

Molekulare Charakterisierung des NOD-*like* Rezeptors NLRC5

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

Vorgelegt von
Sven Künzel
Diplom-Biologe
Kiel, 2009

Referent/in:

Koreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt:

Inhaltsverzeichnis

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	<u>I</u>
<u>1 EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1 DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM	1
1.2 DIE TOLL-LIKE REZEPTOR (TLR) PROTEINFAMILIE	2
1.3 DIE <i>RETINOIC ACID INDUCIBLE GENE-1 (RIG-I)-LIKE</i> RNA HELIKASEN (RLH)	3
1.4 DIE NLR-PROTEINFAMILIE: EVOLUTION UND STRUKTUR	3
1.4.1 Die <i>Effektor-Binding Domain</i> (EBD)	5
1.4.2 Die NACHT-Domäne	7
1.4.3 Die <i>Ligand-Recognition Domain</i> (LRD)	8
1.5 DIE ROLLE VON NLR-PROTEINEN BEI ERKENNUNG VON PAMPs UND DAMPs	9
1.6 NLR-ABHÄNGIGE INTRAZELLULÄRE SIGNALTRANSDUKTION	11
1.7 INTERAKTION VON VERSCHIEDENEN NLR PROTEINEN	12
1.8 ASSOZIATION VON ALLELISCHEN VARIANTEN IN NLR-GENEN MIT CHRONISCH ENTZÜNDLICHEN ERKRANKUNGEN	13
1.9 CHARAKTERISIERUNG VON NLRC5	14
<u>2 FRAGESTELLUNG</u>	<u>15</u>
<u>3 MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>16</u>
3.1 CHEMIKALIEN UND ENZYME	16
3.2 PHYLOGENETISCHE ANALYSE DER NOD-LIKE REZEPTOR-GENFAMILIE	16
3.3 ZELLKULTURMETHODEN	16
3.3.1 Zellen und Kultivierung	16
3.3.2 Präparation humaner Fibroblasten	17
3.3.3 Bestimmung der Zelldichte	18
3.3.4 Aussaat und Ernte	18
3.3.5 Stimulationsexperimente	19
3.3.6 Zellinvasions-Assay mit cytoinvasiven Bakterien	19
3.3.7 Infektion mit Viren	20

3.3.8	Kultivierung von CMV	21
3.3.9	Titration von CMV	21
3.3.10	Transfektion von eukaryontischen Zellen	22
3.3.11	Bestimmung der Zellviabilität	23
3.4	MIKROSKOPIE	24
3.4.1	Fluoreszenzmikroskopie	24
3.4.2	Zellfixierung mit Paraformaldehyd	25
3.4.3	Färbung nukleärer DNA mit 4',6-Diamidino-2'-phenylindol (DAPI)	25
3.4.4	Färbung von Mitochondrien	26
3.4.5	Färbung von Lysosomen	26
3.5	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	26
3.5.1	Herstellung von Gesamtproteinlysaten	26
3.5.2	Koimmunpräzipitation	27
3.5.3	Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	28
3.5.4	Native Gelelektrophorese von Proteinen	29
3.5.5	Proteintransfer auf eine Trägermembran (Western-Blot)	29
3.5.6	Herstellung eines NLRC5-spezifischen Antikörpers	30
3.5.7	Immundetektion von Proteinen	30
3.5.8	Rehybridisierung der PVDF-Membran	30
3.5.9	Dual-Luziferase-Assay	31
3.6	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	33
3.6.1	Isolierung genomischer DNA	33
3.6.2	Isolierung von Gesamt-RNA	33
3.6.3	Qualitätskontrolle der RNA	33
3.6.4	cDNA-Synthese	34
3.6.5	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	35
3.6.6	Ortsgerichtete Mutagenese	36
3.6.7	Agarose-Gelelektrophorese	37
3.6.8	TaqMan <i>Real-Time</i> -quantitative-PCR (QRT-PCR)	37
3.6.9	Klonierung von Überexpressions- und Reportergenkonstrukten	38
3.6.10	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
3.6.11	Restriktionsverdau und Dephosphorylierung	39
3.6.12	Ligation	40
3.6.13	Transformation von Plasmiden in kompetente Bakterien- Zellen	41

3.6.14	Kolonie-PCR	41
3.6.15	Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen durch eine Mini-Präparation	42
3.6.16	Isolierung von Plasmid-DNA durch eine Maxi-Präparation	42
3.6.17	Sequenzierung	42
3.6.18	GATEWAY™-Klonierung	43
3.6.19	Künstliche Oligomerisierung	45
4 ERGEBNISSE		47
4.1	GENOMISCHE ORGANISATION UND PROTEINSTRUKTUR VON NLRC5	47
4.2	PHYLOGENETISCHE ANALYSE ZU NLRC5	49
4.3	EXPRESSIONSPROFIL VON NLRC5	51
4.4	TRANSKRPTIONELLE REGULATION VON NLRC5	52
4.4.1	Rolle von IFN (Interferon)- γ für die Regulation von NLRC5	52
4.4.2	Rolle cis-regulatorischer Elemente für die transkriptionelle Regulation von NLRC5	56
4.5	REGULATION VON NLRC5 NACH VIRUSINFEKTION	58
4.6	EXPRESSION VON NLRC5 UNTER PROINFLAMMATORISCHEN BEDINGUNGEN	61
4.7	UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION VON NLRC5	62
4.7.1	Etablierung einer exogen aktivierbaren NLRC5-Chimäre	62
4.7.2	Analyse der Rolle von NLRC5 bei Apoptose und Proliferation	63
4.7.3	Identifizierung von NLRC5-abhängigen intrazellulären Signaltransduktionsprozessen	65
4.7.4	Einfluss von NLRC5 auf den STAT1-Signalweg	67
4.7.5	Autokrine transkriptionelle Regulation von NLRC5	70
4.7.6	Identifizierung von Zielgenen des NLRC5 Signalgeschehens	70
4.8	ROLLE VON NLRC5 BEI ANTIBAKTERIELLEN ABWEHRMECHANISMEN	72
4.8.1	Synergismus zwischen NLRC5 und NOD2	72
4.8.2	Physikalische Interaktion von NLRC5 und NOD2	74
4.8.3	Proteininteraktion mit NOD2	75
4.9	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	76
5 DISKUSSION		77
5.1	NUTZEN UND GRENZEN VERWENDETER ZELLINIEN UND METHODEN	77
5.2	NLRC5 ALS VERTRETER DER NLR-GENFAMILIE	78
		III

5.2.1	Struktur von NLRC5	78
5.2.2	Gewebsspezifische Expression von NLRC5	79
5.2.3	Subzelluläre Lokalisation von NLRC5	80
5.2.4	Regulation von NLRC5 bei chronischen Erkrankungen	81
5.3	ROLLE VON NLRC5 BEI VIRALER UND BAKTERIELLER INFEKTION	82
5.3.1	Spezifische zytokinabhängige Regulation von NLRC5	82
5.3.2	Rolle von NLRC5 bei der Aktivierung antiviraler Signalwege	84
5.3.3	NLRC5 aktiviert antivirale Verteidigungsmechanismen	85
5.3.4	Hypothetisches Modell zur Wirkungsweise von NLRC5	87
5.4	DIE BEDEUTUNG VON NLRC5 FÜR DIE NOD2-ABHÄNGIGE SIGNALTRANSDUKTION UND DIE EPITHELIALE BARRIERE	89
5.4.1	Heterotypische Interaktion von NLRC5 und NOD2	89
5.4.2	Bedeutung der heterotypischen NLR-Proteininteraktion	91
<u>6</u>	<u>AUSBLICK</u>	<u>93</u>
<u>7</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>95</u>
<u>8</u>	<u>ABSTRACT</u>	<u>97</u>
<u>9</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>98</u>
<u>10</u>	<u>ANHANG</u>	<u>115</u>
10.1	NOMENKLATUR DER NLR-GENFAMILIE	115
10.2	ÜBERSICHT ÜBER RLHS UND TLRs	116
10.3	VERWENDETE KITS	116
10.4	VERWENDETE CHEMIKALIEN, ZUSÄTZE UND ENZYME	117
10.5	VERWENDETE PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN	119
10.6	VEKTOREN	120
10.7	OLIGONUKLEOTIDE	120
10.8	ANTIKÖRPER	122
10.9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	123
10.10	TABELLENVERZEICHNIS	124
10.11	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	126

ERKLÄRUNG **130**

LEBENS LAUF **131**

PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE **132**

DANKSAGUNG **133**

1 Einleitung

Der Mensch ist über die Grenzflächen der Haut, der Lunge und des Gastrointestinaltraktes ständig Pathogenen ausgesetzt. Der Begriff „Pathogene“ umfasst eine nicht systematisch zu klassifizierende Gruppe von Organismen bzw. organischen Partikeln, die bei bestimmten Lebewesen Krankheiten verursachen bzw. erregen können. Zu ihnen gehören u.a. Bakterien, Pilze, Nematoden und Viren. Das angeborene Immunsystem stellt hierbei ein Grundverteidigungssystem gegen eindringende Pathogene dar, das sich bereits früh in der Evolution der Metazoen entwickelt hat. Das phylogentisch jüngere erworbene/adaptive Immunsystem kommt hingegen nur bei Vertebraten und den ihnen phylogenetisch nahestehenden Taxa vor.

1.1 Das angeborene Immunsystem

Zu dem angeborenen Immunsystem zählen 1) anatomische und physiologische Barrieren (Epithelien), 2) spezialisierte Zellen (z.B. Monozyten, Phagozyten), 3) das Komplementsystem und 4) allgemein entzündliche Reaktionen. Da es die schnellste Antwort gegen invadierte Pathogene liefert, wird es auch als die erste Verteidigungslinie des Organismus bezeichnet. Über Keimbahn-codierte Rezeptoren, die *pattern recognition receptors* (PRRs), werden zelluläre Gefahrssignale (*damage-associated-molecular-pattern*, DAMP) und konservierte Strukturen von Pathogenen (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) erkannt (Medzhitov 2001). Die Erkennung von PAMPs oder DAMPs führt zu einer Sekretion von pro-inflammatorischen Proteinen (Ghosh und Karin 2002). Zu ihnen gehören u.a. Zytokine (Interferone, Interleukine, Tumornekrosefaktoren, Chemokine und kolonierstimulierende Faktoren) (Bonizzi und Karin 2004) und antimikrobielle Peptide (Defensine, Cathelizidine) (Kaiser und Diamond 2000).

Während antimikrobielle Peptide wie z.B. β -Defensin zu einer Lyse des bakteriellen Erregers führt (White et al. 1995), dienen Zytokine als körpereigene Botenstoffe mit unterschiedlichen Funktionen.

Die Gruppe der PRRs umfaßt u.a. drei konservierte Genfamilien (Abb. 1-1): die membranständigen Oberflächenproteine der Toll-like Rezeptor (TLR)-Familie (Akira et al. 2001, Medzhitov 2001) und die beiden zytoplasmatisch lokalisierten Familien der *retinoic acid inducible gene (RIG-I)-like* RNA Helikasen (RLH) (Thompson und Locarnini 2007) und

der *nuclueotide-binding and oligomerisation domain (NOD)-like receptor (NLR)* Familie (Inohara und Nunez 2001, Inohara et al. 2002).

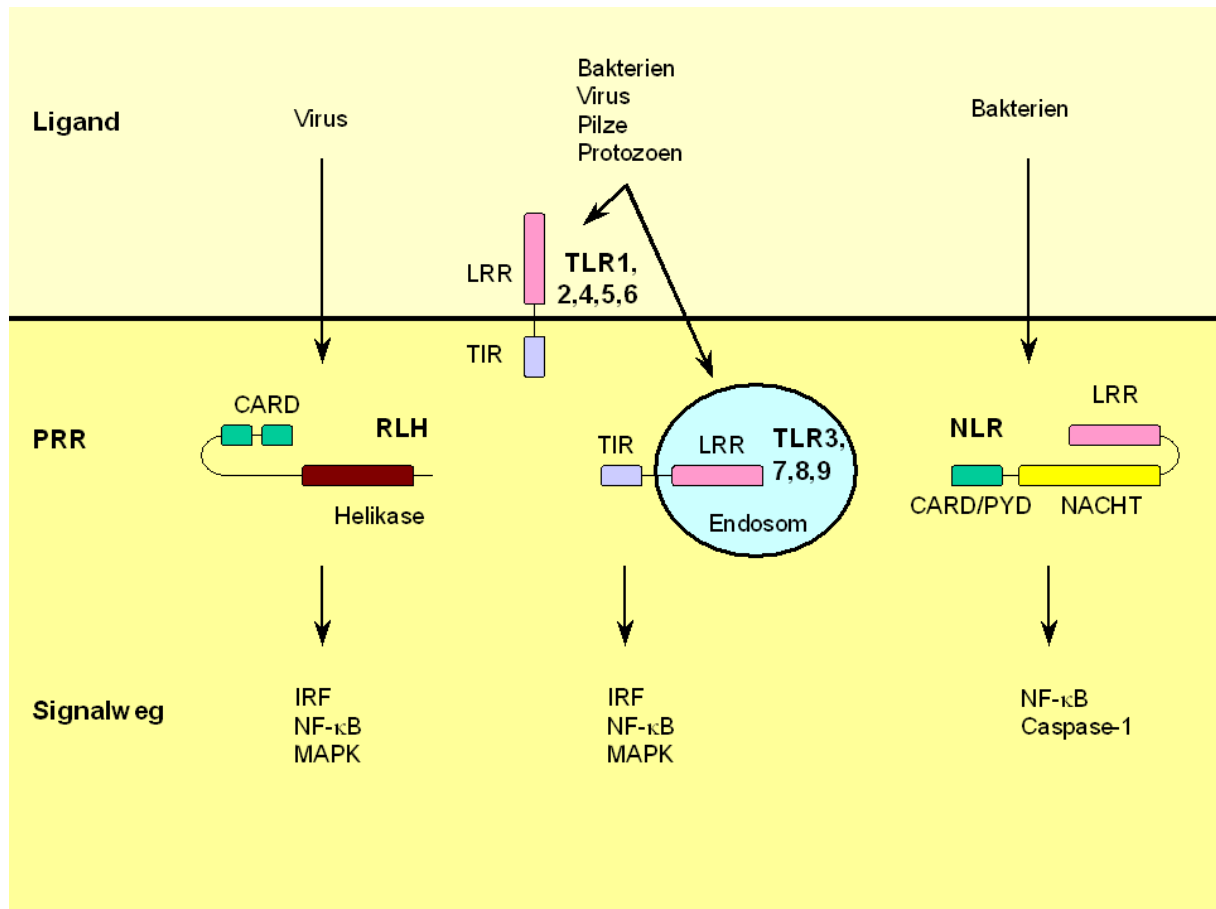


Abb. 1-1: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von *pattern recognition receptors* (PRRs) in Wirbeltier-Zellen.

CARD - *caspase activation and recruitment domain*, IRF - Interferon-regulatorischer Faktor, LRR - *leucine rich repeats*, MAPK - *mitogen activated protein kinase*, NACHT - *neuronal apoptosis inhibitory protein* (NAIP), *MHC class II transcription activator* (CIITA), *incompatibility locus protein from Podospora anserina* (HET-E) and *telomerase-associated protein* (TP1), NF- κ B - *nuclear factor kappaB*, NLR - *nucleotide-binding domain, leucine-rich repeats* (NBD, LRR)-containing, TIR - Toll/IL-1R, TLR – Toll-like Rezeptor, PYD – *pyrin-domain*, RLH - *retinoic acid inducible gene-1 (RIG-I)-like RNA Helikasen*

1.2 Die Toll-*like* Rezeptor (TLR) Proteinfamilie

Die TLRs, in Pflanzen *extracytoplasmatic leucine-rich repeats* (eLRR) genannt, sind eine Familie von transmembranen Oberflächenrezeptoren vom Typ-1. Zur Zeit sind 9 humane TLRs beschrieben (Takeda et al. 2003, Takeda und Akira 2005). Davon sind fünf in der Zellmembran verankert und vier endosomal lokalisiert (Abb. 1-1).

TLRs weisen alle eine charakteristische Domänenstruktur auf. Auf der dem Lumen zugewandten Seite besitzen sie eine *Leucine-Rich-Repeats*-Domäne (LRR-Domäne), welche als Sensor für extrazelluläre PAMPs dient. Im Zytosol befindet sich eine Toll/IL-1R (TIR)

Domäne (Abb.1-1), welche bei Kontakt der LRRs mit dem entsprechenden Liganden über homologe Interaktionen mit einem oder mehreren der zytosolischen TIR-Adaptermolekül TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN*), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) oder MAL (*MyD88-adaptor-like protein*) Signale weiterleitet und p38, JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), NF- κ B (*nuclear factor kappaB*) oder IRF (IFN-regulatorischer Faktor)- Signalwege aktiviert (Moynagh 2005, Takeda und Akira 2005). Zusätzlich zu ihren spezifischen Signalkaskaden können TLRs durch Hetero-Oligomerisierung die Spezifität ihrer Immunantwort variieren (Hajjar et al. 2001, Sandor et al. 2003, Into et al. 2004) und sind dadurch in der Lage, trotz begrenzter Anzahl von Rezeptoren und Signalwegen eine differenzierte und vielfältige Immunreaktion einzuleiten. Eine Übersicht der TLRs, ihrer Lokalisation und Liganden befindet sich im Anhang (Tab. 10-2) (Takeda et al. 2003, Honda und Taniguchi 2006).

1.3 Die *retinoic acid inducible gene-1 (RIG-I)-like RNA Helikasen (RLH)*

Eine weitere Gruppe des angeborenen Immunsystems sind die Nukleinsäuren-erkennenden RLHs. Zwei bekannte Mitglieder der RLH Familie sind: RIG-I und *melanoma differentiation-associated gene (MDA) 5*. Sie bilden intrazelluläre Sensoren für doppelsträngige RNA (dsRNA, Tab. 10-2) (Kang et al. 2002, Yoneyama et al. 2004). Die RLHs bestehen N-terminal aus zwei *caspase activation and recruitment domains (CARD)* und C-terminal aus einer Helikase-Domäne. Durch die Bindung des Liganden an die Helikase-Domäne kommt es zu einer Rekrutierung von IPS-1, ein Adaptermolekül, welches an Mitochondrien lokalisiert ist und über weitere Signaltransduktionsmoleküle IRF-Signalwege, MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) oder NF- κ B aktiviert (Yoneyama et al. 2004). Dabei zeigt die RLH Familie bei der viralen Antwort Ähnlichkeiten zu den antiviralen Signalaktivierungen von TLRs (Meylan und Tschopp 2006).

1.4 Die NLR-Proteinfamilie: Evolution und Struktur

Die PRR-Gruppe, der in den letzten Jahren stetig wachsende Aufmerksamkeit zuteil wurde und die ein Kernthema der vorliegenden Arbeit darstellt, ist die der zytoplasmatischen NLR-Proteine. Diese Genfamilie wurde in der Vergangenheit von verschiedenen Forschungsgruppen als *nucleotide-binding and oligomerization domain (NODs)* (Inohara und

Nunez 2003), NACHT/CRR/pyrin (NALPs) (Tschopp et al. 2003) oder als CARD, *transcription enhancer, R-(purine)-binding, pyrin, lots of leucine-rich repeats* (CATERPILLER) (Harton et al. 2002) bezeichnet. Aufgrund der Namensvielfalt hat sich erst kürzlich das *Human Genome Organisation* (HUGO) *Gene Nomenclature Committee* darauf geeinigt, die Familie einheitlich als *nucleotide-binding domain, leucin-rich repeats* (NBD, LRR)-*containing* Familie oder NLR zu bezeichnen (Ting et al. 2008a).

Die Familie der NLRs ist hoch konserviert und umfasst Vertreter sowohl aus dem Pflanzen- als auch aus dem Tierreich. Das erste Vertreter der NLR-Proteinfamilie, RPS2, wurde 1994 in *Arabidopsis thaliana* gefunden und charakterisiert (Bent et al. 1994). Die pflanzlichen NLRs, die analog zu ihren tierischen Vertretern ebenfalls eine Rolle bei der Abwehr gegen Pathogenbefall darstellen, bilden eine Untergruppe der *disease-resistance* (R) Gene. Das erste beschriebene NLR-Protein in Tieren ist das 1992 in *Caenorhabditis elegans* identifizierte Ced-4 (Yuan und Horvitz 1992), ein Ortholog des humanen APAF-1. Seitdem wurden in vielen weiteren Organismen NLR-Gene beschrieben. Neue genomische Untersuchungen zeigten z.B. bei Seeigeln eine Superfamilie von über 200 NACHT-*domain-leucine-rich repeat* Proteinen (Rast et al. 2006), welche den NLRs in Vertebraten ähneln. Während bei den niederen mehrzelligen Organismen eine große Anzahl von NLR-Genen im Genom vorkommen, sind es bei Säugetieren ungefähr 20. Im menschlichen Genom sind zur Zeit 22 Mitglieder beschrieben (Tab. 10.1), wobei nur ein kleiner Teil bisher charakterisiert wurde. Die bisher am besten untersuchten humanen NLR-Proteine sind NOD1, NOD2 und CIITA.

Der hohe Grad der Konservierung zeigt sich im Vergleich der Aminosäuresequenzen der verschiedenen humanen NLR-Proteine. Innerhalb der NLRs sind Übereinstimmungen von 10-30% festzustellen (Proell et al. 2008). Man nimmt an, dass es im Laufe der Evolution zu Rearrangements und Duplikationen von einzelnen Domänen kam, die eine neue Domänenarchitektur hervorbrachten. Um die evolutionäre Entwicklung zu untersuchen wird daher von verschiedenen Autoren die zentral liegende *neuronal apoptosis inhibitory protein* (NAIP), *MHC class II transcription activator* (CIITA), *incomptibility locus protein from Podospora anserina* (HET-E) and *telomerase-associated protein* (TP1) (NACHT-) Domäne als Grundlage für Stammbaumanalysen benutzt (Harton et al. 2002, Proell et al. 2008) (1.4.2).

Im Allgemeinen zeichnet sich die Proteinfamilie durch eine konservierte dreiteilige Domänenstruktur aus (Abb. 1-2) – eine aminoterminal liegende *effector-binding domain* (EBD), eine zentral lokalisierte NACHT-Domäne und carboxyterminal, eine *ligand-recognition domain* (LRD). Diese Domänen sollen im Folgenden näher vorgestellt werden.

