeigt sich auch in den Fraktionen Kern und Cytoskelett eine starke NOD2-Bande.

Anders sieht aber das Ergebnis bei endogenem NOD2 aus den THP1-Zellen aus. Hier ist eine starke NOD2-Bande nur in der Cytosolfraction zu erkennen. In der Membranfraktion ist eine sehr schwache Bande vorhanden, die in der Stärke derjenigen von p38 entspricht, also vermutlich eine Verunreinigung darstellt.

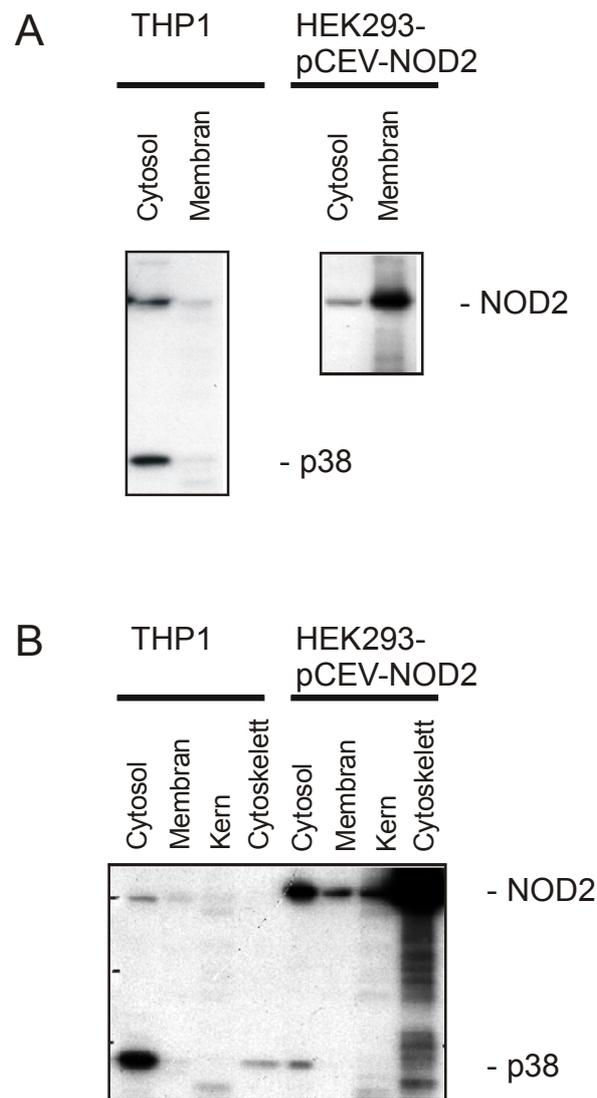


Abbildung 4.1: Lokalisation von NOD2 in verschiedenen Zellfraktionen.

A: Fraktionierungsprotokoll nach Barnich et al. (2005). **B:** Fraktionierung mit „*Proteo-Extract Subcellular Proteome Extraction Kit*“, Calbiochem.

Endogenes NOD2 aus THP1-Zellen ist cytosolisch lokalisiert, transfiziertes NOD2 in HEK-Zellen ist dagegen auch in der Membranfraktion nachweisbar. In B sind zusätzlich starke NOD2-Banden in der Kern- und der Cytoskelettfraktion zu erkennen.

4.2 NOD2 wird phosphoryliert

Phosphorylierung eines Proteins ist ein häufiger Mechanismus in der Signaltransduktion, über den Aktivierung, aber auch Degradierung vermittelt werden.

Um die Frage zu untersuchen, ob auch NOD2 phosphoryliert wird, wurden zunächst Immunpräzipitationen (IP) durchgeführt. Die IP-Eluate wurden per Western-Blot auf Phosphobanden im Molekularbereich von NOD2 getestet. Phosphorylierung ist möglich an Hydroxylgruppen der Aminosäuren Tyrosin, Serin und Threonin. Spezifische Antikörper sind erhältlich für entweder p-Tyrosin oder p-Serin/p-Threonin Motive. Entsprechend wurden die Versuche entweder mit Inhibitoren gegen Tyrosinphosphatasen oder mit Inhibitoren, die spezifisch gegen Serin/Threonin Phosphatasen wirken, durchgeführt. Zur Gewinnung von phosphoryliertem NOD2 wurden Zellen in 10 ml Schalen per Calcifektion mit dem Plasmid pCEV-NOD2 transfiziert, das N-terminal eine FLAG-Sequenz enthält. Nach 24 h wurde dem Zellkulturmedium der Ser/Thr Phosphataseinhibitor Calyculin A (Upstate) entsprechend der Herstellerempfehlung zu einer Endkonzentration von 100 nM zugegeben und gleichzeitig mit MDP (10 µg/ml) stimuliert. Die Wirkung des Lösemittels DMSO auf die Zellen konnte vernachlässigt werden, da das Ziel des Experimentes nur die Gewinnung von p-NOD2 war und kein Vergleich mit unstimulierten Zellen vorgenommen wurde. Nach maximal 60 Minuten wurden die Zellen geerntet, da Calyculin A stark toxisch wirkt und bei längerer Inkubation die Zellen absterben. Entsprechend wurde mit dem Tyrosin Inhibitor *Phosphataseinhibitor Cocktail II* (PICII) (Sigma) verfahren, der in einer Endverdünnung von 1:100 eingesetzt wurde. Dem nativen Lysepuffer für die schonende Extraktion von cytosolischen Proteinen wurde ebenfalls Calyculin A (100 nM) beziehungsweise PIC II (1:100) beigelegt. Dieses Lysat wurde wie im Kapitel 3.6.7 beschrieben einer schonenden Immunpräzipitation unterzogen, per Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western-Blot auf eine Membran transferiert.

Abbildung 4.2 zeigt das Ergebnis für HEK-Zellen, die mit dem Serin/Threonin-Phosphataseinhibitor Calyculin A und MDP stimuliert sind. Nach 60 Minuten Stimulation ist bei Immundetektion mit Anti-p(Ser/Thr)Protein-KinaseA (Cell Signaling Technology) eine deutliche Phosphobande sichtbar, die nach dem Molekulargewicht phosphoryliertes NOD2 anzeigen könnte.

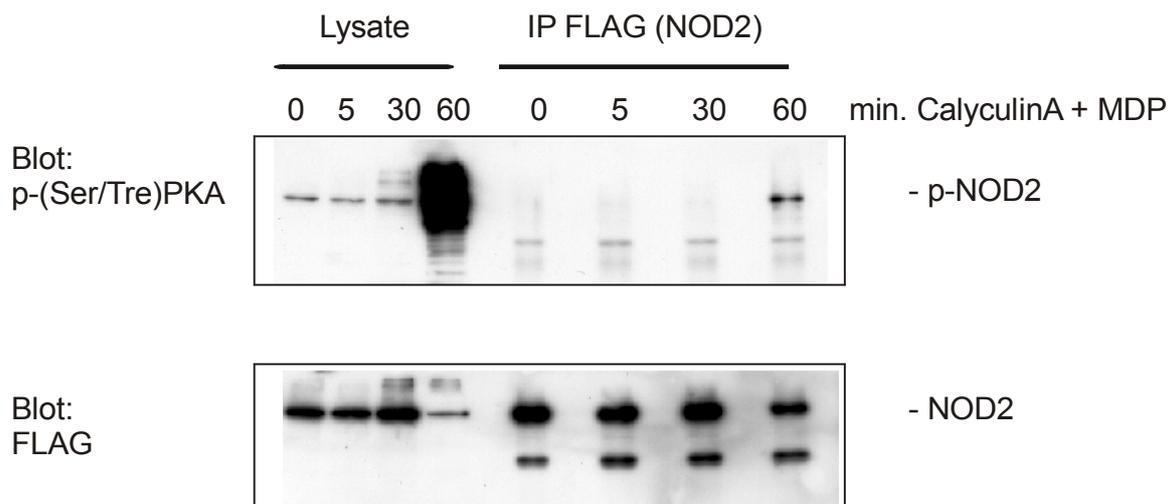


Abbildung 4.2: p-NOD2 nach Stimulation mit Calyculin A und MDP. Immunpräzipitation von FLAG-NOD2 mit Anti-FLAG-M2-Antikörper und Nachweis der Phosphorylierung mit Anti-p(Ser/Thr)PKA. Zur Kontrolle wurde die gestrippte Membran mit Anti-FLAG-M2 beprobt. Repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

Um einen sicheren Nachweis zu haben, dass auch tatsächlich NOD2 phosphoryliert ist und die Phosphobande nicht auf Verunreinigungen zurückgeht, wurden Coomassie-Blau- oder mit Silber gefärbte NOD2 Banden aus den Acrylamidgelen ausgeschnitten und an die „Protein Research Group“, Department of Biochemistry and Molecular Biology der University of Southern Denmark, eingeschickt.

Dort wurden die Proteine im Gel mittels Trypsinverdaus in Peptide gespalten und eluiert. Nach einer Anreicherung von Phosphopeptiden durch Affinitätschromatographie (IMAC, Immobilized Metal Affinity Chromatography) wurden die Peptide mittels Massenspektrometrie (LC-MS, *liquid chromatography mass spectrometry*) analysiert. Diese Analysen zeigten in zwei unabhängigen Versuchen eine Serin-Phosphorylierung des Peptids LIAAAQEAQAD[pS]PK (Abbildung 4.3). Das phosphorylierte Serin ist die Aminosäure 116 in der NOD2 Sequenz und liegt in der ersten CARD-Domäne.

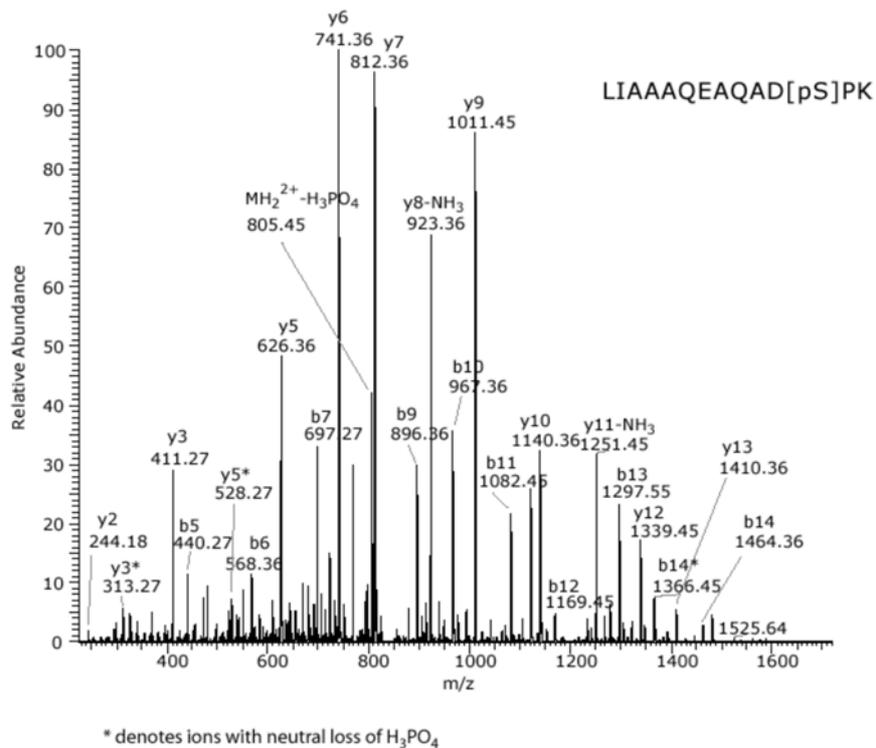


Abbildung 4.3: Ergebnis der Massenspektrometrie.

Mittels *liquid chromatography mass spectrometry* (LC-MS) wurden Trypsin-verdaute NOD2 Peptide aufgetrennt, fragmentiert und detektiert. Die so aufgezeichneten Massenbanden wurden durch einen Datenbankvergleich mit einem theoretischem computergenerierten Spektrum identifiziert. Erkannt wurde ein NOD2-Peptid mit phosphoryliertem Serin. m/z : mass/charge ratio.

4.3 Microarrays

4.3.1 Überprüfung der stabilen Zellen

Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Microarrays aus verschiedenen Genotypen ist die ähnlich hohe Expression des Genprodukts und möglichst geringe Effekte auf die Expression anderer Gene. Durch das FLP-IN System ist gewährleistet, dass die verschiedenen Insertionen am selben Ort im Genom lokalisiert sind und somit keine unterschiedlichen Effekte auf die Regulation und Intaktheit benachbarter Gene ausüben. Zudem werden sie unter der Kontrolle desselben CMV-Promotors exprimiert, was eine gleichmäßige Expression ermöglicht. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden die stabilen Zelllinien auf ihre NOD2-mRNA- und Proteinproduktion getestet. Sowohl in der Taqman *real-time* PCR (Abbildung 4.4 A) als auch auf Proteinebene im Western-Blot (Abbildung 4.4 B) wurde eine vergleichbare Genexpression für beide NOD2 Genotypen festgestellt. Die verkürzte L1007fsinsC-Variante hat ein etwas geringeres Molekulargewicht als der Wildtyp, die Bande läuft daher in der Elektrophorese etwas weiter.

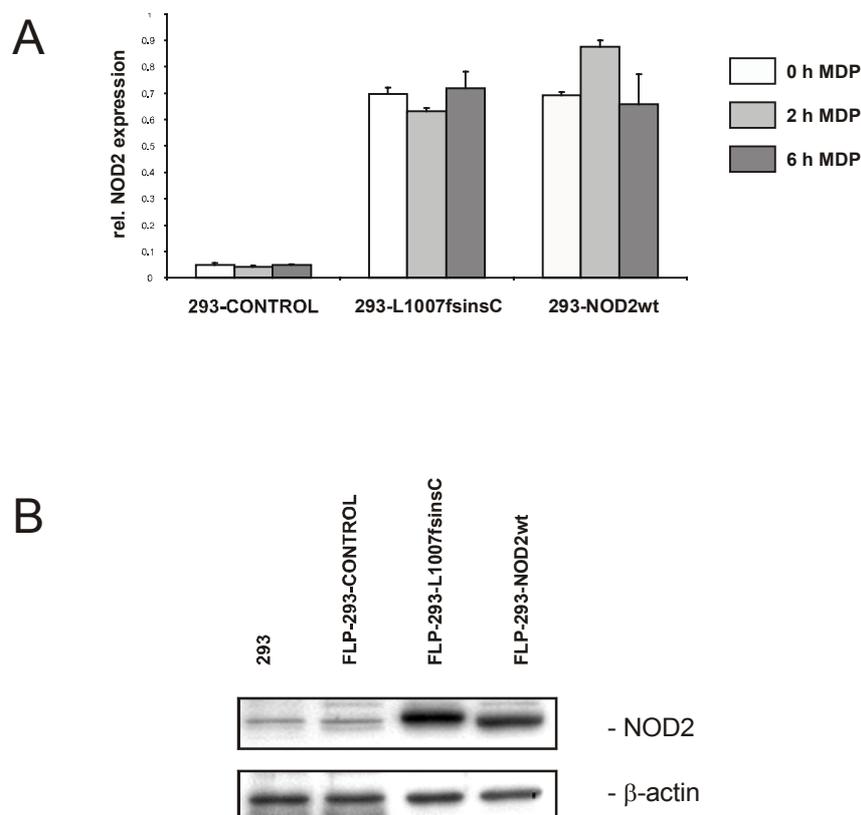


Abbildung 4.4: Untersuchung der NOD2-Expressionsstärke in den stabilen Zelllinien mittels Taqman PCR und Western-Blot.

FLP-IN HEK-293 Zellen exprimieren NOD2wt und L1007fsinsC in vergleichbarer Stärke.

A: NOD2-Taqman *real-time assay* (Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen) **B:** NOD2 Protein Western-Blot (repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Versuchen). Die Banden in HEK-293 und HEK-293 Kontrolle liegen nicht genau auf der Höhe von NOD2 und sind unspezifische Banden des polyklonalen Antikörpers (*rabbit Anti-NOD2-polyclonal antiserum*, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA.)

Die Stimulierbarkeit der Zelllinien wurde mittels zweier unabhängiger funktioneller Tests überprüft. Sowohl im NF- κ B Luciferase Assay (Abbildung 4.5 A) als auch im IL-8 ELISA (Abbildung 4.5 B) ist im Wildtyp eine klare Stimulierbarkeit mit dem physiologischen Liganden MDP erkennbar. Der starke Anstieg der Sekretion von IL-8 nach sechs Stunden diente als Ausgangspunkt für die Entscheidung, zu welchem Zeitpunkt die Microarrayversuche durchgeführt wurden. Da im ELISA die Proteinmenge gemessen wird, die Transkription der Translation aber zeitlich vorausgeht, wurde der erste Versuchszeitpunkt bei zwei Stunden gewählt.

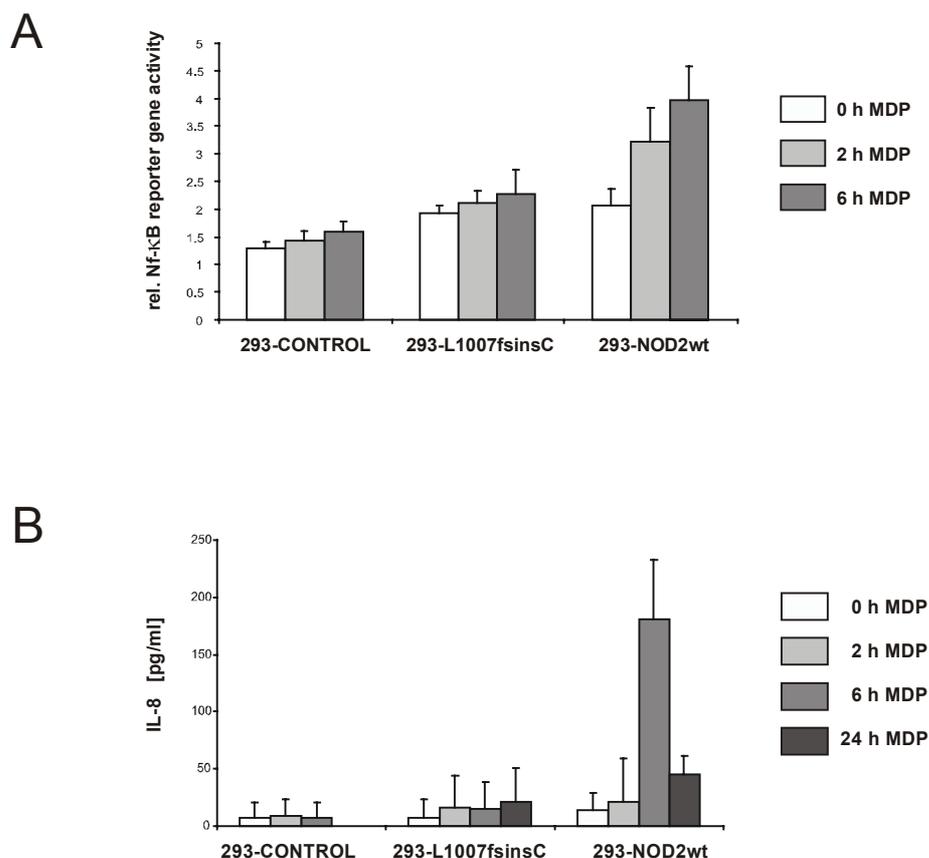


Abbildung 4.5: Funktioneller NOD2-Nachweis in den stabilen Zelllinien.

A: NF-κB-Luciferase Assay. **B:** IL-8 ELISA.

Die zeitabhängige MDP-Aktivierbarkeit wurde nachgewiesen. Nach beiden Methoden ist der NOD2wt eindeutig reaktiv auf die Stimulation mit MDP (10 µg/ml) (jeweils Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen).

4.3.2 Statistische Auswertung der Microarrays (ANOVA-Ergebnisse)

Die hier angewendete ANOVA-Analyse erlaubt die Auswertung der Versuche im Hinblick auf bestimmte Fragestellungen. So können Gruppen signifikanter Gene identifiziert werden, die entweder:

1. in Abhängigkeit vom Genotyp differentiell exprimiert werden oder
2. in Antwort auf die Stimulation mit MDP differentiell reguliert werden.

Die ANOVA erbrachte statistische Signifikanz für Genotypeneffekte (Punkt 1) in der Expression von 3378 Genen (11 % aller analysierten Gene). Für MDP-Effekte (Punkt 2) wurde für 294 Genen (0,96 % aller analysierten Gene) statistische Signifikanz erbracht. Diese beiden Gruppen überschneiden sich weitgehend, nur 80 Gene der MDP-abhängigen Gruppe sind nicht in der Genotyp-Gruppe enthalten.

Weiterhin wurde mit dem Programm Spotfire eine Suche nach Profilen durchgeführt, die genotyp- und zeitabhängig dem Expressionsprofil des Interleukin 8-Gens ähnlich sind. Der Suchalgorithmus basierte auf Korrelationsähnlichkeit, nicht auf euklidischer Distanz. Die gefundenen Gene ähneln also dem Profil von IL-8 in seinem relativen Verlauf, nicht aber den absoluten Signalstärken. Die 100 ähnlichsten Gene wurden in weitere Analysen mit eingeschlossen, wodurch 26 neue Gene zu den ANOVA-Ergebnissen hinzugefügt wurden.

4.3.3 Genotypunterschiede

Mit den 3378 signifikanten Genen für Genotypregulation wurde eine hierarchische Cluster-Analyse durchgeführt (Abbildung 4.6). Um den Einfluss des Genotyps zu verdeutlichen, wurden nur die unstimulierten (0 h MDP) Arrays für diese Analyse ausgewählt. Besonders augenfällig ist das deutlich isolierte Cluster des NOD2wt Genotyps, wohingegen L1007fsinsC und Kontrolle wesentlich ähnlicher sind. Dieser Eindruck wird bestätigt durch die relative Distanz im Dendrogramm.

Zur Beantwortung der Frage, inwieweit die 3378 Gene im L1007fsinsC Genotyp gleichsinnig wie im NOD2wt Genotyp reguliert werden, also im Vergleich zur Kontrolle entweder beide positiv oder beide negativ reguliert sind, wurde eine Analyse der Profile der Genotypmittelwerte ausgeführt. Die Mittelwerte aus allen 9 Versuchen in einem Genotyp wurden berechnet, danach der *fold-change* des NOD2wt-Mittelwertes gegen den Kontrollmittelwert und der *fold-change* des L1007fsinsC-Mittelwertes ebenfalls versus Kontrollmittelwert. Dabei ergab sich, dass 1652 (48,9 %) der Gene gleichsinnig reguliert sind. Da diese Zahl errechnet wurde, ohne einen Grenzwert für den *fold-change* zu setzen, also auch kleinste, tatsächlich zufällige Abweichungen mitzählen, ist dieses Ergebnis in der Nähe des Zufallswertes von 50 % zu erwarten. Bei Betrachtung der gleichsinnig regulierten Gene stellte sich aber heraus, dass für 1364 (82,5 %) Gene im L1007fsinsC Genotyp das Expressionsniveau zwischen dem von Wildtyp und Kontrolle liegt. Diese Beobachtung spricht für eine ähnliche, aber schwächere basale Aktivierung im mutierten NOD2 im Vergleich zum Wildtyp.

Diese Ergebnisse zeigten, dass der NOD2wt Genotyp das Expressionsprofil der Zellen auch in unstimuliertem Zustand verändert. Der L1007fsinsC Genotyp ist der Kontrolle ähnlicher, und die von ihm hervorgerufene basale Aktivierung ist schwächer als im Wildtyp.