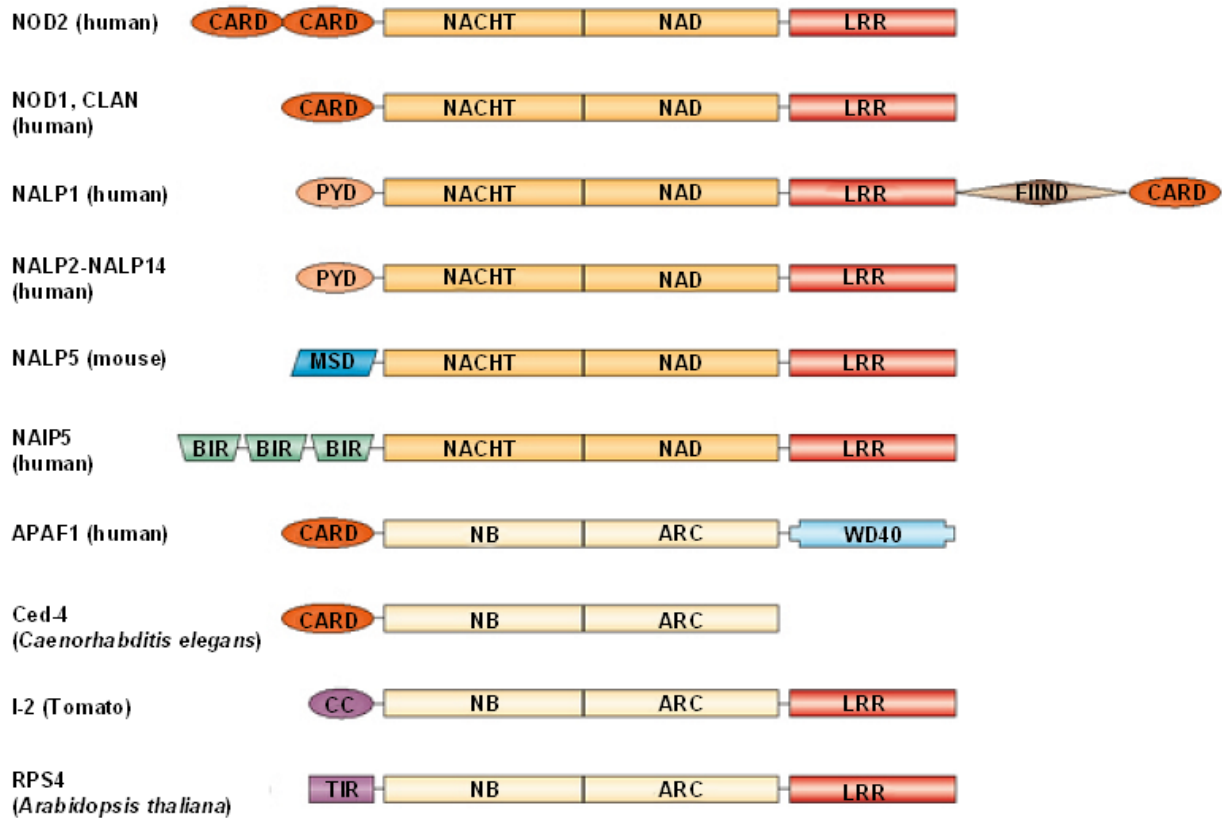


Abb. 1-2: Domänenstruktur einiger NLR Proteine.

Schematische Darstellung ausgewählter NLR Proteine: BIR – baculovirus IAP (*inhibitor of apoptosis protein*) repeat; CARD – caspase activation and recruitment domain; FIIND – domain with function to find; LRR – leucine-rich repeats; NACHT – neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), MHC class II transcription activator (CIITA), incompatibility locus protein from *Podospora anserina* (HET-E) and telomerase-associated protein (TP1); NAD – NACHT-associated domain; NAIP – neuronal apoptosis inhibitory protein; NB-ARC – nucleotide-binding adaptor shared by APAF-1, plant R gene products and CED-4 domain; PYD – pyrin domain; WD-40 – WD-40 repeat
 verändert nach (Schreiber et al. 2005)

1.4.1 Die Effektor-Binding Domain (EBD)

Für humane NLR-Proteine sind drei verschiedene EBDs beschrieben: *Baculovirus-inhibitor-of-apoptosis repeat* (BIR) (Roy et al. 1995), *caspase activation and recruitment domain* (CARD) (Hofmann et al. 1997) und die Pyrin-Domäne (PYD) (Bertin et al. 1999, Martinon et al. 2001). Durch die Identität der EBD wird die NLR-Proteinfamilie in verschiedene Unterfamilien eingeteilt (Abb. 1-3). Die beiden größten Unterfamilien sind: die CARD-tragende Unterfamilie (*nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and CARD domain containing* – NLRC) und die Pyrin-tragende Unterfamilie (*nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and PYD domain containing* – NLRP) (Ting et al. 2008a). Die Pyrin-tragende Unterfamilie bildet hierbei die größere der beiden Gruppen.

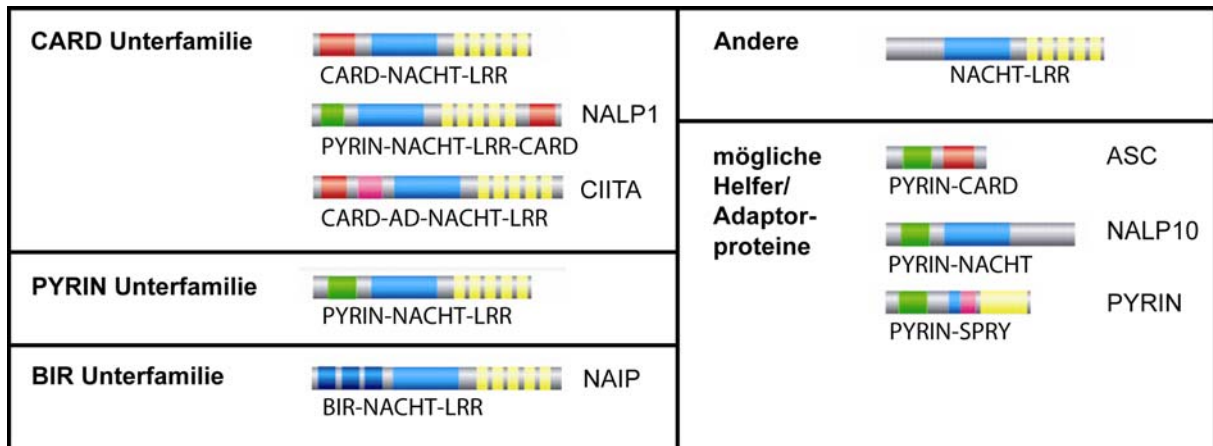


Abb. 1-3: Unterfamilien der NLR Proteine.
verändert nach (Wilmanski et al. 2008)

Die PYD (Hofmann et al. 1997) und die CARD sind strukturell verwandt und gehören zu der *death domain-fold* (DD) Superfamilie. Die Gruppe der DDs umfasst derzeit vier Untergruppen: die *death domain-fold* (DD), die *death-effector domain* (DED), und die oben genannten CARD und PYD. Diese Domänen dienen der Bindung und Aktivierung nachgeschalteter Adaptorproteine. Die Untergruppen der DDs haben einen sehr ähnlichen Aufbau. Sie bestehen aus einem dichten Bündel von sechs antiparallelen α -Helices (Abb. 1-4), der *death domain fold* genannt wird.

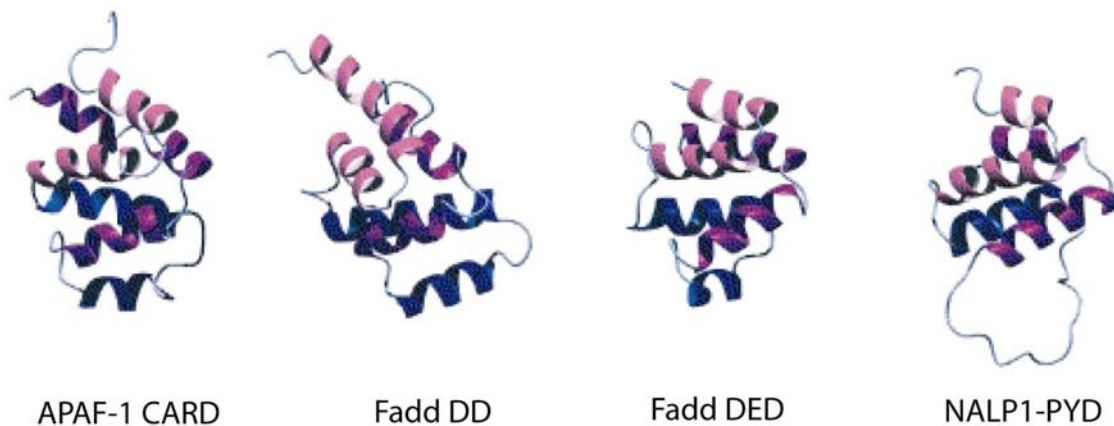


Abb. 1-4: 3D-Modelle der *death domain* (DD) Superfamilie.

Für jedes der vier Mitglieder ist ein Beispiel gezeigt. APAF-1 – *apoptotic protease activating factor-1*, Fadd DD – *Fas-associated protein with death domain*, Fadd DED – *Fadd with death-effector domain*, NALP1-PYD – *NLR family, pyrin domain containing 1-pyrin*. Der Helix-Farbcode: α_1 und α_2 lila, α_3 und α_4 blau und α_5 und α_6 rosa.

verändert nach (Hiller et al. 2003)

CARDS und PYDs können durch homophile Protein-Protein Interaktionen dimerisieren und sind auf diese Weise am Aufbau von Multiproteinkomplexen beteiligt (Hiller et al. 2003).

Dabei bilden die CARDS nach dem bisherigen Wissenstand normalerweise Dimere oder Trimere. CARD-tragende Proteine sind an wichtigen zellulären Prozessen beteiligt. Sie

vermitteln die Aktivierung und Rekrutierung von Caspasen im Rahmen des programmierten Zelltods (Apoptose). Zusätzlich kommen CARDs aber auch in Proteinen vor, die eine anti-apoptotische Funktion haben, wie z.B. in *inhibitors of apoptosis* (IAP) (Dubrez-Daloz et al. 2008) oder in *apoptosis repressor with CARD* (ARC) (Koseki et al. 1998). Eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der angeborenen oder erworbenen Immunantwort in der Zelle ist u.a. die Regulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Bouchier-Hayes und Martin 2002). NF- κ B reguliert die Expression von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden (Hayden et al. 2006).

1.4.2 Die NACHT-Domäne

Zentral gelegen befindet sich die NACHT-Domäne (Abb. 1-5 A), auch *nucleotide-binding domain* (NBD) genannt. Die NACHT-Domäne findet sich typischerweise in der Enzymklasse der NTPasen, welche ATP oder GTP binden (Koonin und Aravind 2000).

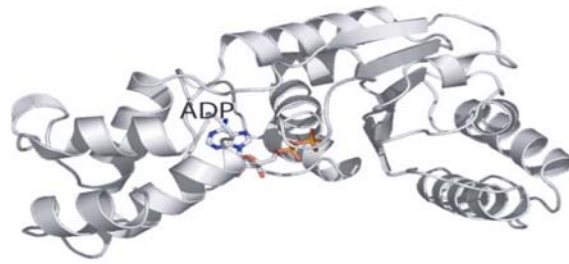
Es wird angenommen, dass die NACHT-Domäne für die Oligomerisierung der NLR-Proteine essentiell ist. Man geht davon aus, dass analog zur APAF-1 Aktivierung die Proteindomäne über Hydrolyse von ATP oligomerisiert, wodurch es zu einer Aktivierung mit anschließender Signaltransduktion kommt (Riedl et al. 2005).

Evolutionär betrachtet hat sich die NACHT-Domäne früh in zwei großen Gruppen gespalten: die NACHT-Subfamilien der CARD- und der PYD-tragenden NLRs (Abb. 1-5 B) (Harton et al. 2002, Proell et al. 2008).

Der hohe Grad der evolutionären Konservierung der NACHT-Domäne zeigt sich in der Ähnlichkeit der pflanzlichen NACHT-Domäne von *Arabidopsis thaliana*, RPM1, zu der humanen NACHT-Domäne von APAF-1 (Abb. 1-5B).

Die NACHT-Domäne bildet eine dreilagige α - β Sandwich-Konfiguration (Abb. 1-5). Dabei liegt das β -Faltblatt auf beiden Seiten eingebettet zwischen α -Helices. Die parallel angeordneten β -Faltblätter bilden das Herzstück der ATPase Domäne (Iyer et al. 2004). Auf dem Faltblatt liegen vier charakteristische Motive: Walker A/P-loop, Walker B sowie Sensor 1 und Sensor 2. Alle vier Motive sind in der ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse involviert, welche nach der gängigen Modellvorstellung zur spezifischen Konformationsänderung (Leipe et al. 2004) und damit Aktivierung führen.

A



B

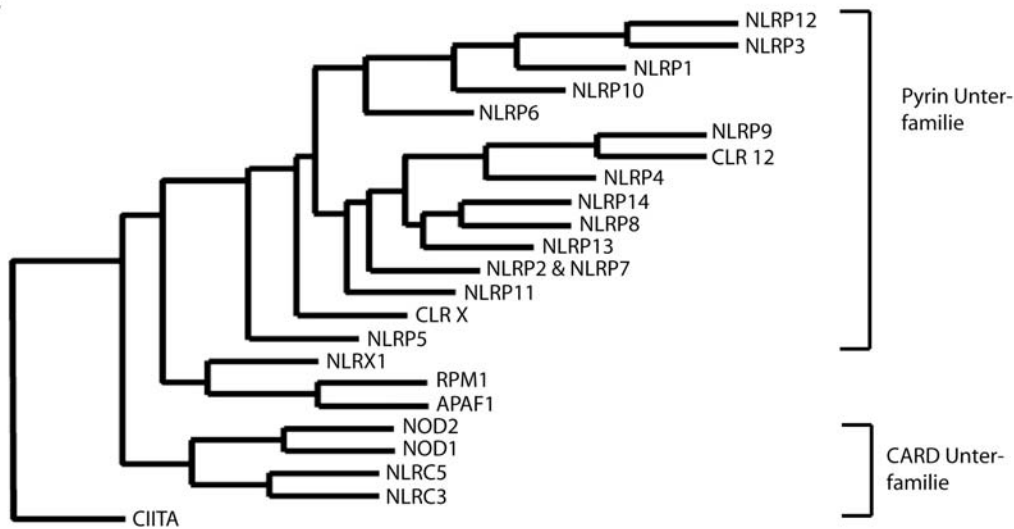


Abb. 1-5: Dreidimensionales Strukturmodell und phylogenetischer Stammbaum der NACHT-Domäne.

(A) Die NACHT-Domäne von APAF-1. Das Adenosindiphosphat (ADP) Molekül ist in Strichen gezeigt um die Nukleotid-bindende Stelle zu markieren. Verändert nach (Proell et al. 2008). (B) Evolutionäre Abstammung der humanen NACHT-Domänen. Der Stammbaum wurde anhand der Aminosäuresequenz erstellt. NALP – NLR family, pyrin domain containing, CLR – Caterpillar, RPM1 (aus *Arabidopsis thaliana*) – resistance to *P. syringae* PV Maculicola 1, NLRC – NLR family, CARD domain containing, APAF-1 – apoptotic protease activating factor-1 verändert nach (Harton et al. 2002)

1.4.3 Die Ligand-Recognition Domain (LRD)

Am C-Terminus der NLR Proteine befindet sich die LRD. Die LRD besteht aus 2-45 *leucine-rich repeats* (LRRs) von je 20-30 Aminosäuren und bildet eine typische Hufeisenform mit innenliegenden β -Faltblättern (Abb. 1-6) (Enkhbayar et al. 2004). Derzeit ist nicht bekannt, ob der entsprechende Ligand direkt mit der LRD interagiert oder indirekt über bisher unbekannte vermittelnde Co-Faktoren. Bei der Familie

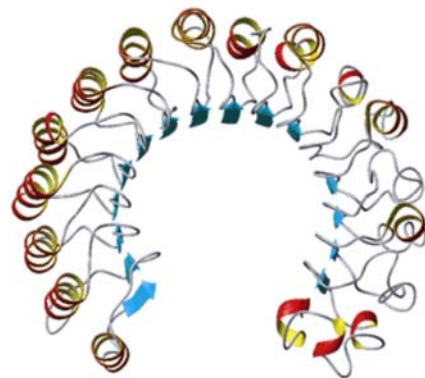


Abb. 1-6: LRD von NOD2.
verändert nach (Tanabe et al. 2004)

der NLRs sind bisher nur für sechs Mitglieder (NOD1, NOD2, NLRC4, NAIP, NALP1 und NALP3) die Liganden beschrieben. Dies sind u.a. Bestandteile der bakteriellen Zellwand (Muramyl-dipeptid bei NOD2 und NALP1) (Martinon et al. 2002, Girardin et al. 2003b), der bakteriellen Geißel (Flagellin bei NLRC4 und NAIP) (Franchi et al. 2006, Miao et al. 2006, Molofsky et al. 2006, Ren et al. 2006) oder bakterielle RNA (bei NALP3) (Kanneganti et al. 2006). Die Ligandenbandbreite ist aber nicht nur auf bakterielle molekulare Signaturen beschränkt. Als Liganden können auch DAMPs wie z.B. Uratkristalle bei NALP3 (Martinon et al. 2006), mineralische oder kristalline Strukturen wie z.B. Quarz oder Asbest (Dostert et al. 2008) oder UV-Strahlung (Faustin und Reed 2008) fungieren.

Interessanterweise ist die Immunantwort der Zelle, welche durch eine Aktivierung der NLRs durch die Liganden ausgelöst wird, nicht mit jedem Liganden gleich stark. Aus bisher unbekanntem Gründen führten verschiedene aktivierende Liganden bei NOD1 und NOD2 zu unterschiedlich starken Immunantworten (Hasegawa et al. 2006). Obwohl eine große Anzahl von Liganden für die sechs NLR-Proteine beschrieben wurde, scheinen neben der Ligandenbindung zusätzliche Faktoren bei der Immunantwort eine wichtige Rolle zu spielen.

1.5 Die Rolle von NLR-Proteinen bei Erkennung von PAMPs und DAMPs

NLR-Proteine fungieren als Sensoren für Mikroorganismen und allgemeine Gefahrensignale in der Zelle, die nach Aktivierung Verteidigungsprogramme in der Zelle auslösen. Das Grundverständnis von der Funktionsweise der NLR-Proteine leitet sich zum großen Teil aus Untersuchungen des Apoptose-induzierenden NLR-Vertreters APAF-1 ab. Inaktive NLR-

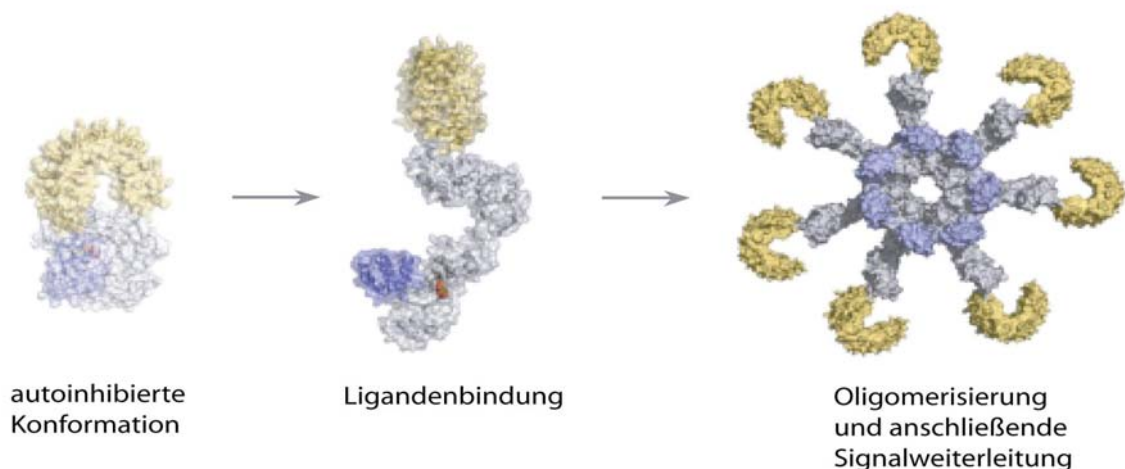


Abb. 1-7: Modell einer NLR Aktivierung und Oligomerisierung basierend auf strukturellen Informationen über APAF-1.
 verändert nach (Proell et al. 2008)

Proteine liegen in einer autoinhibierten Konformation vor, in der die LRD intramolekular die NACHT-Domäne inhibiert (Abb. 1-7) (Albrecht et al. 2003, Tanabe et al. 2004). Sobald die entsprechenden Liganden (Tab. 1-1) direkt oder indirekt mit der LRD interagieren, kommt es zu einer Konformationsänderung innerhalb des Proteins. Durch die Konformationsänderung kommt es zu einer strukturellen De-Inhibition der nun freiliegenden NACHT-Domäne. Das Binden von Nukleotidtriphosphat am *P-Loop* der NACHT-Domäne führt zu einer weiteren Strukturänderung, was eine Oligomerisierung der NLR-Proteine bewirkt. Hierbei bildet APAF-1 ein ringförmiges Heptamer. Für die anderen beschriebenen NLR-Proteine ist die Anzahl der an dem endgültigen Proteinkomplex beteiligten Moleküle nicht bekannt. Durch die Oligomerisierung kommt es zur Bindung von Adaptorproteinen und der Aktivierung nachgeschalteter Signalwege (Saleh et al. 1999, Benedict et al. 2000, Ogura et al. 2001b). Es wird davon ausgegangen, dass dieses Aktivierungsmodell generell bei den NLR-Proteinen mit einer dreigeteilten Domänenstruktur zutrifft. Zusätzlich zu dem beschriebenen Modell kommt es bei starker Überexpression von NLRs (z.B. NOD1 und NOD2) auch ohne den Liganden zu einer Selbstoligomerisierung und damit Aktivierung der weiteren Signalwege (Inohara et al. 2000, Ogura et al. 2001b).

Tab. 1-1: Übersicht über NLR Liganden und beteiligter Signalprozesse.
 verändert nach (Dostert et al. 2008, Wilmanski et al. 2008, Wagner et al. 2009)

Protein	Ligand	Bakterien	Adaptor	Signalweg
NOD1	GM-tripeptid	<i>Shigella flexneri</i>	RIP2	NF-κB
	Meso-lanthionin, meso-DAP	<i>Helibacter pylori</i>		
	γ-D-Glu-DAP (iEDAP)	<i>Enteroinvasive Escherichia coli</i>		
	γ-D-lactyl-L-ala-γ-Glu-meso-DAP-Gly (FK156)	<i>Pseudomonas species</i>		
	Heptanoyl-γ-Glu-meso-DAP-D-ala (FK565)	<i>Chlamydia species</i>		
		<i>Listeria monocytogenes</i>		
NOD2	MDP	<i>Listeria monocytogenes</i>	RIP2	NF-κB
	MurNAc-L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys (M-TRILys)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
		<i>Salmonella typhimurium</i>		
		<i>Shigella flexneri</i>		
NLRC4	Flagellin (<i>Salmonella</i> , <i>Legionella</i> , <i>Coxiella</i>)	<i>Salmonella typhimurium</i>	ASC	Caspase1
NAIP	Flagellin (<i>Salmonella</i> , <i>Legionella</i> , <i>Coxiella</i>)	<i>Legionella pneumophila</i>		Caspase1
NLRP3	bakterielle RNA	<i>Staphylococcus aureus</i>	ASC	Caspase1
	Nigericin	<i>Listeria monocytogenes</i>		
	Maitotoxin			
	Uratkristalle			
	Aerolysin			
	Asbest			
	Quarz			
NLRP1	Anthrax		ASC	Caspase1
	MDP			

1.6 NLR-abhängige intrazelluläre Signaltransduktion

Bisher wurden zwei generell unterschiedliche Signalprozesse beschrieben, die von aktivierten NLRs reguliert werden (Tab. 1-1, Abb. 1-8). Ein Signalmechanismus bewirkt die Aktivierung der NF- κ B und MAPK Signalkaskaden, welche durch eine Interaktion von NOD1/NOD2 mit der zytosolischen Serin/Threonin Kinase RIP2 (Rick/Cardiak/Ripk2) eingeleitet wird (Inohara et al. 1998, McCarthy et al. 1998, Thome et al. 1998, Girardin et al. 2001, Ogura et al. 2001b). Die Aktivierung erfolgt über eine homophile CARD-CARD Interaktion des aktivierten NLRs mit RIP2 (Kobayashi et al. 2002). RIP2 aktiviert anschließend auf bisher unbekanntem Weg den I κ B Kinase (IKK)-Komplex. Daraus resultiert eine Phosphorylierung und Degradation des NF- κ B Inhibitor I κ B, und es kommt zu einer Freisetzung und Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B.