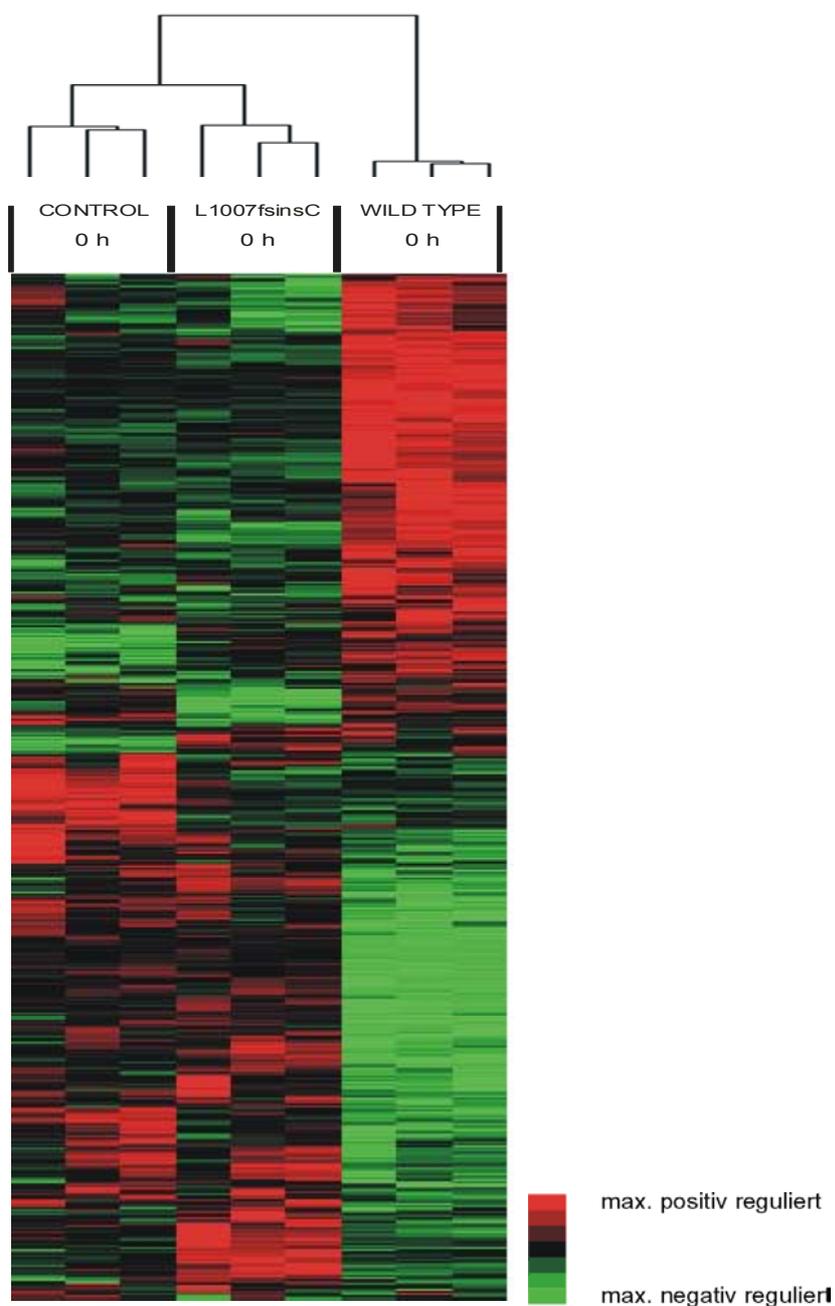


Abbildung 4.6: Hierarchisches Cluster-Bild des Genexpressionsmusters in unstimulierten Zellen. Die gezeigten 3378 Gene sind laut ANOVA signifikant für Genotypunterschiede.

Tabelle 4.1 zeigt funktionell interessante Gene in Übersicht zusammen mit den *fold-changes* (FC) der Mittelwerte der NOD2-Genotypen im Vergleich zum Kontrollmittelwert. Ausgewählt wurden Gene, die im Zusammenhang mit Entzündungsprozessen allgemein oder Erkrankungen des Darmes eine Funktion haben oder im Zusammenhang mit NOD2-Signalwegen diskutiert werden. Zusätzlich wurden die ebenfalls regulierten Gene der entsprechenden Proteinfamilie mit angegeben. Im Falle mehrerer regulierter Transkripte eines Genes wurde dasjenige mit dem höchsten Fold-Change ausgewählt.

Tabelle 4.1: Auflistung von genotyp-regulierten Genen und ihren *fold-changes*.

Aufgelistet wurden funktionell interessante Gene, die im Zusammenhang mit inflammatorischen Vorgängen diskutiert werden, und die Mitglieder der entsprechenden Proteinfamilien. Die angegebenen *fold-changes* beziehen sich auf den Mittelwert aller neun Signalwerte eines Genotyps im Vergleich zum Mittelwert der Kontrolle.

Accession	Unigene_Def	Descriptions	FC NOD2wt vs. CTR	FC L1007fsinsC vs. CTR
NM_145259	ACVR1C	activin A receptor, type IC	1.96	-1.29
NM_001616	ACVR2	activin A receptor, type II	1.08	-1.20
AA583044	BMP2	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	13.38	-2.26
NM_001718	BMP6	bone morphogenetic protein 6	-1.30	1.07
AI457436	BMPR2	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	1.29	-1.07
NM_001511	CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	4.28	1.35
U19495	CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	-2.26	1.29
M57731	CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	5.38	1.47
NM_002090	CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	2.83	1.59
NM_002993	CXCL6	chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	3.68	1.51
AJ224869	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	2.17	1.20
NM_004417	DUSP1	dual specificity phosphatase 1	1.86	1.29
N36770	DUSP10	dual specificity phosphatase 10	1.58	1.36
AB051487	DUSP16	dual specificity phosphatase 16	1.55	1.25
NM_020185	DUSP22	dual specificity phosphatase 22	-1.46	1.12
AI655015	DUSP7	dual specificity phosphatase 7	-1.22	1.21
D86550	DYRK1A	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A	1.32	1.05
BC037269	DYRK3	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3	1.01	-1.42
NM_014750	DLG7	discs, large homolog 7 (Drosophila)	1.35	-1.14
NM_006644	HSPH1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	-1.27	-1.27
NM_002157	HSPE1	heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)	1.09	-1.23
NM_001540	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	1.45	-1.33
AW674195	HSPD1	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	1.28	-1.26
NM_005345	HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A	-638.55	-683.69
NM_005345	HSPA1A /// 1B	heat shock 70kDa protein 1A	-3.38	-2.68
U56725	HSPA2	heat shock 70kDa protein 2	-1.20	-1.26
AA043348	HSPA4	heat shock 70kDa protein 4	-1.28	1.12
AK023317	HSPA9B	heat shock 70kDa protein 9B (mortalin-2)	-1.25	-1.32
NM_001537	HSBP1	heat shock factor binding protein 1	-3.01	-1.01
NM_014278	APG-1	heat shock protein (hsp110 family)	-1.45	-1.13
NM_016292	TRAP1	heat shock protein 75	-1.27	-1.00
NM_004030	IRF7	interferon regulatory factor 7	1.78	1.07
BG256677	IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16	5.95	-7.24
BC001356	IFI35	interferon-induced protein 35	-2.43	-1.05
AI075407	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4	1.91	1.13
AF167343	IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein	-1.67	1.12
U81379	IL13RA1	interleukin 13 receptor, alpha 1	-1.48	-1.13
AI669535	IL17D	interleukin 17D	-1.54	-1.06
NM_000565	IL6R	interleukin 6 receptor	1.82	1.12
NM_002184	IL6ST	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	1.34	-1.00
NM_000584	IL8	interleukin 8	6.72	1.59

Fortsetzung Tabelle 4.1

Accession	Unigene_Def	Descriptions	FC NOD2wt vs. CTR	FC L1007fsinsC vs. CTR
AA854966	COX4I1	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	-2.26	1.04
NM_004374	COX6C	cytochrome c oxidase subunit VIc	-1.33	-1.24
AI760495	CYCS	cytochrome c, somatic	1.83	-1.15
NM_001916	CYC1	cytochrome c-1	-1.58	-1.60
AV700558	CYP2R1	cytochrome P450, family 2, R1	-1.04	1.23
AF182273	CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	1.79	-1.01
NM_004110	FDXR	ferredoxin reductase	-1.38	-1.16
AI888037	GSR	glutathione reductase	-1.36	-1.16
N79662	GSTA4	glutathione S-transferase A4	-1.24	1.03
NM_000852	GSTP1	glutathione S-transferase pi	-1.15	-1.95
NM_000854	GSTT2	glutathione S-transferase theta 2	1.77	1.23
M10943	MT1F	metallothionein 1F (functional)	2.42	-1.21
NM_005950	MT1G	metallothionein 1G	1.90	-1.13
NM_005951	MT1H	metallothionein 1H	2.83	-1.16
NM_002450	MT1X	metallothionein 1X	4.23	-1.26
NM_005953	---	metallothionein 2A	2.93	-1.08
NM_018002	OXR1	oxidation resistance 1	-1.56	-1.33
W46388	SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	1.40	-1.07
NM_138957	MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	1.54	1.16
AI808345	---	mitogen-activated protein kinase 9	1.29	1.14
AF239798	MAP3K2	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	1.32	-1.20
NM_005204	MAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	2.03	1.19
NM_006575	MAP4K5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5	1.29	-1.08
W61007	NFAT5	nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	-1.32	-1.06
U85430	NFATC3	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3	-1.66	-1.13
AL049593	PLCB1	phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)	-1.37	1.05
NM_002661	PLCG2	phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)	-1.84	1.12
AL135787	LTB4DH	leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase	-1.73	1.18
NM_000956	PTGER2	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa	1.56	-2.08
D38300	PTGER3	prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)	1.06	-1.33
AF010316	PTGES	prostaglandin E synthase	1.70	-1.09
NM_000963	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	2.81	1.38
T62044	---	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	1.56	-1.00
AI638762	PPIG	peptidyl-prolyl isomerase G (cyclophilin G)	1.32	-1.03
NM_173672	PPIL6	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 6	-1.61	1.17
NM_006223	PIN4	protein (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting, 4 (parvulin)	1.56	1.25
NM_030790	CDA08	T-cell immunomodulatory protein	-1.70	1.05
NM_007315	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	1.52	-1.12
BC004973	STAT6	signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced	-1.77	-1.92

Fortsetzung **Tabelle 4.1**

Accession	Unigene_Def	Descriptions	FC NOD2wt vs. CTR	FC L1007fsinsC vs. CTR
NM_001252	TNFSF7	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7	1.86	1.38
W65310	TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	-1.98	-1.67
AF021233	TNFRSF10D	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain	-1.63	1.06
AW026379	TNFRSF11A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, activator of NFkB	-1.46	1.11
NM_000043	TNFRSF6	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	-1.68	-1.08
NM_001561	TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	4.74	1.67
NM_021137	TNFAIP1	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	1.42	1.04
A1738896	TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	3.05	1.37
BF338389	CARD8	tumor up-regulated CARD-containing antagonist of caspase nine	1.45	-1.09

4.3.3.1 Vergleich Transkriptom- und Proteom-Analysen

Weichart et al. (2006) veröffentlichten eine Proteomanalyse, die von ähnlichen experimentellen Grundlagen ausgeht wie die hier vorgestellten Versuche. Auch in der Arbeit von Weichart et al. (2006) wurde mit HEK-293 Zellen gearbeitet. Die gleichen drei transfizierten Genotypen wurden mit MDP stimuliert. Mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese wurden 198 Proteine identifiziert, deren Abundanz signifikant durch Überexpression von NOD2wt oder L1007fsinsC und/oder durch die Stimulation mit MDP beeinflusst wurde.

Tabelle 4.2 listet die Schnittmenge der 33 Gene auf, deren Produkte in der Gruppe der 198 Proteine der Proteomveröffentlichung (Weichart et al. 2006) und auch in der Gruppe der 3378 genotypabhängigen signifikanten Gene des Microarray enthalten sind. In der engeren Auswahl der 158 Transkripte, die im Microarray auch MDP-Effekte zeigen (siehe Kapitel 4.3.4), gibt es keine Übereinstimmung.

Tabelle 4.2: Überschneidung regulierter Gene der Transkriptom- und Proteom-Analyse. Die gezeigten Gene sind signifikant sowohl in der ANOVA für genotypabhängige Expressionsunterschiede als auch in der Proteom-Analyse von Weichart et al. (2006).

Number	Affy_ID	Accession	Gene Symbol	Unigene_Def
1	200966_x_at	NM_000034	ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate
1	214687_x_at	AK026577	ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate
2	208758_at	D89976	ATIC	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase
3	211729_x_at	BC005902	BLVRA	biliverdin reductase A
4	209301_at	M36532	CA2	carbonic anhydrase II
5	244802_at	AA909218	GLUD1	glutamate dehydrogenase 2
6	224734_at	N92507	HMGB1	high-mobility group box 1
7	225107_at	AI963008	HNRPA2B1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1
7	225932_s_at	AI375753	HNRPA2B1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1
8	202581_at	NM_005346	HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1A
9	208814_at	AA043348	HSPA4	heat shock 70kDa protein 4
10	1555037_a_at	BC012846	IDH1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble
10	201193_at	NM_005896	IDH1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble
11	212188_at	AA551075	KCTD12	hypothetical protein BC013764
11	212192_at	AI718937	KCTD12	hypothetical protein BC013764
12	200624_s_at	AA577695	MATR3	matrin 3
13	202472_at	NM_002435	MPI	mannose phosphate isomerase
14	217761_at	NM_018269	MTCBP-1	SIPL protein
15	202309_at	NM_005956	MTHFD1	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase
16	203517_at	NM_006554	MTX2	metaxin 2
17	200015_s_at	NM_004404	NEDD5	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 5
18	221801_x_at	AL566528	NEFL	neurofilament, light polypeptide 68kDa
19	215157_x_at	AI734929	PABPC1	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1
20	236907_at	AI760366	PABPC1	Homo sapiens cDNA FLJ25706 fis, clone TST04817
21	205202_at	NM_005389	PCMT1	protein-L-isospartate (D-aspartate) O-methyltransferase
21	208857_s_at	M93008	PCMT1	protein-L-isospartate (D-aspartate) O-methyltransferase
22	208911_s_at	M34055	PDHB	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta
23	226336_at	T62044	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
24	201214_s_at	NM_002712	PPP1R7	protein phosphatase 1, regulatory subunit 7
24	213465_s_at	BF718769	PPP1R7	protein phosphatase 1, regulatory subunit 7
25	201762_s_at	NM_002818	PSME2	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)
26	200631_s_at	NM_003011	SET	SET translocation (myeloid leukemia-associated)
26	40189_at	M93651	SET	SET translocation (myeloid leukemia-associated)
27	226419_s_at	AA046439	SFRS1	splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2, alternate splicing factor)
27	229246_at	AI803504	SFRS1	splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2, alternate splicing factor)
27	239384_at	R18746	SFRS1	splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2, alternate splicing factor)
28	209607_x_at	U08032	SULT1A3	hypothetical protein MGC5178
29	210580_x_at	L25275	SULT1A3	sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 3
30	228205_at	AU152969	TKT	transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome)
31	201391_at	NM_016292	TRAP1	heat shock protein 75
32	201426_s_at	AI922599	VIM	vimentin
33	208642_s_at	AA205834	XRCC5	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining; Ku autoantigen, 80kDa)

4.3.3.2 NOD2-Interaktionspartner und andere mit Morbus Crohn assoziierte Gene

Die bekannten Interaktionspartner von NOD2 und andere bekannte Krankheitsgene für Morbus Crohn wurden auf ihre Expression in den Microarrays überprüft. Keines der überprüften Gene war signifikant reguliert. Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über die überprüften Transkripte.

Tabelle 4.3: NOD2-Interaktionspartner und weitere Morbus Crohn assoziierte Gene

Affy_ID	Accession	Gene Symbol	Unigene_Def	absent/present	signifikant reguliert
209544_at	AF027706	RIP2	receptor-interacting serine-threonine kinase 2	<i>present</i>	nein
220864_s_at	NM_015965	GRIM19	cell death-regulatory protein GRIM19	<i>present</i>	nein
206853_s_at	AL121964	MAP3K7	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 (TAK1)	<i>present</i>	nein
206854_s_at	NM_003188	MAP3K7	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 (TAK1)	<i>present</i>	nein
211536_x_at	AB009358	MAP3K7	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 (TAK1)	<i>present</i>	nein
211537_x_at	AF218074	MAP3K7	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 (TAK1)	<i>present</i>	nein
217941_s_at	NM_018695	ERBB2IP	erb2 interacting protein (ERBIN)	<i>present</i>	nein
222473_s_at	AI807103	ERBB2IP	erb2 interacting protein (ERBIN)	<i>present</i>	nein
232896_at	AK026757	ERBB2IP	erb2 interacting protein (ERBIN)	<i>present</i>	nein
206011_at	AI719655	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	<i>absent</i>	
209970_x_at	M87507	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	<i>absent</i>	
211366_x_at	U13698	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	<i>absent</i>	
211367_s_at	U13699	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	<i>absent</i>	
211368_s_at	U13700	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	<i>absent</i>	
1552553_a_at	NM_021209	CARD 12	caspase recruitment domain family, member 12 (IPAF, CLAN)	<i>absent</i>	
1552554_a_at	AY027790	CARD 12	caspase recruitment domain family, member 12 (IPAF, CLAN)	<i>absent</i>	
226162_at	AL389934	CARD 12	caspase recruitment domain family, member 12 (IPAF, CLAN)	<i>absent</i>	
240319_at	AI023795	CARD 12	caspase recruitment domain family, member 12 (IPAF, CLAN)	<i>absent</i>	
205896_at	NM_003059	SCL22A4	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4 (OCTN1)	<i>absent</i>	
241899_at	AA524418	SCL22A4	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4 (OCTN1)	<i>absent</i>	
205074_at	NM_003060	SCL22A5	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 5 (OCTN2)	<i>absent</i>	
239615_at	AI768445	SCL22A5	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 5 (OCTN2)	<i>present</i>	nein
201681_s_at	AB011155	DLG5	discs, large homolog 5 (Drosophila)	<i>present</i>	nein

4.3.4 MDP induzierbare Gene

In der ANOVA-Analyse wurden 294 Gene als signifikant in ihrer Expressionsänderung nach MDP-Stimulation klassifiziert. Dazu kamen aus der Profilsuche nach IL-8-Ähnlichkeit 24 Gene, die in den 294 Genen noch nicht enthalten waren. Um für diese Gene auch eine zusammenfassende Aussage über positive und negative Regulation machen zu können, wurden die einzelnen Genotypen

entsprechend ihrem Profil wie in Kapitel 3.5.3.2 beschrieben klassifiziert. Alle Gene, die nicht den Grenzwert von $FC = \pm 1,4$ erreichten, wurden ausgeschlossen. Weiterhin wurde überprüft, ob die *absent/present*-Klassifizierung plausibel war. Übernommen wurden nur Gene, die bei positiver Regulierung (*increased*) zum Zeitpunkt 2 Stunden im NOD2wt mindestens einmal mit „*present*“ klassifiziert waren, dagegen wurden negativ (*decreased*) regulierte Gene nur weitergeführt, wenn sie mindestens zum Zeitpunkt 0 Stunden als „*present*“ eingestuft waren. Diese Selektionskriterien reduzierte die Anzahl der Gene auf 158.

Mit den Signalwerten dieser 158 Gene wurde eine Cluster-Analyse durchgeführt wie in Kapitel 3.5.3.3 beschrieben. Abbildung 4.7 zeigt das Ergebnis dieser Analyse mit gekürzter Liste der Gene in den einzelnen Clustern. Die vollständige Liste befindet sich im Anhang 10.

Bei Betrachtung der Gene, die signifikant auf MDP reagieren, fand sich ein starkes Cluster von Genen die nach zwei Stunden Stimulation im Wildtyp hochreguliert wurden (Cluster 1, Abbildung 4.7). Die Gene dieses Clusters können in mehrere funktionelle Gruppen unterteilt werden. Besonders auffällig ist die Gruppe der entzündlichen Chemokine: IL-8 ist nach zwei Stunden stark hochreguliert, eine Bestätigung der bekannten NOD2-Induzierbarkeit von IL-8. Aber auch MIP2 α (CXCL2, *macrophage inflammatory protein 2*) und MIP2 β (CXCL3), die ähnliche Funktion in der Rekrutierung von Neutrophilen zu Entzündungsherden haben, sind genauso reguliert. GCP2 (CXCL6, *granulocyte chemotactic protein 2*) zählt funktionell ebenfalls in diese Gruppe, ist aber nach sechs Stunden noch stärker hochreguliert und erscheint daher in Cluster zwei.

Ebenfalls gut bekannt als pro-entzündliches Enzym ist PTGS2 (*prostaglandin-endoperoxide synthase 2*, COX2), das eine zentrale Rolle in der Prostaglandin-Synthese einnimmt.

Interessant ist auch das gleich mit mehreren Transkripten auftauchende JUN (*v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)*). JUN ist ein Bestandteil des heterodimeren AP-1 Transkriptionsfaktors. Neben dem NF- κ B Signalweg werden von NOD2 auch MAP Kinasen aktiviert, und die positive Regulation von JUN deutet auf eine Beteiligung von JNK in MDP-induzierten Entzündungsvorgängen.

Eine weitere Verbindung zu MAP Kinasen stellt TPL2 (MAP3K8, COT) her. Diese Kinase kann ERK1/2 aktivieren und ist z.B. als wichtiger Regulator der Th-1 Immunantwort beschrieben (Sugimoto et al. 2004).

Eine andere sehr auffällige funktionelle Gruppe in Cluster 1 besteht aus Genen, deren Produkte eine negativ regulatorische Wirkung auf den NF- κ B Signalweg haben. Hier ist am bekanntesten I κ B α (NFKBIA), das zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors degradiert werden muss. Neutranslation des Proteins führt zur Abschaltung der Signaltransduktion. Aber auch IER3 (*immediate early response 3*, IEX1) und A20 (TNFAIP3, *tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3*) werden hochreguliert. Offenbar besteht eine wichtige Aufgabe der MDP induzierten Genexpression in der rechtzeitigen Modulation und Beendigung des NF- κ B Signals. Daher wurde eines dieser Gene, A20, für weitere Untersuchungen ausgewählt.

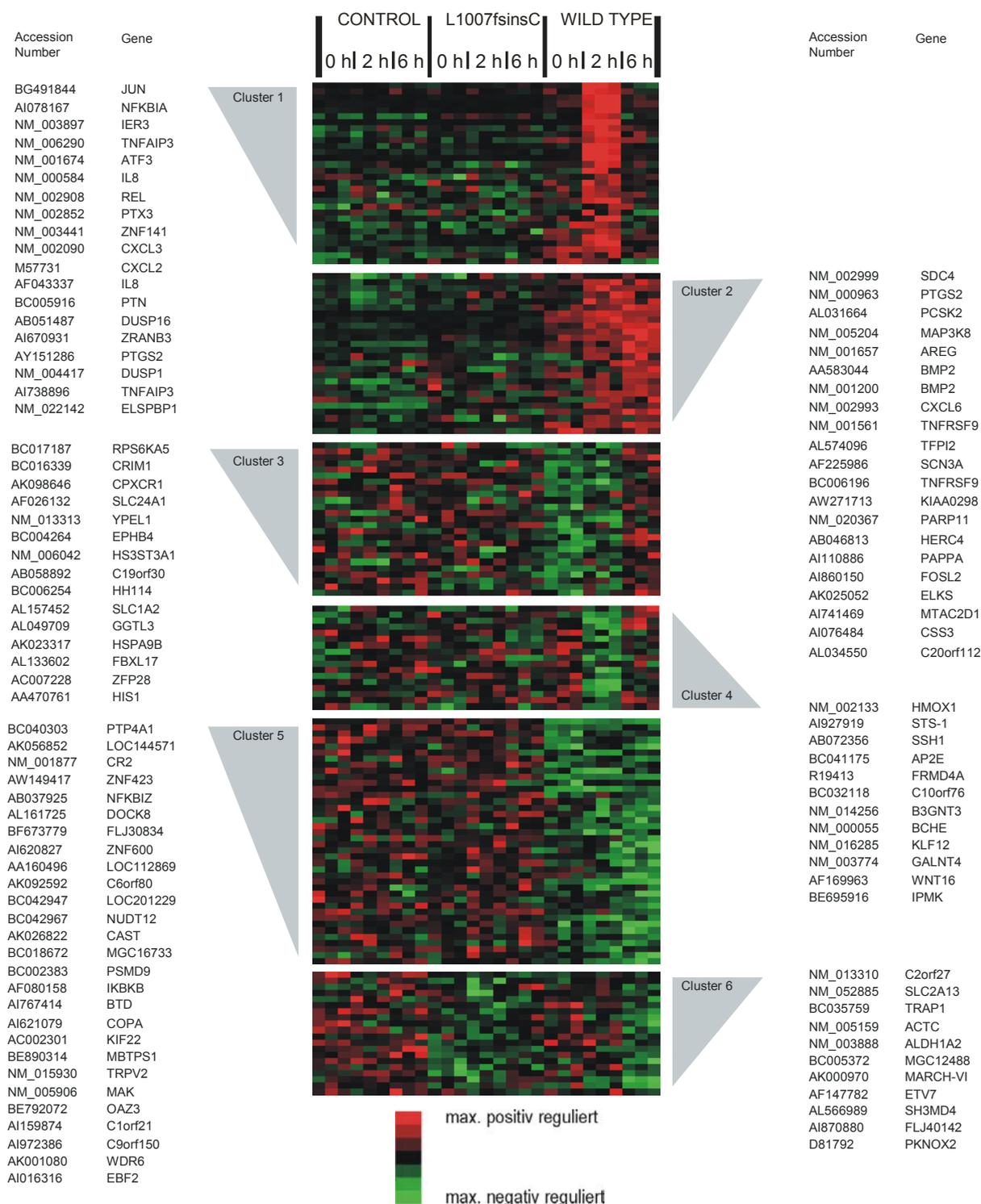


Abbildung 4.7: K-means clustering von 158 Genen, deren Regulation MDP-abhängig ist. Die dargestellten Gene sind entweder signifikant in der ANOVA für MDP-Effekte oder sind im IL-8-Ähnlichkeitsranking enthalten. Weitere Kriterien waren ein minimaler *fold-change* von +/- 1,4 von NOD2wt vs. Control und Klassifizierung als „present“ zum 2 h Zeitpunkt im NOD2wt bei den positiv regulierten und zum 0 h Zeitpunkt bei den negativ regulierten Genen. Ausgewählte Gennamen sind angegeben, die vollständige Liste findet sich in Anhang 10.