Die Interaktion von RIP2 und NOD1/NOD2 kann neben der Aktivierung von NF- κ B

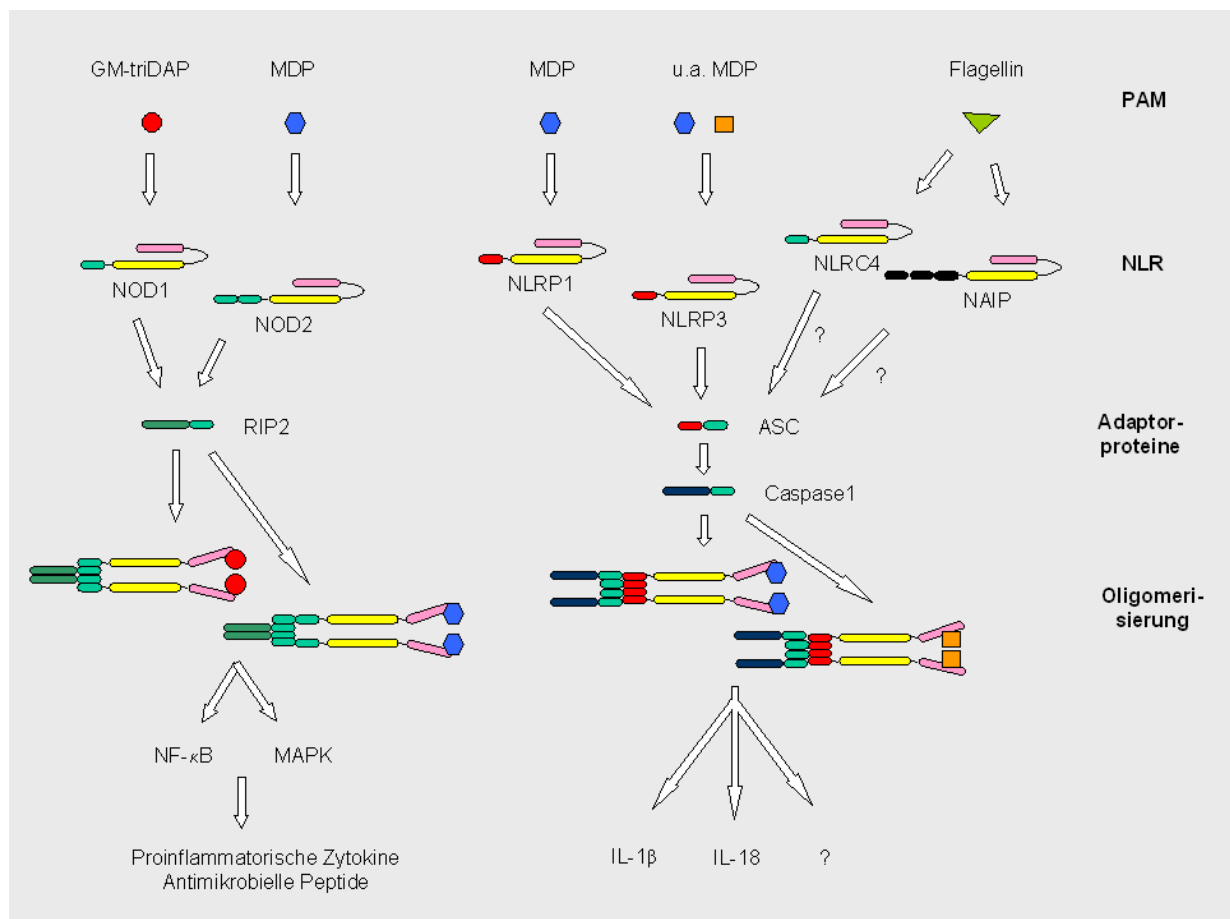


Abb. 1-8: Signalwege von bekannten NLRs.

ASC – apoptosis associated speck-like protein containing a CARD, IL-1 β - Interleukin 1 beta; MAPK - mitogen-activated protein kinase; MDP – Muramyldipeptid; NF- κ B – nuclear transcription factor kappaB; NLR - nucleotide-binding and oligomerisation domain (NOD)-like receptor; PAMP – pathogen-associated molecular pattern

zusätzlich direkt auf den MAPK-Signalweg einwirken (Abb. 1-8) und schließlich den Transkriptionsfaktor AP-1 regulieren. Beide Signalwege resultieren u.a. in einer Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-6, TNF- α , IL-12 oder IL-8 und in der Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden wie β -Defensinen (Kobayashi et al. 2002, Li et al. 2004, Kobayashi et al. 2005).

Ein weiterer über NLRs aktivierter Signalmechanismus ist die Aktivierung von Caspase-1 durch verschiedene NLRs (NALP1, NALP3, NLRC4 und NAIP) über das Adaptorprotein ASC (*apoptosis associated speck-like protein containing a CARD*) (Tab. 1-1, Abb. 1-8). ASC ist ein dualer Adaptor, da es sowohl eine PYD-Domäne als auch eine CARD besitzt (Masumoto et al. 1999). Da Caspase-1 N-terminal eine CARD besitzt und die interagierenden Proteine als EBD eine PYD besitzen, nimmt man an, dass ASC als Adaptorprotein fungiert (Srinivasula et al. 2002). Diese Aktivierung von Caspase-1 führt zur Prozessierung und Sekretion von IL-1 β . IL-1 β wird als pro-IL-1 β synthetisiert, das von der aktivierten Caspase-1 prozessiert wird. IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, das als Abwehrreaktion u.a. Fieber auslösen kann (Davidson et al. 1990). Unter bisher nicht näher charakterisierten zellulären Bedingungen kann es auch zur Einleitung des programmierten Zelltods kommen (Thalappilly et al. 2006).

1.7 Interaktion von verschiedenen NLR Proteinen

Eine interessante Frage ist, ob und unter welchen Bedingungen NLRs heterotypische Interaktionen eingehen können. Eine Interaktion und damit Oligomerisierung über die NACHT-Domäne mit verschiedenen anderen NLR-Proteinen ist bisher nur für überexprimiertes NLRC4 bekannt. Die NACHT-Domäne von NLRC4 interagiert mit allen getesteten NACHT-Domänen (Damiano et al. 2004). Durch die Interaktion von NLRC4 mit NOD1 und NOD2 wird deren NF- κ B Aktivierung signifikant inhibiert. Nach diesen Ergebnissen ist NLRC4 als positiver wie negativer Regulator an entzündlichen Prozessen beteiligt, in Abhängigkeit vom Pathogen oder PAMP. Die NACHT-Domäne ist in der Lage, unspezifisch weitere NACHT-Domänen zu binden (Damiano et al. 2004). Eine erst kürzlich erschienene Veröffentlichung zu dieser Fragestellung beschreibt eine ganze Reihe bisher nicht untersuchter Kreuzreaktionen der NLRs untereinander, welche durch eine CARD-CARD Interaktion eingeleitet werden. Obwohl das gängige Modell von einer Interaktion beruhend auf NACHT-NACHT Wechselwirkungen ausgeht, zeigten *yeast-two-Hybrid* Untersuchungen Interaktionen der EBD von NOD2 mit den EBD von NLRP1, NLRP3 und NLRP12 (Wagner

et al. 2009). Der Einfluss dieser Interaktionen auf die weitere Signaltransduktion ist bisher ungeklärt.

1.8 Assoziation von allelischen Varianten in NLR-Genen mit chronisch entzündlichen Erkrankungen

Genetische Variationen in diversen NLR-Genen sind mit der Entwicklung von verschiedenen Krankheiten assoziiert (Tab. 1-2). Bei den beschriebenen Krankheiten handelt es sich um chronisch entzündliche Erkrankungen mit Beteiligung der epithelialen Barriere bzw. um generalisierte Fieber-Syndrome. Der bisher am besten untersuchte Vertreter der NLR-Familie, NOD2, ist u.a. mit der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn assoziiert (Hampe et al. 2001, Hugot et al. 2001, Ogura et al. 2001a, Wang et al. 2002). In Tabelle 1-2 sind die verschiedenen Genvarianten mit den assoziierten Krankheiten dargestellt. Treten genetische Veränderungen in der LRD auf, kommt es nicht mehr zu einer spezifischen Ligandenerkennung, wodurch eine Oligomerisierung des NLR-Proteins ausbleibt (Tanabe et al. 2004, Girardin et al. 2005). Bei Mutationen in der NACHT-Domäne erfolgt zwar eine Ligandenbindung an die LRD, jedoch verhindert der SNP wahrscheinlich eine Oligomerisierung und damit eine Aktivierung der weiteren Signaltransduktionskaskade. Die assoziierten Krankheiten verdeutlichen umso mehr die Bedeutung der NLRs für den Menschen und das angeborene Immunsystem (Rosenstiel et al. 2007).

Tab. 1-2: NLR Proteine und ihre assoziierten Krankheiten.
 verändert nach (Kabesch et al. 2003, Wilmanski et al. 2008)

Gen	Assoziierte Krankheit	Mutation
NLRC2	Morbus Crohn	R702W, G908R, 1007fs (innerhalb der LRD)
	Blau-Syndrom	R334Q, R334W, L469F (innerhalb der NACHT Domäne)
	Sarkoidose	R334W (innerhalb NACHT Domäne)
NLRC1	Asthma bronchiales	ND(1)+32656
CIITA	Blau-Syndrom	Δ 940-963, Δ 1079-1106, Δ 1050-1078 (Splicemutationen der LRD)
NALP1	Weißfleckenkrankheit	L155H (zwischen Pyrin und NACHT Domäne)
NALP3	Nesselfieber	G301D, L305P, L353P, A439V, R488K, E525K, E627G
	Nesselfieber, Muckle-Wells Syndrom	R260W, V198M (innerhalb der NACHT Domäne)
	Muckle-Wells-Syndrom	A353V, A439T, G569R (innerhalb der NACHT Domäne)
PYRIN	Familiäres Mittelmeerfieber	M694V, M694I, V726A, M680I (SPRY Domäne)

1.9 Charakterisierung von NLRC5

Wie in den vorhergehenden Kapiteln dargelegt, stellen NLR-Proteine eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems dar. Überdies unterstreichen die mit genetischen Variationen von NLRs assoziierten chronischen Erkrankungen die elementare Bedeutung dieser Familie. Von den 22 beim Menschen vorkommenden Mitgliedern sind bisher nur sieben NLR-Proteine (NOD1, NOD2, CIITA, NLRP1, NLRP3, NLRC4 und NAIP) funktionell charakterisiert und deren Signalwege beschrieben (Abb. 1-8). Der Grossteil der Familie ist bisher nur rudimentär oder gar nicht charakterisiert. NLRC5 ist einer dieser unbekannteren Vertreter der NLR-Genfamilie. Ziel dieser Arbeit war es, NLRC5 näher zu charakterisieren und seine Bedeutung für das angeborene Immunsystem aufzuzeigen.

2 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte der NLR Vertreter NLRC5 näher charakterisiert werden. Bisherige Veröffentlichungen über NLRC5 hatten sich nur mit den Aspekten der *Legionella pneumophila* induzierten IFN- β Genexpression befasst (Opitz et al. 2006) und konnten keine umfassende Charakterisierung dieses Gens und des resultierenden Protein liefern.

Im einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie ist NLRC5 auf genomischer Ebene organisiert und was bedeutet diese Architektur für den Aufbau des resultierenden Proteins?
2. Wie wird NLRC5 auf transkriptioneller Ebene reguliert? Welche regulatorischen Elemente sind an dieser Regulation beteiligt?
3. Kann man Stimuli identifizieren, die zu einer Regulation von NLRC5 beitragen?
4. Welche intrazellulären Signalwege werden durch NLRC5 Oligomerisierung aktiviert ?
5. Kann man Zielgene des durch NLRC5 initiierten Signalgeschehens identifizieren?
6. Welche Rolle spielt NLRC5 bei der Pathogenabwehr?
7. Kann man eine physische und funktionelle Interaktion von NLRC5 mit anderen NLRs zeigen? Welche Rolle spielte diese Interaktion für das damit verbundene Signalgeschehen?

Die Beantwortung dieser und daraus resultierender Fragen sollte dazu beitragen, nicht nur den NLR Vertreter NLRC5 besser zu charakterisieren, sondern auch allgemeine Grundlagenkenntnisse über die komplexe Rolle von NLRs als Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zu gewinnen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Enzyme

Eine genaue Auflistung der Chemikalien und Enzymen und der kommerziellen Anbieter befindet sich im Anhang 10.4.

Primer und Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) bezogen. Alle Lösungen und Puffer wurden mit Wasser angesetzt, welches durch die SG Water UltraClear 300 UV Plus (Barsbüttel) deionisiert wurde. Eine Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen befindet sich im Anhang 10-5.

3.2 Phylogenetische Analyse der NOD-like Rezeptor-Genfamilie

Die Berechnung des phylogenetischen Stammbaumes erfolgte mit dem im Internet frei zugänglichen TreeBeST Programm (<http://treesoft.sourceforge.net/treebest.shtml>). Hierzu wurden die Sequenzinformationen der genomischen Sequenzen von humanem und dem *NLRC5* von verschiedenen Spezies in die Analysesoftware eingegeben.

3.3 Zellkulturmethoden

3.3.1 Zellen und Kultivierung

Die verschiedenen humanen Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) und von dem Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (Paris, Frankreich) bezogen. Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter Beachtung der üblichen sterilen Bedingungen an einer Arbeitsbank (HeraSafe, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) durchgeführt. Für alle Arbeitsschritte wurden ausschließlich sterile Materialien, Puffer und Medien verwendet.

Die Zelllinien (Tab. 3-1) wurden in den verschiedenen Zellkultur-Medien ergänzt mit 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin) (jeweils 50 µg/ml) bei 37°C und 5% (v/v) Kohlenstoffdioxid (CO₂) kultiviert, zweimal pro Woche mittels eines Inversmikroskops (h500, Hund, Wetzlar) visuell überprüft und bei etwa 80%iger Konfluenz passagiert. Für die Passage wurden die adhärenen Zellen mit auf 37°C temperiertem PBS (Gibco, Eggenstein) gewaschen und mittels Überschichtung mit Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen, Frankfurt) für fünf Minuten bei 37°C abgelöst. Die Enzymbehandlung wurde

durch Zugabe von FCS-haltigem Medium beendet, die Zellsuspensionen in 50 ml-Röhrchen überführt und für fünf Minuten bei 626x g (1.700 U/min) pelletiert. Nach Resuspendieren der Zellen in 1-2 ml Medium wurde ein entsprechender Anteil an Zellen zur weiteren Kultivierung in 25 ml-Kulturflaschen (Falcon, Heidelberg) überführt (durchschnittliche Verdünnung 1:4 - 1:6). Für die Experimente wurde die Zelldichte bestimmt (3.3.3), eine Zellsuspension definierter Zelldichte hergestellt, in das entsprechende Kulturgefäß ausgesät (3.3.4) und über Nacht kultiviert. Für die Experimente wurden nur Zellen bis zur maximal 25. Passage verwendet und zusätzlich einmal pro Monat auf Kontamination mit Mykoplasmen untersucht.

Tab. 3-1: In der vorliegenden Arbeit verwendete Zelllinien.

DSMZ - Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

x¹ - HFF wurden nach dem Protokoll 3.3.2. hergestellt.

x² – CEPH Zellen wurden von dem Centre d’Etude du Polymorphisme Humain in Paris bezogen (Dausset et al. 1990).

Zelllinien	Bedeutung	Ursprungsgewebe	Morphologie	DSMZ - Nr.	Medium
HEK293	<i>human embryonal kidney</i>	Niere (embyonal)	Epithel	ACC 305	DMEM
HeLa S3	Henrietta Lacks	Zervixkarzinom (Gebärmutterhalskrebs)	Epithel	ACC 161	RPMI 1640
SW-480	<i>human colon adenocarcinoma</i>	Kolon Adenokarzinom	Epithel	ACC 313	RPMI 1640
HT-29	<i>human colon adenocarcinoma</i>	Kolon Adenokarzinom	Epithel	ACC 299	DMEM
CACO-2	<i>human colon adenocarcinoma</i>	Kolon Adenokarzinom	Epithel	ACC 169	MEM
THP-1	<i>human acute monocytic leukemia</i>	T-Zell Leukämie	Monozyten	ACC 16	RPMI 1640
HEP-G2	<i>human hepatocellular carcinoma</i>	Leberkrebs	Epithel	ACC 180	MEM
RPMI-2650	<i>human nasal septum squamous cell carcinoma</i>	Nasenscheidewandkrebs	Epithel	ACC 287	RPMI 1640
HFF	<i>human foreskin fibroblasts</i>	Vorhautzellen	Epithel	x1	MEM
CEPH	<i>Centre d’Etude du Polymorphisme Humain</i>	Lymphoblastoide Zellen	Epithel	x2	RPMI 1640

3.3.2 Präparation humaner Fibroblasten

Humane Vorhautfibroblasten (*humane foreskin fibroblasts*, HFF) wurden aus frischem Circumcisionsmaterial präpariert. Das Material wurde unter sterilen Bedingungen auf einer Petrischale mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend 1 h in einem Kolben mit 50 ml Trypsinlösung (Biochrom, Berlin) in einem Hybridisierungssofen bei 37°C drehend inkubiert. Zur Entfernung grober bindegewebiger Bestandteile wurde das Material durch einen sterilen Filter (Cell Strainer, 70 µm Nylon Filter, Becton Dickinson, Heidelberg) gegossen und auf

zwei Röhrchen verteilt, die jeweils 10 ml MEM mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem (56°C, 30 min) FCS, L-Glutamin (350 µg/ml; Biochrom), Gentamycin (100 µg/ml; Serva, Heidelberg) und Nystatin (3,4 µg/ml; Lederle, Münster) enthielten. Das Gemisch wurde 10 min bei 100x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml Medium aufgenommen und nochmals unter obigen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 6 ml MEM mit 20% (v/v) FCS, L-Glutamin, Gentamycin, Nystatin und Ciprofloxacin (12 µg/ml; Ciprobay, Bayer, Leverkusen) aufgenommen und in 25 cm²-Zellkulturflaschen überführt. Die HFF-Zellen wurden nach vier Tagen mit Trypsin abgelöst, 1:2 verdünnt und in 80 cm²-Zellkulturflaschen überführt. Im Durchschnitt dauerte es bis zu 14 Tage, bis die Zellen Konfluenz erreichten. Nach weiteren vier Tagen wurden die Zellen erneut 1:2 verdünnt und in 175 cm²-Zellkulturflaschen überführt. Ab diesem Zeitpunkt wurden die HFF-Zellen in DMEM (mit 10% (v/v) FCS, L-Glutamin, Gentamycin und Ciprofloxacin) kultiviert.

3.3.3 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde eine Neubauer-Zählkammer (VWR International, Darmstadt) verwendet. Hierbei wurden ein 10 µl-Aliquot der Zellsuspension mit 90 µl 0,4% (v/v) Trypan-Blau (Sigma, München), einem Vitalfarbstoff, versetzt und von dieser Verdünnung 10 µl in die Zählkammer eingebracht. Anschließend wurden die nicht mit Trypan-Blau gefärbten lebenden Zellen unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter wurde mit folgender Formel berechnet:

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

3.3.4 Aussaat und Ernte

Die Zellzahl und das Medium-Volumen variierte je nach Zellkulturformat und Art des Experimentes. Für Transfektionsexperimente wurden geringere Zelldichten ausgesät, um die Transfektionseffizienz zu optimieren. Die für die verschiedenen Experimente eingesetzten Zellzahlen und Zellkulturplattenformate sind in Tab. 3-2 dargestellt.

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 626x g (1.700 U/min) sedimentiert. Suspensionskulturen

wurden erst in ein Reaktionsgefäß überführt, die Zellen sedimentiert und mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellpellets je nach weiterer Versuchsplanung entweder in den verschiedenen Lysepuffern aufgenommen oder bei -80°C eingefroren.

Tab. 3-2: Ausgesäte Zelldichten für die verschiedenen Experimente.

Experiment	Zellkulturformat	Zellzahl/well	Medienvolumen [ml]
Transfektion und Immunpräzipitation	10-cm-Schale	2×10^6	10
Proteinisolierung	6-well-Platte	4×10^5	2
RNA-Isolierung	6-well-Platte	4×10^5	2
Fluoreszenzmikroskopie	6-well-Platte	2×10^5	2
Gentamicin Protection Assay	24-well-Platte	2×10^4	0,5
Dual Luciferase Assay (DLA)	96-well-Platte	2×10^4	0,1

3.3.5 Stimulationsexperimente

Die jeweiligen Zelllinien wurden für entsprechende Versuche in den gewünschten Plattenformaten ausgesät (Tab. 3.2) und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde entweder die Transfektion oder Stimulation durchgeführt. Sollten die Zellen transfiziert und stimuliert werden, wurden die Zellen 24 h nach Aussaat transfiziert und 48 h nach Aussaat stimuliert. Die Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, 24 h mit dem Stimulans inkubiert.

3.3.6 Zellinvasions-Assay mit cytoinvasiven Bakterien

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellinvasions-Assays wurden HEK-293 Zellen mit lebenden Bakterien der Species *Listeria monocytogenes*, Serotyp 1/2a, Stamm EGD, inkubiert. Bei dieser Spezies handelt es sich um Gram-positive, stäbchenförmige, fakultativ-anaerobe Bakterien, welche in der Lage sind, in nicht-phagozytierende Zellen zu invadieren. Die Invasion der Zellen ist in der Regel pathogen und verursacht eine Reihe von Erkrankungen bei Menschen und Tieren, die als Listeriosen bezeichnet werden.

Am Vortag wurden Listerien in einem 5-ml-Aliquot Antibiotika-freiem Luria-Broth-Medium (LB-Medium) kultiviert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit frischem LB-

Medium 1:5 verdünnt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurden die Bakterien im Dunkeln für 45-60 min bei 37°C mit dem Farbstoff, 5-(6)-Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) inkubiert. CFSE ist ein nicht-fluoreszierendes Molekül, welches passiv in die Zellen diffundiert und durch intrazelluläre Esterasen in ein fluoreszentes Derivat umgesetzt wird.

Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (3000 U/min, 10 min), mit PBS gewaschen, und in 5 ml Medium resuspendiert. In jede Vertiefung einer 12-well-Zellkulturplatte wurden 100 µl Bakteriensuspension zu den dort befindlichen humanen Zellen hinzugegeben. Dabei wurden pro ausgesäter humaner Zelle 100 fluoreszent markierte Bakterien für das Infektionsassay eingesetzt (*multiplicity of infection* [MOI] = 100 Bakterien/Zelle). Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden durch Waschen mit PBS die extrazellulären Bakterien entfernt, die humanen Zellen in 250 µl PBS aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg) überführt. Die Proben wurden mit Hilfe des FACS-Calibur Durchflusszytometers (BD Biosciences, Heidelberg) gemessen. Die Proben wurden bei 488 nm angeregt und die entstehende Fluoreszenz im Fluoreszenzkanal-FL1 (Maximum bei 530 nm) detektiert. Dabei wurde der prozentuale Anteil der CFSE-positiven Zellen (M1) sowie das geometrische Mittel (*geo mean*) der Fluoreszenzintensität bestimmt. Um die Menge an cytosolisch vorliegenden Listerien abschätzen zu können, wurde der Aufnahmeindex (u.i., *uptake index*) als Produkt von M1 und *geo mean* nach der Methode von Pils et al. (Pils et al. 2006) errechnet.

Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle.

3.3.7 Infektion mit Viren

Die Infektionsversuche für diese Arbeit wurden mit HFF-Zellen durchgeführt. Dabei wurde mit dem humanen Zytomegalievirus (CMV) AD169-BAC gearbeitet (Hobom et al. 2000). CMV gehört zu der Familie der Herpesviridae und ist ein behülltes, doppelsträngiges DNA-Virus. Die Verbreitung ist weltweit ubiquitär. Je nach geographischer Lage sind hundert bis 60 Prozent der Menschen mit dem Virus infiziert. Die Übertragung erfolgt über Tröpfcheninfektion (Speichel, Urin, Spermasekrete und Bluttransfusion).

HFF-Zellen wurden je nach Versuchsansatz in festgelegter Anzahl in entsprechende Zellkulturschalen ausgebracht und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die verwendeten Virusstocks in MEM so verdünnt, dass die benötigte Infektiosität (*plaque forming units* (PFU) /ml) pro Infektionsansatz in einem Volumen von 100 µl vorlag.

Bei der Infektion von mehreren Zellkulturschalen mit dem gleichen Virusstock wurde ein entsprechender Mastermix hergestellt. Nach einem Medienwechsel wurden die Zellen mit jeweils 100 µl der Virusverdünnungen infiziert. Das Endvolumen pro Infektionsansatz wurde nach Möglichkeit so gewählt, dass eine endgültige Verdünnung des Virusstocks von mindestens 1:100 vorlag, da die Zellen ansonsten Schaden durch das im Virusstock vorhandene Saccharosephosphat nehmen könnten. War dies bei einem verwendeten Stock nicht möglich, wurde den anderen Infektionsansätzen die entsprechende Menge Saccharosephosphat zugefügt, um identische Infektionsbedingungen herzustellen. Die Zellen wurden für 1 h im Brutschrank inkubiert, um extrazelluläre Viren zu inaktivieren und virale Partikel abzuwaschen, dreimal mit Zitratpuffer pH 3 gewaschen und nach dem Überschichten mit frischem Medium bis zur weiteren Verwendung kultiviert (Schierling et al. 2005).

Um zu überprüfen, ob nur intakter CMV an Regulation von NLRC5 beteiligt ist, wurden in einigen Fällen die Viruspartikel vor der Infektion durch Hitzeinwirkung inaktiviert (65°C, 10 min) und die Infektion im Anschluss unter sonst vergleichbaren Bedingungen durchgeführt.

3.3.8 Kultivierung von CMV

Konfluente HFF-Kulturen wurden vor der Infektion 1:2 verdünnt und in 80 cm²-Zellkulturflaschen überführt. Dies entsprach etwa $0,75 \times 10^6$ HFF-Zellen. Infizierte HFF-Zellen wurden bei einem zytopathogenen Effekt von bis zu 80% (v/v) mit Trypsin abgelöst und in frischem DMEM-Medium verdünnt. Anschließend wurden etwa 10^4 der infizierten HFF-Zellen mit den frisch ausgesäten Zellen kokultiviert. Alle infizierten Zellen wurden einmal pro Woche verdünnt und mit frisch verdünnten, uninfizierten HFF-Zellen kokultiviert.

3.3.9 Titration von CMV

Titrationsexperimente zur Bestimmung der Endverdünnung von CMV wurden in HFF-Zellen in 24-well Platten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Dazu wurden am ersten Tag pro well 3×10^5 uninfizierte Zellen in 500 µl DMEM-Medium ausgesät. Zusätzlich wurden je 9×10^6 uninfizierte HFF-Zellen in vier mittlere Zellkulturflaschen ausgesät und mit je etwa 4×10^5 infizierten HFF-Zellen gemischt. Je eine Flasche dieser Kulturen wurde für die Infektion von HFF-Zellen ein bis vier Tage später verwendet. Anschließend wurden an den Tagen 0 bis 4 jeweils 500 µl von 10fach verdünnten infizierten HFF-Zellen dazugegeben. Der ersten Verdünnung lag ein Verhältnis von einer infizierten Zellen zu vier uninfizierten Zellen zu Grunde. Jede Verdünnung wurde vierfach ausgeführt. Die infizierten Zellen wurden bei

37°C im Brutschrank inkubiert. Die zytopathogenen Effekte wurden zehn Tage lang beobachtet und dokumentiert.

3.3.10 Transfektion von eukaryontischen Zellen

Für das Einbringen von DNA oder RNA in eukaryotische Zellen wurde das Verfahren der Lipofektion verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Komplexierung der DNA an der Oberfläche kationischer Lipidvesikel, die sehr leicht mit der Zellmembran fusionieren und so die DNA in die Zelle transferieren.

3.3.10.1 Transfektion mit Plasmid-DNA

Für die Transfektion von Plasmid-DNA wurde das Reagenz FuGENE® 6 (Roche, Mannheim) verwendet. Für die Transfektion wurde zuerst DNA in FCS-freiem Medium vorgelegt und in diese Mischung vorsichtig das FuGENE® 6-Reagenz zugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung zu dem Zellkulturmedium in den jeweiligen Kulturschalen gegeben (Tab. 3-3). Die Gesamtmenge transfizierter DNA wurde durch die entsprechende Zugabe eines Insert-freien Plasmids auf die jeweilige in Tab. 3-3 angegebene Menge aufgefüllt.

Tab. 3-3: Mengen und Volumina für FuGENE® 6-Lipofektion.

Plattenformat	Medium [µl]	DNA [µg]	FuGENE® 6 [µl]
10-cm-Schale	100	3	12
6-well-Platte	100	1	3
24-well-Platte	75	0,5	1
96-well-Platte	50	0,05	0,15

3.3.10.2 Transfektion mit siRNA

Für das Einschleusen von siRNA in eukaryotische Zellen wurde das kationische lipidbasierte Reagenz Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet.

Für die Durchführung der Transfektion wurde zunächst FCS-freies Zellkulturmedium (Tab. 3-4) mit siRNA vermischt. Ein weiteres Medialiquot gleichen Volumens wurde mit einer entsprechenden Menge des Transfektionsreagenz vermischt (Tab. 3-4) und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide Lösungen vereint und nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben.

Tab. 3-4: Mengen und Volumina für Lipofectamine™ 2000-Transfektionen.

Plattenformat	Gemeinsame Reagenzien		RNA [pmol]	Lipofectamine 2000 [µl]
	Plattengesamtvolumen [ml]	Medienvolumen für Verdünnungen [µl]		
6-well-Platte	2	2 x 250	100	5
12-well-Platte	1	2 x 100	40	2
24-well-Platte	0,5	2 x 50	20	1
96-well-Platte	0,1	2 x 25	5	0,25

3.3.11 Bestimmung der Zellviabilität

Die Zellviabilität wurde zum einen durch ein Zell-Proliferationsassay gemessen. Zum anderen wurde der Caspase Glo®-3/7-Assay (Promega, Mannheim) verwendet. Dieser Ansatz misst luminometrisch die Caspase 3 und 7 Aktivität und kann daher als ein Rückschluss für Zelltodmechanismen benutzt werden.

3.3.11.1 Zell-Proliferationsassay

Mit Propidiumiodid (PI) ist es möglich, nicht nur zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden, sondern auch die verschiedenen Phasen des Zellzyklus im Durchflußcytometer zu quantifizieren. PI wirkt dabei ähnlich dem Ethiumbromid als Nukleinsäureinterkalator.

Die Zellen wurden in einem 12-well-Format kultiviert und mit siRNA transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen zweimal gewaschen und in 1 ml PBS + 0,1% BSA aufgenommen und mit 3 ml 70% (v/v) Ethanol für 1 h bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 200 µl PI-Färbelösung (50µg/ml) resuspendiert und 50 µl von Rnase A Stammlösung (100 µg/ml) dazugegeben und bei 4°C für 3 h inkubiert. Die Proben wurden mit Hilfe des FACS-Calibur Durchflußzytometers (BD Biosciences, Heidelberg) gemessen. Die Proben wurden bei 488 nm angeregt und die Fluoreszenz im Fluoreszenzkanal-FL1 detektiert.

3.3.11.2 Caspase-Glo®-3/7-Assay

Bei dem Caspase-Glo®-3/7-Assay (Promega, Mannheim) wird die Aktivität der Caspasen 3 und 7 von Kulturen adhärenter oder sich in Suspension befindlicher Zellen luminometrisch gemessen. Diese beiden Caspasen werden nur dann aktiviert, wenn das Apoptose-Programm der Zelle aktiviert wird. Der Assay enthält ein nicht-lumineszentes Substrat, das die Tetrapeptidsequenz DEVD enthält. Dieses Substrat wird von den genannten Caspasen

gespalten, wobei Aminoluziferin frei wird, welches wiederum ein Substrat für eine im Assay enthaltene Luziferase ist. Bei der Umsetzung des Aminoluziferins durch die Luziferase werden Lichtquanten frei, welche luminometrisch detektiert werden können. Die Chemolumineszenz ist dabei ein direkter Indikator für das Ausmaß der sich in Apoptose befindlichen Zellen.

Der Assay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurden Zellen zunächst im *96-well*-Format kultiviert. Nach entsprechender Transfektion der Zellen wurden 100 µl des Caspase-Glo[®]-Reagenz auf die Zellen pipettiert. Nach 90-minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Lumineszenz mit einem GeniosPro-Plattenlesegerät (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) gemessen.

3.3.11.3 MTT-Assay

Ein weiterer Test für die Zellviabilität wurde mit dem MTT-Assay der Firma Promega (Mannheim) bestimmt. Das gelbe MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird in den Mitochondrien lebender Zellen zu purpurfarbenem Formazan umgesetzt, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm messbar ist. Da die Farbtintensität proportional zur enzymatischen Reduktion von MTT ist, kann somit die Zellviabilität kolorimetrisch quantifiziert werden.

Der Assay wurde im *96-well*-Platten-Format nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Absorptionsmessung bei 570 nm wurde das Platten-Lesegerät GeniosPro der Tecan Trading AG (Männedorf, Schweiz) und ein entsprechender Filtersatz verwendet.

3.4 Mikroskopie

3.4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Detektion der subzellulären Lokalisation von NLRC5 und der Interaktion mit NOD2 erfolgte u.a. mittels Fluoreszenzmikroskopie. Zu diesem Zweck wurden HeLaS3-Zellen auf Deckgläsern ausgesät, transient transfiziert und fixiert. Die entsprechenden Proteine wurden dabei mit Hilfe von Klonierungsstrategien mit zwei verschiedenen fluoreszierenden Proteinen fusioniert, koexprimiert und anschließend mit einem AxioImager.Z1-Fluoreszenzmikroskop mit integriertem Apotom (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) detektiert. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden unter Verwendung geeigneter Filtersätze (Tab. 3-5) der Firma Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Göttingen) und mittels einer an das Mikroskop angeschlossenen Kamera (AxioCam MR, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen)

dokumentiert. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte mit der Software AxioVision V4.5 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen).

Tab. 3-5: Filtersätze für Fluoreszenzmikroskopie.

Fluoreszentes Protein/ Fluorochrom	Filtersatz
CFP (AmCyan)	47
EGFP (enhanced GFP)	38
DAPI	49

3.4.2 Zellfixierung mit Paraformaldehyd

Paraformaldehyd diente als Fixierungsagens für eukaryontische Zellen und wurde von der Firma Merck KGaA (Darmstadt) bezogen. Paraformaldehyd vernetzt zelluläre Proteine irreversibel, wodurch organische Präparate für längere Zeit konserviert werden.

Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und 20 min bei 4°C mit 4% (w/v) Paraformaldehyd fixiert. Ein Verblässen der Fluoreszenzfarbstoffe wurde weitgehend unterbunden, indem alle folgenden Schritte unter Schwachlichtbedingungen durchgeführt wurden. Die Fixierungslösung wurde anschließend verworfen und Paraformaldehydrückstände durch dreimaliges Waschen mit kalter PBS-Lösung entfernt.

3.4.3 Färbung nukleärer DNA mit 4',6-Diamidino-2'-phenylindol (DAPI)

Nach der vorangegangenen Fixierung wurde die nukleäre DNA der Zellen mit dem Fluorochrom DAPI gefärbt. Auf diese Weise wurde die Kernmorphologie sichtbar und die Unterscheidung zwischen apoptotischen und vitalen Zellen möglich.

Für die Färbung wurde die DAPI-Stammlösung (Sigma, München) 1:1000 mit PBS verdünnt. Die Zellen auf den Deckgläschen wurden mit 500 µl der DAPI-PBS-Lösung überschichtet und für 15 min bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit 1 ml kaltem PBS-Puffer je 5 min gewaschen. Die Fertigstellung der Fluoreszenzpräparate erfolgte, indem 20 µl einer 50%igen (v/v) Glycerinlösung auf einen sauberen Objektträger pipettiert und ein mit Zellen bewachsenes Deckgläschen luftblasenfrei darauf abgelegt wurde.

3.4.4 Färbung von Mitochondrien

Für die Färbung von Mitochondrien wurde der MitoTracker[®] Red CMX ROS (Invitrogen, Frankfurt) verwendet. Der MitoTracker[®] Red CMX ROS ist ein Derivat von X-Rosamin und enthält Thiol-reaktives Chloromethyl, welches spezifisch Mitochondrien färbt. Der in dieser Arbeit benutzte Farbstoff bleibt in den fixierten Zellen erhalten. Die Färbung erfolgte nach dem Protokoll von Invitrogen. Die nach 3.4.2 fixierten Zellen wurden mit 250nM MitoTracker[®] für 45 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und mit DAPI gefärbt (3.4.3).

3.4.5 Färbung von Lysosomen

Schwache basische Amine, organische Derivate des Ammoniaks, akkumulieren selektiv in zellulären Kompartimenten mit geringem pH-Wert und können daher für Untersuchungen mit Lysosomen verwendet werden. In dieser Arbeit wurden die Lysosomen mit LysoTracker[®] Red DND-99 (Invitrogen, Frankfurt) angefärbt.

Die Färbung erfolgte nach dem Protokoll von Invitrogen. Die nach 3.4.2 fixierten Zellen wurden mit 75nM LysoTracker[®] für 45 min im Dunkeln gefärbt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit DAPI gefärbt (3.4.3).

3.5 Proteinchemische Methoden

3.5.1 Herstellung von Gesamtproteinlysaten

3.5.1.1 Denaturierte Proteinlysate

Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden Zellen wie beschrieben (3.3.4) geerntet und mit PBS gewaschen. Ein Pellet von circa 10^6 Zellen wurde in 60-80 μ l DLB-Puffer + 1% (v/v) Phosphatase-Inhibitor Cocktail II (Sigma, München) + 2% (v/v) 50x Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma, München) lysiert. Nach 5-minütigem Aufkochen bei 95°C und einer Ultraschallbehandlung (2 x 5 s) wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation (16.000x g, 15 min, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde jeweils in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und einer Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) unter Verwendung des DC (*Detergent Compatible*) Protein Assays (Bio-Rad, München) unterzogen.

3.5.1.2 Native Proteinlysate

Die Zellen wurden wie in 3.3.4 beschrieben geerntet, mit PBS gewaschen und pelletiert. Die Lyse der Zellen erfolgte unter Kühlung durch dreimaliges Vortexen für 45 s. Um die Proteine möglichst im nativen Zustand zu erhalten, wurden die sedimentierten Zellen in 40 µl eiskaltem nicht-denaturierendem Lysepuffer (RIPA) aufgenommen, der mit 1% (v/v) Phosphatase-Inhibitor-Cocktail II (Sigma, München) und 10% (v/v) EDTA-freiem 10x Protease-Inhibitor-Cocktail (complete Mini, Roche, Mannheim) supplementiert wurde. Anschließend wurden die Membrantrümmer durch Zentrifugation (16.000x g, 15 min, 4°C) von den Proteinen getrennt.

3.5.2 Koimmunpräzipitation

Die Koimmunpräzipitation (IP) ist eine molekularbiologische Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen (Phizicky und Fields 1995). Der Nachweis der Protein-Protein-Interaktion erfolgt bei einer IP unter nativen Bedingungen, indem mit Hilfe eines Antikörpers ein bestimmtes Protein isoliert wird. Die mit diesem Protein interagierenden Proteine werden dabei aus dem Proteingemisch mitisoliert und anschließend durch Immunoblot nachgewiesen.

Zunächst wurden die Proteine, deren Interaktion überprüft werden sollte, für 24-48 h transient in HEK293-Zellen überexprimiert und die Zellen geerntet. Um die potentiellen Bindungseigenschaften der überexprimierten Proteine zu erhalten, wurden die sedimentierten Zellen in 400 µl eiskaltem nicht-denaturierendem IP-Lysepuffer (RIPA) aufgenommen, der mit 1% (v/v) Phosphatase-Inhibitor-Cocktail II (Sigma, München) und 10% (v/v) EDTA-freiem 10x Protease-Inhibitor-Cocktail (complete Mini, Roche, Mannheim) supplementiert wurde. Die Lyse erfolgte unter Kühlung durch dreimaliges Vortexen der Zellen für 45 s. Das native Lysat wurde mit 20 µl Protein A/G-Agarose-Beads (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) versetzt, gevortext und durch Zentrifugation (16.000x g, 15 min, 4°C) von Membrantrümmern und unspezifisch bindenden Proteinen getrennt (sog. *Pre-clearing*). Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 µg eines monoklonalen Antikörpers. Nach einer einstündigen Inkubation bei 4°C auf einem Schüttler (*Multi-Axle Rotator A257*, Denley-Tech, England) und der Zugabe von 20 µl Protein A/G-Agarose-Beads zu den jeweiligen Proben folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurden die Agarose-Beads mit einer Tischzentrifuge sedimentiert (2 min, 400x g). Das Agarosepellet wurde dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Die Agarosebeads wurden mit 40 µl 2x SDS-Ladepuffer versetzt und

für 15 min bei 95°C erhitzt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und mittels SDS-PAGE analysiert.

3.5.3 Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Das Prinzip der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970) beruht auf der Trennung negativ geladener SDS-Protein-Komplexe durch Gelelektrophorese. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, das Proteine und Proteinkomplexe bis zur Primärstruktur entfaltet und die Eigenladung der Proteine überdeckt. Zusätzlich werden inter- und intramolekulare Proteinbindungen durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT; Sigma, München) aufgebrochen. Die denaturierten Proteine werden schließlich durch ihr konstantes Ladung/Masse-Verhältnis im Polyacrylamidnetz nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Zunächst wurde das Gel für die Elektrophorese aus den einzelnen Komponenten (Tab. 3-6) hergestellt. Je nach Größe des Zielproteins wurde der Acrylamid-Anteil und somit die Porengröße verändert.

Die äquilibrierten Proteinproben wurden kurz vor Beladen des Gels mit 4x SDS-Ladepuffer versetzt, für fünf Minuten auf 99°C erhitzt und abzentrifugiert. Die Geltaschen wurden mit jeweils 15 µg Protein beladen und zusammen mit 5 µl eines Molekulargewichts-Standards (Precision Plus Protein™ Dual Color, Bio-Rad, München) in Gelkammern des Typs Multigel G44 (Biometra, Göttingen) aufgetrennt. Dabei wurden die Proben im Sammelgel bei 15 mA/Gel (PP 3000 High Voltage Power Pack, Biometra, Göttingen) für 30 min fokussiert und anschließend im Trenngel je nach Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins bei 30 mA/Gel für 45-90 min aufgetrennt.

Tab. 3-6: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE.

Trenngel				
	Größe des Zielproteins [kDa]			
	10-60	20-100	30-120	50-200
Acrylamid (w/v)	15%	12%	10%	7,5%
Acrylamid/Bis (30%/0,8%) (w/v)	5 ml	4,15 ml	3,5 ml	2,5 ml
4x Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Aqua bidest.	2,5 ml	3,5 ml	4,15 ml	5 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
10% (w/v) APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Total	10,11 ml	10,11 ml	10,11 ml	10,11 ml

3% (w/v) Sammelgel	
Acrylamid/Bis (30%/0,8%) (w/v)	0,3 ml
4x Sammelgelpuffer	0,75 ml
Aqua bidest.	1,95 ml
TEMED	3 µl
10% (w/v) APS	30 µl
Total	3,033 ml

3.5.4 Native Gelelektrophorese von Proteinen

Native Gelsysteme enthalten kein denaturierendes SDS, somit werden die Proteine nicht denaturiert und behalten ihre native Konformation. Dieses Gelsystem ist daher sehr gut geeignet, komplexierte Proteine durch Detektion einer verschobenen Bande (*band shift*) zu analysieren.

Für diese Arbeit wurde ein 10%iges Glycin-Trenngel (Coligan et al. 1995) und ein 2,5%iges Sammelgel verwendet (Tab. 3-7). Als Größenmarker wurde 5 µl Precision Plus Protein™ Dual Color aufgetragen. Das Probenvolumen betrug 20 µl. Die Spannung war dieselbe wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben.

Tab. 3-7: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für ein natives Glycin-Gel.

10 % (w/v) Trenngel		2,5 % (w/v) Sammelgel	
200 mM Glycin	5 ml (pH 8,9)	200 mM Glycin	5 ml (pH 6,8)
Acrylamid/Bis (30%/0,8%) (w/v)	7 ml	Acrylamid/Bis (30%/0,8%) (w/v)	2 ml
Aqua bidest.	7,89 ml	Aqua bidest.	1 ml
TEMED	10 µl	TEMED	8 µl
APS (10%) (w/v)	100 µl	APS (10%) (w/v)	43 µl
Total	20 ml	Total	8,051 ml

3.5.5 Proteintransfer auf eine Trägermembran (Western-Blot)

Für den Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen auf eine Trägermembran wurden *Semi-dry*-Blots in Anlehnung an die Methode nach Southern (Southern 1975) durchgeführt. Hierbei wandern die durch SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld aus der Gelmatrix zur Anode und werden auf einer chemisch inerten Membran fixiert (Towbin et al. 1979).