4.3.4.1 Die L1007fsinsC Mutation führt zum Funktionsverlust

In Abbildung 4.7 werden neben dem NOD2wt auch Kontrolle und L1007fsinsC-Genotyp gezeigt. Weder Kontrolle noch L1007fsinsC zeigten durch MDP induzierte Regulationseffekte. Auch eine Suche ausschließlich im L1007fsinsC Genotyp nach denselben Kriterien wie für NOD2wt beschrieben (Kapitel 4.3.4) erbrachte keine Cluster, die eine MDP induzierte Regulierung zeigten.

4.3.5 Validierung der Microarray Ergebnisse mittels *real-time* PCR

Um die Qualität der Microarray Daten überprüfen zu können, wurde die Expression ausgewählter Gene mit Taqman-Assays verifiziert. Vier Gene aus der genotypregulierten Gruppe wurden ausgewählt, um generelle Expressionsunterschiede in den Genotypen zu verifizieren. Stabile FLP-IN HEK-293 Zellen wurden für verschiedene Zeiträume (2h, 4h und 8h) mit Bakterien stimuliert. Aus den verschiedenen Genotypen wurde RNA isoliert und per Taqman *real-time* PCR die Expression von MT1X (*metallothionein 1X*), IFI16 (*interferon, gamma-inducible protein 16*), ZNF91 (*zinc finger protein 91*) und MTGST1 (*microsomal glutathione S-transferase 1*) untersucht. Abbildung 4.8 lässt erkennen, dass sich das basale Expressionsniveau aller vier Gene auch in der Taqman *real-time* PCR genau wie in den Microarrayergebnissen verhält. IFI16 und MT1X sind im Vergleich zur L1007fsinsC Mutante im NOD2 Wildtyp positiv reguliert, MGST1 und ZNF91 sind negativ reguliert. Eine weitere Expressionsinduktion durch Stimulation mit kokultivierten Bakterien (*L.monozytogenes* und *L.innocua*) ließ sich nicht feststellen. In der Abbildung sind daher die verschiedenen Bakterienstämme und die verschiedenen Stimulationszeiträume zu einem Mittelwert zusammengefasst.

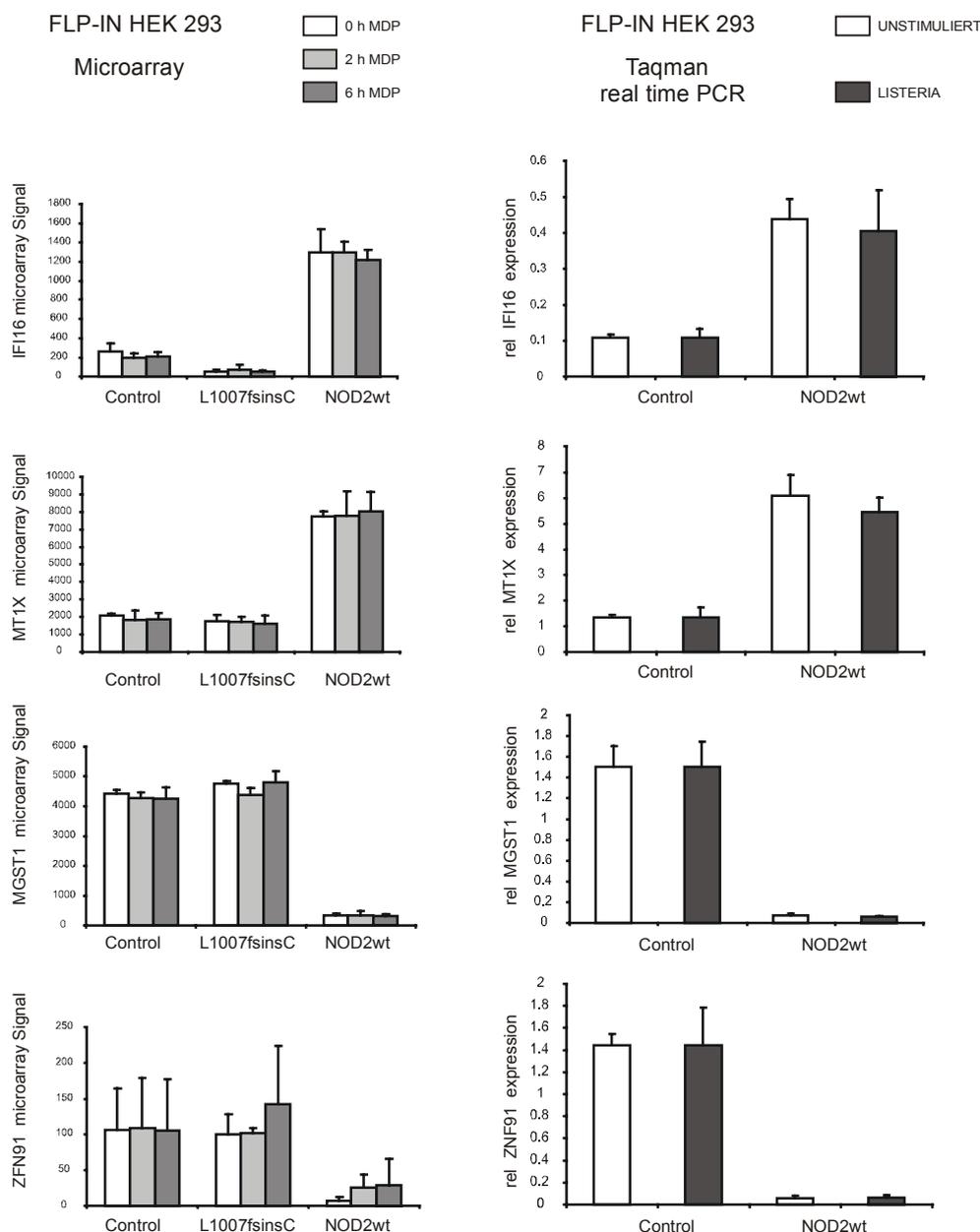


Abbildung 4.8: Vergleich von Microarray und Taqman *real-time* PCR-Ergebnissen.

Getestet wurden vier Gene aus der Genotypgruppe.

Die linke Spalte gibt die Ergebnisse der Microarraysignalwerte wieder. Die rechte Spalte zeigt die Expression der Gene relativ zur β -Actinexpression für FLP-Control und FLP-NOD2wt-Zellen jeweils unstimuliert und nach Coinkubation mit lebenden Listerien (*L.monozytogenes* und *L.innocua*, je 2h, 4h und 8h Stimulation). Die Genotypunterschiede, die sich in den Microarraysignalwerten (linke Spalte) ablesen lassen, werden in der Taqman *real-time* PCR bestätigt, dagegen ist keine Expressionsveränderung durch die Stimulation mit Listerien erkennbar (Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen).

Abbildung 4.9 zeigt die Ergebnisse für zwei Gene aus Cluster 1. Für die Taqman *real-time* PCR wurde dieselbe RNA eingesetzt wie für die Microarrays. Die *real-time* PCR-Ergebnisse von JUN (*v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog*) und IER3 (*immediate early response 3, IEX1*) bestätigen die Microarray-Ergebnisse. Für Interleukin-8 wurde auf die PCR verzichtet, da bereits mittels ELISA auf Proteinebene die IL-8 Translation bestätigt wurde (siehe Abbildung 4.5).

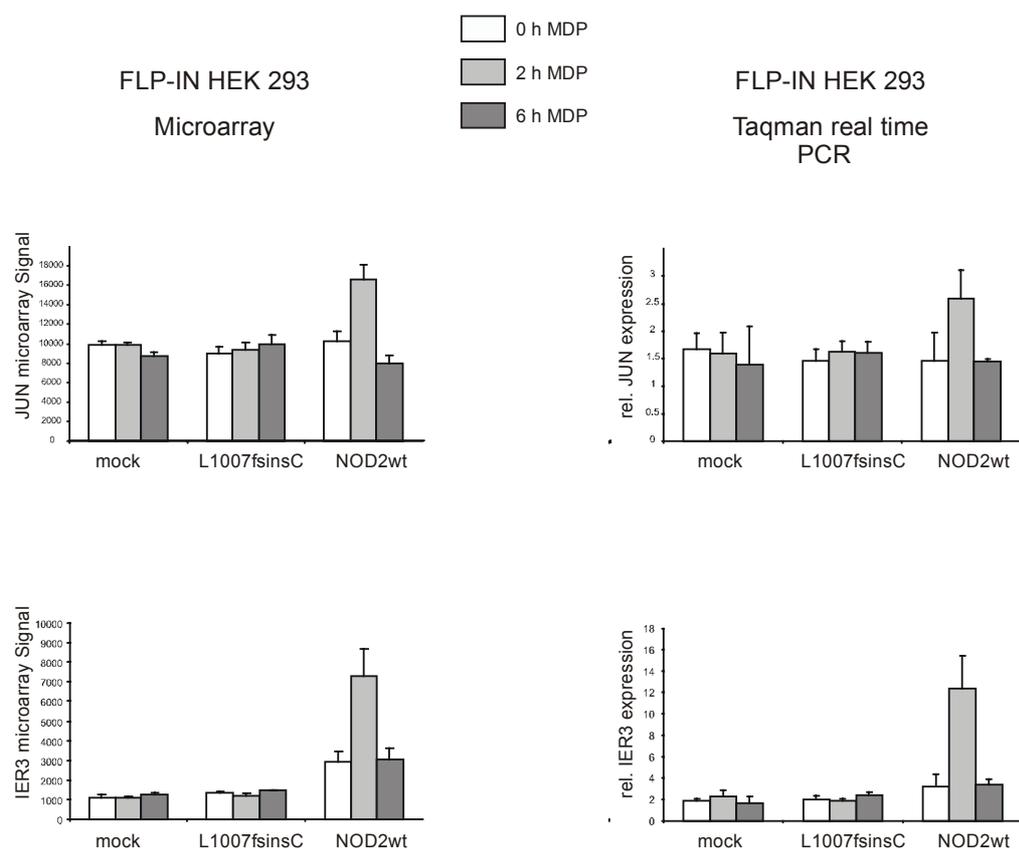


Abbildung 4.9: Vergleich von Microarray (links) und Taqman *real-time* PCR-Ergebnissen (rechts). JUN- und IER3-Expression wurde in der Taqman *real-time* PCR überprüft, die Ergebnisse bestätigen die Signalwerte der Microarrays und die Induzierbarkeit durch MDP (Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen).

Die Verifikation der *in vivo* Relevanz der Ergebnisse wurde durch Wiederholung der Stimulationsversuche an primären Zellen von Patienten gewonnen (Abbildung 4.10). Aus Blutproben eines L1007fsinsC homozygoten Patienten und einer NOD2wt Kontrollperson wurden primäre mononukleäre Zellen (PBMC, *peripheral blood mononuclear cell*) isoliert und mit MDP stimuliert. Überprüft wurde die mRNA Abundanz von IL-8 (Interleukin 8), A20 (TNFAIP3, *tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3*), TPL2 (*tumor progression locus-2, MAP3K8*), BMP2 (*bone morphogenetic protein 2*) und 4-1BB (TNFRSF9, *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9, CD137*). Die Ergebnisse der *real-time* PCRs (Abbildung 4.10) auf den primären Zellen bestätigten die Unterschiede zwischen den NOD2 Genotypen. Der L1007fsinsC Genotyp reagierte nicht auf MDP, nur bei BMP2 war auch in diesem Genotyp eine Aktivierung vorhanden, allerdings schwächer als im Wildtyp. Die Induzierbarkeit der Gentranskription durch MDP im Wildtyp entsprach dagegen exakt den Ergebnissen des Microarrays, sogar der Zeitverlauf der Aktivierung bei 4-1BB (TNFRSF9, *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9, CD137*) stimmt überein.

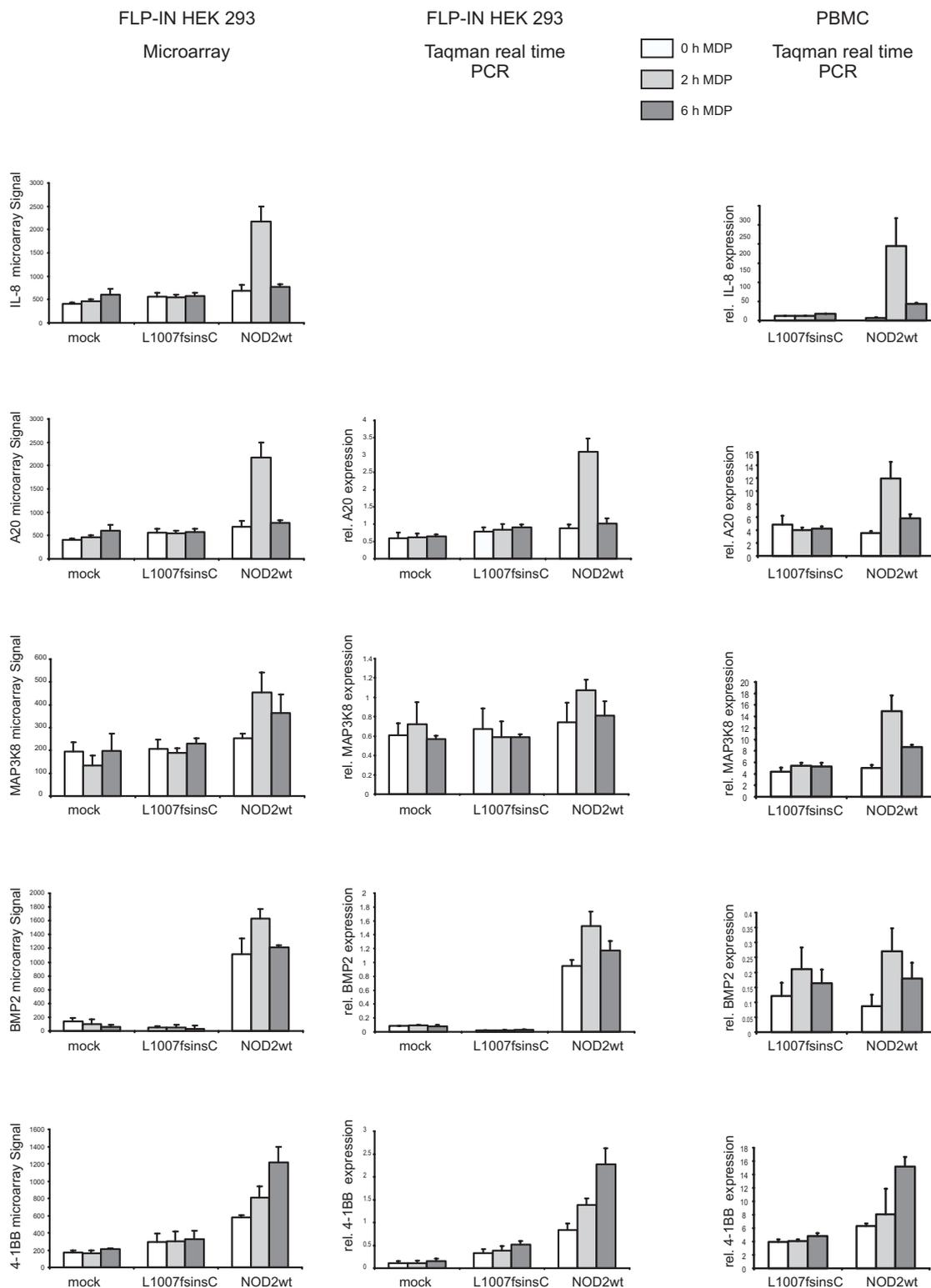


Abbildung 4.10: Vergleich von Microarray und *real-time* PCR-Ergebnissen von verschiedenen Zelltypen.

Spalte eins und zwei: RNA der stabilen FLP-IN HEK-293 Zellen, Spalte 3: RNA von primären mononukleären Zellen (PBMC) nach MDP Stimulation (Spalte eins und zwei: Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen; Spalte drei: repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen).

4.4 Funktionelle Analysen von A20

Mit den Microarrays wurde eine positive Regulierung der A20 (TNFAIP3, *tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3*) Transkription nach MDP-Stimulation gezeigt. Im Folgenden werden Ergebnisse vorgestellt, die diesen Befund auf Proteinebene bestätigen. Zudem wird ein funktioneller Einfluss der A20-Abundanz auf die NOD2-abhängige NF- κ B-Aktivierung gezeigt.

4.4.1 A20-Genexpression in Abhängigkeit von MDP-Stereoisomeren

Für die Bindung von MDP an NOD2 ist die räumliche Konfiguration entscheidend. Nur das physiologisch in Bakterien synthetisierte MurNAc-L-Ala-D-isoGln (LD-MDP) kann erkannt werden. Das Stereoisomer MurNAc-D-Ala-D-isoGln (DD-MDP) wurde als spezifische Kontrolle eingesetzt. In Abbildung 4.11 wird der Effekt der beiden Isomere auf die A20-Expression gezeigt. Per Western-Blot und Immundetektion mit einem A20-Antikörper (Stressgen, San Diego, USA) wurde die Proteinabundanz von A20 nach unterschiedlichen Stimulationszeitpunkten ermittelt. Sowohl in THP1-Zellen (Abbildung 4.11 A) als auch in den stabilen FLP-IN HEK-293 NOD2wt Zellen (Abbildung 4.11 B) wurde ein Ansteigen der A20-Proteinmenge nach Stimulation mit LD-MDP festgestellt. In den L1007fsinsC-Zellen dagegen ist kein Anstieg in der Proteinmenge festzustellen (Abbildung 4.11 C). Die densitometrische Auswertung der A20 Proteinbanden auf den Western-Blots (Abbildung 4.11 D) bestätigt diese Beobachtungen.

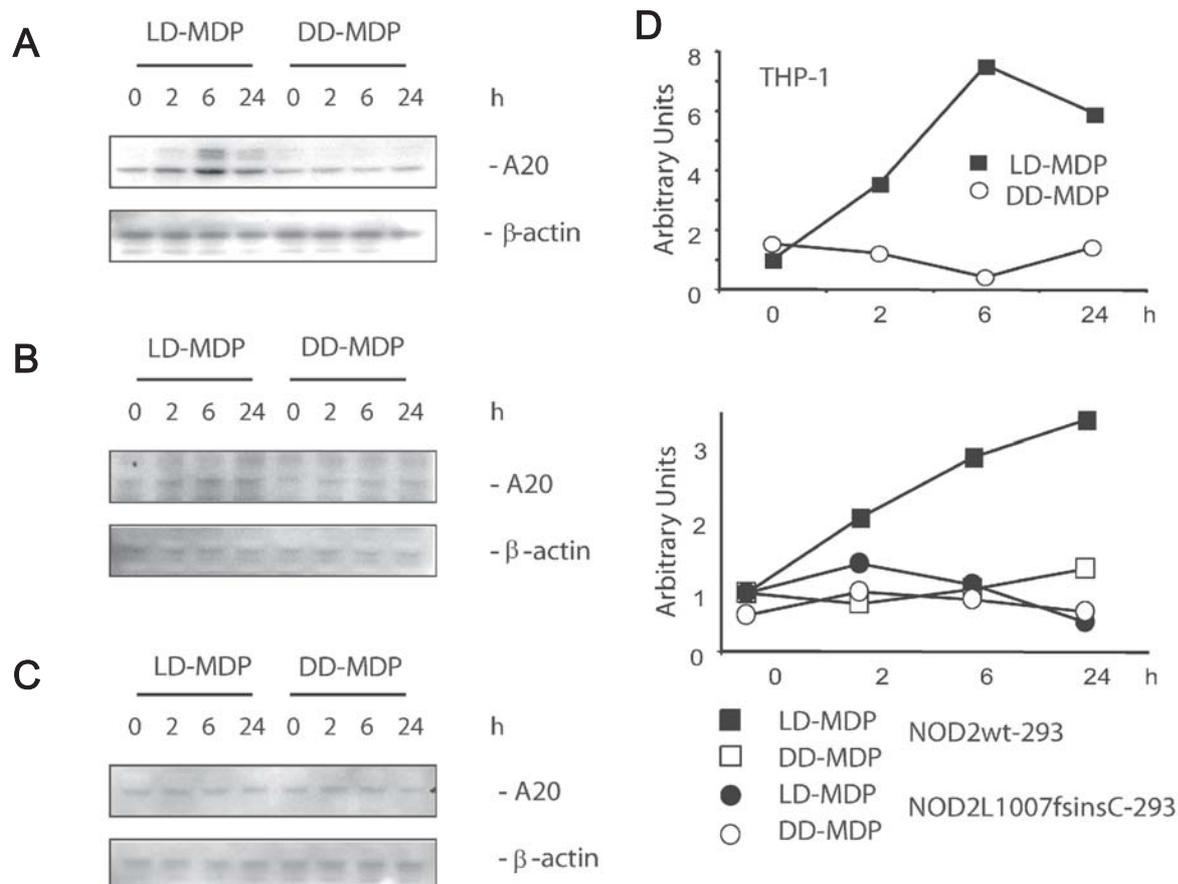


Abbildung 4.11: Nachweis der A20-Expression auf Proteinebene.

A20-Expression wird positiv reguliert durch LD-MDP Stimulation. Die Stimulation mit DD-MDP dagegen zeigt keine Induktion.

Western-Blots von Lysaten aus **A:** THP-1 Zellen **B:** HEK-293 NOD2wt und **C:** HEK-293 NOD2L1007fsinsC Zellen, entwickelt mit Anti-A20 (Stressgen) (repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen).

D: Densitometrische Auswertung der A20 Proteinbanden.

4.4.2 A20 ist ein negativer Regulator der durch NOD2 induzierten NF- κ B Antwort

Um die Auswirkung der Hochregulierung von A20 auf das entzündliche Geschehen beurteilen zu können, wurden ansteigende Mengen von A20 in HeLa Zellen überexprimiert. Dazu wurden Zellen mit dem A20-Expressionsplasmid pUNO-hTNFAIP3 (InvivoGen, San Diego, USA) transfiziert. Um auszuschließen, dass die ansteigende Expression von A20 einen hemmenden Effekt auf die NOD2-Synthese hat, wurde zuerst per Western-Blot die Konstanz der NOD2-Proteinabundanz verifiziert. Dazu wurde in 6-wells jeweils eine konstante Menge von NOD2 Expressionsplasmid (pCEV-NOD2wt) transfiziert und zusätzlich ansteigende Mengen von 0 ng bis 1000 ng pUNO-hTNFAIP3 pro well. Um die Zellen immer mit gleichen Plasmidmengen zu transfizieren, wurden die Differenzen mit einem

Leervektor aufgefüllt. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion geerntet, lysiert und dem Western-Blot Verfahren unterzogen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.12 A gezeigt. Durch die Co-Transfektion von A20-Plasmiden zu den NOD2-Plasmiden wurde die Synthese von NOD2 nicht beeinflusst.

Für den NF- κ B-Reportergenassay wurden in 96-wells 0 ng bis 16 ng pUNO-hTNFAIP3 pro well in die Zellen transfiziert. Gleichzeitig wurde eine konstante Menge von NOD2 Expressionsplasmid (pCEV-NOD2wt) transfiziert und ebenso die Reportergenplasmide für den Dual-Luciferase-Reporter Gene Assay. Anschließend wurde für 24 h, 8 h, 4 h und 0 h mit DD-MDP (10 μ g/ml) stimuliert. Die durch MDP induzierte NF- κ B Aktivierung ist in Abbildung 4.12 B dargestellt, es ist eine A20-dosisabhängige Hemmung der Aktivierung zu beobachten. Diese Hemmung ist bereits nach 4 Stunden MDP-Stimulation zu erkennen und ist für die Zeitpunkte 8 Stunden und 24 Stunden noch deutlicher.