Zur Vorbereitung des Proteintransfers wurde eine PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach) sowie spezielles 3 mm dickes Filterpapier (Whatman, Dassel) auf die Größe des SDS-Polyacrylamid-Gels zurechtgeschnitten. Die Membran wurde vor der Verwendung für 10 s in Methanol aktiviert, dann für mindestens 5 min in Wasser äquilibriert. Anschließend wurde das Gel vorsichtig auf in Kathodenpuffer getränktes Filterpapier positioniert. Auf das Gel wiederum wurde die Membran luftblasenfrei positioniert und darauf die in Anodenpuffer I und Anodenpuffer II getränkten Filterpapiere. Dieser Stapel aus Filterpapier, Gel und Membran wurde in einen Elektroblotter (*Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell*, Bio-Rad, München) transferiert und der Proteintransfer auf die PVDF-Membran bei 300 W und 0,8 mA/cm² für 90 min durchgeführt.

3.5.6 Herstellung eines NLRC5-spezifischen Antikörpers

Antiserum gegen NLRC5 wurde von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt. Um einen spezifischen Antikörper gegen NLRC5 herzustellen, wurden das Peptid CGQIENLSFKSRK für eine Immunisierung von Kaninchen als Wirtstier benutzt. Die Spezifität des Antikörpers wurde durch Immunoblotting von Lysaten mit überexprimiertem NLRC5-GFP Fusionsprotein getestet.

Alle weiteren benutzten Antikörper waren kommerziell erhältlich und sind im Anhang in Tab. 10-8 und Tab. 10-9 einschließlich der Firmen und der eingesetzten Verdünnung aufgelistet.

3.5.7 Immundetektion von Proteinen

Zum Nachweis von spezifischen membrangebundenen Proteinen wurde die Methode der doppelten Antikörpermarkierung mit nachfolgender Chemilumineszenz-Detektion genutzt. Dazu wird das Zielprotein auf der Membran zuerst mit einem spezifischen Antikörper (Primärantikörper) markiert. Im Anschluss wird ein Sekundärantikörper aufgebracht, der gegen die Wirtsspezies des Primärantikörpers gerichtet ist. Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (*Horse Radish Peroxidase*, HRP) konjugiert. Bei Zugabe eines geeigneten Reagenz katalysiert die HRP eine chemilumineszente Reaktion, die mit photochemischen Filmen sichtbar gemacht und dokumentiert werden kann (Ong et al. 1990).

Nach dem in 3.5.5 beschriebenem Proteintransfer wurde die PVDF Membran für mindestens eine Stunde in 5% (w/v) Magermilchpulver (MMP) in TTBS inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen der Membran abzusättigen. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper in der gewünschten Verdünnung (in 5% (w/v) MMP in TTBS) über Nacht inkubiert (4°C, leichte Rollbewegung). Nach dreimaligem Waschen in TTBS für jeweils 10 min wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde die Membran mit ECL-Reagenz (ECL PLUS, Amersham Biosciences, Braunschweig) überschichtet und 3 min bei RT inkubiert. Danach wurde mit Belichtungszeiten von 5 s bis 30 min ein Röntgenfilm belichtet (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) und anschließend entwickelt (Curix 60, AGFA, Leverkusen).

3.5.8 Rehybridisierung der PVDF-Membran

Die durch vorangegangene immunologische Nachweise auf der Membran gebundenen Antikörper wurden durch sogenanntes „Strippen“ entfernt. Hiermit wird die Entfernung gebundener Antikörper durch alkalische Denaturierung bezeichnet.

Dabei wurden zwei verschiedene Protokolle benutzt. Sollte nach der ersten Immundetektion mit dem gleichen Sekundärantikörper weitergearbeitet werden, wurde das erste Protokoll verwendet. Es hat den Nachteil, dass es längere Inkubationsschritte hat und dass mit 2-Mercaptoethanol gearbeitet wird.

Wurde für die zweite Detektion mit einem Sekundärantikörper gegen einen nicht vorher benutzten Organismus gearbeitet, wurde das zweite Protokoll verwendet.

3.5.8.1 Membran-Strippen Methode 1

Das *Strippen* erfolgte durch Inkubation der PVDF-Membran für 40 min bei 55°C in *Stripping*-Puffer 1 (Tab. 10-5), gefolgt von mehrmaligem Waschen in TTBS. Für die zweite Inkubation wurde entweder Anti- β -Actin oder ein anderer der Fragestellung entsprechender Primärantikörper verwendet.

3.5.8.2 Membran-Strippen Methode 2

Die PVDF-Membran wurde für 5 min bei Raumtemperatur in *Stripping*-Puffer 2 (Tab. 10-5) gelegt und dann 4x mit TTBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran wie in 3.5.7 beschrieben erneut behandelt.

3.5.9 Dual-Luziferase-Assay

Reportergenassays wurden zur Analyse der NLRC5-Promotor-Aktivität und zur Quantifizierung von Signalwegen (NF- κ B, NFAT, HSE, ISRE, GAS, STAT3 und AP-1) verwendet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Messung der Aktivität zweier unterschiedlicher Reportergene, die unter der Kontrolle zweier unterschiedlicher Promotoren stehen. Das hier verwendete erste Reportergen ist die Luziferase aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis*, welches in Gegenwart von Adenosintriphosphat (ATP), Magnesium und Sauerstoff die biolumineszente Oxidation von Luziferin katalysiert. Die Lumineszenz dient dabei als Maß für die Transaktivierung einer regulatorischen DNA-Sequenz.

Für die Aktivitätsmessung des NLRC5-Promotors wurden 1700bp der Promotoregion in den Vektor pGL3B kloniert. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz und der Zellvitalität wurde eine zweite Luziferase aus dem marinen Cnidarier *Renilla reniformis* verwendet. Sie ist auf dem Plasmid pRL-TK (Promega, Madison, USA) kodiert und steht unter der Kontrolle eines moderat konstitutiven Promotors (Thymidinkinase-Promotor). Da die *Renilla*- und die

Leuchtkäfer-Luziferasen unterschiedliche Substrate umsetzen und unterschiedliche pH Optima besitzen, war eine sukzessive Messung der Biolumineszenz in einem Ansatz möglich. Für die Quantifizierung von verschiedenen Signalwegen wurde das für die Leuchtkäfer-Luziferase kodierende Gen ebenfalls unter die Kontrolle eines bestimmten Zielpromotors oder einer potentiell regulatorischen DNA-Sequenz gestellt. Zur quantitativen Analyse der Signalweg-Transaktivierung wurden die oben genannten verschiedenen Reportervektoren verwendet.

Für die Messungen wurde der *Dual-Luziferase-Assay* (Promega, Madison, USA) eingesetzt, der nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde.

Die entsprechenden Zellen wurden für die *Assays* im 96-well-Format ausgesät und am Folgetag transfiziert. Für die Aktivierung des NLRC5-Promotors wurde 40 ng des Vektors mit der Promotorsequenz und 10 ng pRL-TK eingesetzt. Im Fall der Quantifizierung der Aktivierung der Signalwege wurden 22,5 ng pNF- κ B-Luc, pNFAT-TA-Luc, pHSE-Luc, pISRE-Luc, pGAS-TA-Luc, pSTAT3-TA-Luc oder pAP-1(PMA)-TA-Luc (Clontech, Heidelberg) und 5 ng Kontrollvektor pRL-TK (Promega, Madison, USA) zur Normalisierung der Transfektionseffizienz eingesetzt. Mit zusätzlich transfizierten Genen (z.B. NLRC5-GFP, CARD-FKBP) wurde die Gesamtmenge der transfizierten DNA auf 50 ng eingestellt. Wurde NLRC5 in Kombination mit NOD1 oder NOD2 zu dem Reporteragenassay transfiziert, betrug die Menge pro Ansatz für die einzelnen Gene: 3 ng NOD1 bzw. NOD2, 32 ng NLRC5, 3 ng pRL-TK und 12 ng des Reportervektors. Die Transfektion erfolgte nach dem in 3.3.10 beschriebenen Protokoll mit FuGENE[®] 6. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit unterschiedlichen Agenzien stimuliert und nach 24 h in 25 μ l 1x PLB (*Passive Lysis Buffer*, Promega, Madison, USA) lysiert. Die Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte mit Hilfe eines GeniosPro-Plattenreaders (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) durch automatisierte Zugabe von 50 μ l Luziferase-Substrat (Promega, Madison, USA) mit anschließender Meßzeit von 10 s, gefolgt von der Zugabe von 50 μ l *Stop-and-Glow*-Lösung (Promega, Madison, USA) und einer Messung für weitere 10 s. Als Leerwertkontrollen dienten untransfizierte Zellen. Die relative Luziferase-Aktivität (*relative light units*, RLU) wurde nach Abzug der Leerwerte als Quotient aus den Biolumineszenzmesswerten der Leuchtkäfer- und der *Renilla*-Luziferase berechnet und aus den Parallelexperimenten gemittelt. Die Experimente wurden jeweils dreimal wiederholt.

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 Isolierung genomischer DNA

Das Wizard SV *Genomic DNA Purification* System von Promega (Madison, USA) wurde nach Herstellerprotokoll verwendet. 10^6 Zellen wurden nach einem Waschschrift in PBS in 150 μ l des Wizard SV Lysis Buffer lysiert. Um die DNA an die Silicamembran zu binden, wurde dieses Lysat auf eine Minisäule gegeben und drei Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Darauf folgten drei Waschschriffe mit je 500 μ l SV *Wash Solution*. Eluiert wurde schließlich mit 50 μ l Nuklease-freiem Wasser (1 min; 13.000 g) in ein sauberes Reaktionsgefäß. Die Konzentration wurde mit einem UV-Photometer bestimmt. Anschließend wurde die isolierte DNA bei -20°C gelagert.

3.6.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Die jeweils verwendeten Zelllinien wurden mit PBS gewaschen, abgeschabt und die Zellen sedimentiert. Die RNA-Isolierung aus Zellkultur wurde mit dem RNeasy-Kit von Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Nach dem ersten Waschschrift mit RW1-Puffer wurde zum genomischer DNA Restriktionsverdau 80 μ l der DNase-Lösung (10 μ l DNase I in 70 μ l RDD-Puffer, Qiagen) auf die Membran aufgetragen und diese für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde weiter nach Protokoll die RNA aufgereinigt.

Die Konzentrationsmessung der RNA wurde mit einem UV-Photometer (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, ©PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei 260 nm durchgeführt. 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.

3.6.3 Qualitätskontrolle der RNA

Zur Überprüfung der Qualität der RNA wurde je 1 μ g auf einem 1%igen SYBR® *Safe*-haltigen (Invitrogen, Frankfurt) Agarosegel in 0,5x TAE bei 80 V/cm für 90 min aufgetrennt. Die optische Auswertung erfolgte mit Hilfe einer UV-Geldokumentationsanlage (BioDoc Analyze, Biometra, Göttingen). Während bei intakten RNA-Proben lediglich die 18S- und 28S-rRNA Banden zu erkennen sind, deuten zusätzliche Banden oder ein Verschmieren der rRNA-Banden auf Kontamination oder Degradation der RNA hin.

Um Kontaminationen der RNA-Proben mit genomischer DNA auszuschließen, wurde eine Test-PCR durchgeführt, für die die isolierte RNA als Matrize verwendet wurde. Nur RNA-Proben, die keine GAPDH-Bande (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) beruhend auf Amplifikation genomischer DNA zeigten, wurden für die reverse Transkription verwendet. Kontaminierte Proben wurden nochmals auf eine RNeasy-Säule aufgebracht und mit DNase I behandelt.

3.6.4 cDNA-Synthese

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase kann aus RNA die dazu komplementäre cDNA (*complementary DNA*) hergestellt werden. Diese spezifische, RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt einen Primer zur Synthese, welcher an die RNA bindet. Meist wird als Primer ein Oligo-dT-Abschnitt (10-15 Thyminbasen), welcher komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA ist, oder *random* Hexamere (Oligonukleotide bestehend aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleinbasen) eingesetzt. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten cDNA-Synthesen wurde das Advantage[®] RT-for-PCR Kit (Clontech, Heidelberg) verwendet, welches neben einer retroviralen *MMLV (moloney-murine leukemia virus)* Transkriptase, alle weiteren benötigten Komponenten enthielt.

Zunächst wurde von den unterschiedlichen RNA-Präparationen ein Aliquot entnommen, welches einer Menge von 250 ng entsprach. Diese Aliquote wurden mit RNase-freiem Wasser auf ein einheitliches Volumen von 12,5 µl gebracht und anschließend mit 1 µl (20µM) Oligo(dT)₁₈-Primer versetzt. Durch 2-minütiges Erhitzen der Proben erfolgte die Denaturierung der RNA und eine anschließende Primerhybridisierung. Für eine nachfolgende schnelle Abkühlung der Proben wurden diese auf Eis gelagert. In Tab. 3-8 sind die weiteren Komponenten aufgelistet, die anschließend zu den jeweiligen Ansätzen hinzugefügt wurden.

Nach der 5-minütigen Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase und dem Hinzufügen von jeweils 80 µl DEPC-behandeltem Wasser (Ambion/*Applied Biosystems*, Darmstadt) wurden die einzelnen Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Tab. 3-8: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.

Komponenten	Volumen	Inkubation
Gesamt-RNA	500 ng	
Oligo(dT) ₁₈ -Primer	1,0 µl	
Aqua bidest. (RNase-frei)	add 13,5 µl	
Gesamter Ansatz		2 min bei 70°C
5xReaktionspuffer	4,0 µl	
dNTP-Mix (10 mM)	1,0 µl	
Rekombinanter RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl	
MMLV-Reverse-Transkriptase (200 U/µl)	1,0 µl	
Gesamter Ansatz		1 h bei 42°C 5 min bei 95°C ∞ bei 10°C

3.6.5 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Für den Nachweis der *NLRC5*-Expression und verschiedenen antiviralen und proinflammatorischen Zielgenen (*DDX58*, *IFN-α*, *IL-8*, *IL-12a*, *OAS1*, *PRKRIR* und *STAT1*) auf mRNA-Ebene wurden genspezifische Primerpaare entworfen, von der Firma Metabion International AG (Planegg-Martinsried) synthetisiert und diese in Anlehnung an die Methode nach Mullis und Faloona (Mullis und Faloona 1987) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt.

Die Sequenzen der Primer beruhen auf den jeweiligen annotierten kodierenden mRNA Sequenzen, die in der Genbank der *University of California, Santa Cruz (UCSC) Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/index.html>, Santa Cruz, USA) beschrieben sind. Für die Amplifikation der betreffenden mRNA wurde ein Primerpaar gewählt, welches ein Intron überspannt.

Für eine semiquantitative Auswertung wurde die Zyklenzahl für jedes Gen so niedrig gewählt, dass die Reaktion sich im nicht-gesättigten Bereich der Amplifikationskinetik befand.

Nach Auftrennung des kompletten Reaktionsansatzes auf einem 1%igen SYBR[®] Safe-haltigen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) Agarosegel (3.6.7) wurde die DNA mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers sichtbar gemacht und in einigen Fällen mit der Software *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>, National Institutes of Health, USA) für densitometrische Auswertungen quantifiziert (Rasband 1997-2005, Abramoff et al. 2004). Die Expression

entsprechender Zielgene wurde als Mittelwert von mindestens zwei unabhängigen Experimenten in Relation zur GAPDH-Expression berechnet.

Tab. 3-9: Exemplarischer Reaktionsansatz und PCR-Programm einer RT-PCR.

Für den Reaktionsansatz wurde die *GoTaqTM* DNA-Polymerase mit dazugehörigem Puffer (Promega, Madison, USA) verwendet. Die Durchführung der PCR erfolgte mit einem Gradient *Thermocycler* von Biometra (Göttingen). Die verwendeten Oligonukleotide mit den jeweiligen Hybridisierungstemperaturen sind im Anhang 10.7 aufgelistet.

Komponenten	Volumen	Programm		
		Temperatur	Zeit	Zyklen
DNA	250 ng	95°C	5 min	1
Primer-Mix (je 10µM)	0,5 µl	95°C	30 sec	
GoTaq Polymerase	0,25 µl	T _{anneal}	30 sec	28-35
5x GoTaq Buffer	5 µl	72°C	1-8 min	
dNTPs (10mM)	0,5 µl	72°C	10 min	1
Aqua bidest.	add 25 µl	10°C	∞	1

3.6.6 Ortsgerichtete Mutagenese

Deletion von putativen Transkriptionsfaktor-Bindestellen im NLRC5-Promotor wurde durch Mutagenese des Wildtyp-Promotors mit sequenzspezifischen Primern und dem Mutagenese-Kit QuickChange[®] *Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Hierfür wurde Primerpaare hergestellt, die zu einer Deletion der mutierenden Stelle führten (Tab. 10-7). Nach der Amplifikation wurde die unmutierte *Template*-DNA durch die Restriktionsendonuklease *DpnI*, die nur die methylierte bakterielle DNA erkennt, abgebaut. Ein typischer Ansatz ist in Tab. 3-10 dargestellt.

Das unverdaute mutierte Plasmid wurde wie in 3.6.13 beschrieben in *E. coli* transformiert.

Tab. 3-10: Reaktionsansatz und PCR-Programm einer Mutagenese.

Komponente	Menge	Programm		
		Temperatur	Zeit	Zyklen
<i>Template</i> -Plasmid	50 ng	95°C	30 sec	1
<i>sense</i> -Primer	125 ng	95°C	30 sec	
<i>antisense</i> -Primer	125 ng	55°C	1:30 min	18
Pfu-DNA-Polymerase	1 µl	68°C	7 min	
10x Reaktionspuffer	5 µl	10°C	∞	1
dNTPs (je 10 mM)	1 µl			
Aqua bidest.	add 50 µl			

3.6.7 Agarose-Gelelektrophorese

Für 1%ige Gele wurden 1 g Agarose (Seakem LE Agarose; BIO-Whittaker Molecular Applications, USA) in 100 ml 1x TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nachdem die Lösung auf ca. 60°C abgekühlt war, wurden 0,00003% (v/v) SYBR[®] Safe (Invitrogen, Frankfurt) dazugegeben und die Lösung zum Aushärten in eine Apparatur (Biozym, Hess. Oldendorf) mit 20- oder 15-zähligen Kämmen gegossen. Die Proben wurden zum Auftragen mit 1:10 Volumen Probenpuffer versetzt und der SmartLadder (Eurogentec, Berlin) wurde als Molekulargewichtsmarker aufgetragen.

Für die Gelelektrophorese wurde 1x TBE als Puffer verwendet. Die Gele wurden mit einem UV-Transilluminator (TF 20 M Vilber Lourmat; Torcy, Frankreich) bestrahlt und mit einer Videodokumentationsanlage BioDoc Analyse (Biometra, Göttingen) dokumentiert.

3.6.8 TaqMan *Real-Time*-quantitative-PCR (QRT-PCR)

Um eine quantitative Aussage über die RNA-Transkripte eines bestimmten Genes machen zu können, wurde die QRT-PCR-Technik eingesetzt (Bustin 2000). Das Prinzip der QRT-PCR beruht auf der herkömmlichen PCR, wobei zusätzlich die Menge des neu synthetisierten PCR-Produktes quantifiziert wird. Die Quantifizierung wird mit Fluoreszenzmessungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Mit einer willkürlich gesetzten Grenze (*Threshold*), die die Amplifikationskurven schneidet, wird als Maß für den Ablauf der Reaktion der *Threshold-Cycle* (C_t) bestimmt. 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-Energie-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 ein geprüftes fertiges *Assay (assay on demand)* der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) zurückgegriffen. Es wurde das Expressionsassay Hs00260008_m1 für *NLRC5* verwendet. Die QRT-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 *housekeeping gene* 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 3-11 gibt die Zusammensetzung der einzelnen Reaktionen an. Temperaturen und Reaktionszeiten der PCR folgten den Herstellerempfehlungen.

Für die Standardkurve wurde von einer Probe für β -*Actin* und für *NLRC5* jeweils die in Tabelle 3-12 angegebenen Verdünnungen in TE-Puffer angesetzt und in einer Doppelbestimmung amplifiziert.

In der Auswertung wurde aus den relativen Quantitäten der Quotient von Probe und β -Actin-Wert ermittelt (Pfaffl 2001). Danach wurde aus den Doppelbestimmungen der Mittelwert errechnet.

Tab. 3-11: Zusammensetzung der Taqman-PCR-Reaktion.

Komponente	Volumen [μ l]
cDNA (1:5 vorverdünnt)	5
Taqman Primer und Sonde 20 Mix	0,5
Mastermix	4,5
Total	10

Tab. 3-12: Verdünnung 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

3.6.9 Klonierung von Überexpressions- und Reportergenkonstrukten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Untersuchung verschiedener Fragestellungen unterschiedliche Vektoren benötigt. Die komplette codierende Sequenz von *NLRC5* wurde aus cDNA von humanem Pankreas (Human Tissue Panels, Clontech, Heidelberg) amplifiziert und kloniert. Der *NLRC5*-Promotor wurde aus genomischer DNA von freiwilligen Spendern amplifiziert und kloniert. Der Transfer in die verschiedenen Vektoren erfolgte, soweit nicht

anders aufgeführt, über die GATEWAY-Klonierung (3.6.18). Der Promotor wurden mittels Restriktionsendonukleasen in den Luziferase enthaltenden Vektor pGL3B kloniert. Die Klonierung in den FKBP enthaltenden Vektor pC₄M-F_v2E der CARD von NLRC5 erfolgte ebenfalls durch Restriktionsendonukleasen. Im Anhang (Tab. 10-6) befindet sich eine Zusammenfassung der verwendeten Plasmide mit der jeweiligen Zielsetzung der erstellten Klonierung.

3.6.10 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die identifizierten DNA-Banden in der richtigen Größe wurden aus dem Agarosegel mit dem Wizard[®] SV *Gel and PCR Clean-Up-System* (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben eluiert. Die DNA wurde abschließend mit 20 µl Nuklease-freiem Wasser in ein sauberes Röhrchen eluiert (1 min, 13.000 g).

3.6.11 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Nach der Amplifikation und Aufreinigung der DNA wurden durch enzymatische Hydrolyse das 5'- und das 3'-Ende des PCR-Fragmentes abgetrennt. Diese Reaktion wurde mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt, die hochspezifisch bestimmte Nukleotidsequenzen innerhalb doppelsträngiger DNA erkennen und dort den DNA-Strang durch eine hydrolytische Reaktion durchtrennen. Eine Reihe von Restriktionsendonukleasen erzeugen dabei Schnittstellen mit unterschiedlich langen Überhängen einzelsträngiger DNA. Werden Vektor und PCR-Amplikon mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen hydrolysiert, die zueinander nicht kompatible Schnittstellen erzeugen, wird eine gerichtete Ligation des DNA-Fragments in das Plasmid ermöglicht und eine Re-Ligation des Vektors verhindert.

Die Tabelle 3-13 zeigt exemplarisch einen Reaktionsansatz einer typischen Doppelrestriktionshydrolyse. Die Restriktionsendonukleasen wurde von der Firma *New England Biolabs* (Frankfurt) bezogen. Die Auswahl der entsprechenden Enzyme richtete sich dabei nach den Restriktionsschnittstellen innerhalb der *Multiple Clonig Sites* (MCS) der jeweiligen Plasmide und optimalen Kombination zweier Restriktionsendonukleasen. Letzterer Punkt ist insofern von Bedeutung, als dass es bei bestimmten Enzymkombinationen zu einer unspezifischen Enzym-Aktivität kommen kann.

Die Reaktionsansätze wurden bei 4°C angesetzt und anschließend für ein bis zwei Stunden in einem Wasserbad (Biometra, Göttingen) bei 37°C inkubiert. Während der Restriktionsansatz mit dem in den Vektor zu inserierenden PCR-Fragment auf Eis gelagert wurde, erfolgte bei

dem Plasmidrestriktionsansatz die Zugabe von 1 µl alkalische Phosphatase (CIP, *Calf Intestine Phosphatase*, New England Biolabs, Frankfurt) und eine weitere einstündige Inkubation bei 37°C. Durch die enzymatische Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe des linearisierten Vektors wird eine Rezirkularisierung der DNA verhindert. Nach einer Inaktivierung (75°C, 10 min) der Restriktionsenzyme und der alkalische Phosphatase wurden beide Reaktionsansätze zusammen mit dem zirkulären Vektor zur Kontrolle der Restriktionshydrolyse auf einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das der Restriktionshydrolyse unterzogene PCR-Fragment und das linearisierte Plasmid wurden nun in der unter Kapitel 3.6.10 beschriebenen Weise aus dem Agarosegel eluiert.

Tab. 3-13: Exemplarische Zusammensetzung einer Doppelrestriktion.

Komponenten	Nukleinsäure	
	Plasmid	Insertion
Nukleinsäure	1 µg	0,1-0,3 µg
10x Puffer	3 µl	3 µl
10x BSA (10 mg/ml)	2 µl	2 µl
Enzym 1 (20 U/µl)	1 µl	1 µl
Enzym 2 (20 U/µl)	1 µl	1 µl
Aqua bidest.	add 20 µl	add 20 µl

3.6.12 Ligation

Die Ligation eines DNA-Fragments in ein Plasmid erfolgte bei einem molaren Verhältnis von 3:1 (Insert : Vektor). Vor der Erstellung einer Ligationsreaktion wurde zunächst photometrisch (NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer, ©PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) die DNA-Konzentration von eluiertem Plasmid und PCR-Amplikon bestimmt. Mit Kenntnis der Konzentration wurde anschließend die molare Konzentration nach der folgenden Formel errechnet.

$$\text{molare Konzentration} \left(\frac{\text{fmol}}{\mu\text{l}} \right) = \frac{\text{Konzentration} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right) \times 10^6}{\text{Insertlänge (bp)} \times 649 \left(\frac{\text{pg}}{\text{fmol} \times \text{bp}} \right)}$$

Für die Ligation wurde eine Ligase aus dem Phagen T4 verwendet, die mit dem dazugehörigen Pufferkonzentrat von der Firma *New England Biolabs* (Frankfurt) bezogen wurde. Der Tabelle 3-14 sind die Komponenten und Mengen eines typischen

Ligationsansatzes zu entnehmen. Die Ligationsreaktionen wurden stets über Nacht bei einer Temperatur von 14°C inkubiert.

Tab. 3-14: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes für die Inserierung eines DNA-Fragments in ein Plasmid.

Komponenten	Volumen
aufgereinigtes Plasmid nach Restriktionshydrolyse	15 fmol
aufgereinigtes Insert (PCR-Amplikon nach Restriktionshydrolyse)	45 fmol
10x Pufferkonzentrat	2 µl
T4-Ligase (2,5 U/µl)	1 µl
Aqua bidest.	add 20 µl

3.6.13 Transformation von Plasmiden in kompetente Bakterienzellen

Unter Transformation versteht man die Aufnahme freier DNA bzw. von Plasmiden in Bakterien. Positive Bakterienklone können anschließend über ein vom Plasmid codiertes Resistenzgen (z.B. *Ampicillin Resistance Gene*) selektioniert werden.

Verwendet wurden *One shot Top 10 Escherichia coli* Zellen von Invitrogen (Frankfurt). Nachdem die Zellen auf Eis aufgetaut waren, wurde ihnen 1-2 µl der Ligationsreaktion (siehe Kapitel 3.6.13) zugegeben und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz 30 s bei 42°C einem Hitzeschock im Wasserbad ausgesetzt und anschließend für zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Bakterien in 250 µl SOC-Medium (Invitrogen, Frankfurt) aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C auf dem Schüttelinkubator inkubiert (200 U/min, Orbital Incubator SI50, Stuart Scientific, Watford Herts, GB). Der Ansatz wurde auf einer Antibiotika-haltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Nach erfolgreicher Selektion wurden aus einigen der gewachsenen Bakterienkolonien die Plasmide isoliert und auf eine korrekte Insertion des gewünschten PCR-Produktes untersucht.

3.6.14 Kolonie-PCR

Bei dieser Methode handelt es sich um eine schnelle Identifikation, ob *E. coli* erfolgreich transformiert wurde. Für eine Kolonie-PCR wird keine isolierte DNA sondern ganze Zellen

eingesetzt. Nach einem Zellaufschluß, der im ersten PCR-Schritt passiert, liegt die DNA frei und kann in den folgenden Amplifikationsschritten als Vorlage dienen.

Von der zu prüfenden Kolonie wurde mit einer Pipettenspitze ein Teil auf eine mit dem entsprechenden Antibiotika versehene, LB-Agarplatte und ein weiterer Teil in den fertigen PCR-Ansatz übertragen. Die anschließende PCR enthält Primer des vorher klonierten Produktes, welche für ein relativ kurzes Amplifikat kodieren. Die PCR wurde nach dem Schema von Tab. 3-9 laufen gelassen. Das Gesamtvolumen der PCR betrug 10 µl.

3.6.15 Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen durch eine Mini-Präparation

Zur Identifizierung von Klonen, die die korrekte Ziel-DNA enthielten, wurden pro Transformationansatz 10-12 Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, in 2-3 ml antibiotikahaltigem LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Plasmid Mini-Präparation mit Hilfe des Wizard® Plus SV *Minipreps DNA Purification System* der Firma Promega (Mannheim) nach Herstellerangaben. Das Verfahren der Plasmid Mini-Präparation basiert auf der 1979 von Birnboim und Doly (Birnboim und Doly 1979) beschriebenen alkalischen Lyse und ist heute die am häufigsten verwendete Methode.

Die Reinheit und die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt und die DNA teilweise direkt für Transfektion eingesetzt, beziehungsweise bei -20°C gelagert. Durch Restriktionsverdau bzw. PCR mit den Klonierungsprimern wurden die isolierten Plasmide auf die korrekte Insertion der Ziel-DNA überprüft.

3.6.16 Isolierung von Plasmid-DNA durch eine Maxi-Präparation

Zur Isolierung größerer Plasmidmengen wurde eine Maxi-Präparation durchgeführt. 250 ml Übernachtkultur wurde bei 4°C zentrifugiert (15 min, 4.000 U/min; Varifuge 3.0R, Heraeus, Hannover) und unter Verwendung des QIAfilter Maxiprep Kits (Qiagen, Hilden) wurden die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben isoliert.

3.6.17 Sequenzierung

Die Sequenz jedes klonierten DNA-Stranges 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. Durch die Inkorporation eines solchen Didesoxynukleotids 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 die maximale Leselänge einer Sequenzierungsreaktion ungefähr bei 800 bp lag, wurden längere DNA-Abschnitte in mehreren Schritten sequenziert. Dabei wurden Primer verwendet, mit denen sich überlappende Sequenzabschnitte verifiziert werden konnten. Die Parameter einer Sequenzierungsreaktion sind der Tabelle 3-15 zu entnehmen.

Tab. 3-15: Reaktionsansatz für eine Sequenzierung und Programmierung eines Thermocyclers.

Komponenten	Volumen	Programm		
		Temperatur	Zeit	Zyklen
Matrizen-DNA	300 ng	95°C	1 min	1
Big Dye V.5	5 µl	95°C	10 sec	
Primer (4,8 pmol/µl)	1 µl	50°C	5 sec	30
Aqua bidest.	add 10 µl	60°C	4 min	
		72°C	10 min	1
		10°C	∞	1

3.6.18 GATEWAY™-Klonierung

Die GATEWAY-Technologie der Firma Invitrogen ist ein neues System zur Klonierung und Subklonierung von DNA-Sequenzen. Unter Beibehaltung der Orientierung und des Leserasters können die DNA-Segmente mittels spezifischer Rekombinationssequenzen zwischen den GATEWAY-kompatiblen Vektoren beliebig transferiert werden. Die PCR-amplifizierte DNA-Sequenz wird zunächst per BP-Reaktion in einen *Entry*-Vektor kloniert und anschließend per LR-Reaktion in die entsprechenden *Destination*-Vektoren überführt. Diese Technologie wurde u.a. für die Erstellung von Konstrukten für Reportergerätsversuche (3.6.9) benutzt.

3.6.18.1 Klonierung durch BP-Rekombination

Voraussetzung für eine erfolgreiche BP-Rekombination ist, dass sowohl das PCR-Produkt als auch der *Entry*-Vektor frei von Verunreinigungen sind. Für die Erstellung eines *Donor*-Konstruktes wurde zunächst die zu klonierende DNA mittels PCR amplifiziert. Die benutzten Primer enthielten die Sequenz für die Rekombinationsstellen in dem pDONR221 Vektor. Zur Erfolgskontrolle wurde der PCR-Ansatz in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die Zielbande durch Vergleich mit dem DNA-Standard *SmartLadder* (Eurogentec, Berlin) identifiziert und nach Kapitel 3.6.10 aus dem Gel extrahiert. Die Klonierung mittels BP-Rekombination erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers und ist in der Tabelle 3-16 dargestellt. Nach Inaktivierung der BP-Klonase durch die Zugabe von Proteinase K wurde 1 µl des BP-Reaktionsansatzes für die Transformation von chemisch kompetenten *E.coli*-Zellen verwendet (siehe 3.6.13). Nach der in Kapitel 3.6.15 und 3.6.16 beschriebenen Plasmidisolierung aus einer kultivierten Bakteriensuspension wurde der Erfolg der BP-Rekombination mittels Sequenzierung (siehe 3.6.17) des klonierten DNA-Segments kontrolliert.

Tab. 3-16: Sequenzspezifische Rekombination zur Erstellung von Donor-Vektoren mittels BP Clonase.

Komponenten	Volumen	Inkubationsbedingungen	
		Temperatur	Zeit
PCR Amplifikat	250 ng		
Donor-Vektor (pDONR221, 200 ng/µl)	1 µl		
10xBP Puffer	1 µl	14°C	über Nacht
TE-Puffer (pH 8,0)	add 8 µl		
BP Clonase™ II Enzym-Mix	2 µl		
Total	10 µl		

3.6.18.2 Klonierung durch LR-Rekombination

Die im Folgenden verwendete Rekombinase erkennt hochspezifisch besondere Rekombinationssequenzen, die sich von denen der zuvor verwendeten BP-Rekombinase unterscheiden. Diese Erkennungssequenzen finden sich in den GATEWAY-fähigen Plasmiden wieder. Unter Verwendung des GATEWAY® *LR Clonase*™ II-Enzym-Mixes der Firma Invitrogen (Frankfurt) konnten die verschiedenen Konstrukte aus dem *Entry*-Vektor

pDONR221 in die jeweiligen *Destination*-Vektoren übertragen werden. Diese Reaktion wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt und ist in der Tabelle 3-17 wiedergegeben. Der Erfolg der LR-Rekombination wurde durch Sequenzierung (3.6.17) der jeweiligen *Destination*-Vektoren überprüft. Aufgrund der vorangegangenen Sequenzverifizierung des *Entry*-Vektors war eine genaue Kontrolle des in die jeweiligen *Destination*-Vektoren übertragenen DNA-Segments nicht weiter erforderlich.

Tab. 3-17: Sequenzspezifische Rekombination zur Erstellung von *Destination*-Vektoren mittels LR-Rekombinase.

Komponente	Volumen	Inkubationsbedingungen	
		Temperatur	Zeit
Entry-Vektor (pDONR221)	100-300 ng		
Destination-Vektor (pDest)	300 ng		
TE-Puffer (pH 8,0)	add 8 µl	25°C	über Nacht
5xLR Clonase Reaktions-Puffer	2 µl		
LR Clonase™ II Enzym-Mix	2 µl		

3.6.19 Künstliche Oligomerisierung

Viele zelluläre Prozesse werden durch direkte Protein-Protein-Interaktion reguliert, so wie es auch bei der Aktivierung nachgeschalteter Signalwege durch *NOD-like* Rezeptoren der Fall ist. Durch Benutzung einer speziellen Chimäre ist es möglich, diese Protein-Protein Interaktion durch Zugabe eines exogenen Linkers künstlich zu initiieren. Der pC₄M-F_v2E Vektor, der in dieser Arbeit benutzt wurde, ist Teil des Argent™ *Regulated Homodimerization Kit* von Ariad (Cambridge, USA). Die Effektor-domäne von NLRC5 wurde über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XbaI* in den Vektor pC₄M-F_v2E kloniert. Der Vektor (Abb. 3-1A) enthält zwei FK506-binding protein (FKBP)₂ Monomere. Daraus resultierte ein Fusionsprotein der CARD Domäne von NLRC5 mit FKBP. Durch Zugabe von 0,1% (v/v) des synthetischen Dimerisierers AP20187 (Abb. 3-1B) kommt es zu einer exogen getriggerten Oligomerisierung und dadurch zu einer künstlichen Aktivierung nachfolgender Signalprozesse (Abb. 3-1C) (Spencer et al. 1996).

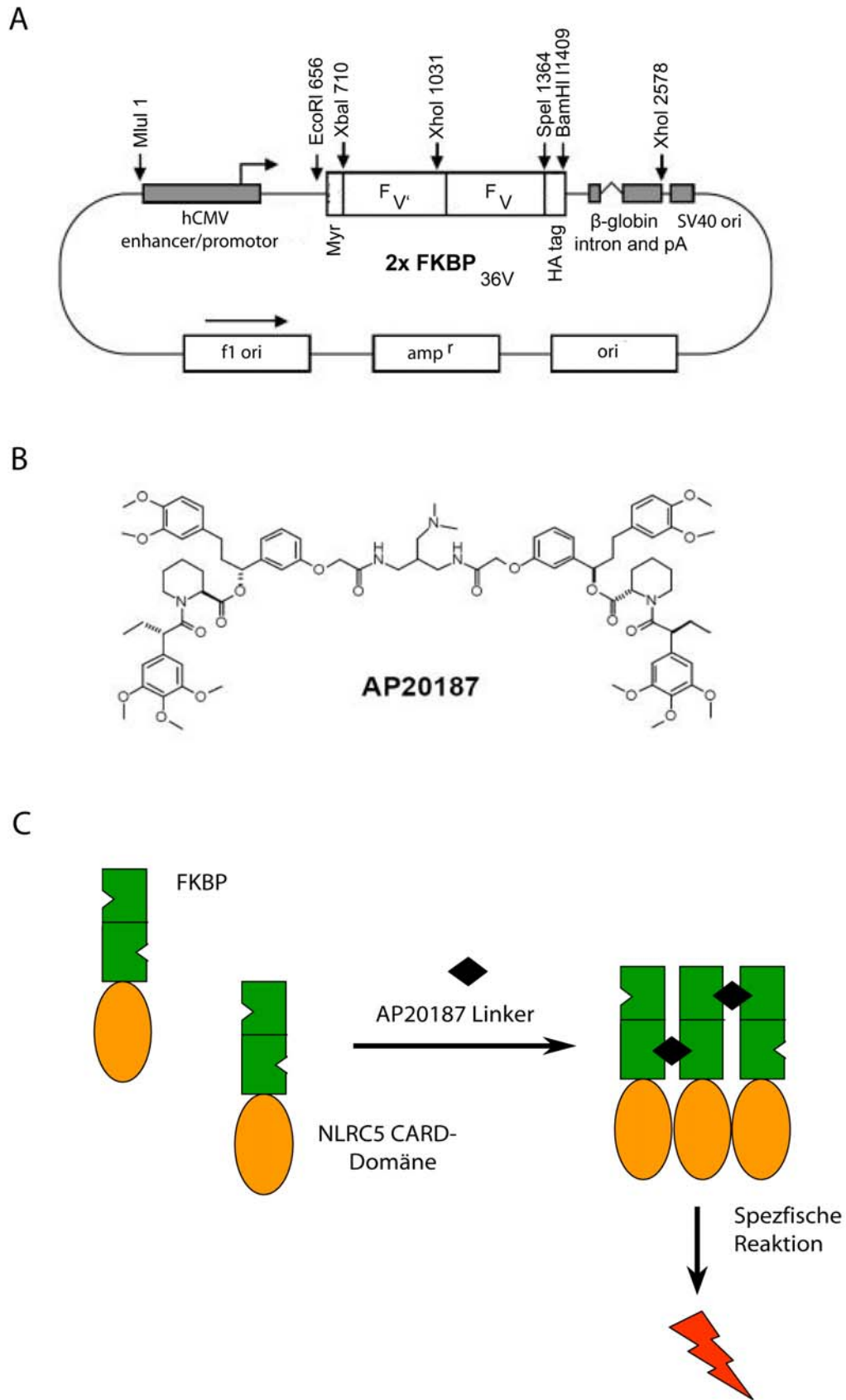


Abb. 3-1: Künstliche Oligomerisierung.

(A) pC₄M-F_v2E Vektor. (B) Synthetischer Dimerisierer AP20187. (C) Schematische Darstellung einer künstliche Oligomerisierung.

4 Ergebnisse

4.1 Genomische Organisation und Proteinstruktur von NLRC5

Der bisher nicht näher charakterisierte NLR-Vertreter *NLRC5* ist auf Chromosom 16q12.3 lokalisiert und überspannt eine Region von ungefähr 96kbp. Das vorhergesagte Gen besteht aus 39 Exonen (Abb. 4-1A). Der Translationsstart befindet sich im dritten Exon, das Stopcodon in Exon 39.

Laut bioinformatischer Vorhersage (<http://genome.ucsc.edu/>) besteht das korrespondierende Protein aus 1866 Aminosäuren und hat eine Größe von ~205kDa. NLRC5 hat die für die Familie typische dreigeteilte Domänenstruktur (Abb. 4-1A, B) (Albrecht und Takken 2006, <http://smart.embl-heidelberg.de/>). Die N-terminal gelegene CARD-Domäne umspannt die Aminosäuren 1-91. Die NACHT-Domäne überspannt die Aminosäuren 220-383. Die C-terminale LRD beginnt ab Aminosäure 713 und zeigt im Vergleich zu den anderen NLR Proteinen eine ungewöhnliche Architektur. Während bei dem Rest der Protein-Familie die einzelnen LRRs als zusammenhängender Block vorliegen, sind die LRRs von NLRC5 in fünf LRR-Blöcke organisiert. Die Anzahl der einzelnen LRR in den Blöcken variiert hierbei. Die Blöcke enthalten zwischen 2 und 5 zusammenhängende LRR (Abb. 4-1A, B), dazwischen verteilt liegen wiederum vereinzelt LRRs. Das vollständige Protein besitzt 20 LRR.

NLR-Proteine besitzen nach heutigem Wissenstand weder Signalpeptid noch Transmembrandomäne und liegen im allgemeinen als lösliche Proteine im Cytosol vor. Bioinformatische Vorhersagen mit Hilfe des pSort Algorithmus wiesen auch für NLRC5 auf eine zytosolische Lokalisation hin. Um diese Vorhersage zu überprüfen, wurde ein NLRC5-GFP Fusionskonstrukt hergestellt und in einem Immunoblot die Expression überprüft (Abb. 4-2A). Anschließend wurden HeLaS3-Zellen mit dem Fusionskonstrukt transient transfiziert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten NLRC5 stark akkumuliert im Zytosol und teilweise in vesikulären Strukturen des Zytosols vorliegen (Abb. 4-2B).

ERGEBNISSE

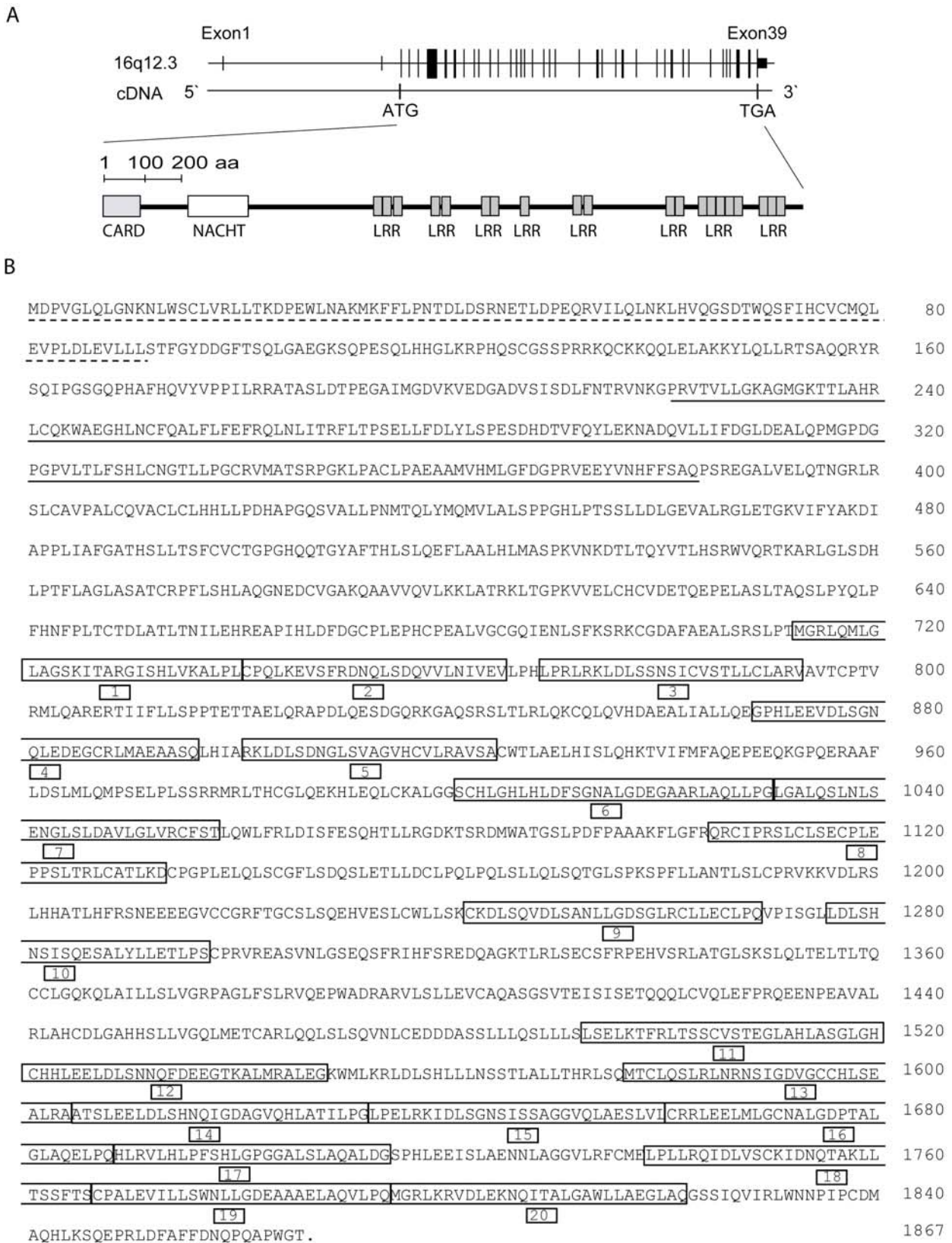


Abb. 4-1: Genomische Organisation und Proteinstruktur von NLRC5.