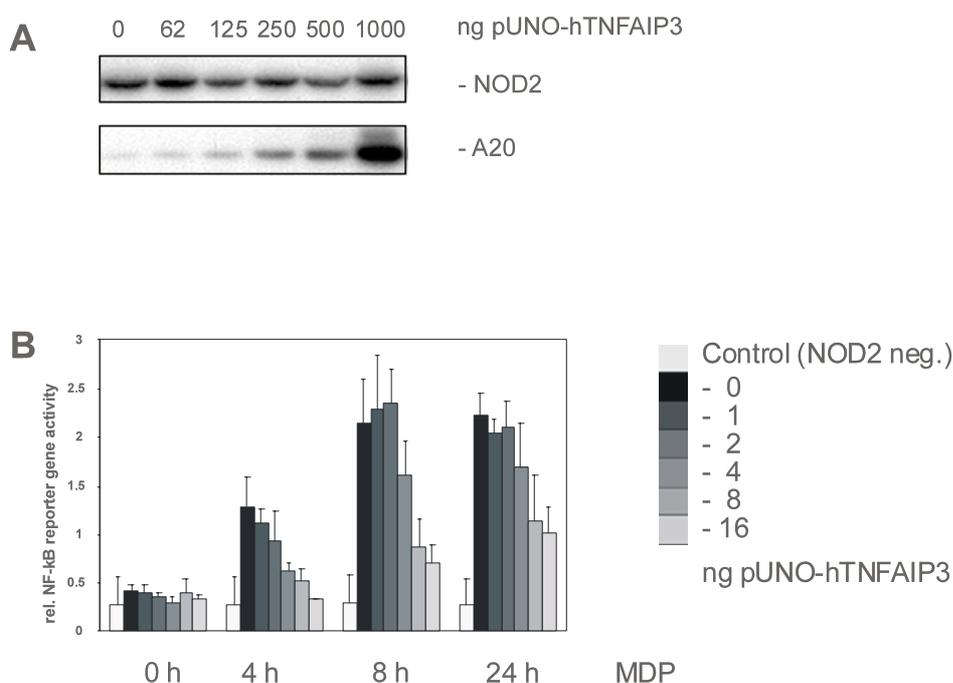


Abbildung 4.12: A20 (hTNFAIP3) hemmt die MDP induzierte NF- κ B-Aktivierung.

A: A20 und NOD2 Überexpression in HeLa-Zellen. Die Western-Blot Membran wurde mit Anti-A20 (Stressgen) und Anti-NOD2 Serum (Cayman Chemical) entwickelt.

B: Dual-Luciferase-Reporter Gene Assay auf HeLa-Zellen (repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen). Die NF- κ B Aktivierung nach MDP-Stimulation wird gehemmt durch steigende Konzentrationen von A20.

5 Diskussion

5.1 Lokalisation von NOD2

Die Lokalisation von Proteinen hat einen wichtigen Einfluss auf differentielle Funktionen. Während NOD2 bisher als cytosolisch lokalisiert galt, berichten neuere Arbeiten von einer Membranassoziation von NOD2 (Barnich, Aguirre et al. 2005; McDonald et al. 2005, Kufer et al. 2006). In den hier vorgestellten Ergebnissen zu einer subzellulären Isolierung mit anschließendem NOD2-Western-Blot konnte die Membranassoziation nur für überexprimiertes NOD2 bestätigt werden. Bei Isolierung von endogenem NOD2 aus THP1-Zellen konnte NOD2 nur in der Cytosolfraktion nachgewiesen werden.

Barnich et al. (2005) zeigen eine Aufnahme eines Konfokalen-Laserscanner-Mikroskopes, die endogenes NOD2 in HT-29 Zellen mit teilweiser Membranassoziation zeigt. Western-Blots von subzellulären Fraktionen werden allerdings ausschließlich mit überexprimiertem NOD2 gezeigt, nicht mit endogenem. Nur der NOD2wt ist membranständig, die L1007fsinsC-Variante dagegen nicht. Im weiteren zeigen Barnich et al. anhand mehrerer in der LRR-Mutationen von NOD2, dass nur die membranständigen Varianten NF- κ B-Aktivität induzieren können. Auch hier wird die Membranassoziation nur in Immunfluoreszenzbildern gezeigt und nicht mit einer quantitativen Methode.

McDonald et al. (2005) untersuchen die Lokalisation von NOD2, um ein inkonsistentes Ergebnis ihrer Untersuchungen zu erklären: Obwohl ERBIN (ERBB2IP, *erb2 interacting protein*) mit den CARD-Domänen von NOD2 interagieren soll, ist bei der L1007fsinsC-Mutation keine Interaktion mehr nachweisbar. Dieses Ergebnis wird laut McDonald et al. durch die fehlende Membranassoziation von L1007fsinsC erklärbar. Interaktion mit dem membranlokalisierten ERBIN soll dann nicht mehr möglich sein. Entsprechende Untersuchungen an endogenem NOD2 wurden nicht vorgestellt, alle Experimente wurden mit überexprimiertem NOD2 durchgeführt.

Kufer et al. (2006) dagegen zeigen auch eine Immunfluoreszenzaufnahme mit Co-Lokalisation von endogenem NOD2 mit endogenem Erbin. Auch in dieser Arbeit wurde die Membranlokalisation von NOD2 als ERBIN-unabhängig beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisation von endogenem und überexprimiertem NOD2 im Western-Blot verglichen. Die Ergebnisse von Barnich und McDonald konnten für das endogene NOD2 nicht bestätigt werden. Bereits in der Einleitung wurde beschrieben, dass Überexpression von Proteinen der NOD-like-Proteinfamilie Nebeneffekte wie Autooligomerisation bis zur Größe von anfärbaren Proteinaggregaten hervorrufen kann. Eine unphysiologische Lokalisation solcher Proteinaggregate ist durchaus vorstellbar, z.B. liegt eine solche unphysiologische Isolierung vermutlich bei dem Nachweis von überexprimiertem NOD2 in der Kern- und der Cytoskelettfraktion vor (Abbildung 4.1 B).

Inwieweit die Membranassoziation also tatsächlich essentiell für die Funktion von NOD2 ist, wird sich erst bei weiteren Untersuchungen zeigen. Einen wichtigen Hinweis auf die Bedeutung der Membranassoziation würde die Aufklärung eines primären Assoziationspartners für NOD2 in der Membran liefern. ERBIN scheint aber nach der Erklärung von McDonald et al. (2005) erst sekundär mit NOD2 zu interagieren, ein Ergebnis, dass auch von Kufer et al. (2006) bestätigt wird.

5.2 Phosphorylierung von NOD2

Durch Immunpräzipitation und anschließende Massenspektrometrie wurde eine phosphorylierte Form von NOD2 nachgewiesen. Nach Stimulation mit MDP und Behandlung mit dem Phosphataseinhibitor Calyculin A wurde eine Phosphorylierung des Serin116 von NOD2 gezeigt.

Die phosphorylierte Sequenz entspricht keinem bekannten Kinasmotiv, so dass eine Aussage über die beteiligte Kinase ohne weitere Experimente nicht möglich ist. Da das phosphorylierte Serin aber N-terminal zu einem Prolin liegt, kann die Suche zunächst auf prolinspezifische Kinasen eingegrenzt werden. Von den prolinspezifischen Kinasen sind zwei Gruppen bekannt, zum einen die cyclinabhängigen Kinasen (CDK, *cyclin-dependent-Kinases*) und die MAP Kinasen.

Da die Phosphorylierungsstelle in der ersten CARD-Domäne liegt, ist zunächst an eine Funktion der Phosphorylierung in der Signaltransduktion zu denken. In der Arbeit von Tanabe et al. wurde neben zahlreichen anderen Klonen auch das Serin116 gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht. Dabei wurde für diesen Klon kein Effekt auf die NF- κ B-Aktivierbarkeit festgestellt (Tanabe et al. 2004). Dieses Ergebnis wurde auch durch einen selbst hergestellten Klon bestätigt. Der NOD2S116A Klon reagierte auf die Stimulation mit MDP genauso wie der Wildtyp mit NF- κ B-Aktivierung (Daten nicht gezeigt). Dennoch ist eine Funktion in der Signaltransduktion nicht auszuschließen, da die anderen bekannten Signalwege von NOD2 wie die Aktivierung von Caspase1 und die MAP Kinasen-Aktivierung noch nicht überprüft wurden.

Ebenso denkbar ist aber auch eine Funktion als Deaktivierungssignal. Durch die Phosphorylierung könnte NOD2 für den proteasomalen Abbau markiert werden.

Bei Inhibierung mit Phosphatase-Inhibitor Cocktail II wurde in der Immunpräzipitation auch eine Phospho-Tyrosin Bande mit dem Molekulargewicht von NOD2 gefunden (Daten nicht gezeigt). In der LC-MS (*liquid chromatography mass spectrometry*) konnte dieser Befund aber nicht bestätigt werden. Es ist in der LC-MS nicht gelungen, eine vollständige Abdeckung der NOD2 Sequenz zu erreichen. Die im Trypsinverdau entstandenen Peptide wurden nicht vollständig wiedergefunden. Daher ist es durchaus möglich, dass NOD2 an einer der nicht untersuchten Peptide Tyrosin-phosphoryliert ist.

5.3 Transkriptomanalyse von NOD2wt und L1007fsinsC transfizierten Zellen

Die Technik der Microarrays erlaubt eine genomweite Analyse der RNA-Expression. In der Praxis sind aber einige Punkte in der Durchführung problematisch.

Um in der Analyse vergleichbare Ergebnisse zu erlangen, muss die eingesetzte RNA von hoher Qualität sein. Die bei RNA häufig auftretende Degradierung durch RNAsen führt zum Misslingen der Hybridisierung an die gespotteten Oligomere. In dieser Arbeit wurde die Qualität der eingesetzten RNA mittels Agilent RNA 6000 *nano chips* überprüft und sehr saubere 18S und 28S rRNA-Banden festgestellt, das heißt es war keine Degradation aufgetreten.

Ein weiterer kritischer Arbeitsschritt ist die Hybridisierung der Chips. Affymetrix Microarray Chips sind die zur Zeit bewährtesten und am besten validierten Chips. Die Wiederholbarkeit der Ergebnisse ist sehr gut. Dennoch spiegeln sich auch bei diesen Chips sofort geringste Schwankungen im Protokoll in den Ergebnissen wieder.

Bei der Durchführung von Microarray-Versuchen ist ein entscheidender Faktor die Analyse der Expressionsdaten, wobei aus der großen anfallenden Datenmenge die regulierten Gene ausgefiltert werden. Zwei grundsätzlichen Kriterien, nach denen die Selektion interessanter Gene durchgeführt wurde, sollen hier kurz erläutert werden.

5.3.1.1 Signifikanzwerte (p-Werte)

Der Signifikanzwert oder p-Wert erlaubt eine Einschätzung der Anzahl falsch positiver Gene.

Als statistisches Auswertungsverfahren wurde in dieser Arbeit die ANOVA-Analyse angewendet, da mit diesem Verfahren Aussagen über die beiden experimentellen Parameter Genotyp und MDP-Stimulation möglich sind. Der Signifikanzwert wurde auf 0,05 justiert.

Ein hochsignifikanter p-Wert für ein bestimmtes Gen bedeutet aber nur, dass die jeweils drei Wiederholungen der neun experimentellen Bedingungen sehr ähnliche Ergebnisse geliefert haben. Für den Zellstoffwechsel wichtige Regulationen mögen aber auch durchaus in den breit variierenden und damit unsignifikanten Ergebnissen zu finden sein.

5.3.1.2 Fold-change

Der *fold-change* gibt die Veränderung der Expressionsstärke im Vergleich zweier experimenteller Bedingungen, also ein direktes Maß für den induzierten Unterschied. In vielen Auswertungsverfahren für Microarrays werden zuerst Gene mit hohen *fold-change* Werten als interessant selektiert.

Unmittelbar verständlich ist die Bedeutung der Expressionsstärke bei sezernierten Botenstoffen oder membranständigen Rezeptoren: geht man davon aus, dass die mRNA auch quantitativ in Proteine translatiert wird, gibt die Expressionsstärke die Menge des Botenstoffes oder Rezeptors an. Die Stärke eines biologischen Signales ist aber normalerweise abhängig von der Abundanz des Botenstoffes bzw. Rezeptors. Als Beispiel kann die Induktion von IL-8 dienen. Wie im ELISA

(Abbildung 4.5) nachgewiesen, wird die induzierte IL-8 Genexpression auch in sezerniertes Protein übersetzt. Je mehr IL-8 sezerniert wird, desto stärker ist die chemoattraktive Wirkung auf Lymphozyten.

Da in fast allen Signalwegen die beteiligten Proteine auch über *feed-back* Schleifen in ihrer Expression reguliert werden, kann eine Analyse des Transkriptoms auch Hinweise auf beteiligte Signalwege liefern. Allerdings ist hier die Bedeutung der Expressionsänderung viel vorsichtiger zu interpretieren, da häufig die Proteinaktivität posttranslational kontrolliert wird. Ist z.B. durch eine Stimulation die Translation eines Transkriptionsfaktors hochreguliert, heißt das noch nicht, dass dieser Transkriptionsfaktor auch vermehrt aktiv ist. Dazu kann beispielsweise eine aktivierende Phosphorylierung durch eine Kinase notwendig sein.

Dieses Beispiel soll verdeutlichen, dass eine Überschätzung des Selektionskriteriums *fold-change* den biologischen Abläufen nicht immer gerecht wird. Ein hoher *fold-change* muss nicht bedeuten, dass auch ein starker biologischer Effekt eintritt. *Vice versa* kann auch das Anschalten eines Schlüsselproteins trotz niedrigem *fold-change* starke Auswirkungen auf den Stoffwechsel haben.

Ein weiteres Problem der *fold-change* Analyse besteht ihrer Tendenz, niedrige Signalwerte überzubewerten. Signalwerte in der Nähe des experimentellen Rauschens erreichen oft allein durch Zufall hohe *fold-changes*.

Aus diesen Überlegungen heraus wurde in dieser Arbeit für die engere Genauswahl der Cluster-Analysen der relativ niedrige *fold-change* Grenzwert von 1,4 gewählt.

5.3.2 Diskussion der Microarray-Ergebnisse

5.3.2.1 Die transgenen Zelllinien

Um für die Microarrayversuche vergleichbare Zellen zu haben, die sich nur im NOD2 Genotyp unterscheiden, wurde das FLP-IN System eingesetzt. Da mit diesem System sichergestellt werden kann, dass die Insertion der Expressionskassette immer am selben Ort des Genoms erfolgt, sind die festgestellten Expressionsunterschiede mit größter Wahrscheinlichkeit auf den Einfluss der insertierten NOD2-Varianten zurückzuführen.

Die Zelllinie HEK-293 wurde ausgewählt, da sie NOD2 nicht konstitutiv exprimiert. Die nur mit Leervektor transfizierte Stammlinie kann also als Negativkontrolle im Experiment dienen. Dies impliziert aber eine wichtige Einschränkung: Zellen, die kein NOD2 exprimieren, sind möglicherweise auch defizient für Adaptoren oder andere nachgeschaltete Effektoren. Deswegen wurden die Zellen in NF- κ B-Luciferase Assays und in IL-8 ELISAs auf ihre Stimulierbarkeit getestet, wobei sich für die NOD2wt Zellen eine normale Aktivierbarkeit zeigte. Auch die Expression des wichtigsten Effektors, RIP2, wurde per Western-Blot kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass endogen NOD2 exprimierende Zellen wie Monozyten eventuell zusätzliche Signalwege nutzen, die in HEK-293 Zellen nicht nachgewiesen werden können.

5.3.2.2 Genotypinduzierte Genregulation

Auf der Basis des genomweiten Microarray-Experiments wurden 3378 Gene identifiziert, deren Expression vom NOD2 Genotyp abhängig war.

Die große Anzahl der genotypregulierten Gene lässt sich mit dem Modell der Aktivierung durch Oligomerisierung erklären. Da auch ohne Liganden immer eine bestimmte Rate von Autooligomerisation auftritt, ist die basale Aktivität auch von der Abundanz der NOD2 Moleküle abhängig. Transfiziert man NOD2 in steigenden Konzentrationen, steigt auch die NF- κ B-Aktivität. Dies führt zu einer erhöhten basalen Aktivierung bei Überexpression, die für viele Gene die mögliche Expressionsregulation bereits ausschöpft. Solche Gene sind durch MDP nicht mehr stark induzierbar und erreichen daher in der Analyse nach MDP-Regulierbarkeit keine signifikante Expressionsänderung.

Es wurde auch ein Vergleich der Ergebnisse der Proteom-Analyse von Weichart et al. (2006) mit der Gruppe der Genotyp-induzierten Gene durchgeführt. Die 33 Gene, die in beiden Gruppen Signifikanz erreichen, sind allein aufgrund ihres wiederholten Auftretens in einer quantitativen Analyse von besonderem Interesse. Ein genauerer Vergleich von *fold-changes* in den einzelnen Genotypen ist aufgrund unterschiedlicher Datenanalysen nicht sinnvoll durchzuführen. Für einzelne Gene lässt sich aber ein Tendenzvergleich anstellen: Im Microarray ist z.B. Vimentin stark positiv reguliert, dieses Ergebnis findet sich auch in der Proteom-Analyse. Auch die stark negative Regulierung von *heat shock protein 70* stimmt in beiden Arbeiten überein.

5.3.2.3 MDP-induzierte Genexpression und Dysfunktion der L1007fsinsC-Mutante

Nur im NOD2wt wurden MDP-induzierte Cluster gefunden. Weder in der L1007fsinsC Mutation noch in der Kontrolle waren MDP-induzierte Gencluster zu finden, was für eine essentielle Rolle von NOD2 in der MDP-Erkennung spricht. Die beschriebene Erkennung von MDP durch NALP3 (Martinon et al. 2004) hat in HEK-293 Zellen keine Bedeutung, da NALP3 nicht exprimiert wird. Weitere mögliche Interaktionspartner von MDP wie Calreticulin (Chen et al. 2005) konnten ebenfalls nicht bestätigt werden.

Für NOD2wt und L1007fsinsC ist in der Literatur eine ähnlich hohe basale NF- κ B-Aktivität berichtet (Chamaillard et al. 2003; Tanabe et al. 2004). Deswegen war es unerwartet, dass in der vorliegenden Arbeit die L1007fsinsC-Variante im unstimulierten Zustand dem Expressionsmuster der Kontrolle deutlich ähnlicher war als dem Wildtyp. Auch mit MDP-Stimulation waren nur wenige Änderungen der Genexpression zu verzeichnen, die sich bei weiterer Anwendung von Selektionskriterien nicht bestätigen ließen. Allerdings zeigt sich in der einzigen Arbeit, die ebenfalls Microarrays mit diesen

beiden NOD2-Varianten durchführte, ein vergleichbares Ergebnis: in primären L1007fsinsC-homozygoten Monozyten war die MDP-Antwort im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert (Li et al. 2004). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten an primären Monozyten verifiziert werden. Dieser Vergleich spricht für die physiologische Richtigkeit der verminderten L1007fsinsC-Reaktivität. Bei starker Überexpression lässt sich aber auch die basale Aktivität von L1007fsinsC steigern, dadurch sind vermutlich die abweichenden Ergebnisse von Chamaillard et al. (2003) und Tanabe et al. (2004) zu erklären.

5.3.3 NOD2 abhängige Gene

5.3.3.1 Chemokine

In NOD2wt-Zellen führte die MDP-Stimulation zur Hochregulierung einiger Chemokine mit proinflammatorischer und chemotaktischer Wirkung. Interleukin-8 (CXCL8) ist gut bekannt als parakriner Lockstoff für Neutrophile. IL-8, MIP2 α (CXCL2, *macrophage inflammatory protein 2*), MIP2 β (CXCL3) und GCP2 (CXCL6, *granulocyte chemotactic protein 2*) haben möglicherweise redundante Funktionen, da sie alle an denselben Rezeptor CXCR1 binden. Zusätzlich können IL-8 und GCP2 auch an den CXCR2 binden (Matityahu et al. 2002). Von all diesen Chemokinen ist bekannt, dass sie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hochreguliert sind (Autschbach et al. 2002; Banks et al. 2003). Für GCP2 war bisher noch keine Abhängigkeit von NOD2 beschrieben. Von der Wirkungsweise von GCP2 bei Morbus Crohn ist aber ein differenzierteres Bild bekannt. GCP2 wird selektiv in Endothelzellen des entzündeten intestinalen Gewebes von Crohn-Patienten exprimiert. Die endotheliale Expression von GCP2 ist hier beschränkt auf verletzte und abheilende Regionen des Epithels (Gijsbers et al. 2004). Diese Ergebnisse deuten auf eine differenzierte und sich wechselseitig ergänzende Funktion der verschiedenen Chemokine im Krankheitsverlauf.

Unter den genotypregulierten Genen finden sich in NOD2wt-Zellen negativ reguliert das Chemokin SDF1 (*stromal cell derived factor 1*; CXCL12) und positiv reguliert sein Rezeptor, CXCR4. SDF1 ist effizienter Lockstoff für Lymphozyten. Smith et al. (2005) zeigen aber auch, dass SDF1 durch den Rezeptor CXCR4 die Migration von intestinalen Epithelzellen steuert und die Wundheilung der Mucosa fördert. Dadurch wird die Barrierefunktion gegen Pathogene wiederhergestellt.

Bis auf SDF1 sind alle erwähnten Chemokine in NOD2wt-Zellen positiv reguliert. Die Beispiele zeigen, dass nicht nur die primäre proinflammatorische Reaktion von den Chemokinen gesteuert wird, sondern auch Heilung und Regeneration der Mucosa nach einem bakteriellen Angriff. Auch hier könnte ein weiterer Faktor zur Begünstigung permanenter Entzündungen in der L1007fsinsC Variante liegen: Wenn die Regeneration der Mucosa nicht organisiert wird, sind weitere bakterielle Angriffe eher erfolgreich und können zu einem chronischem Problem werden.

5.3.3.2 MAP Kinasen

Die Beteiligung der MAP Kinasen ERK 1/2 (MAPK1 *mitogen-activated protein kinase 1*) und p38 in NOD2-Signaltransduktion ist bereits mehrfach beschrieben worden (Pauleau und Murray 2003; Martinon et al. 2004; Kobayashi et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden diese MAP Kinasen nicht gefunden, aber etliche andere in der MAP Kinasen-Kaskade beteiligte Proteine.

Ein interessantes Gen der MAP Kinasen-Kaskade ist im NOD2wt nach MDP-Stimulation positiv reguliert: TPL2 (*tumor progression locus-2*) oder synonym COT (MAP3K8). Die Rolle von TPL2 in der angeborenen Immunität wird schon seit einigen Jahren diskutiert, nachdem der Einfluss von TPL2 auf die LPS induzierte Sekretion von $\text{TNF}\alpha$ bekannt wurde (Dumitru et al. 2000). TPL2 defiziente Mäuse zeigen nach Stimulation mit LPS keine ERK-Aktivierung, die Aktivierung der anderen MAP Kinasen bleibt intakt. Der Verlust der ERK-Aktivierung führt zu einer geringeren $\text{TNF}\alpha$ Induktion.

Jüngst sind zwei Arbeiten erschienen, die zeigen, dass die Sekretion von IL-12 p40, das die Immunantwort in Richtung Th1 reguliert, in ERK oder TPL2 defizienten Zellen stark erhöht ist. Die ERK-Aktivierung nach Infektion mit *Helicobacter hepaticus* benötigt sowohl die p50/p105 Untereinheit von NF- κ B (NFKB1 *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)*) als auch TPL2 (Tomczak et al. 2006). Ist dieser Signalweg unterbrochen, wird vermehrt IL-12 p40 produziert. In TPL2 defizienten Mäusen wurde nach bakterieller Infektion eine nach Th1 polarisierte Immunantwort festgestellt (Sugimoto et al. 2004).

Geht man von der Vermutung aus, dass TPL2 in der Signaltransduktion von NOD2 eine ähnliche Rolle spielt, könnte in der fehlenden TPL2 Induktion der L1007fsinsC-Mutation ein weiterer Baustein zur Entstehung von Morbus Crohn liegen: Morbus Crohn ist gekennzeichnet durch eine überschießende Th1-Immunantwort. Die fehlende Induktion des Negativregulators TPL2 könnte das Signalgleichgewicht in Richtung Krankheit verschieben.