(A) Genomische Organisation und korrespondierende Proteinstruktur (<http://genome.ucsc.edu/>, Albrecht und Takken 2006, <http://smart.embl-heidelberg.de/>). (B) Die gestrichelte Linie zeigt die vorhergesagte CARD. Die unterstrichene Linie repräsentiert die NACHT-Domäne. Die nummerierten Kästchen geben die Positionen der

NLRC5 besitzt laut *in silico*-Vorhersage keine Importsequenz für Mitochondrien oder Lysosomen. Um festzustellen, ob NLRC5 mit Proteinen an der äußeren Hüllmembran der Mitochondrien assoziiert oder innerhalb von Lysosomen lokalisiert ist, wurden transient transfizierte HeLaS3-Zellen mit MitoTracker® bzw. LysoTracker® angefärbt. Mit diesen Farbstoffen ist es möglich, Mitochondrien bzw. Lysosomen über Fluoreszenz sichtbar zu machen. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen bestätigten eine ausschließlich zytosolische Lokalisation von NLRC5 (Abb. 4-2C, D).

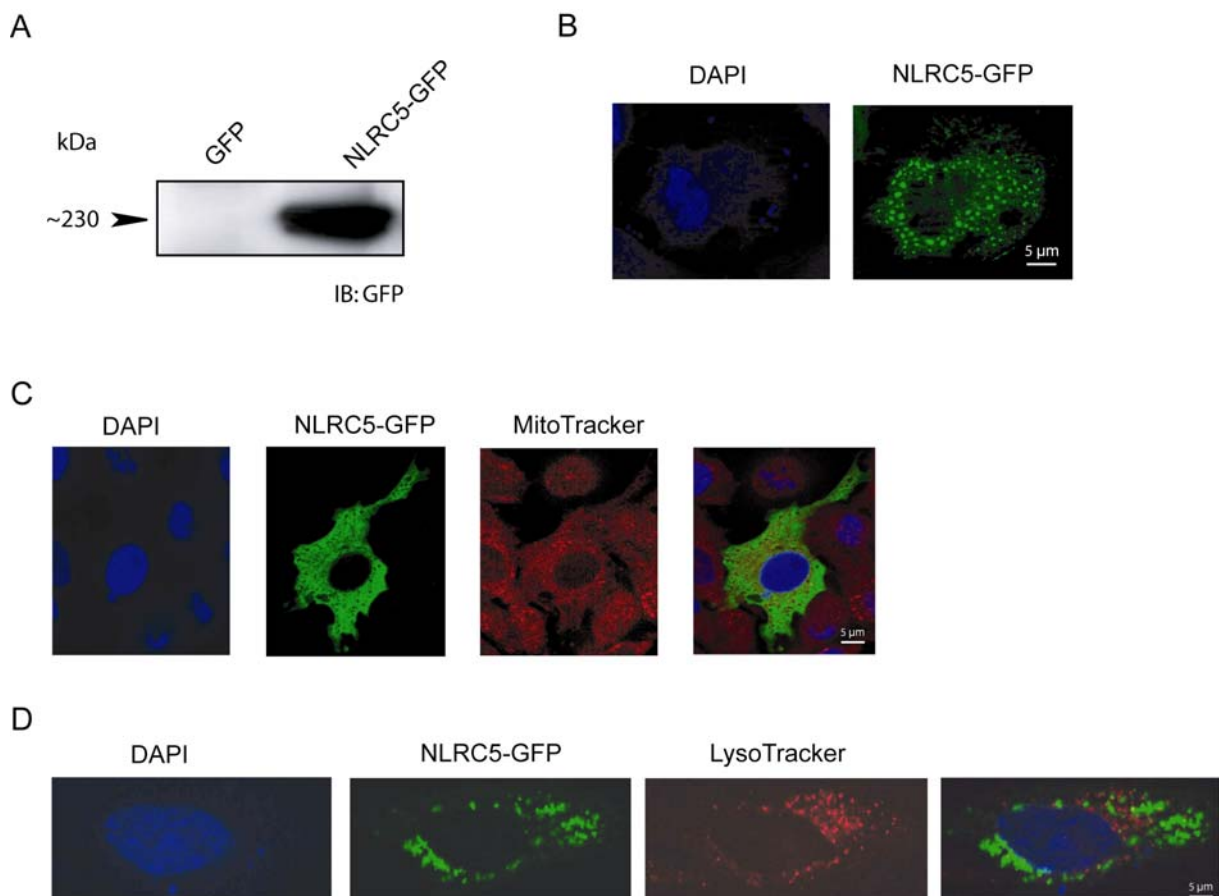


Abb. 4-2: Fluoreszenzmikroskopie von HeLaS3-Zellen mit angefärbten Organellen.

NLRC5-GFP transfizierte HeLaS3-Zellen. **(A)** Immunoblot (IB) mit Proteinlysaten von HeLaS3-Zellen. Ein spezifischer anti-GFP Antikörper weist eine Bande der erwarteten Größe nach. **(B)** Fluoreszenzmikroskopie ohne gefärbte Organellen. **(C)** Die Mitochondrien wurden mit MitoTracker® (250 nM) gefärbt. **(D)** Die Lysosomen wurden mit LysoTracker® (75 nM) gefärbt. Der Zellkern wurde jeweils mit DAPI gefärbt. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bestätigen eine ausschließlich zytosolische Lokalisation.

4.2 Phylogenetische Analyse zu *NLRC5*

Mit dem Programm TreBeST wurden die phylogenetischen Beziehungen der NLR Vertreter mit besonderer Berücksichtigung von *NLRC5* analysiert. In Abb. 4-3 sind die einzelnen

ERGEBNISSE

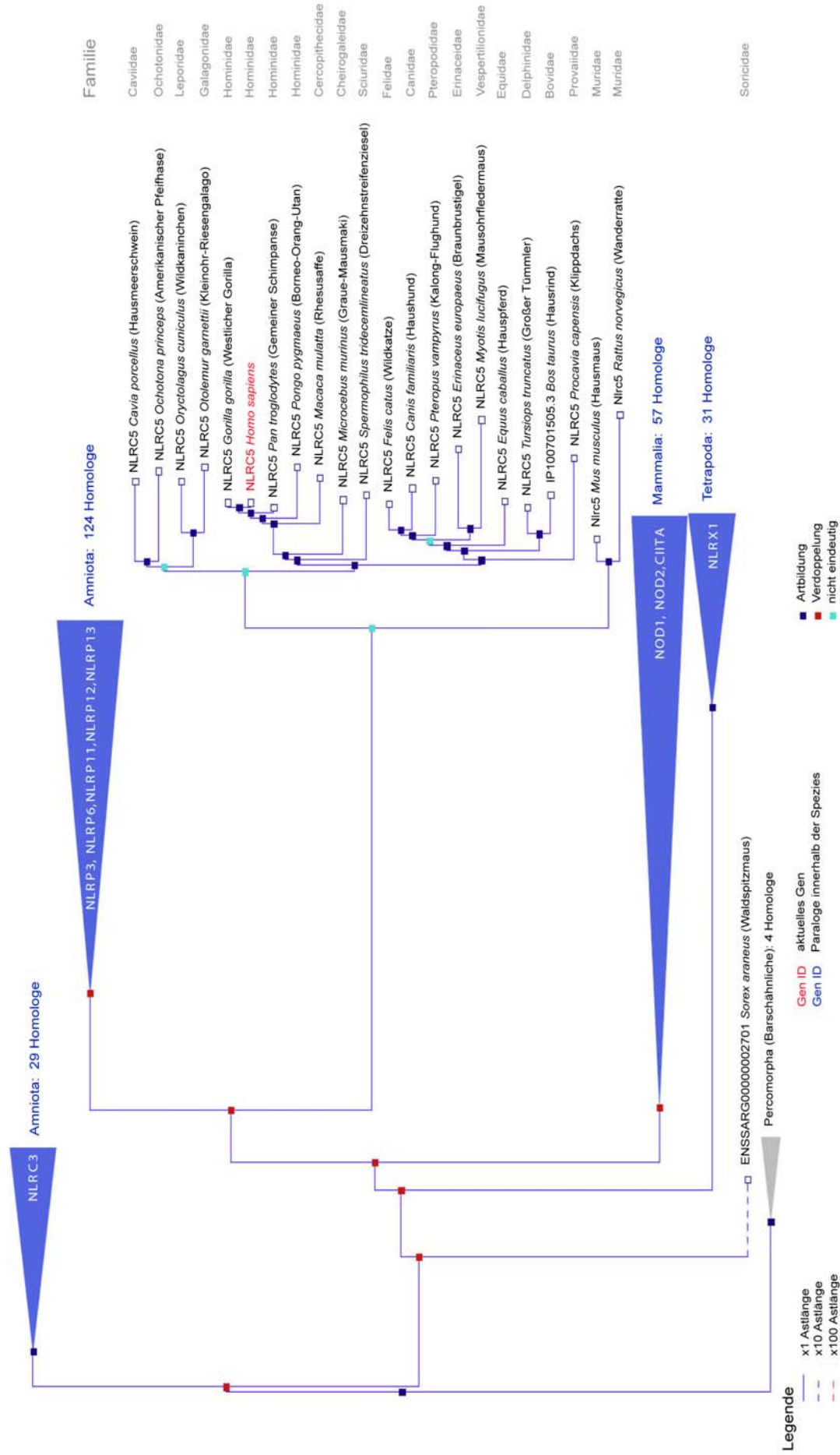


Abb. 4-3: Phylogenetischer Stammbaum von *NLR3*. Der Stammbaum wurde mit dem Programm TreBeST (<http://treesoft.sourceforge.net/treebest.shtml>) erstellt.

evolutionären Verzweigungen in einem Farbcode dargestellt, um Genduplikationen und Abgrenzung zwischen einzelnen Arten erkenntlich zu machen (siehe Legende). Die *in silico*-Daten deuten darauf hin, dass *NLRC5* in der frühen Evolution der Säugetiere durch Genduplikation entstanden ist. Die nächste engere Verwandtschaft zeigt es zu verschiedenen NALPs (NLRP3, NLRP6, NLRP11, NLRP12 und NLRP13).

4.3 Expressionsprofil von *NLRC5*

Mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR sollte untersucht werden, in welchen menschlichen Geweben *NLRC5* transkribiert wird. Es wurden 18 verschiedene humane Gewebe (Herz, Gehirn, Skelettmuskel, Lunge, Niere, Leber, Dünndarm, Kolon, Pankreas, Plazenta, Eierstock, Hoden, Prostata, Thymus, Leukozyten, Lymphknoten, Milz und Mandel) hinsichtlich der Expression von *NLRC5* untersucht. In allen getesteten Geweben konnte die mRNA von *NLRC5* nachgewiesen werden (Abb. 4-4A). Die stärkste Expression war im Gehirn und in der Lunge zu finden. Die geringste Expression zeigte sich in der Milz. Zusätzlich wurde die *NLRC5* Expression in unterschiedlichen humanen Krebszelllinien analysiert (Abb. 4-4B). In allen Zelllinien konnte die mRNA von *NLRC5* nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sowohl epitheliale (z.B. HeLaS3) als auch monozytäre Zelllinien (THP-1) vergleichbare Expressionsniveaus von *NLRC5*. Die geringste Expression war in CaCo2- und HFF-Zellen zu finden.

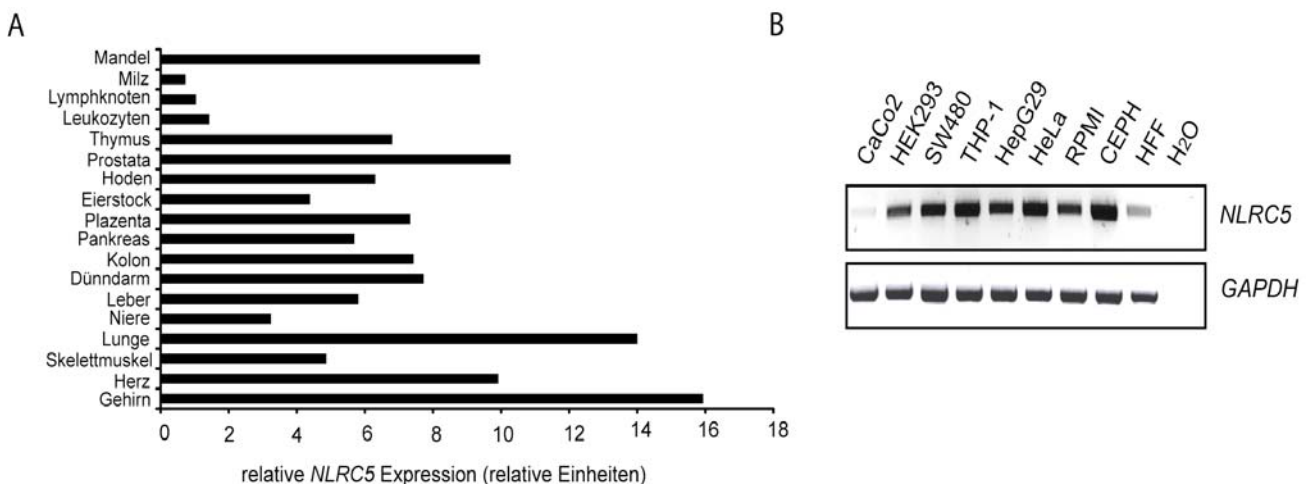


Abb. 4-4: Expression von *NLRC5*.

(A) Expression von *NLRC5* in verschiedenen humanen Geweben. *NLRC5* wurde mittels RT-PCR detektiert und gegen die Expression des *housekeeping*-Gens *GAPDH* normalisiert. Die Expression wurde mit dem Programm ImageJ densitometrisch ausgewertet. (B) Expression von *NLRC5* in verschiedenen humanen Zelllinien. *NLRC5* wurde mittels RT-PCR detektiert.

4.4 Transkriptionelle Regulation von NLRC5

4.4.1 Rolle von IFN (Interferon)- γ für die Regulation von NLRC5

4.4.1.1 Analyse der NLRC5-Promotoraktivität

Für die Charakterisierung der transkriptionellen Regulation von *NLRC5* wurde die Promotorregion 1700bp *upstream* vom ersten Exon in den Luziferase-Reportergenvektor pGL3B kloniert. Das Reportergenkonstrukt (pGL3-NLRC5) wurde in HeLaS3 und HEK293-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden mit zehn verschiedenen Stimuli, u.a. Zytokinen und PAMPs stimuliert (EGF, TNF- α , LPS, Flagellin, TGF- β , MDP, PG, IFN- γ , IFN- α und IFN- β). Um zusätzlich den Einfluss von bakterieller Infektion auf die Expression von *NLRC5* zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem zytoinvasiven Bakterium *Listeria monocytogenes* infiziert. Nur die mit IFN- γ stimulierten Zellen zeigten eine signifikante Zunahme der Luziferase-Aktivität, während alle anderen Stimuli einschließlich IFN- α und IFN- β keinen Effekt auf die Promotor-Transaktivierung hatten (Abb. 4-5A, B). Die gleichen Effekte wurden auch in HEK293-Zellen beobachtet.

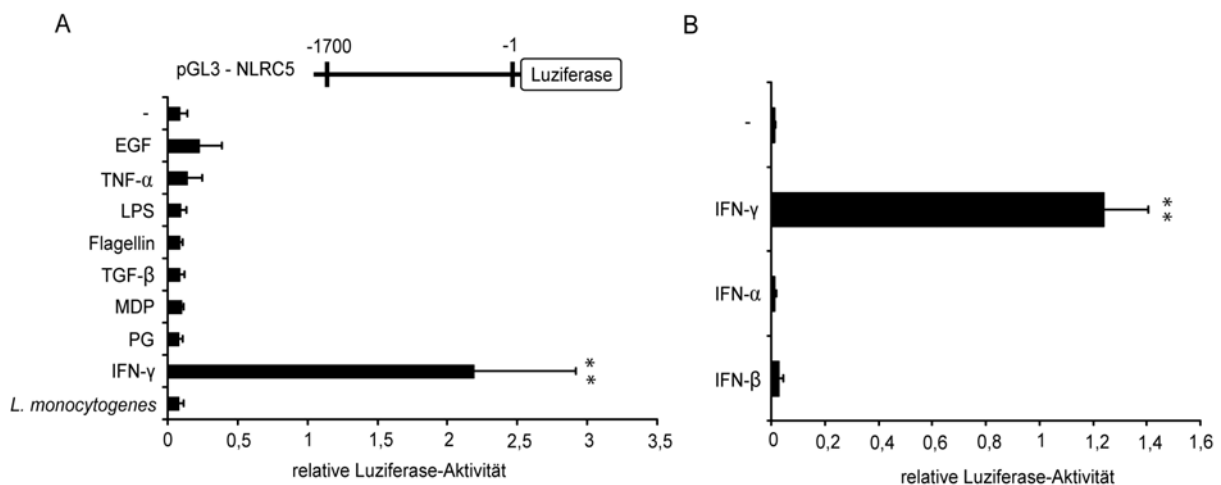


Abb. 4-5: Regulation der NLRC5-Promotoraktivität.

(A, B) HeLaS3-Zellen wurden mit dem NLRC5-Promotorkonstrukt transfiziert und für 24 h stimuliert: EGF - *epidermal-growth-factor* (100 ng/ml), Flagellin (500 ng/ml), IFN- α - Interferon alpha (2.500 U/ml), IFN- β - Interferon beta (2.500 U/ml), IFN- γ - Interferon gamma (2.500 U/ml), LPS - Lipopolysaccharide (10 μ g/ml), MDP - Muramyl-dipeptid (50 μ g/ml), PG - Peptidoglycan (10 μ g/ml), TGF- β - *tumor-growth-factor beta* (25 ng/ml), TNF- α - *tumor-necrosis-factor alpha* (10ng/ml). Alternativ erfolgte eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* (MOI 100). Anschließend wurde luminometrisch die Luziferase-Aktivität gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen (n=3; **, p < 0,01).

Da bereits für andere NLR Vertreter ein synergistischer Effekt von IFN- γ in Kombination mit anderen proinflammatorischen Stimuli auf Ebene transkriptioneller Regulation gezeigt werden konnte (Rosenstiel et al. 2003), wurden HeLaS3- und HEK293-Zellen mit IFN- γ und

jeweils acht weiteren Stimuli kostimuliert. Im Vergleich zu den nur mit IFN- γ stimulierten Zellen bewirkte eine Kostimulation keine signifikante Zunahme der Luziferase-Aktivität (Abb. 4-6).

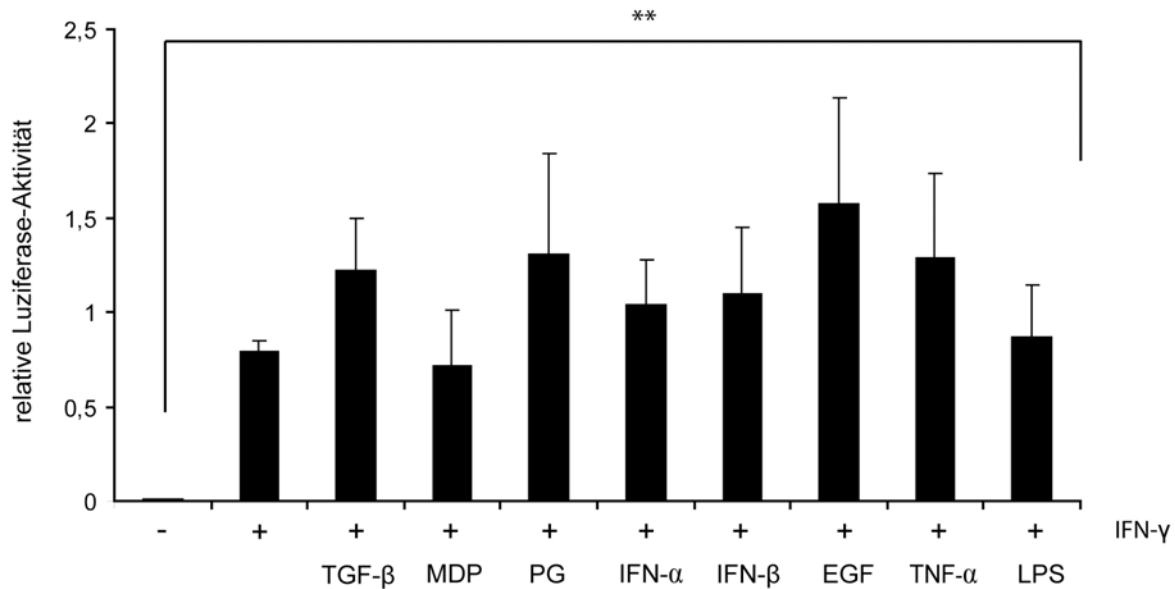


Abb. 4-6: Kostimulation zur Analyse der *NLRC5*-Promotoraktivität.

HeLaS3-Zellen wurden mit dem *NLRC5*-Promotorkonstrukt transfiziert und für 24 h stimuliert: EGF - *epidermal-growth-factor* (100 ng/ml), IFN- α - Interferon alpha (2.500 U/ml), IFN- β - Interferon beta (2.500 U/ml), IFN- γ - Interferon gamma (2.500 U/ml), LPS –Lipopolysaccharide (10 μ g/ml), MDP – Muramyldipeptid (50 μ g/ml), PG – Peptidoglycan (10 μ g/ml), TGF- β - *tumor-growth-factor beta* (25 ng/ml) und TNF- α - *tumor-necrosis-factor alpha* (10ng/ml). Anschließend wurde luminometrisch die Luziferase-Aktivität gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen (n=3; **, p < 0,01).

4.4.1.2 Regulation von *NLRC5* mRNA durch Stimulation mit IFN- γ

In den bisherigen Versuchen wurde die Regulation von *NLRC5* nur auf Promotorebene gezeigt. In weiteren Experimenten sollte dieser Befund auf mRNA-Ebene nachverfolgt werden. Dazu wurden vier verschiedene Zelllinien mit verschiedenen Zytokinen und lebenden zytotoxischen Bakterien (*L. monocytogenes*) stimuliert bzw. infiziert und über eine *Real-Time*-quantitative-PCR (QRT-PCR) untersucht. Wie in Abb. 4-7 zu sehen, zeigten alle Zelllinien eine zeitabhängige Zunahme des mRNA-Levels von *NLRC5* mit dem Zytokin IFN- γ . Die stärkste mRNA Expression zeigten HT-29-Zellen.