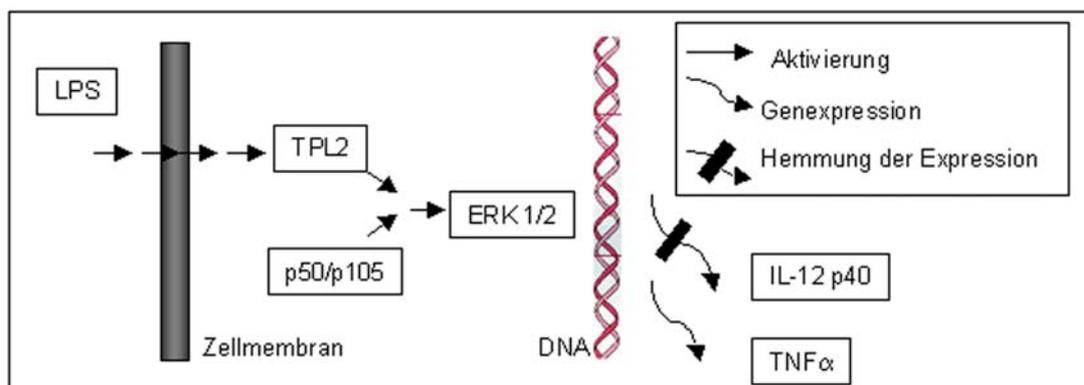


Abbildung 5.1: Funktion von TPL2 in der LPS-induzierten Immunantwort.

(nach Tomczak et al. 2006 und Sugimoto et al. 2004)

ERK 1 / 2: *mitogen activated kinase 1*; IL-12 p40: Interleukin-12 Untereinheit 40 kD;

LPS: Lipopolysaccharid; p50/p105: NF- κ B Untereinheit 105 kD; TNF α : *tumor necrosis factor* α ;

TPL2: Tumor progression locus-2.

Auffällig ist auch die starke positive Regulation von JUN (*v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog*) nach MDP Stimulation in NOD2wt-Zellen. JUN ist Bestandteil des heterodimeren Transkriptionsfaktors AP1. JUN wird klassischerweise von JNK aktiviert. Eventuell zeigt diese Regulation, dass auch die MAP Kinase JNK eine Rolle in der NOD2 Signaltransduktion spielt.

Ebenso in Cluster 1 (Abbildung 4.7) vertreten sind zwei Inhibitoren der MAP Kinasen: DUSP1 und DUSP16 (*dual specificity phosphatases 1 and 16*). Obwohl sie als Kinasen zur vollen Aktivierung der MAP Kinasen beitragen, ist ihre Phosphatasefunktion, die zur Deaktivierung der MAP Kinasen führt, besser untersucht und für inflammatorische und cancerogene Vorgänge entscheidend. DUSP16 wird selber durch ERK phosphoryliert und inhibiert daraufhin JNK und p38 (Masuda et al. 2003). Für DUSP1 ist bereits eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität belegt. So zeigten zwei Arbeitsgruppen (Hammer et al. 2006; Salojin et al. 2006) dass DUSP1 ein essentieller endogener Regulator der inflammatorischen Antwort auf LPS ist. DUSP1 defiziente BMDMs (*bone marrow derived macrophages*) zeigten längere p38 Aktivierung und eine erhöhte Cytokinproduktion. Unter diesen Cytokinen ist auch das antiinflammatorische IL-10, das durch die verlängerte p38-Aktivierung vermehrt produziert wird. Trotzdem sind DUSP1 defiziente Mäuse aufgrund der ungehemmten IL-6 Produktion hochempfindlich gegen Endotoxinschocks (Chi et al. 2006).

Mit DUSP1 und DUSP16 sind zwei weitere negative Regulatoren der inflammatorischen Antwort MDP-abhängig hochreguliert.

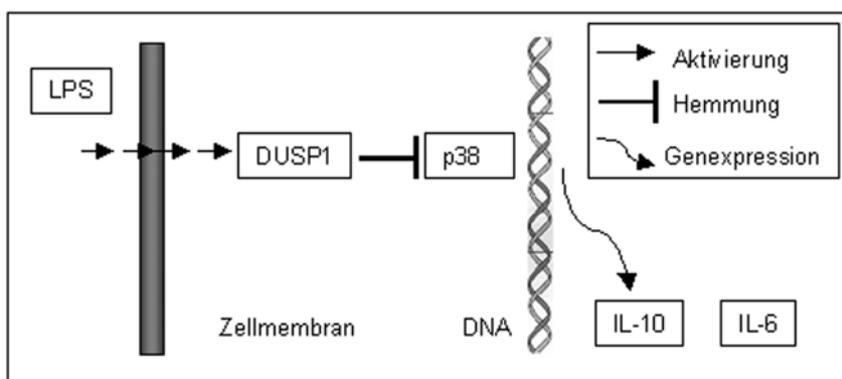


Abbildung 5.2: Hemmende Funktion von DUSP1 auf die p38 Aktivität nach LPS-Stimulation. (nach Hammer et al. 2006; Salojin et al. 2006 und Chi et al. 2006)
 DUSP1: *dual specificity phosphatase 1*; IL-6: Interleukin 6; IL-10: Interleukin 10; LPS: Lipopolysaccharid; p38: p38 MAP Kinase.

5.3.3.3 Hinweise auf NOD2-abhängige T-Zell-Aktivierung

5.3.3.3.1 4-1BB

Ein stark positiv MDP-reguliertes Gen in Cluster 1 (Abbildung 4.7) ist 4-1BB (TNFRSF9, *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9*, CD137). 4-1BB wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen exprimiert und fungiert dort als costimulatorischer Rezeptor. In der hier vorliegenden Arbeit wird die Expression von 4-1BB als NOD2-abhängig beschrieben, die Expressionsinduktion konnte in primären Monozyten bestätigt werden.

Interessant ist, dass 4-1BB bereits im Zusammenhang mit Morbus Crohn untersucht wurde. Maerten et al. (2004) berichten, dass die Menge von 4-1BB mRNA in entzündetem Gewebe von Morbus Crohn Patienten im Vergleich zu Proben von Normalkontrollen und Ulzerativer Colitis Patienten erhöht war. Eine andere Arbeitsgruppe beschreibt, dass agonistischer Anti-4-1BB Antikörper eine experimentell induzierte Colitis in Mäusen verbessern kann, indem die Produktion von IL-2 vermindert und die Anzahl der regulatorischen T-Zellen erhöht wird (Lee, Lee et al. 2005). Eine dritte Arbeitsgruppe beobachtete eine erhöhte Anfälligkeit von 4-1BB defizienten Mäusen gegen Infektionen mit *Listeria monocytogenes*. Eine Vorbehandlung mit agonistischem Anti-4-1BB dagegen führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer erhöhten Resistenz gegen *L. monocytogenes* (Lee, Ju et al. 2005). 4-1BB scheint also eine wichtige Funktion in der Pathogenabwehr zu haben, eine Funktion, die in den L1007fsinsC-mutierten Zellen nicht in gleichem Maße genutzt werden kann.

5.3.3.3.2 Immunophiline

Immunophiline sind Enzyme, die als Peptidyl-Prolyl-*cis/trans* Isomerasen (PPlasen) fungieren. Während die normale Peptidbindung fast ausschließlich in der planaren *trans*-Konformation vorliegt, ist am cyclischen Prolin auch die abgewinkelte *cis*-Konformation stabil. Aufgrund dieser einzigartigen Eigenschaft ist Prolin maßgeblich an der sekundären Strukturierung von Proteinen beteiligt. Die enzymatische Änderung der *cis/trans*-Konformation ist geeignet, die Aktivität von Proteinen zu regulieren (Edlich und Fischer 2006).

Die vorliegenden Microarray-Ergebnisse zeigen, dass fünf dieser PPlasen genotypabhängig reguliert sind: Cyclophilin A (PPIA, *peptidyl-prolyl isomerase A*) ist im NOD2wt positiv reguliert, ebenso PPIG (*peptidyl-prolyl isomerase G* (cyclophilin G)) und PIN4 (*peptidyl-prolyl cis/trans isomerase*) *NIMA-interacting, 4* (*parvulin*)), PPIL6 (*peptidyl-prolyl isomerase (Cyclophilin)-like 6*) und ITFG1 (*T-cell immunomodulatory protein*) sind negativ reguliert.

Cyclophilin A wird bei inflammatorischen Stimuli von der Zelle sekretiert und wirkt als Chemoattraktant für Neutrophile und Eosinophile. Das Immunsuppressivum Cyclosporin A wirkt durch Hemmung von Cyclophilin A. Cyclophilin A interagiert mit Emmprin (CD147) und führt über diesen Signalweg zur Aktivierung von ERK (Yurchenko et al. 2002). Cyclophilin A wurde auch in der Proteomanalyse als signifikant NOD2-abhängig reguliert erkannt (Weichart et al. 2006).

Über die anderen genannten Proteine ist wenig bekannt, aber die PPIasen werden als wichtiger Faktor bei der Aktivierung von T-Zellen angesehen. Auch hier könnte sich eine Verbindung zwischen dem NOD2-Signalweg und der Entzündungsregulation durch das adaptive Immunsystem ergeben.

5.3.3.4 Weitere positiv-regulierte entzündungsinduzierende Gene

NF- κ B-Aktivierung führt nicht nur zu Chemokinsekretion, sondern auch zur Induktion von Prostaglandinen und Leukotrienen. Über diese kurzlebigen Botenstoffe wird z.B. die Vasodilatation in den entzündeten Bereichen reguliert. Schlüsselenzym zur Produktion dieser Botenstoffe ist COX2 (PTGS2, *prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)*). Auch dieses Enzym ist in dem vorliegenden Microarray im stimulierten Wildtyp stark hochreguliert.

PTX3 (*Pentraxin –related gene, rapidly induced by IL-1 β*) gehört zur Pentraxin Superfamilie, zu der auch CRP (*C-reactive Protein*) und SAP (*serum amyloid P component*) zählen. Diese sogenannten *acute-phase* Proteine werden kurzfristig als Antwort auf Entzündungssignale sekretiert und sind dann im Blut nachweisbar. PTX3 defiziente Mäuse sind empfindlicher gegen Infektionen mit *Aspergillus fumigatus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella typhimurium*. Man nimmt derzeit an, dass PTX3 als Opsonin fungiert und die Pathogene so dem Angriff von Monozyten und Makrophagen zugänglich macht (Bottazzi et al. 2006). PTX3 wurde auch in Microarrays als proinflammatorisches Gen identifiziert, das als Teil des Aktivierungsprogramms von primären Makrophagen bei Stimulation mit verschiedenen Bakterien positiv reguliert wird (Nau et al. 2002). Laut Han et al. (2005) kann die PTX3-Induktion durch Inhibition von JNK verhindert werden, nicht aber durch NF- κ B-Inhibitoren.

5.3.3.5 Verbindung zu anderen Signalwegen

BMP2 (*bone morphogenetic protein 2*) gehört zur TGF β Superfamilie. Die Signaltransduktion findet über zwei Rezeptortypen statt, BMPRI und BMPRII. BMP2 bindet kooperativ an beide Rezeptoren, die wiederum SMAD1 (*SMAD, mothers against DPP homolog 1 (Drosophila)*) phosphorylieren. SMAD1 bildet einen heterodimeren Komplex mit SMAD4, und dieser Komplex führt im Nukleus zu spezifischer Genaktivierung. BMP2 ist bereits als Tumor-Suppressor für Colon-Karzinome im Interesse der Forschung. Sowohl BMP2 als auch seine Rezeptoren Typ I und II werden von IECs exprimiert. Die Wirkung von BMP2 ist antiproliferativ und fördert die Differenzierung der Zellen (Hardwick et al. 2004). Eine andere Arbeit zeigt, dass eine *H. pylori*-Infektion der Magenschleimhaut zu erhöhter BMP2-Sekretion führt (Bleuming et al. 2006).

BMP2 ist in NOD2wt-Zellen stark durch MDP induzierbar, und dieses Ergebnis konnte auf PBMCs verifiziert werden (Abbildung 4.10). BMPRII (*bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)*) ist im NOD2wt Genotyp positiv reguliert, dagegen im L1007fsinsC leicht negativ. Durch die Veränderung im BMP2-Signalweg kommt es möglicherweise zu histologischen Veränderungen der Mucosa bei bakteriellen Infektionen.

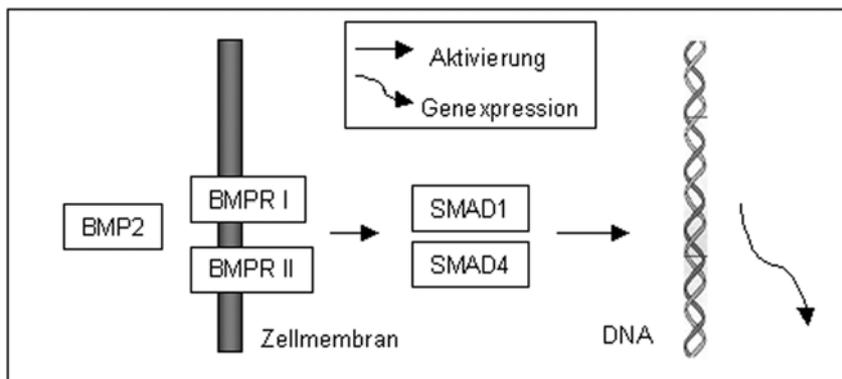


Abbildung 5.3: Der BMP2 Signalweg.

(nach Hardwick et al. 2004)

BMP2: *bone morphogenetic protein 2*; BMPR *bone morphogenetic protein receptor*; SMAD : SMAD, mothers against DPP homolog.

Stark genotypabhängig reguliert ist auch IFI16 (*interferon, gamma-inducible protein 16*). In NOD2wt-Zellen ist IFI16 positiv, dagegen in der L1007fsinsC-Variante negativ reguliert. Klassischerweise ist die Expression von IFI16, wie der Name sagt, durch Interferon gamma induzierbar. IFI16 trägt eine Pyrin-Domäne wie die NALP-Proteine und interagiert mit p53. Über diese Interaktion kann IFI16 den Zellzyklus unterbrechen und die Zellen in der G-0 Phase festhalten (Gugliesi et al. 2005).

Einzigster Vertreter mit CARD-Domäne unter den genotypregulierten Genen ist CARD8 (*tumor up-regulated CARD-containing antagonist of caspase nine*). CARD8 oder synonym TUCAN oder CARDINAL ist im NOD2wt-Genotyp positiv reguliert, im L1007fsinsC-Genotyp dagegen fast nicht reguliert im Vergleich zur Kontrolle.

CARD8 ist bekannt für seine inhibierende Wirkung auf den mitochondrialen Apoptoseweg über APAF1 und Caspase-9 (Pathan et al. 2001). Den NF- κ B-Signalweg kann CARD8 über eine direkte Interaktion mit NEMO (IKK γ) inhibieren (Bouchier-Hayes et al. 2001). Aber CARD8 zeigt auch Interaktionen mit anderen Proteinen mit CARD- oder NOD-Domäne. So interagiert CARD8 mit Caspase-1 und den Caspase-1 Inhibitoren ICEBERG (*caspase-1 inhibitor*) und pseudo-ICE (COP1, *caspase-1 dominant negative inhibitor*) (Razmara et al. 2002) und kann so das Prozessieren von IL-1 β beeinflussen. Eine weitere Einflussnahme auf diesen Signalweg ist durch Interaktion der FIIND-Domäne von CARD8 mit den NOD-Domänen von NALP2 und NALP3 gegeben. Durch diese Interaktion kann CARD8 ein Bestandteil des NALP3-Inflammasoms werden und die IL-1 β Sekretion fördern (Agostini et al. 2004).

Welche Rolle CARD8 in der NOD2 induzierten Signaltransduktion hat, lässt sich aufgrund dieser teils widersprüchlichen Ergebnisse nicht genau eingrenzen. CARD8 ist ein vielfältiges Adaptorprotein, das die NOD2-Antwort sowohl für den NF- κ B-Signalweg als auch für die IL-1 β Sekretion modulieren kann.

5.3.3.6 Hitzeschock-Proteine

Unter den im Genotyp regulierten Genen ist HSP70 (HSPA1, *heat-shock 70-KD Protein*) eines der am stärksten negativ regulierten. Diese Beobachtung deckt sich mit denen der Proteomanalyse von Weichart et al. (2006), wo HSP74 (HS74, *heat-shock 70-KD Protein 4*) in den NOD2 Zelllinien herabreguliert war.

Zwar ist bekannt, dass Hitzeschock-Proteine oft unspezifisch auf die Transformation von Zellen reagieren, im Falle der NOD-Proteine gibt es aber Hinweise, dass ein funktioneller Bezug zur Signaltransduktion besteht. Für pflanzliche Resistenzgene ist beispielsweise nachgewiesen, dass HSP90 essentiell ist für ihre Rezeptorfunktion (Schulze-Lefert 2004). Auch für TLRs ist bekannt, dass sie auf sekretierte HSPs aus Pathogenzellen oder lysierten Nachbarzellen reagieren (Takenaka et al. 2004). In der Arbeit von Hahn (2005) ist eine Interaktion von NOD1 mit HSP70 und HSP90 und dem Co-Chaperon CHP-1 beschrieben. Hahn erwägt für die Chaperone eine analoge Rolle zu den pflanzlichen R-Genen: die Komplexierung mit den Chaperonen sorgt nicht nur für eine korrekte Faltung des Proteins, sondern im weiteren auch für ein Verhindern vorzeitiger Oligomerisation. Erst mit Bindung des Pathogenliganden wird der Chaperonkomplex aufgelöst und die Signaltransduktion eingeleitet. Eine direkte Verbindung von negativ regulierter HSP70-Produktion im NOD2wt zu einer veränderten Aktivität von NOD2 lässt sich nicht unmittelbar herstellen. Dennoch ist die Veränderung der HSP70-Expression ein möglicher Hinweis auf eine funktionelle oder physische Interaktion, die z.B. über Immunpräzipitation gezeigt werden könnte.

5.3.3.7 Vergleich mit Pathogen-induzierten Aktivierungsprogrammen

Über die bakteriell induzierte transkriptionelle Antwort verschiedener Zelltypen ist bereits umfangreich geforscht worden. So veröffentlichten Nau et al. (2002) ein Makrophagen-Aktivierungsprogramm, das auf der Stimulation von primären humanen Makrophagen mit verschiedenen Bakterien beruht. Dieses Aktivierungsprogramm zeigt etliche Überschneidungen mit den hier vorgestellten NOD2-induzierten Expressionsänderungen. Folgende Gene finden sich in beiden Stimulationen: IL-8, CXCL2, CXCL3, DUSP1, NFKBIA, COX2, PTX3, IER3, TNFAIP3 und TNFRSF9. Ähnliche Überschneidungen finden sich bei der durch invasive *Shigella flexneri* in Caco-2 Zellen induzierten Expressionsänderungen. Hier werden z.B. Amphiregulin, IL-8, CXCL2, CXCL3, TNFAIP3, IER3, COX2 und JUN genannt (Pedron et al. 2003). Inwieweit hier NOD2 und TLRs redundant oder kumulativ aktiviert werden, lässt sich anhand der Microarrays nicht entscheiden. Trotz der Annahme eines generellen Aktivierungsprogrammes sind darüber hinaus die spezifischen Effekte jeder Pathogenspezies zu beachten.

5.3.3.8 Negative Regulatoren der NF- κ B-Antwort und mögliche Pathogentoleranz

Die Hochregulation proinflammatorischer Gene wie den Chemokinen im NOD2wt, aber nicht in der L1007fsinsC-Mutante, trägt nicht zur Erklärung des Paradoxons von Morbus Crohn bei: Wieso wird eine chronische Entzündung ausgelöst durch eine Mutante mit Defizienz in der entzündlichen

Signaltransduktion? In dieser Hinsicht bedenkenswerter ist die Gruppe der Gene, die Entzündungssignale beenden. In diesem Microarray wurden im NOD2wt eine Anzahl solcher Gene hochreguliert:

I κ B α (NFKBIA) wird beim Beginn der NF- κ B-Signaltransduktion abgebaut und muss durch Neutranslation ersetzt werden, um das Signal abzuschalten.

IEX1 (IER3) ist ebenfalls als negativer Regulator der NF- κ B-Antwort bekannt, ein Mechanismus besteht in der Hemmung der I κ B α -Degradierung (Arlt et al. 2003). Aber die Funktion von IEX1 ist komplex, es wurden einige Arbeiten über pro- und antiapoptotische Sensitivierung durch IEX1 veröffentlicht. So ist z.B. trotz der negativen Regulierung der anti-apoptotischen Signalwege von NF- κ B und AKT1 (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) auch eine Hemmung von Apoptose in aktivierten T-Zellen durch IEX1 bekannt (Kruse et al. 2005).

Weiterhin zählt zu dieser Gruppe auch A20, das nachfolgend diskutiert wird.

5.3.4 A20 als negativer Regulator der MDP-Antwort

Die Gruppe der Negativregulatoren der inflammatorischen Antwort bildet einen auffälligen Anteil im Cluster 1 (Abbildung 4.7). Sie sind hochsignifikant und MDP induzierbar. Dies legt die Hypothese nahe, dass die negative Regulation von NF- κ B eine sekundäre, aber wichtige physiologische Funktion von NOD2 darstellt. Eventuell wird auf diesem Wege eine gewisse Toleranz gegen Bakterien aufrechterhalten, analog zur bekannten Endotoxin-Toleranz der TLRs. Aus diesem Grunde wurde A20 (TNFAIP3, *tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3*) als Mitglied dieser Gruppe genauer untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde A20 als NOD2 induziertes Gen erkannt. Daraufhin wurde die Wirkung von A20 auf die MDP induzierte inflammatorische Antwort eingehend untersucht und eine negative Regulierung festgestellt. Es stellt sich nun die Frage, an welcher Stelle des Signalweges und mit welchem Mechanismus A20 in den NOD2-Signalweg eingreift.

A20 ist bekannt als negativer Regulator der NF- κ B-Antwort. Mehrere mögliche Mechanismen der Hemmung wurden bereits publiziert. So wurden z.B. A20, NEMO und RIP zusammen mit dem p55 TNF-Rezeptorkomplex präzipitiert (Zhang et al. 2000). Die Bindung von überexprimiertem A20 an den Rezeptorkomplex führte zu geringerer I κ B-Kinaseaktivität.

Wie komplex die Interaktion von A20 und RIP bei TNF α induzierter Aktivierung ist, wird aus einer anderen Arbeit deutlich: A20 hat hier eine duale Funktion als Ubiquitin editierendes Enzym. Zuerst werden die Lys63 verknüpften Ubiquitinreste von RIP deubiquitiniert, diese Reaktion wird von der N-terminalen OTU-Domäne von A20 vermittelt. Danach katalysiert A20 mit seinen C-terminalen Zink-Finger-Domänen eine Lys48 verknüpfte Ubiquitinierung von RIP. Durch diese Lys48 Ubiquitinierung wird RIP proteasomal abgebaut und damit die inflammatorische Antwort unterbrochen (Wertz et al. 2004).

Durch die Arbeit von Boone et al. (2004), die die Rolle von A20 in der TLR-Antwort untersucht haben, wurde klar, dass die OTU-Domäne von A20 auch TRAF6 deubiquitiniert und damit inaktiviert. A20 defiziente Mäuse entwickeln spontan schwere Entzündungen und können die TLR-Antwort nicht wieder abschalten (Boone et al. 2004). Interessanterweise ist aber das Phänomen der Endotoxin-Toleranz (LPS-Vorstimulation vermindert die inflammatorische Antwort einer nachfolgenden Stimulation) in den A20 defizienten Zellen nicht beeinträchtigt. Dies zeigt, dass A20 nicht der einzige negativ regulierende Faktor sein kann.

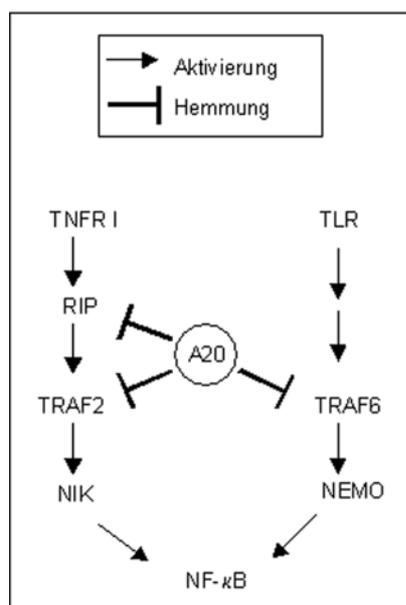


Abbildung 5.4: Bekannte Deaktivierungsziele von A20. (nach Boone et al. 2004; Wertz et al. 2004 und Zhang et al. 2000) NEMO: *NF-κB essential modulator*; NIK: *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14*; TLR: *toll-like-receptor*; TNFR I: *TNF α Rezeptor 1, p55*; TRAF: *TNF receptor-associated factor*; RIP: *receptor interacting serine-threonine kinase*.

Auch im NOD2 Signalweg ist bereits eine Beteiligung von Ubiquitinierungsreaktionen gezeigt worden: Aktiviertes RIP2 induziert eine Lys63 Ubiquitinierung von NEMO, die notwendig ist um die volle Aktivierung des IKK-Komplexes zu erreichen (Abbott et al. 2004). Diese Reaktion kann durch die Überexpression von CYLD (*cylindromatosis (turban tumor syndrome)*), einem Protein mit deubiquitinierender Funktion, inhibiert werden.

CYLD ist in der vorliegenden Arbeit im NOD2wt schwächer exprimiert als in der Kontrolle. Bei IBD-Patienten wurde eine Herunterregulierung von CYLD festgestellt (Costello et al. 2005). Eventuell ist auch dieses Protein ähnlich wie A20 an der Modulation der NOD2-Antwort beteiligt.

Die Ergebnisse der hier durchgeführten NF-κB-Luciferase Assays zeigten eine starke Hemmung der NOD2-Antwort durch A20. Sowohl essentiell für den NOD2-Signalweg und aus der Literatur als A20-Zielprotein bekannt ist NEMO. Ebenso könnte aber A20, analog zu seiner Wirkung auf RIP, auch RIP2 modulieren. Nicht zuletzt ist auch noch unbekannt, ob NOD2 selbst ubiquitiniert wird. Welches dieser Proteine an der A20-vermittelten Regulierung der NOD2-Signaltransduktion beteiligt sein könnte, bleibt Ziel weiterer Untersuchungen.

6 Ausblick

Durch die Microarrayergebnisse sind den bisher bekannten NOD2-Wirkungen zahlreiche neue Aspekte hinzugefügt worden. Dabei wurde in der Diskussion besonderes Augenmerk auf Gene gelegt, die möglicherweise mit Entzündungsregulation in Zusammenhang stehen. Ebenso kann man aber in den Ergebnissen die zahlreichen Gene untersuchen, deren Funktion in der Regulation oder Einhaltung von Zellkontakten liegt. Eine weitere Gruppe von regulierten Genen stammt aus dem Bereich der DNA-Reparatur und der Regulation von Zellzyklus und Apoptose. Nicht zuletzt kann sich in den noch nicht weiter beschriebenen Sequenzen der ESTs ein wichtiger Regulator der Entzündungsfunktionen von NOD2 verbergen.

Unter den diskutierten Ergebnissen fällt auf, dass einige Proteine eine abheilende und proliferative Funktion einnehmen können (BMP2, GCP2, CXCR4), oder aber generell antiinflammatorisch wirken (DUSP1, A20, IER3, IKB α). Diese Auswirkungen der NOD2-Antwort könnte eine Verknüpfung zur Ätiologie von Morbus Crohn enthalten.

Letztendlich sind die Ergebnisse der Microarrays erst zu beurteilen, wenn eine Bestätigung für die einzelnen Gene auf Proteinebene stattgefunden hat. Auch bei plausiblen Microarrays wird immer ein gewisser Anteil der Ergebnisse auf zufälligen Effekten und unbekanntem Ursachen beruhen. Der Nachweis der funktionellen Interaktion des A20-Proteins mit der NOD2 induzierten NF- κ B-Antwort ist daher Voraussetzung für eine weitere Untersuchung dieser negativ-regulatorischen Wirkung von NOD2.

7 Zusammenfassung

NOD2 ist ein cytosolischer Rezeptor des angeborenen Immunsystems, der den Bestandteil der Bakterienzellwand Muramyl-dipeptid (MDP) erkennt. Mutationen von NOD2 sind assoziiert mit erhöhter Suszeptibilität für Morbus Crohn, Sarkoidose (early onset sarcoidosis), Blau Syndrom, Asthma, Atopischem Ekzem und Colonkarzinom. Die Beschreibung der von NOD2 aktivierten Signalwege und deren genauer Regulation hat daher große Bedeutung für das Verständnis der Pathophysiologie dieser Erkrankungen.

Ein genereller Mechanismus bei der Steuerung von Signalwegen ist die Phosphorylierung der beteiligten Proteine. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Phosphorylierung von NOD2 untersucht. Eine Phosphorylierung des Serin 116 von NOD2 wurde massenspektrometrisch nachgewiesen.

Ebenso von grundlegender Bedeutung für das funktionelle Verständnis ist das genaue Wissen über die Lokalisation von NOD2 in der Zelle. Das Bild von der freien cytosolischen Lokalisation von NOD2 ist durch eine jüngere Veröffentlichung (Barnich, Aguirre et al. 2005) in Frage gestellt worden. Mittels subzellulärer Proteinfractionierung wurde die These einer Membranassoziation überprüft. Für endogenes NOD2 konnte eine Membranlokalisation nicht bestätigt werden.

Hauptteil der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der transkriptionellen Aktivität von NOD2^{wt} und der Morbus Crohn assoziierten Variante NOD2-L1007fsinsC mittels genomweiter Microarrays. Zur Optimierung der Vergleichbarkeit wurden stabile Zellen mit identischer Lokalisation des genomischen Inserts generiert. Dies wurde ermöglicht durch Einsatz von FLP-Rekombinase und Zellen mit integriertem FRT-*site* nach dem FLP-In-System (Invitrogen). Nach Stimulation mit MDP wurde aus den Zellen isolierte RNA zur Hybridisierung von HG-U133Plus 2.0 Microarraychips von Affymetrix eingesetzt und so das Transkriptom der Zellen quantifiziert.

Die Auswertung der Microarrayversuche ergab zwei Gruppen von Genen:

1. 3378 Gene, die bereits aufgrund ihres veränderten Genotyps differentiell zur Kontrolle exprimiert wurden.
2. 294 Gene, deren Expression innerhalb eines bestimmten Genotyps durch MDP-Stimulation variiert werden konnte.

Die große Zahl der Gene in Gruppe 1 ist möglicherweise durch Autoaktivierung von NOD2 aufgrund der Überexpression erklärbar. Plausibel erscheint dies auch dadurch, dass Gruppe 2 fast vollständig eine Teilmenge von Gruppe 1 ist.

Die Microarrayergebnisse wurden für 10 Gene durch Taqman *real-time* PCR mit sehr guter Übereinstimmung bestätigt. Für fünf Gene wurde die Stimulation auf primären Zellen von L1007fsinsC homozygoten Patienten wiederholt und mit Taqman *real-time* PCR überprüft, auch hier fand sich eine

Bestätigung der Microarrayergebnisse. Auf Proteinebene wurde der Negativregulator des NF- κ B-Signalweges A20 bestätigt und ein funktioneller Zusammenhang zur NOD2-Aktivierung gezeigt.

Entsprechend dem bisherigen Kenntnisstand über die Rezeptorfunktion von NOD2 konnte die differentielle Regulation zahlreicher NF- κ B aktivierbarer Entzündungsgene gezeigt werden. Aus diesem Funktionsbereich sind die Chemokine CXCL8, CXCL2, CXCL3 und CXCL6, aber auch COX2 und PTX3 zu nennen.

In der MDP-abhängig regulierten Gruppe finden sich Gene, deren erhöhte Expression bei Morbus Crohn bereits publiziert ist, deren NOD2-Abhängigkeit aber noch unbekannt war. Hierzu zählen 4-1BB und GCP-2.

Weiterhin finden sich Gene, deren Funktion in der angeborenen Immunität bereits diskutiert wird, deren Induzierbarkeit durch MDP aber bisher unbekannt war. So sind TPL2 und DUSP1 in ihrer Funktion bei der LPS-Antwort von Zellen untersucht, ihre Reaktion auf MDP dagegen wurde noch nicht beschrieben.

Interessant für die weitere Funktionsaufklärung von NOD2 sind auch Gene, die eine Verbindung zur Regulation der adaptiven Immunantwort schaffen. Hier wurde neben 4-1BB die Gruppe der Immunophiline mit fünf in den Microarrayergebnissen regulierten Vertretern diskutiert.

Als am stärksten reguliertes Gen der Genotypgruppe zeigte sich HSP70. Da bereits für die pflanzlichen R-Gene eine Interaktion mit HSP70 bekannt ist und auch für NOD1 eine funktionelle Interaktion beschrieben ist, kann auch für NOD2 eine analoge Funktion als wahrscheinlich angesehen werden.

Auffällig war, dass Negativ-Regulatoren von NF- κ B durch die MDP-Stimulation mit hoher Signifikanz induziert wurden. Neben I κ B α und IEX1 zählt zu dieser Gruppe auch A20. Die Rolle von A20 auf die MDP-induzierte Zellantwort wurde detailliert untersucht. Mit Luciferase-Assays konnte gezeigt werden, dass die NF- κ B-Antwort von NOD2 durch A20 dosisabhängig inhibiert werden kann.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der Microarrayversuche aufgrund der sehr guten Beurteilung der vorgeschalteten Qualitätskontrollen und der sehr guten Ergebnisse in den *real-time* Validierungsversuchen ein hohes Maß an Plausibilität erreichen. Bereits bekannte NOD2 abhängige Gene wurden im Microarray bestätigt. Darüber hinaus wurden zahlreiche Gene identifiziert, deren NOD2-Abhängigkeit bisher unbekannt war. Damit liefert diese Arbeit neue Ansatzpunkte, um die Pathophysiologie von NOD2 weiter zu untersuchen.

Für die L1007fsinsC-Mutation wurde eine generelle Dysfunktion festgestellt. Es wurden keine Gene gefunden, die nur in diesem Genotyp differentiell MDP-abhängig reguliert sind. Dadurch erscheint es unwahrscheinlich, dass die Entstehung von Morbus Crohn durch eine abweichende Funktion dieser Mutation begünstigt wird. Vielmehr wird die Ursache für Morbus Crohn im Wegfall der zahlreichen regulatorischen Leistungen des NOD2-Wildtyps zu suchen sein.

Abstract

NOD2 is an intracellular receptor for the bacterial cell wall component, muramyl dipeptide. Activation of NOD2 induces a complex inflammatory and antibacterial cellular program. Mutations in the leucine-rich repeat region of NOD2, which lead to an impaired recognition of muramyl-dipeptide (MDP), have been genetically associated with chronic inflammatory diseases of barrier organs such as Crohn disease, asthma and atopic eczema. The transcriptomal signature that defines the physiological innate immune responses downstream of NOD2 activation still remains unclear .

Addressing this problem, we tested NOD2 and its Crohn's disease associated mutant NOD2L1007fsinsC expressing cells for transcriptional activation following to stimulation with MDP. Affimetrix HG-U133 plus 2.0 chips have been charged for genomewide mRNA analysis. Significant effects of the NOD2-genotype could be observed on expression of 3378 genes, and expression of 294 genes was MDP responsive. The mutated NOD2 variant showed lower basal activation and was not responsive to MDP.

Within the MDP-dependent genes in the NOD2wt cells was a group of inflammation mediating chemokines (CXCL8, CXCL2, CXCL3, CXCL6). A second noticeable group were genes involved in negativ regulation of NF- κ B response (NFKBIA, IER3, TNFAIP3). For selected genes, these results were verified by using PBMCs of an L1007fsinsC homozygote patient and an wild-type control.

Overexpressed TNFAIP3 (A20) showed a dose dependent negative regulatory effect on MDP elicited NF- κ B activation. This is a evidence for the relevance of A20 regulatory effects in NOD2 signalling. As Morbus Crohn is characterised by elevated NF- κ B activation, the detailed clarification of NF- κ B regulation might contribute to the understanding of etiopathogenesis of Crohn's disease.

8 Literatur

- Abbott, D. W., A. Wilkins, J. M. Asara and L. C. Cantley (2004). "The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitylation of a novel site on NEMO." *Curr Biol* **14**(24): 2217-27.
- Acehan, D., X. Jiang, D. G. Morgan, J. E. Heuser, X. Wang and C. W. Akey (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." *Mol Cell* **9**(2): 423-32.
- Agostini, L., F. Martinon, K. Burns, M. F. McDermott, P. N. Hawkins and J. Tschopp (2004). "NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder." *Immunity* **20**(3): 319-25.
- Arlt, A., M. L. Kruse, M. Breitenbroich, A. Gehrz, B. Koc, J. Minkenberg, U. R. Folsch and H. Schafer (2003). "The early response gene IEX-1 attenuates NF-kappaB activation in 293 cells, a possible counter-regulatory process leading to enhanced cell death." *Oncogene* **22**(21): 3343-51.
- Autschbach, F., T. Giese, N. Gassler, B. Sido, G. Heuschen, U. Heuschen, I. Zuna, P. Schulz, H. Weckauf, I. Berger, H. F. Otto and S. C. Meuer (2002). "Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease." *Virchows Arch* **441**(5): 500-13.
- Banks, C., A. Bateman, R. Payne, P. Johnson and N. Sheron (2003). "Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease." *J Pathol* **199**(1): 28-35.
- Barnich, N., J. E. Aguirre, H. C. Reinecker, R. Xavier and D. K. Podolsky (2005). "Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- κ B activation in muramyl dipeptide recognition." *J Cell Biol* **170**(1): 21-6.
- Barnich, N., T. Hisamatsu, J. E. Aguirre, R. Xavier, H. C. Reinecker and D. K. Podolsky (2005). "GRIM-19 interacts with nucleotide oligomerization domain 2 and serves as downstream effector of anti-bacterial function in intestinal epithelial cells." *J Biol Chem* **280**(19): 19021-6.
- Benjamini, Y. a. H., Y (1995). "Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing." *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B* **57**: 289-300.
- Bleuming, S., L. Kodach, M. Garcia Leon, D. Richel, M. Peppelenbosch, P. Reitsma, J. Hardwick and G. van den Brink (2006). "Altered bone morphogenetic protein signalling in the Helicobacter pylori-infected stomach." *J Pathol*.
- Boone, D. L., E. E. Turer, E. G. Lee, R. C. Ahmad, M. T. Wheeler, C. Tsui, P. Hurley, M. Chien, S. Chai, O. Hitotsumatsu, E. McNally, C. Pickart and A. Ma (2004). "The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses." *Nat Immunol* **5**(10): 1052-60.
- Bottazzi, B., A. Bastone, A. Doni, C. Garlanda, S. Valentino, L. Deban, V. Maina, A. Cotena, F. Moalli, L. Vago, A. Salustri, L. Romani and A. Mantovani (2006). "The long pentraxin PTX3 as a link among innate immunity, inflammation, and female fertility." *J Leukoc Biol*.
- Bouchier-Hayes, L., H. Conroy, H. Egan, C. Adrain, E. M. Creagh, M. MacFarlane and S. J. Martin (2001). "CARDINAL, a novel caspase recruitment domain protein, is an inhibitor of multiple NF-kappa B activation pathways." *J Biol Chem* **276**(47): 44069-77.
- Cario, E., D. Brown, M. McKee, K. Lynch-Devaney, G. Gerken and D. K. Podolsky (2002). "Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium." *Am J Pathol* **160**(1): 165-73.
- Chamaillard, M., D. Philpott, S. E. Girardin, H. Zouali, S. Lesage, F. Chareyre, T. H. Bui, M. Giovannini, U. Zaehring, V. Penard-Lacronique, P. J. Sansonetti, J. P. Hugot and G. Thomas (2003). "Gene-environment

- interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3455-60.
- Chang, L. and M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." *Nature* **410**(6824): 37-40.
- Chen, C. M., Y. Gong, M. Zhang and J. J. Chen (2004). "Reciprocal cross-talk between Nod2 and TAK1 signaling pathways." *J Biol Chem* **279**(24): 25876-82.
- Chen, D., D. E. Texada, C. Duggan, C. Liang, T. B. Reden, L. M. Kooragayala and M. P. Langford (2005). "Surface calreticulin mediates muramyl dipeptide-induced apoptosis in RK13 cells." *J Biol Chem* **280**(23): 22425-36.
- Chi, H., S. P. Barry, R. J. Roth, J. J. Wu, E. A. Jones, A. M. Bennett and R. A. Flavell (2006). "Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2274-9.
- Costello, C. M., N. Mah, R. Hasler, P. Rosenstiel, G. H. Waetzig, A. Hahn, T. Lu, Y. Gurbuz, S. Nikolaus, M. Albrecht, J. Hampe, R. Lucius, G. Kloppel, H. Eickhoff, H. Lehrach, T. Lengauer and S. Schreiber (2005). "Dissection of the inflammatory bowel disease transcriptome using genome-wide cDNA microarrays." *PLoS Med* **2**(8): e199.
- Damiano, J. S., V. Oliveira, K. Welsh and J. C. Reed (2004). "Heterotypic interactions among NACHT domains: implications for regulation of innate immune responses." *Biochem J* **381**(Pt 1): 213-9.
- Dumitru, C. D., J. D. Ceci, C. Tsatsanis, D. Kontoyiannis, K. Stamatidis, J. H. Lin, C. Patriotis, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, G. Kollias and P. N. Tsichlis (2000). "TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway." *Cell* **103**(7): 1071-83.
- Edlich, F. and G. Fischer (2006). "Pharmacological targeting of catalyzed protein folding: the example of peptide bond cis/trans isomerases." *Handb Exp Pharmacol*(172): 359-404.
- Eisen, M. B., P. T. Spellman, P. O. Brown and D. Botstein (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 14863-8.
- Epinat, J. C. and T. D. Gilmore (1999). "Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF-kappaB signal transduction pathway." *Oncogene* **18**(49): 6896-909.
- Gentleman, R. C., V. J. Carey, D. M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A. J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smyth, L. Tierney, J. Y. Yang and J. Zhang (2004). "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics." *Genome Biol* **5**(10): R80.
- Gijsbers, K., G. Van Assche, S. Joossens, S. Struyf, P. Proost, P. Rutgeerts, K. Geboes and J. Van Damme (2004). "CXCR1-binding chemokines in inflammatory bowel diseases: down-regulated IL-8/CXCL8 production by leukocytes in Crohn's disease and selective GCP-2/CXCL6 expression in inflamed intestinal tissue." *Eur J Immunol* **34**(7): 1992-2000.
- Girardin, S. E., I. G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D. J. Philpott and P. J. Sansonetti (2003). "Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection." *J Biol Chem* **278**(11): 8869-72.
- Girardin, S. E., J. P. Hugot and P. J. Sansonetti (2003). "Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing." *Trends Immunol* **24**(12): 652-8.
- Gruhler, A., J. V. Olsen, S. Mohammed, P. Mortensen, N. J. Faergeman, M. Mann and O. N. Jensen (2005). "Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway." *Mol Cell Proteomics* **4**(3): 310-27.
- Gugliesi, F., M. Mondini, R. Ravera, A. Robotti, M. de Andrea, G. Gribaudo, M. Gariglio and S. Landolfo (2005). "Up-regulation of the interferon-inducible IFI16 gene by oxidative stress triggers p53 transcriptional activity in endothelial cells." *J Leukoc Biol* **77**(5): 820-9.

Gutierrez, O., C. Pipaon, N. Inohara, A. Fontalba, Y. Ogura, F. Prosper, G. Nunez and J. L. Fernandez-Luna (2002). "Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation." *J Biol Chem* **277**(44): 41701-5.

Hahn, J. S. (2005). "Regulation of Nod1 by Hsp90 chaperone complex." *FEBS Lett* **579**(20): 4513-9.

Hammer, M., J. Mages, H. Dietrich, A. Servatius, N. Howells, A. C. Cato and R. Lang (2006). "Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock." *J Exp Med* **203**(1): 15-20.

Hampe, J., A. Cuthbert, P. J. Croucher, M. M. Mirza, S. Mascheretti, S. Fisher, H. Frenzel, K. King, A. Hasselmeier, A. J. MacPherson, S. Bridger, S. van Deventer, A. Forbes, S. Nikolaus, J. E. Lennard-Jones, U. R. Foelsch, M. Krawczak, C. Lewis, S. Schreiber and C. G. Mathew (2001). "Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations." *Lancet* **357**(9272): 1925-8.

Han, B., M. Mura, C. F. Andrade, D. Okutani, M. Lodyga, C. C. dos Santos, S. Keshavjee, M. Matthay and M. Liu (2005). "TNFalpha-induced long pentraxin PTX3 expression in human lung epithelial cells via JNK." *J Immunol* **175**(12): 8303-11.

Hardwick, J. C., G. R. Van Den Brink, S. A. Bleuming, I. Ballester, J. M. Van Den Brande, J. J. Keller, G. J. Offerhaus, S. J. Van Deventer and M. P. Peppelenbosch (2004). "Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon." *Gastroenterology* **126**(1): 111-21.

Hisamatsu, T., M. Suzuki, H. C. Reinecker, W. J. Nadeau, B. A. McCormick and D. K. Podolsky (2003). "CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells." *Gastroenterology* **124**(4): 993-1000.

Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabet, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han and B. Beutler (2003). "Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling." *Nature* **424**(6950): 743-8.

Hornef, M. W., B. H. Normark, A. Vandewalle and S. Normark (2003). "Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells." *J Exp Med* **198**(8): 1225-35.

Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J. P. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J. F. Colombel, M. Sahbatou and G. Thomas (2001). "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease." *Nature* **411**(6837): 599-603.

Inohara, N., T. Koseki, J. Lin, L. del Peso, P. C. Lucas, F. F. Chen, Y. Ogura and G. Nunez (2000). "An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways." *J Biol Chem* **275**(36): 27823-31.

Inohara, N. and G. Nunez (2001). "The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens." *Oncogene* **20**(44): 6473-81.

Inohara, N., Y. Ogura, F. F. Chen, A. Muto and G. Nunez (2001). "Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides." *J Biol Chem* **276**(4): 2551-4.

Into, T., K. Kiura, M. Yasuda, H. Kataoka, N. Inoue, A. Hasebe, K. Takeda, S. Akira and K. Shibata (2004). "Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF-kappa B activation." *Cell Microbiol* **6**(2): 187-99.

Kabesch M, W. Peters, D. Carr, W. Leupold, S.K. Weiland, E. von Mutius (2003). „ Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations". *J Allergy Clin Immunol. Apr*; **111**(4):813-7

Kambe, N., R. Nishikomori and N. Kanazawa (2005). "The cytosolic pattern-recognition receptor Nod2 and inflammatory granulomatous disorders." *J Dermatol Sci* **39**(2): 71-80.

Karin, M. and Y. Ben-Neriah (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity." *Annu Rev Immunol* **18**: 621-63.

- Kerr, M. K., Martin, M. and Churchill, G. A. (2000). "Analysis of variance in microarray data." *Analysis of variance in microarray data*. 7: 819-837.
- Kobayashi, K., N. Inohara, L. D. Hernandez, J. E. Galan, G. Nunez, C. A. Janeway, R. Medzhitov and R. A. Flavell (2002). "RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems." *Nature* **416**(6877): 194-9.
- Kobayashi, K. S., M. Chamaillard, Y. Ogura, O. Henegariu, N. Inohara, G. Nunez and R. A. Flavell (2005). "Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract." *Science* **307**(5710): 731-4.
- Kruse, M. L., A. Arlt, A. Sieke, F. Grohmann, M. Grossmann, J. Minkenbergh, U. R. Folsch and H. Schafer (2005). "Immediate early gene X1 (IEX-1) is organized in subnuclear structures and partially co-localizes with promyelocytic leukemia protein in HeLa cells." *J Biol Chem* **280**(26): 24849-56.
- Kufer, T. A., E. Kremmer, D. J. Banks and D. J. Philpott (2006). "Role for erbin in bacterial activation of Nod2." *Infect Immun* **74**(6): 3115-24.
- Lala, S., Y. Ogura, C. Osborne, S. Y. Hor, A. Bromfield, S. Davies, O. Ogunbiyi, G. Nunez and S. Keshav (2003). "Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells." *Gastroenterology* **125**(1): 47-57.
- Landgrebe, J., F. Bretz and E. Brunner (2004). "Efficient two-sample designs for microarray experiments with biological replications." *In Silico Biol* **4**(4): 461-70.
- Lauw, F. N., D. R. Caffrey and D. T. Golenbock (2005). "Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin." *Trends Immunol* **26**(10): 509-11.
- Lee, J., E. N. Lee, E. Y. Kim, H. J. Park, C. Y. Chang, D. Y. Jung, S. Y. Choi, S. K. Lee, K. W. Lee, G. Y. Kwon, J. W. Joh and S. J. Kim (2005). "Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of inflammatory bowel disease." *Immunol Lett* **101**(2): 210-6.
- Lee, S. C., S. A. Ju, H. N. Pack, S. K. Heo, J. H. Suh, S. M. Park, B. K. Choi, B. S. Kwon and B. S. Kim (2005). "4-1BB (CD137) is required for rapid clearance of *Listeria monocytogenes* infection." *Infect Immun* **73**(8): 5144-51.
- Li, J., T. Moran, E. Swanson, C. Julian, J. Harris, D. K. Bonen, M. Hedl, D. L. Nicolae, C. Abraham and J. H. Cho (2004). "Regulation of IL-8 and IL-1beta expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations." *Hum Mol Genet* **13**(16): 1715-25.
- Lu, C., A. Wang, M. Dorsch, J. Tian, K. Nagashima, A. J. Coyle, B. Jaffee, T. D. Ocain and Y. Xu (2005). "Participation of Rip2 in lipopolysaccharide signaling is independent of its kinase activity." *J Biol Chem* **280**(16): 16278-83.
- Luo, J. L., H. Kamata and M. Karin (2005). "IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy." *J Clin Invest* **115**(10): 2625-32.
- Maeda, S., L. C. Hsu, H. Liu, L. A. Bankston, M. Imura, M. F. Kagnoff, L. Eckmann and M. Karin (2005). "Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing." *Science* **307**(5710): 734-8.
- Mannick, E. E., J. C. Bonomolo, R. Horswell, J. J. Lentz, M. S. Serrano, A. Zapata-Velandia, M. Gastanaduy, J. L. Himmel, S. L. Rose, J. N. Udall, Jr., C. A. Hornick and Z. Liu (2004). "Gene expression in mononuclear cells from patients with inflammatory bowel disease." *Clin Immunol* **112**(3): 247-57.
- Martinon, F., L. Agostini, E. Meylan and J. Tschopp (2004). "Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome." *Curr Biol* **14**(21): 1929-34.
- Martinon, F., L. Agostini, E. Meylan and J. Tschopp (2004). "Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome." *Curr Biol* **14**(21): 1929-34.
- Martinon, F., K. Burns and J. Tschopp (2002). "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta." *Mol Cell* **10**(2): 417-26.

- Martinon, F., K. Hofmann and J. Tschopp (2001). "The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation." *Curr Biol* **11**(4): R118-20.
- Masuda, K., H. Shima, C. Katagiri and K. Kikuchi (2003). "Activation of ERK induces phosphorylation of MAPK phosphatase-7, a JNK specific phosphatase, at Ser-446." *J Biol Chem* **278**(34): 32448-56.
- Matityahu, E., R. Feniger-Barish, T. Meshel, A. Zaslaver and A. Ben-Baruch (2002). "Intracellular trafficking of human CXCR1 and CXCR2: regulation by receptor domains and actin-related kinases." *Eur J Immunol* **32**(12): 3525-35.
- McDonald, C., F. F. Chen, V. Ollendorff, Y. Ogura, S. Marchetto, P. Lecine, J. P. Borg and G. Nunez (2005). "A role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling." *J Biol Chem* **280**(48): 40301-9.
- Means, T. K., E. Lien, A. Yoshimura, S. Wang, D. T. Golenbock and M. J. Fenton (1999). "The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors." *J Immunol* **163**(12): 6748-55.
- Miceli-Richard, C., S. Lesage, M. Rybojad, A. M. Prieur, S. Manouvrier-Hanu, R. Hafner, M. Chamailard, H. Zouali, G. Thomas and J. P. Hugot (2001). "CARD15 mutations in Blau syndrome." *Nat Genet* **29**(1): 19-20.
- Nau, G. J., J. F. Richmond, A. Schlesinger, E. G. Jennings, E. S. Lander and R. A. Young (2002). "Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3): 1503-8.
- Navas, T. A., D. T. Baldwin and T. A. Stewart (1999). "RIP2 is a Raf1-activated mitogen-activated protein kinase kinase." *J Biol Chem* **274**(47): 33684-90.
- Netea, M. G., G. Ferwerda, D. J. de Jong, C. Werts, I. G. Boneca, M. Jehanno, J. W. Van Der Meer, D. Mengin-Lecreux, P. J. Sansonetti, D. J. Philpott, S. Dharancy and S. E. Girardin (2005). "The frameshift mutation in Nod2 results in unresponsiveness not only to Nod2- but also Nod1-activating peptidoglycan agonists." *J Biol Chem* **280**(43): 35859-67.
- Ogura, Y., N. Inohara, A. Benito, F. F. Chen, S. Yamaoka and G. Nunez (2001). "Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB." *J Biol Chem* **276**(7): 4812-8.
- Opitz, B., A. Puschel, W. Beermann, A. C. Hocke, S. Forster, B. Schmeck, V. van Laak, T. Chakraborty, N. Suttrop and S. Hippenstiel (2006). "Listeria monocytogenes activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells." *J Immunol* **176**(1): 484-90.
- Pathan, N., H. Marusawa, M. Krajewska, S. Matsuzawa, H. Kim, K. Okada, S. Torii, S. Kitada, S. Krajewski, K. Welsh, F. Pio, A. Godzik and J. C. Reed (2001). "TUCAN, an antiapoptotic caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer." *J Biol Chem* **276**(34): 32220-9.
- Pauleau, A. L. and P. J. Murray (2003). "Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists." *Mol Cell Biol* **23**(21): 7531-9.
- Pedron, T., C. Thibault and P. J. Sansonetti (2003). "The invasive phenotype of *Shigella flexneri* directs a distinct gene expression pattern in the human intestinal epithelial cell line Caco-2." *J Biol Chem* **278**(36): 33878-86.
- Philpott, D. J. and S. E. Girardin (2004). "The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection." *Mol Immunol* **41**(11): 1099-108.
- Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg and R. Medzhitov (2004). "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis." *Cell* **118**(2): 229-41.
- Razmara, M., S. M. Srinivasula, L. Wang, J. L. Poyet, B. J. Geddes, P. S. DiStefano, J. Bertin and E. S. Alnemri (2002). "CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis." *J Biol Chem* **277**(16): 13952-8.
- Riveau, G., K. Masek, M. Parant and L. Chedid (1980). "Central pyrogenic activity of muramyl dipeptide." *J Exp Med* **152**(4): 869-77.

- Roberts R. L., R. B. Geary, M. D. Allington, H. R. Morrin, B. A. Robinson, F. A. Frizelle (2006) "Caspase recruitment domain-containing protein 15 mutations in patients with colorectal cancer". *Cancer Res.* Mar 1; **66**(5):2532-5.
- Rosenstiel P, Hellmig S, Hampe J, Ott S, Till A, Fischbach W, Sahly H, Lucius R, Folsch UR, Philpott D, Schreiber S (2006). "Influence of polymorphisms in the NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 genes on the clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection" *Cell Microbiol.* 2006 Jul; **8**(7):1188-98.
- Rosenstiel, P., M. Fantini, K. Brautigam, T. Kuhbacher, G. H. Waetzig, D. Seegert and S. Schreiber (2003). "TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells." *Gastroenterology* **124**(4): 1001-9.
- Salojin, K. V., I. B. Owusu, K. A. Millerchip, M. Potter, K. A. Platt and T. Oravecz (2006). "Essential role of MAPK phosphatase-1 in the negative control of innate immune responses." *J Immunol* **176**(3): 1899-907.
- Salvesen, G. S. and V. M. Dixit (1999). "Caspase activation: the induced-proximity model." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 10964-7.
- Schreiber, S., P. Rosenstiel, M. Albrecht, J. Hampe and M. Krawczak (2005). "Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease." *Nat Rev Genet* **6**(5): 376-88.
- Schulze-Lefert, P. (2004). "Plant immunity: the origami of receptor activation." *Curr Biol* **14**(1): R22-4.
- Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake and M. Kimoto (1999). "MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4." *J Exp Med* **189**(11): 1777-82.
- Smith, J. M., P. A. Johanesen, M. K. Wendt, D. G. Binion and M. B. Dwinell (2005). "CXCL12 activation of CXCR4 regulates mucosal host defense through stimulation of epithelial cell migration and promotion of intestinal barrier integrity." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**(2): G316-26.
- Smyth, G. K. (2004). "Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." *Stat. Appl. in Gen. and Mol. Biol.* **3**.
- Sugimoto, K., M. Ohata, J. Miyoshi, H. Ishizaki, N. Tsuboi, A. Masuda, Y. Yoshikai, M. Takamoto, K. Sugane, S. Matsuo, Y. Shimada and T. Matsuguchi (2004). "A serine/threonine kinase, Cot/Tpl2, modulates bacterial DNA-induced IL-12 production and Th cell differentiation." *J Clin Invest* **114**(6): 857-66.
- Tada, H., S. Aiba, K. Shibata, T. Ohteki and H. Takada (2005). "Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells." *Infect Immun* **73**(12): 7967-76.
- Takenaka, R., K. Yokota, K. Ayada, M. Mizuno, Y. Zhao, Y. Fujinami, S. N. Lin, T. Toyokawa, H. Okada, Y. Shiratori and K. Oguma (2004). "*Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells." *Microbiology* **150**(Pt 12): 3913-22.
- Tanabe, T., M. Chamailard, Y. Ogura, L. Zhu, S. Qiu, J. Masumoto, P. Ghosh, A. Moran, M. M. Predergast, G. Tromp, C. J. Williams, N. Inohara and G. Nunez (2004). "Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition." *Embo J* **23**(7): 1587-97.
- Thome, M., K. Hofmann, K. Burns, F. Martinon, J. L. Bodmer, C. Mattmann and J. Tschopp (1998). "Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1." *Curr Biol* **8**(15): 885-8.
- Tomczak, M. F., M. Gadjeva, Y. Y. Wang, K. Brown, I. Maroulakou, P. N. Tschlis, S. E. Erdman, J. G. Fox and B. H. Horwitz (2006). "Defective activation of ERK in macrophages lacking the p50/p105 subunit of NF-kappaB is responsible for elevated expression of IL-12 p40 observed after challenge with *Helicobacter hepaticus*." *J Immunol* **176**(2): 1244-51.
- Vavricka, S. R., M. W. Musch, J. E. Chang, Y. Nakagawa, K. Phanvijhitsiri, T. S. Waypa, D. Merlin, O. Schneewind and E. B. Chang (2004). "hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells." *Gastroenterology* **127**(5): 1401-9.

- Viala, J., C. Chaput, I. G. Boneca, A. Cardona, S. E. Girardin, A. P. Moran, R. Athman, S. Memet, M. R. Huerre, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, P. J. Sansonetti, A. Labigne, J. Bertin, D. J. Philpott and R. L. Ferrero (2004). "Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island." *Nat Immunol* **5**(11): 1166-74.
- Wada, T. and J. M. Penninger (2004). "Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation." *Oncogene* **23**(16): 2838-49.
- Watanabe, T., A. Kitani, P. J. Murray and W. Strober (2004). "NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses." *Nat Immunol* **5**(8): 800-8.
- Wehkamp, J., J. Harder, M. Weichenthal, M. Schwab, E. Schaffeler, M. Schlee, K. R. Herrlinger, A. Stallmach, F. Noack, P. Fritz, J. M. Schroder, C. L. Bevins, K. Fellermann and E. F. Stange (2004). "NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression." *Gut* **53**(11): 1658-64.
- Weichart, D., J. Gobom, S. Klopffleisch, R. Hasler, N. Gustavsson, S. Billmann, H. Lehrach, D. Seegert, S. Schreiber and P. Rosenstiel (2006). "Analysis of NOD2-mediated proteome response to muramyl dipeptide in HEK293 cells." *J Biol Chem* **281**(4): 2380-9.
- Weidinger S., N. Klopp, L. Rummeler, S. Wagenpfeil, H.J. Baurecht, A. Gauger, U. Darsow, T. Jakob, N. Novak, T. Schafer, J. Heinrich, H. Behrendt, H.E. Wichmann, J. Ring, T. Illig, KORA study group (2005). "Association of CARD15 polymorphisms with atopy-related traits in a population-based cohort of Caucasian adults". *Clin Exp Allergy*. Jul;**35**(7):866-72.
- Wertz, I. E., K. M. O'Rourke, H. Zhou, M. Eby, L. Aravind, S. Seshagiri, P. Wu, C. Wiesmann, R. Baker, D. L. Boone, A. Ma, E. V. Koonin and V. M. Dixit (2004). "De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling." *Nature* **430**(7000): 694-9.
- Yurchenko, V., G. Zybarth, M. O'Connor, W. W. Dai, G. Franchin, T. Hao, H. Guo, H. C. Hung, B. Toole, P. Gallay, B. Sherry and M. Bukrinsky (2002). "Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147." *J Biol Chem* **277**(25): 22959-65.
- Zhang, S. Q., A. Kovalenko, G. Cantarella and D. Wallach (2000). "Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation." *Immunity* **12**(3): 301-11.
- Zou, H., W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg and X. Wang (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." *Cell* **90**(3): 405-13.

9 Anhang

9.1 Eingesetzte Materialien

9.1.1 Puffer und Lösungen

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
Nativer Lysepuffer	Hepes KOH 20 mM pH 7,5, KCl 10 mM, MgCl ² 1,5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1mM, PMSF 0,1 mM, Complete Protease Inhibitor
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
Subzelluläre Proteinisolierung	Puffer 1: Hepes KOH 10 mM pH 5,6, NaCl 100 mM, TritonX 1% v/v, EDTA 2 mM, Na ₃ VO ₄ 4 mM, NaF 40 mM, Complete Protease Inhibitor Puffer 2: wie Puffer 1 plus 1% w/v SDS
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 Tris/HCl (pH 8,8), 0,4 % (w/v) SDS
TTBS	20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween20

9.1.2 Verwendete Chemikalien, Zusätze und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
6-Amino-Capronsäure	Merck, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30:0,8)	BioRad, München
Agar Noble	BD Biosciences, Heidelberg
Agarose	Eurogentec, Köln
Ammoniumpersulfat	Merck
Ampicillin	Sigma, München
AmpliTaq DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Bacillol	Bode Chemie, Hamburg
Bacto-Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto-Yeast Extract	BD Biosciences
<i>BamH I</i>	NEB
Bromphenolblau	Merck
BSA-Lösung (10mg/ml)	NEB, Bad Schwalbach
β -Mercaptoethanol	Sigma
CaCl ₂	Merck
Calyculin A	Upstate
Cell Culture Freezing Medium-DMSO	Invitrogen
DEPC	Sigma
DMSO	Sigma
dNTP Set (100 mM-Lösung)	Invitrogen
EDTA	Calbiochem
EGTA	Sigma
Essigsäure	Merck
Ethanol (p.a.)	Merck
Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml)	Merck
FCS Gold	PAA, Linz, Österreich
FuGENE	Roche
Gentamicin (G 1264)	Sigma
Glycerol	Merck
Glycogen	Invitrogen
HCl	Merck
Hepes	Sigma
Isopropanol (2-Propanol)	Merck
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
Magermilchpulver (MMP)	BioRad
LD.-MDP	Bachem, Weil am Rhein
DD-MDP	Bachem, Weil am Rhein
Methanol	Merck
MgCl ₂	Merck
MgSO ₄	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
Natriumacetat	Sigma
NaCl	Merck
Natriumazid	Sigma
<i>Nhe I</i>	NEB
1x PBS	PAA Laboratories, Linz
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail (50 X)	Sigma, München
Protease Inhibitor Complete	Roche
ProteinA/G-Agarose-Beads	SantaCruz, Heidelberg
Proteinmarker prestained broad range	Bio-Rad

Bezeichnung	Hersteller
RPMI-1640 Medium	PAA Laboratories, Linz
SDS	Calbiochem
SDS-PAGE standards, prestained, broad range	Bio-Rad
SmartLadder DNA Markers	Eurogentec
50x TAE Buffer	Invitrogen
TEMED	Sigma
TGS protein electrophoresis buffer 10x	Bio-Rad
Tris/Glycin/SDS	
Tris	Merck
TritonX-100	Merck
Trypan-Blau-Lösung	Sigma
Trypsin/EDTA (1X)	Invitrogen
Tween20	Merck
Wasserstoffperoxid (30% Lösung)	Sigma
Xylenol	Merck

9.1.3 Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
Big Dye Terminator Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
Caspase-Glo 3/7 Assay	Promega, München
Colloidal Blue Staining Kit	Invitrogen
DC Protein Assay	BioRad, München
DNase I	Qiagen, Hilden
Dual-Luciferase-Assay	Promega
ECL-PLUS	Amersham Biosciences, Freiburg
FLP-In System	Invitrogen
Interleukin-8-ELISA KIT	Biosource
One-Cycle Target Labeling and Control Reagents	Affymetrix
GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit	Affymetrix
MiniElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
MiniElute PCR Purification Kit	Qiagen
Platinum Taq DNA polymerase high fidelity Kit	Invitrogen
Proteo-Extract <i>subcellular proteome extraction Kit</i>	Calbiochem
QIAfilter Maxi Kit	Qiagen
QIAPrep Miniprep Kit	Qiagen
QIAShredder Homogenizer Kit	Qiagen
QuickChange site-directed-mutagenesis II Kit	Stratagene, Heidelberg
RNeasy Mini Kit	Qiagen
VerorGeM <i>mycoplasma detection</i> PCR Kit	Minerva Biolabs, Berlin
Wizard SV Genomic DNA Purification System	Promega

9.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APAF1	<i>apoptotic protease-activating factor 1</i>
BMP2	<i>bone morphogenetic protein 2</i>
cagPAI	<i>cag-pathogenicity-island</i>
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CARD8	<i>tumor up-regulated CARD-containing antagonist of caspase nine</i>
CLAN	<i>CARD, LRR and NACHT domain containing protein</i>
COX2	Cyclooxygenase2
DAP	D-Glu-meso-Diaminopimelinsäure
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DUSP1	<i>dual specificity phosphatase 1</i>
DUSP16	<i>dual specificity phosphatase 16</i>
ELISA	enzyme-linked immuno-sorbent assay
ERBIN	<i>erbB2 interacting protein</i>
ERBIN	<i>erbB2 interacting protein</i>
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FC	<i>fold-change</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCP2 CXCL6,	<i>granulocyte chemotactic protein 2</i>
GRIM19	<i>gene associated with retinoid-IFN-induced mortality 19</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	<i>human embryo kidney</i>
IEC	intestinale epitheliale Zellen
IER3	<i>immediate early response 3</i>
IFI16	<i>interferon, gamma-inducible protein 16</i>
IFN γ	<i>interferon gamma</i>
IKB α	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
IL-12 p40	Interleukin-12 Proteinuntereinheit40
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-8	InterleukinL-8
IP	Immunpräzipitationen
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LC-MS	<i>liquid chromatography mass spectrometrie</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	<i>Leucin-rich-repeats</i> Domäne
MAP2Kinase	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDP	Muramyldipeptid
MIP2 α	<i>macrophage inflammatory protein 2</i>
MIP2 β	<i>macrophage inflammatory protein 3</i>
MM	<i>mismatch</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MT1X	<i>metallothionein 1X</i>
MTGST1	<i>microsomal glutathione S-transferase 1</i>
NALP	<i>NACHT, leucine rich repeat and PYD containing</i>
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NOD	<i>nucleotide-binding and oligomerization domain</i>
p38	p38 MAP-Kinase
p50/p105	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>

Abkürzung	Bedeutung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PM	<i>perfect match</i>
PTX3	<i>Pentraxin –related gene, rapidly induced by IL-1β</i>
PVDF	Polyvenyldifluorid
RIP2	<i>receptor-interacting serine-threonine kinase 2</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
SDF1 CXCL12	<i>stromal cell derived factor 1</i>
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
srCRT	<i>surface calreticulin</i>
TAK1 MAP3K7	<i>mitogen activated protein kinase kinase kinase 7</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNFAIP3	<i>tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3</i>
TNFRSF9	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9, CD137</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TPL2	<i>tumor progression locus-2</i>
UV	Ultraviolett
wt	Wildtyp
ZNF91	<i>zinc finger protein 91</i>

Fortsetzung 6.4 Liste der MDP-abhängig regulierten Gene aus Abbildung 4.7

Nummer Cluster Nr.	ARY_ID	Accession	GeneSymbol	Unigene Definition	Signal mean CONTROL 0 h MDP	Signal mean CONTROL 2 h MDP	Signal mean CONTROL 6 h MDP	Signal mean NOD2out 0 h MDP	Signal mean NOD2out 2 h MDP	Signal mean NOD2out 6 h MDP	Signal mean L1007famsC 0 h MDP	Signal mean L1007famsC 2 h MDP	Signal mean L1007famsC 6 h MDP	N= No Change In Increase D= Decrease			Wahr	In Interaktion oder NOD2/MIP1 significant for MDP Effekte	L=0 Attachment (nm)	In Interaktion or MDP of L=0 MDP or L=0 Similarity positive
														CONTROL/MDP FC mm +/- 1,4	CONTROL/MDP FC mm +/- 1,4	NOD2out/MDP FC mm +/- 1,4				
56	2 230554_at	AL034550	C20orf112	chromosome 20 open reading frame 112	71	51	114	296	207	226	148	108	50	I	D	D	Wahr			
57	3 1554319_at	BC017187	RPS6KA5	ribosomal protein S6 kinase, 60kDa, polypeptide 5	13	24	80	19	33	56	62	62	4	I	D	I	Wahr			
58	3 1558932_at	BC016339	CRIM1	cysteine-rich motor neuron 1	202	161	187	87	136	179	144	144	184	N	N	I	Wahr			
59	3 1560031_at	R19413	FRMD4A	Home sapiens transcribed sequence with weak similarity to protein ref:NP_060219.1 (H.sapiens) hypothetical protein FLJ20294 (Homo sapiens)	104	176	184	124	75	134	145	66	70	I	D	D	Wahr			
60	3 1564139_at	AK056852	LOC144571	hypothetical protein LOC144571	190	210	201	83	118	118	183	117	185	N	D	I	Wahr			
61	3 1564200_at	AK091805	---	Home sapiens cDNA FLJ42957 fs, clone BRHIP3016302	77	96	118	19	62	93	123	40	127	I	D	I	Wahr			
62	3 1569253_at	BC016733	MGC16733	hypothetical gene MGC16733 similar to C151113	105	108	127	71	99	22	116	137	84	N	N	D	Wahr			
63	3 211842_s_at	AF026132	SLC24A1	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 1	220	142	206	105	105	200	193	223	172	D	N	I	Wahr			
64	3 213896_at	NM_013313	YPEL1	ytpee-like 1 (Drosophila)	152	177	280	83	123	184	188	133	203	D	D	I	Wahr			
65	3 219690_s_at	BC004284	EPH4	Eph4	367	321	362	232	385	324	333	250	409	N	I	I	Wahr			
66	3 217449_at	AL137284	---	Home sapiens mRNA; cDNA DKFZp434D1516 (from clone DKFZp434D1516)	37	140	182	97	132	156	164	94	141	I	D	I	Wahr			
67	3 219690_s_at	NM_006042	HS3ST3A1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1	1725	2284	2406	1339	2134	2229	2197	1963	1867	N	N	I	Wahr			
68	3 222812_s_at	AB059892	C1orf100	pituitary gland specific factor 1a	106	82	103	104	108	170	101	214	196	D	N	I	Wahr			
69	3 224480_s_at	BC006254	HH114	hypothetical protein HH114	726	897	1029	657	595	806	923	850	779	I	N	I	Wahr			
70	3 225491_at	AL157492	SLC12A2	solute carrier family 12 (glial high affinity glutamate transporter), member 2	148	111	133	84	178	163	203	186	252	N	N	I	Wahr			
71	3 226469_s_at	AL048709	GGTL3	gamma-glutamyltransferase-like 3	157	241	137	96	175	191	174	132	136	I	N	I	Wahr			
72	3 226560_at	AA578959	---	sphingosine-1-phosphate phosphatase 2	2120	1863	2129	1809	1785	2546	2137	1893	1862	N	N	I	Wahr			
73	3 230576_at	AL042523	KIAA1396	KIAA1396 protein	73	44	116	32	67	139	150	125	116	I	N	I	Wahr			
74	3 232200_at	AK023317	HSPA9B	heat shock 70kDa protein 9B (mortalin-2)	156	149	140	72	144	139	136	76	123	N	D	I	Wahr			
75	3 233087_at	AL133602	FBLX17	F-box only protein 13	78	67	126	22	69	87	91	42	62	I	D	I	Wahr			
76	3 234837_x_at	AC007228	ZFP28	zinc finger protein 28 homolog (mouse)	237	143	251	186	277	281	312	317	265	D	N	I	Wahr			
77	3 237278_x_at	R37392	---	Home sapiens transcribed sequences	108	86	95	18	74	100	48	70	56	D	I	I	Wahr			
78	3 238442_at	AA470761	HIS1	HMB1A-inducible	214	279	270	120	216	227	221	294	183	N	D	I	Wahr			
79	3 240072_at	N75937	---	KIAA1836 protein	166	253	271	135	212	213	154	118	212	I	I	I	Wahr			
80	3 241948_at	A1051280	---	Home sapiens transcribed sequences	138	117	129	40	100	124	81	60	97	N	I	I	Wahr			
81	3 242487_at	AW981746	KIAA1836	KIAA1836 protein	183	272	259	163	284	323	268	219	318	I	I	I	Wahr			
82	4 203695_at	NM_002133	HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	368	571	486	549	429	850	360	463	417	I	N	I	Wahr			
83	4 214236_at	A039572	---	Home sapiens clone DT19186 mRNA, CAG repeat region	436	562	503	528	421	536	686	578	850	N	N	I	Wahr			
84	4 238587_at	A1927919	STS-1	nm23-phosphorylated unknown substrate	42	102	155	133	40	195	130	94	133	I	I	I	Wahr			
85	4 1554274_a_at	AB072356	SSH1	slingshot 1	161	167	135	175	122	240	194	171	158	N	N	D	Wahr			
86	4 1555348_at	BC041175	AP2E	hypothetical protein MGC49007	369	263	282	387	219	213	301	327	213	D	D	D	Wahr			
87	4 242329_at	AW071804	---	Home sapiens transcribed sequence with weak similarity to protein pit.cOH110 (H.sapiens) (OH110 collagen alpha 1(A) chain precursor - human	526	512	599	826	1188	782	681	689	664	N	N	I	Wahr	13	Yes	
88	4 1563217_at	B1998031	---	Home sapiens, clone IMAGE 5296732, mRNA	181	185	208	97	60	120	158	162	196	N	N	D	Wahr			
89	4 1566295_at	H15441	---	---	62	21	79	69	102	73	40	78	84	D	I	I	Wahr			
90	4 204856_at	NM_014256	BSGHT3	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 3	99	146	182	155	62	156	174	163	41	I	D	D	Wahr			
91	4 205433_at	NM_000056	BOHE	butyrylcholinesterase	11	81	80	69	73	46	28	56	45	I	I	D	Wahr			
92	4 208666_s_at	NM_018286	KLF12	Kruppel-like factor 12	257	233	370	252	151	237	296	254	261	I	N	D	Wahr			
93	4 220442_at	NM_003774	GALNT4	TUWD12	113	223	205	252	170	197	202	267	217	I	N	D	Wahr			
94	4 224022_x_at	AF198983	WNT16	wntless-type WNTV1 integration site family, member 16	168	137	159	186	69	138	164	172	147	N	N	D	Wahr			
95	4 225690_at	AA719628	---	Home sapiens transcribed sequences	144	133	118	181	98	116	105	167	143	N	N	D	Wahr			
96	4 238495_at	A1742356	---	phosphate cytidyltransferase 1, choline, alpha isoform	24	111	82	119	46	96	124	83	77	I	D	D	Wahr			
97	4 238876_at	BE695816	IPMK	inositol polyphosphate multikinase	118	155	184	176	128	219	99	156	227	I	I	D	Wahr			
98	4 243663_at	A1277314	---	Home sapiens transcribed sequences	108	47	96	112	78	110	51	88	78	D	I	D	Wahr			
99	5 1555022_at	SG240303	PTP4A1	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	475	617	615	230	301	222	618	650	523	N	N	I	Wahr			
100	5 1564010_at	AK026822	CAST	calpastatin	133	157	196	154	194	63	182	193	203	I	N	D	Wahr			
101	5 205544_s_at	NM_001877	CR2	complement component (3d) Epstein Barr virus receptor 2	557	609	578	272	493	444	628	663	507	N	N	I	Wahr			
102	5 214761_at	AW148417	ZNF423	OLF-1/EBF associated zinc finger gene	430	305	287	139	273	165	292	295	347	D	N	I	Wahr			
103	5 223218_s_at	AB037625	NFKB2	molecule possessing ankyrin repeats induced by lipopolysaccharide (MAIL)	1193	1210	1203	811	1236	821	1205	1258	1142	N	N	I	Wahr			
104	5 225502_at	AL161725	DOCK8	homolog of mouse	365	289	274	225	160	227	250	293	228	N	N	I	Wahr			
105	5 230137_at	BF673779	FLJ30834	hypothetical protein FLJ30834	195	164	282	146	214	110	305	263	289	I	N	I	Wahr			
106	5 232451_at	AL110178	---	Home sapiens mRNA; cDNA DKFZp5640616 (from clone DKFZp5640616)	113	179	131	87	154	114	189	146	216	I	I	I	Wahr			
107	5 236624_at	N73742	---	Home sapiens cDNA FLJ42287 fs, clone TLIVE205666	213	162	156	76	21	124	68	158	114	N	I	I	Wahr			

Fortsetzung 9.4 Liste der MDP-abhängig regulierten Gene aus Abbildung 4.7

Nummer Cluster Nr.	Affy_ID	Accession	GeneSymbol	Unigene Definition	Signal mean CONTROL 0 h MDP	Signal mean CONTROL 2 h MDP	Signal mean CONTROL 6 h MDP	Signal mean NOD2wt 0 h MDP	Signal mean NOD2wt 2 h MDP	Signal mean NOD2wt 6 h MDP	Signal mean L1007/tinsC 0 h MDP	Signal mean L1007/tinsC 2 h MDP	Signal mean L1007/tinsC 6 h MDP	N= No Change I= Increase D= Decrease			In interaction with NOD2wt for MDP-Effekt	L-β Ankethiol frank	In interaction or MDP- inhibition of IL- 8 stimulation positive
														CONTROL min +/- 1,4	L1007/tinsC min +/- 1,4	NOD2wt min +/- 1,4			
108	5 236591_at	AA671792	---	Homo sapiens mRNA, cDNA DKFZp779H1540 (from clone DKFZp779H1540)	190	274	316	82	140	82	389	325	375	I	N	I	WAHR	Yes	
109	5 238904_at	A1433468	---	Homo sapiens LOC351588 (LOC351588), mRNA	177	209	223	96	181	152	160	247	113	N	D	I	WAHR	Yes	
110	5 242463_x_at	A1620627	ZNF600	similar to hypothetical protein	412	355	321	124	141	194	363	400	313	N	N	I	WAHR	Yes	
111	5 48117_at	AA189496	LOC112669	hypothetical protein BC011961	804	736	747	504	721	552	556	744	798	N	I	I	WAHR	Yes	
112	5 1558651_at	AK092592	C6orf80	chromosome 6 open reading frame 80	218	341	209	285	220	175	279	215	314	I	I	D	WAHR	Yes	
113	5 155875_s_at	BC043547	---	Homo sapiens, clone IMAGE5171873, mRNA	58	49	53	40	63	6	56	52	51	N	N	D	WAHR	Yes	
114	5 1560536_at	BC035759	TRAP1	heat shock protein 75	260	217	242	282	201	131	214	185	289	N	I	D	WAHR	Yes	
115	5 1560703_at	BC042947	LOC201229	hypothetical protein LOC201229	250	230	285	270	152	124	236	310	380	N	I	D	WAHR	Yes	
116	5 1562282_at	BC016334	---	hypothetical protein LOC126167	93	191	183	109	128	78	148	162	161	I	N	D	WAHR	Yes	
117	5 1562775_at	BC042967	NUDT12	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 12	219	204	176	196	168	111	207	138	223	N	D	D	WAHR	Yes	
118	5 1563303_at	AF086473	---	Homo sapiens full length insert cDNA clone ZD86008	28	108	82	107	72	61	70	74	46	I	D	D	WAHR	Yes	
119	5 1566733_at	BC032118	C10orf76	hypothetical protein FLJ13114	256	382	375	448	313	361	353	466	436	I	N	D	WAHR	Yes	
120	5 208334_s_at	BC002393	PFMD9	proteasome (prosome, macropain) 28S subunit, non-ATPase, 9	289	317	318	268	278	167	286	368	291	N	N	D	WAHR	Yes	
121	5 208342_s_at	AF080168	IWBK9	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	148	127	314	121	79	44	143	191	153	I	N	D	WAHR	Yes	
122	5 214117_s_at	A1781414	BTD	betaine dease	538	815	586	491	565	386	575	630	681	N	N	D	WAHR	Yes	
123	5 214337_at	A1621079	COPA	coatamer protein complex, subunit alpha	91	145	110	188	196	82	162	221	139	I	D	D	WAHR	Yes	
124	5 216899_s_at	AK002301	KIF22	kinesin family member 22	749	856	820	801	758	531	769	754	832	N	N	D	WAHR	Yes	
125	5 217543_s_at	BE890314	MBTFP1	membrane-bound transcription factor protease, site 1	1431	1416	1467	821	593	449	1278	1358	1523	N	N	D	WAHR	Yes	
126	5 218262_s_at	NM_015930	TRPV2	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2	298	342	136	239	157	245	337	327	356	D	N	D	WAHR	Yes	
127	5 220302_at	NM_005906	MAK	male germ cell-associated kinase	306	327	211	219	270	131	291	326	293	D	N	D	WAHR	Yes	
128	5 222075_s_at	BE792072	OAZ3	Homo sapiens cDNA FLJ43888 fs, clone TEST4006306, moderately similar to Homo sapiens ornithine decarboxylase antyzyme 3 (OAZ3)	224	146	88	134	141	50	128	148	63	D	D	D	WAHR	Yes	
129	5 223126_s_at	A158674	C1orf21	chromosome 1 open reading frame 21	315	423	450	319	353	244	385	403	365	I	N	D	WAHR	Yes	
130	5 227443_at	A1972386	C8orf150	hypothetical LOC289343	301	213	203	187	229	155	200	263	310	D	I	D	WAHR	Yes	
131	5 227906_at	95238006	KIAA1171	KIAA1171 protein	831	825	872	553	337	540	784	773	780	N	N	D	WAHR	Yes	
132	5 231171_at	A1948681	---	Homo sapiens transcribed sequences	205	239	303	172	220	65	237	251	294	I	N	D	WAHR	Yes	
133	5 232219_at	AK028852	---	similar to Zinc finger protein 29 (Zfp-29)	549	487	408	320	318	160	517	502	653	N	N	D	WAHR	Yes	
134	5 232886_at	AK025300	---	KIAA0182 protein	125	260	181	156	193	112	221	208	252	I	N	D	WAHR	Yes	
135	5 233573_s_at	AK001080	WDR9	WD repeat domain 9	277	328	256	270	197	138	240	180	368	N	I	D	WAHR	Yes	
136	5 238485_at	A1740362	---	Homo sapiens, clone IMAGE5267398, mRNA	253	220	319	184	124	197	266	362	240	I	D	D	WAHR	Yes	
137	5 241300_at	AA187323	---	Homo sapiens transcribed sequences	153	244	318	281	268	114	262	359	310	I	N	D	WAHR	Yes	
138	5 244885_at	A1016316	EBF2	early B-cell factor 2	393	360	386	288	249	155	303	312	341	N	N	D	WAHR	Yes	
139	5 208611_at	NM_013310	C2orf27	hypothetical protein AF038169	569	315	532	237	352	265	340	258	205	D	D	I	WAHR	Yes	
140	5 238277_at	A1023336	---	Homo sapiens transcribed sequences	141	119	136	94	154	122	98	43	126	N	D	I	WAHR	Yes	
141	5 1552694_at	NM_052885	SLC2A13	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 13	73	105	156	113	153	73	131	80	163	I	D	D	WAHR	Yes	
142	5 1553140_at	NM_014100	---	---	187	192	256	174	217	150	210	98	170	N	D	D	WAHR	Yes	
143	5 1555925_at	BE048388	---	Homo sapiens transcribed sequences	14	85	43	51	73	29	72	27	30	I	D	D	WAHR	Yes	
144	5 1556709_at	AK056249	---	Homo sapiens cDNA FLJ13887 fs, clone NT2R12005473	231	252	237	324	273	197	237	197	208	N	N	D	WAHR	Yes	
145	5 1558492_at	BC194311	---	Homo sapiens, clone IMAGE5153889, mRNA	163	153	168	97	119	41	92	49	108	N	D	D	WAHR	Yes	
146	5 1562493_at	AK088646	CPXCR1	CPX chromosome region, candidate 1	128	170	100	68	129	219	144	97	112	D	D	I	WAHR	Yes	
147	5 205132_at	NM_005159	ACTC	actin, alpha, cardiac muscle	238	239	240	250	283	140	243	201	244	D	N	D	WAHR	Yes	
148	5 207015_s_at	NM_003888	ALDH1A2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2	770	799	545	698	689	435	543	492	645	D	N	D	WAHR	Yes	
149	5 211386_at	BC005372	MGC12488	Homo sapiens, clone IMAGE3932794, mRNA	212	222	339	264	323	217	254	184	214	I	N	D	WAHR	Yes	
150	5 215512_at	AK008670	MARCH-VI	similar to S. cerevisiae SGMA	344	259	297	337	366	190	172	222	234	N	N	D	WAHR	Yes	
151	5 221680_s_at	AF147782	ETV7	ets variant gene 7 (TEL2 oncogene)	169	175	289	144	124	81	117	142	89	I	D	D	WAHR	Yes	
152	5 228461_at	AL589899	SH3MD4	Homo sapiens mRNA for FLJ02024 protein	561	613	752	538	585	385	382	417	530	N	N	D	WAHR	Yes	
153	5 228679_at	A1870860	FLJ40142	hypothetical gene supported by AF068409	421	449	387	328	406	266	319	341	378	N	N	D	WAHR	Yes	
154	5 230537_at	AA401256	---	Homo sapiens transcribed sequences	213	185	259	248	277	169	149	189	178	I	N	D	WAHR	Yes	
155	5 230599_at	A1691566	---	Homo sapiens transcribed sequences	300	444	385	362	337	227	201	257	355	I	I	D	WAHR	Yes	
156	5 241197_at	A19440117	---	Homo sapiens transcribed sequences	105	137	116	127	87	15	140	54	155	N	D	D	WAHR	Yes	
157	5 244018_at	A19451618	---	Homo sapiens transcribed sequences	200	178	229	160	139	35	127	140	198	N	I	D	WAHR	Yes	
158	5 63305_at	D81782	PBX10X2	PBX10X2 1 homeobox 2	247	209	284	220	268	187	259	194	189	I	N	D	WAHR	Yes	

9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Ausgesäte Zelldichten für die verschiedenen Experimente	21
Tabelle 3.2: Mengen und Volumina für die Lipofektion.	24
Tabelle 3.3: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.	27
Tabelle 3.4: Taqman Assays (Applied Biosystems).	28
Tabelle 3.5: Zusammensetzung der Taqman-PCR-Reaktion.....	29
Tabelle 3.6: Verdünnungen für die Standardkurve der Taqman-PCR.	29
Tabelle 3.7: Zusammensetzung und Programm der PCR-Reaktion	30
Tabelle 3.8: Komponenten der TOPO-Klonierreaktion.....	32
Tabelle 3.9: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau.	34
Tabelle 3.10: Übersicht über die Verwendeten NOD2-Sequenzierprimer	35
Tabelle 3.11: Sequenzierreaktion.....	36
Tabelle 3.12: Primer für die ortsgerichtete Mutagenese.....	36
Tabelle 3.13.: Reaktionsansatz für die Mutagenese.	37
Tabelle 3.14.: Einteilung der Profile der MDP-Stimulation in Increased (I), No Change (N) und Decreased (D).	45
Tabelle 3.15: Zusammensetzung des Trenngelansatzes.....	50
Tabelle 3.16: Zusammensetzung des Sammelgelansatzes.....	51
Tabelle 3.17: In der Immundetektion verwendete Antikörper und Verdünnungen.	52
Tabelle 4.1: Auflistung von genotyp-regulierten Genen und ihren <i>fold-changes</i>	63
Tabelle 4.2: Überschneidung regulierter Gene der Transkriptom- und Proteom-Analyse.	66
Tabelle 4.3: NOD2-Interaktionspartner und weitere Morbus Crohn assoziierte Gene.....	67

9.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Beispiele aus der NOD- <i>like</i> -Rezeptorfamilie.....	3
Abbildung 2.2: Pathogenliganden von NOD1 und NOD2.	4
Abbildung 2.3: Computergeneriertes Modell der LRRs von NOD2.....	5
Abbildung 2.4: Der klassische IKK/NF- κ B-Signalweg.	11
Abbildung 2.5: Krankheitsassoziierte Mutationen von NOD2	14
Abbildung 3.1: Die FRT-Sequenz aus dem Genom von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
Abbildung 3.2: Schema der FLP-In Klonierung (Quelle: Invitrogen).....	39
Abbildung 3.3: Schema der Photolithographie (Quelle: Affymetrix).....	41
Abbildung 3.4: Klassifizierung der möglichen Profile in der Kinetik.	44
Abbildung 4.1: Lokalisation von NOD2 in verschiedenen Zellfraktionen.	55
Abbildung 4.2: p-NOD2 nach Stimulation mit Calyculin A und MDP.	57
Abbildung 4.3: Ergebnis der Massenspektrometrie.	58
Abbildung 4.4: Untersuchung der NOD2-Expressionsstärke in den stabilen Zelllinien mittels Taqman PCR und Western-Blot.....	59
Abbildung 4.5: Funktioneller NOD2-Nachweis in den stabilen Zelllinien.	60
Abbildung 4.6: Hierarchisches Cluster-Bild des Genexpressionsmusters in unstimulierten Zellen...	62
Abbildung 4.7: <i>K-means clustering</i> von 158 Genen, deren Regulation MDP-abhängig ist.	69
Abbildung 4.8: Vergleich von Microarray und Taqman <i>real-time</i> PCR-Ergebnissen.	71
Abbildung 4.9: Vergleich von Microarray (links) und Taqman <i>real-time</i> PCR-Ergebnissen (rechts). .	72
Abbildung 4.10: Vergleich von Microarray und <i>real-time</i> PCR-Ergebnissen von verschiedenen Zelltypen.....	74
Abbildung 4.11: Nachweis der A20-Expression auf Proteinebene.	76
Abbildung 4.12: A20 (hTNFAIP3) hemmt die MDP induzierte NF- κ B-Aktivierung.....	77
Abbildung 5.1: Funktion von TPL2 in der LPS-induzierten Immunantwort.	84
Abbildung 5.2: Hemmende Funktion von DUSP1 auf die p38 Aktivität nach LPS-Stimulation.....	85
Abbildung 5.3: Der BMP2 Signalweg.	88
Abbildung 5.4: Bekannte Deaktivierungsziele von A20.....	91

10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit - abgesehen von den Beratungen 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 28.09-2006

Susanne Billmann - Born

11 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Susanne Billmann-Born
Geburtsdatum: 08.10.1968
Geburtsort: Bruchsal
Ehemann: Volker Born, Diplom Geologe
Tochter: Inga Felicia Born, geb. 19.06.2006
Eltern: Klaus Billmann, Oberstleutnant a.D.
 Adelheid Billmann (geb. Pollner), Steuerberaterin
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

05/1987 Abitur an der Halepaghenschule Buxtehude,
 Niedersachsen
 Note -1,8 -

Berufliche Ausbildung

09/1998 bis Ausbildung Metallbau Fachrichtung Metallgestaltung
01/2001 Gesellenprüfung Metallbau

05/2001 Staatliche Hufbeschlagprüfung

Studium

08/1989 Vordiplom (Fächer: Zoologie, Botanik, Physik, Chemie),
 Eberhard-Karls-Universität Tübingen

12/1994 Diplom, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
 Fächer: Botanik, Pflanzenphysiologie, Zoologie, Geologie
 Diplomarbeit: Vegetation und Geomorphologie des
 Engentalbaches
 Gesamtnote - sehr gut -

ab 09/2003- Doktorandin am Institut für Klinische Molekularbiologie der
 Klinik für Allgemeine Innere Medizin des
 Universitätsklinikums S-H, Campus Kiel, unter der Leitung
 von Prof. Dr. Stefan Schreiber

Publikationen:

Weichart D., Gobom J., Klopffleisch S., Hasler R., Gustavsson N., Billmann S., Lehrach H., Seegert D., Schreiber S., Rosenstiel P. (2006).

„Analysis of NOD2-mediated proteome response to muramyl dipeptide in HEK293 cells“.

J Biol Chem. Jan 27;**281**(4):2380-9.

Rosenstiel P., Huse K., Till A., Hampe J., Hellmig S., Sina C., Billmann S., von Kampen O., Waetzig G.H., Platzer M., Seegert D., Schreiber S. (2006).

“A short isoform of NOD2/CARD15, NOD2-S, is an endogenous inhibitor of NOD2/receptor-interacting protein kinase 2-induced signaling pathways”.

Proc Natl Acad Sci U S A. Feb 28;**103**(9):3280-5.

Publikation in Vorbereitung:

Characterization of the gene expression signature induced by NOD2 activation.

12 Danksagung

Diese Arbeit entstand von September 2003 bis November 2006 in der Arbeitsgruppe Zellbiologie am Institut für Klinische Molekularbiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

Mein besonderer Dank gilt zuerst Herrn Prof. Dr. med. Stefan Schreiber, in dessen Institut ich die Experimente durchführen konnte, für die interessante Themenstellung, für die Freiheit auch eigene Ideen verwirklichen zu können und die stete Förderung und Unterstützung.

Frau Professor Dr. Krupinska danke ich für die Energie, die sie in die Horizonterweiterung der Doktoranden im Rahmen des Graduiertenkollegs „Natürliche Antioxidantien“ gesteckt hat, und natürlich für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Philip Rosenstiel, durch dessen Vorbild die freie, fröhliche und produktive Atmosphäre der Zellbiologie Arbeitsgruppe geprägt ist. Durch seinen enormen fachlichen Über- und Detailblick wurde diese Arbeit gelenkt.

Die Hybridisierung der Microarrays wurde in Zusammenarbeit mit Boehringer-Ingelheim Pharmaceuticals (Ridgefield, CT, USA) durchgeführt. Hier danke ich Dr. Jun Li und Ayedayo Hanidu für die Durchführung der Chiphybridisierung, für meine Einarbeitung in Auswertungsmethoden und für die aufmerksame Betreuung während meines Besuches in Ridgefield.

Bei der statistischen Auswertung wurde ich in besonderer Weise von Martin Kerick unterstützt, der in Pionierarbeit meine Fragestellung in Biomathematik übersetzt und programmiert hat. Meinen Dank für die Hilfe in dieser besonders schwierigen Phase der Arbeit!

An dieser Stelle danke auch an Marcus Will, der meinen Computerarbeitsplatz für die großen Datenmengen aufgerüstet hat und dessen Soforthilfe einige Male den Computer wiederbelebte.

Robert Häsler und Dorina Ölsner danke ich für die freundliche und kompetente Hilfe bei der Durchführung der Taqman-Assays.

Die Aufreinigung von Phosphopeptiden und ihre Analyse mittels LC-MS wurde durchgeführt von der „Protein Research Group“, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark. Vielen Dank an Dr. Albrecht Gruhler für die erfolgreiche Durchführung dieser Arbeiten und für zahlreiche beratende Telefonate!

Herzlichen Dank an alle Mitglieder der Zellbiologie-Arbeitsgruppe! Dr. Andreas Till und Dr. Stefanie Spitzmann danke ich besonders für ihre Hilfe und die praktischen Tipps bei der Durchführung der Laborarbeiten und bei der Schreibarbeit. Tanja Kaacksteen und Jasmin Brodtmann danke ich für alle Antworten auf die Frage: „Wo finde ich denn.....“ und für die Zellpflege. Dr. Gunnar Jacobs hat bei der Durchsicht des Manuskripts wertvolle Hilfe geleistet. Dafür und für das gute Arbeitsklima bedanke ich mich bei der ganzen Arbeitsgruppe. Extra erwähnen möchte ich noch die große Hilfsbereitschaft der gesamten Arbeitsgruppe, als ich wegen meiner Schwangerschaft nicht mehr vor Ort sein konnte.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern, danke ich für die liebevolle Unterstützung, ohne die diese Arbeit niemals hätte entstehen können.