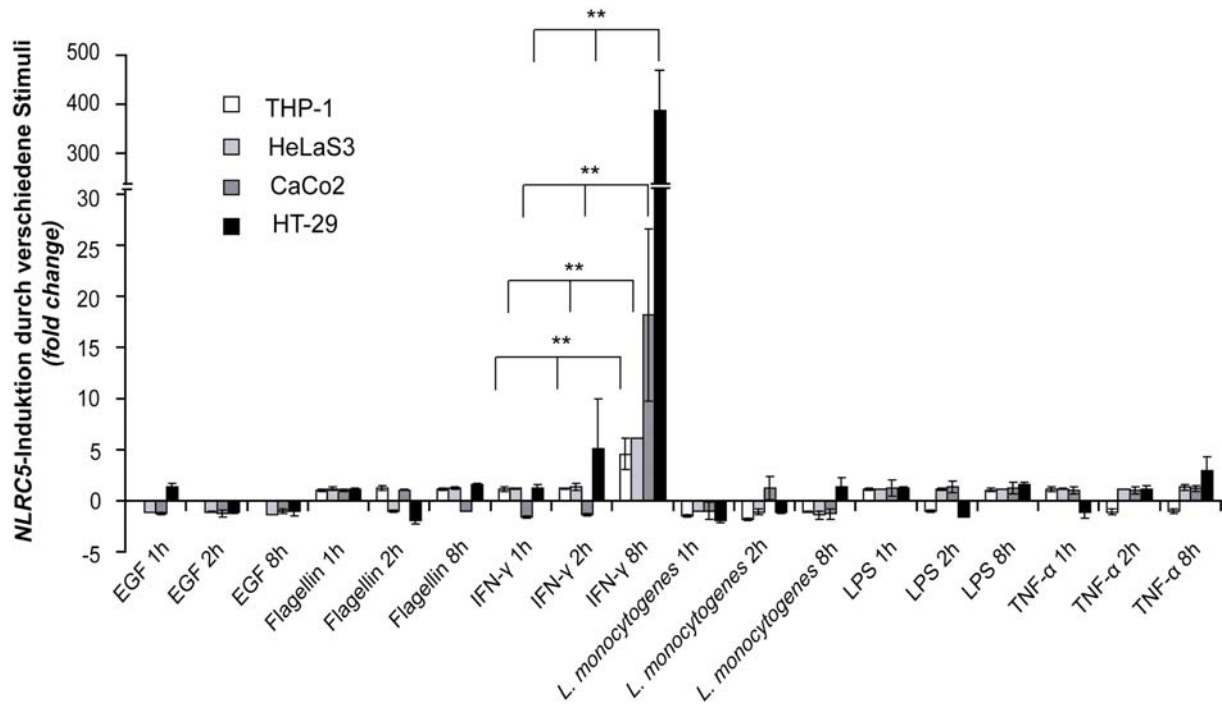


Abb. 4-7: Analyse des *NLRC5* mRNA-Levels nach Stimulation.

THP-1-, HeLaS3-, CaCo2- und HT-29-Zellen wurden wie angegeben mit verschiedenen Stimuli behandelt: EGF - *epidermal-growth-factor* (1 µg/ml), Flagellin (500 ng/ml), IFN-γ - Interferon gamma (5.000 U/ml), *Listeria monocytogenes* (MOI 100), LPS - Lipopolysaccharide (1 µg/ml), TNF-α - *tumor-necrosis-factor alpha* (10 ng/ml). Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils zwei Messungen (**, $p < 0,01$).

Mit Hilfe einer QRT-PCR wurde der konzentrationsabhängige Einfluss von IFN-γ auf die Expression von *NLRC5* untersucht. Wie in Abb. 4-8A gezeigt, zeigten HeLaS3-Zellen eine konzentrationsabhängige Regulation von *NLRC5* nach IFN-γ-Stimulation. Ab einer Konzentration von 500 U/ml reduzierte sich der mRNA Gehalt von *NLRC5* gering.

Anschließend wurde in einer Zeitreihe die Expression von *NLRC5* über einen längeren Zeitraum wie in 4.4.1.2 untersucht. Dafür wurden HeLaS3-Zellen mit 1000 U/ml IFN-γ zu verschiedenen Zeiten stimuliert. Die Messdauer ging hierbei über 24 h. Wie in Abb. 4-8B ersichtlich, waren die Expressionslevel vergleichbar mit den Ergebnissen aus 4.4.1.2. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Expression von *NLRC5* im Vergleich zu den 8 und 12 h Werten bei dem gemessenen Endzeitpunkt von 24 h weiter zugenommen hatte.

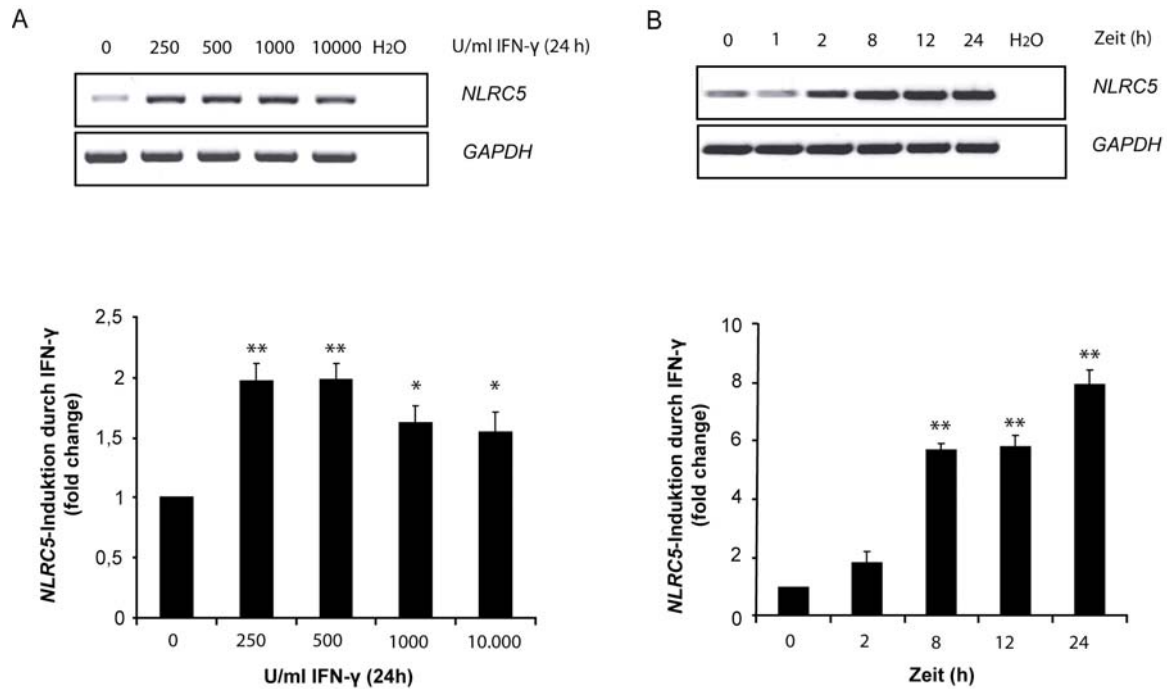


Abb. 4-8: Konzentrations- und zeitabhängige Regulation der *NLRC5*-Expression.

(A) RT-PCR (oben) und QRT-PCR (unten) von HeLaS3-Zellen, die mit verschiedenen IFN- γ Konzentrationen für 24 h stimuliert wurden. Für die QRT-PCR ist der Median aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils zwei Messungen dargestellt (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$). (B) RT-PCR (oben) und QRT-PCR (unten) von HeLaS3-Zellen, die über verschiedene Zeitpunkte mit 1000 U/ml IFN- γ stimuliert wurden. Für die QRT-PCR ist der Median aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils zwei Messungen dargestellt (**, $p < 0,01$).

4.4.1.3 Regulation der *NLRC5*-Proteinexpression

Für eine detaillierte Charakterisierung von *NLRC5* wurde im Laufe dieser Arbeit über einen kommerziellen Anbieter ein Antikörper gegen das *NLRC5*-Protein generiert. Die Spezifität des Antikörpers wurde an *NLRC5*-GFP-transfizierten HeLaS3-Zellen mit Hilfe eines Immunoblots getestet. Wie in Abb. 4-9A gezeigt, korrespondierte das detektierte Signal mit der vorhergesagten Proteingröße von 230kDa. Kein Signal wurde hingegen durch die Verwendung von Präimmun-Serum detektiert. Interessanterweise zeigten alle Experimente eine charakteristische Doppelbande, die eventuell von einer Proteinmodifikation von unbekannter Natur herrührt. Für eine nähere Untersuchung, welche Domäne des Proteins an der möglichen Modifikation beteiligt sein könnte, wurden HeLaS3-Zellen mit den einzelnen Domänen von *NLRC5* transient transfiziert. In einem Immunoblot zeigte sich, dass nur die LRD an der Modifikation beteiligt war (Abb. 4-9B).

Um die IFN- γ -abhängige Regulation von *NLRC5* in verschiedenen Zelllinien zu untersuchen, wurden HeLaS3, HEK293 und die Kolonkarzinomzelllinie SW480 zu drei verschiedenen Zeitpunkten mit 1.000 U/ml IFN- γ stimuliert. Alle Zellen zeigten eine Zunahme des *NLRC5*

Proteingehalts 6 h und 12 h nach Stimulation mit IFN- γ . Abbildung 4-9C zeigt exemplarisch das Ergebnis für HeLaS3-Zellen.

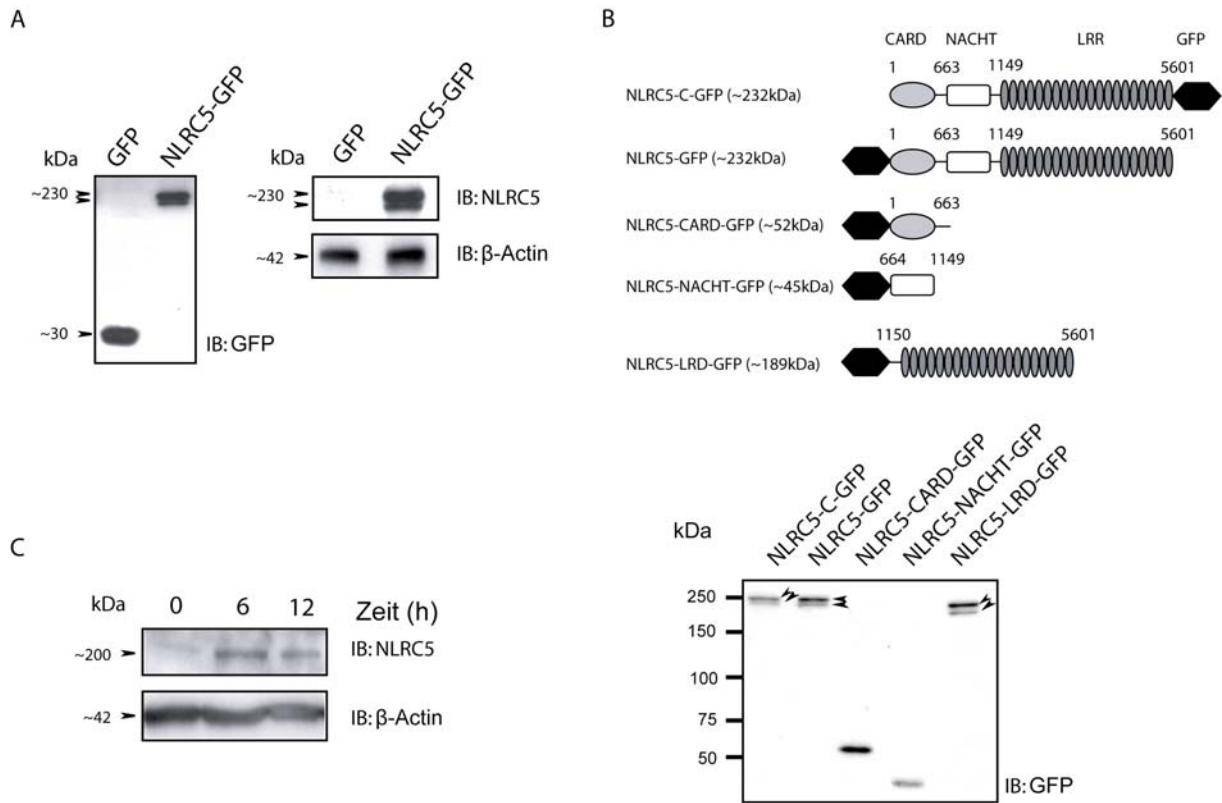


Abb. 4-9: Charakterisierung der NLRC5-Proteinexpression.

(A) Immunoblot (IB) mit verschiedenen Antikörpern gegen Proteinlysate von GFP und NLRC5-GFP transfizierten HeLaS3-Zellen. (B) Immunoblot gegen Proteinlysate von transient transfizierten HeLaS3-Zellen. Die Zellen wurden mit den einzelnen GFP-markierten Domänen von NLRC5 transfiziert. Die Pfeile markieren eine charakteristische Doppelbande, die auf eine Modifikation unbekannter Natur zurückzuführen sein könnte. (C) Immunoblot gegen Proteinlysate von IFN- γ (1.000 U/ml) stimulierten HeLaS3-Zellen. Auch auf Proteinebene zeigte sich eine IFN- γ abhängige Regulation von NLRC5.

4.4.2 Rolle cis-regulatorischer Elemente für die transkriptionelle Regulation von *NLRC5*

Mit Hilfe der Analysesoftware MatInspector wurde der Promotor von *NLRC5* im Hinblick auf die Anwesenheit von potentiellen *cis*-regulatorischen Elementen untersucht. Die computergestützte Vorhersage zeigte die Anwesenheit von zwei *signal transducer and activator of transcription* (STAT) und vier *nuclear factor-kappaB* (NF- κ B)-Bindestellen im Promotorbereich. Die Transkriptionsfaktorfamilie der STATs repräsentiert einen zentralen Baustein von multiplen Signaltransduktionaskaden, wozu die Interferon und Interleukin-

(IL-) 6 Signalwege gehören (Shuai und Liu 2003, Schindler et al. 2007). Die *NLRC5*-Promotorregion enthält zwei putative STAT-Bindestellen. Eine ist an Position –1336bp, eine weitere an Position –452bp lokalisiert. Dabei überlappt die STAT-Bindestelle von Position –1336bp mit einer vorhergesagten NF- κ B-Bindestelle. Um eine mögliche Beteiligung der vorhergesagten Bindestellen an der Regulation der Promotoraktivität zu untersuchen, wurden Deletionsmutanten des *NLRC5* Promotorkonstruktes hergestellt. Individuelle Deletionen der vorhergesagten regulatorischen STAT-Elemente und der ersten NF- κ B-Bindestelle zeigten eine signifikante Reduktion der IFN- γ -abhängigen Promotoraktivierung (Abb. 4-10) in HeLaS3- und HEK293-Zellen. Eine STAT-Doppel-Deletionsmutante (Δ STAT/STAT) zeigte in den Experimenten keine stärkere Reduktion der Luziferaseaktivität als die Einzel-Deletionsmutante.

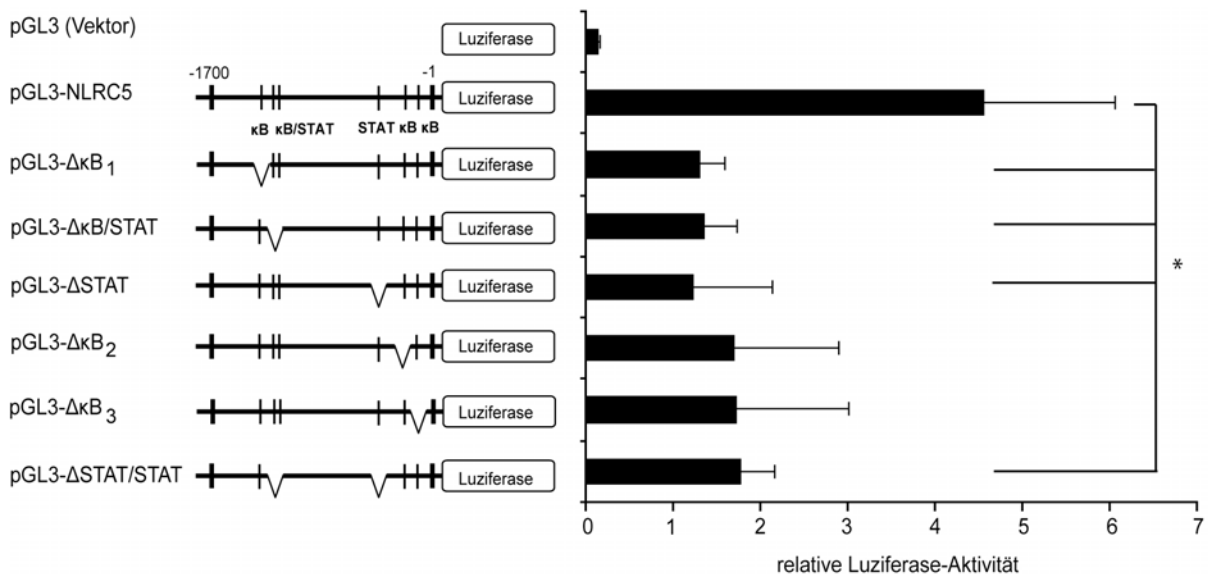


Abb. 4-10: Analyse regulatorischer Elemente innerhalb des *NLRC5*-Promotors.

HeLaS3-Zellen wurden mit verschiedenen *NLRC5*-Promotorkonstrukten transfiziert und für 24 h mit IFN- γ (2.500 U/ml) stimuliert. Anschließend wurde luminometrisch die Luziferase-Aktivität gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen (n=3; *, p < 0,05).

Da die Expression von *NLRC5* nach den vorliegenden Daten über STAT- und NF- κ B-Transkriptionsfaktoren reguliert wird, wurden HeLaS3-Zellen nach Transfektion des *NLRC5*-Promotorkonstruktes a) mit einem pharmakologischen Janus-Kinase (JAK) Inhibitor behandelt, oder b) mit einem I κ B α -Super Repressors (I κ B α -SR) kotransfiziert. Die JAK-Aktivität ist essentiell für die Phosphorylierung und damit die nukleäre Translokation von STAT (Aaronson und Horvath 2002). Das überexprimierte Repressorprotein, I κ B α -SR, kann aufgrund einer spezifischen Mutation nicht mehr von der I κ B-Kinase phosphoryliert werden (Bauerle und Baltimore 1988). Dies verhindert eine Aktivierung von NF- κ B und hemmt

dadurch die weitere Signaltransduktionskaskade. Bei der Vorbehandlung mit dem JAK-Inhibitor sowie mit dem $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -SR kam es nach Stimulation mit $\text{IFN-}\gamma$ zu einer signifikanten Abnahme der Luziferase-Aktivität (Abb. 4-11).

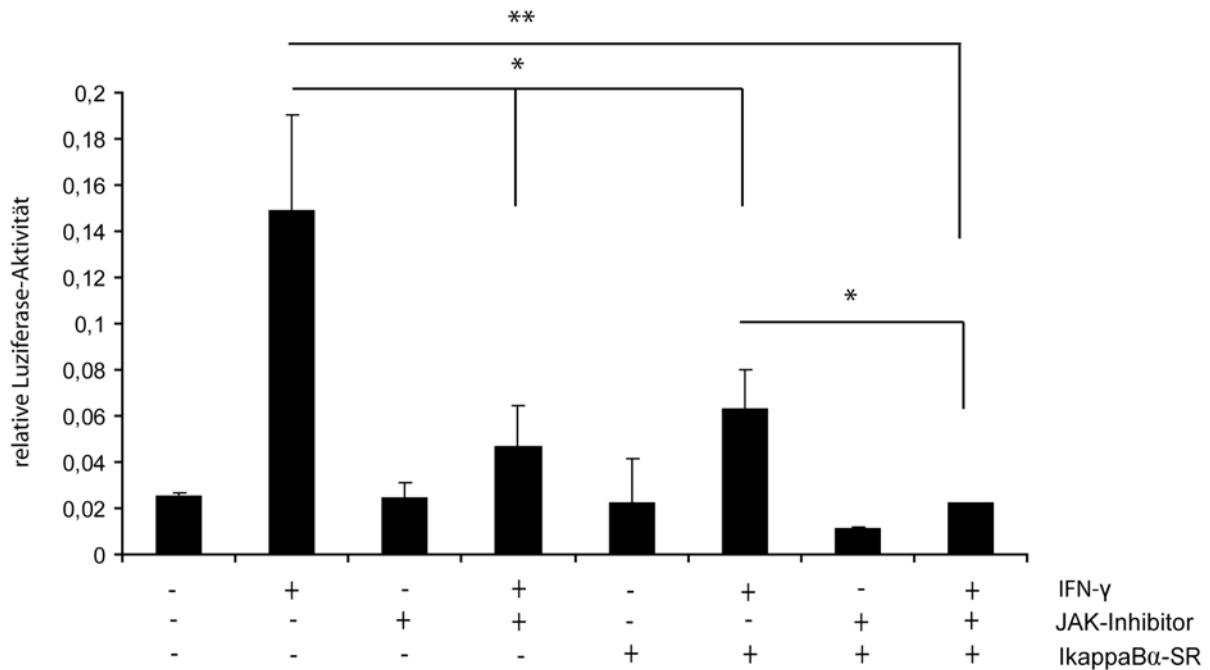


Abb. 4-11: Einfluss spezifischer Signalkaskaden auf die *NLRC5*-Promotoraktivität.

In einem 96-well Format wurden HeLaS3-Zellen mit dem *NLRC5*-Promotorkonstrukt (22,5 ng) transfiziert und mit JAK-Inhibitor (30 nM) und/oder I κ B α -SR (22,5 ng) wie angegeben behandelt bzw. transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen wie angegeben für 24 h mit $\text{IFN-}\gamma$ (2.500 U/ml) stimuliert. Anschließend wurde luminometrisch die Luziferase-Aktivität gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen (n=3; *, p < 0,05; **, p < 0,01).

In einem alternativen Ansatz wurden die Zellen mit einem JAK Inhibitor inkubiert, nachdem sie mit einem I κ B α -SR-Konstrukt kotransfiziert worden waren (Abb. 4-11). Durch gleichzeitige Inhibierung des JAK und NF- κ B Signalweges kam es nach Stimulation mit $\text{IFN-}\gamma$ zu einer weiteren Reduktion der Luziferase-Aktivität. Diese Abnahme war gegenüber der Inhibierung des NF- κ B Signalwegs alleine signifikant verringert.

4.5 Regulation von *NLRC5* nach Virusinfektion

Die Sekretion des Zytokins $\text{IFN-}\gamma$ ist eine zentrale zelluläre Antwort auf eine virale Infektion (Levy und Garcia-Sastre 2001, Samuel 2001). Um zu klären, ob die Expression von *NLRC5* direkt durch virale Infektion reguliert wird, wurde das gut etablierte Infektionsmodell unter Benutzung von menschlichen Vorhautzellen (HFF) und Zytomegalievirus (CMV) benutzt

(Hobom et al. 2000, Schierling et al. 2005). Um zu unterscheiden, ob der beobachtete Effekt nur durch intakte Viruspartikel oder durch denaturierte Komponenten des Virus hervorgerufen wird, wurde zusätzlich der Expressionslevel von *NLRC5* nach Zugabe von hitze-inaktivierten Partikeln untersucht. Der Prozess der viralen Infektion wurde mittels RT-PCR gegen *CMV immediate early gene 2 (CMV-IE2)* verfolgt. *CMV-IE2* ist eines der wenigen viral codierten regulatorischen Proteine, welches in der frühen Phase der *CMV*-Infektion von der Wirtszelle exprimiert wird (Pizzorno et al. 1988, Malone et al. 1990). Wie in Abb. 4-12A gezeigt, war die stärkste Expression von *NLRC5* 12 h nach der Infektion zu

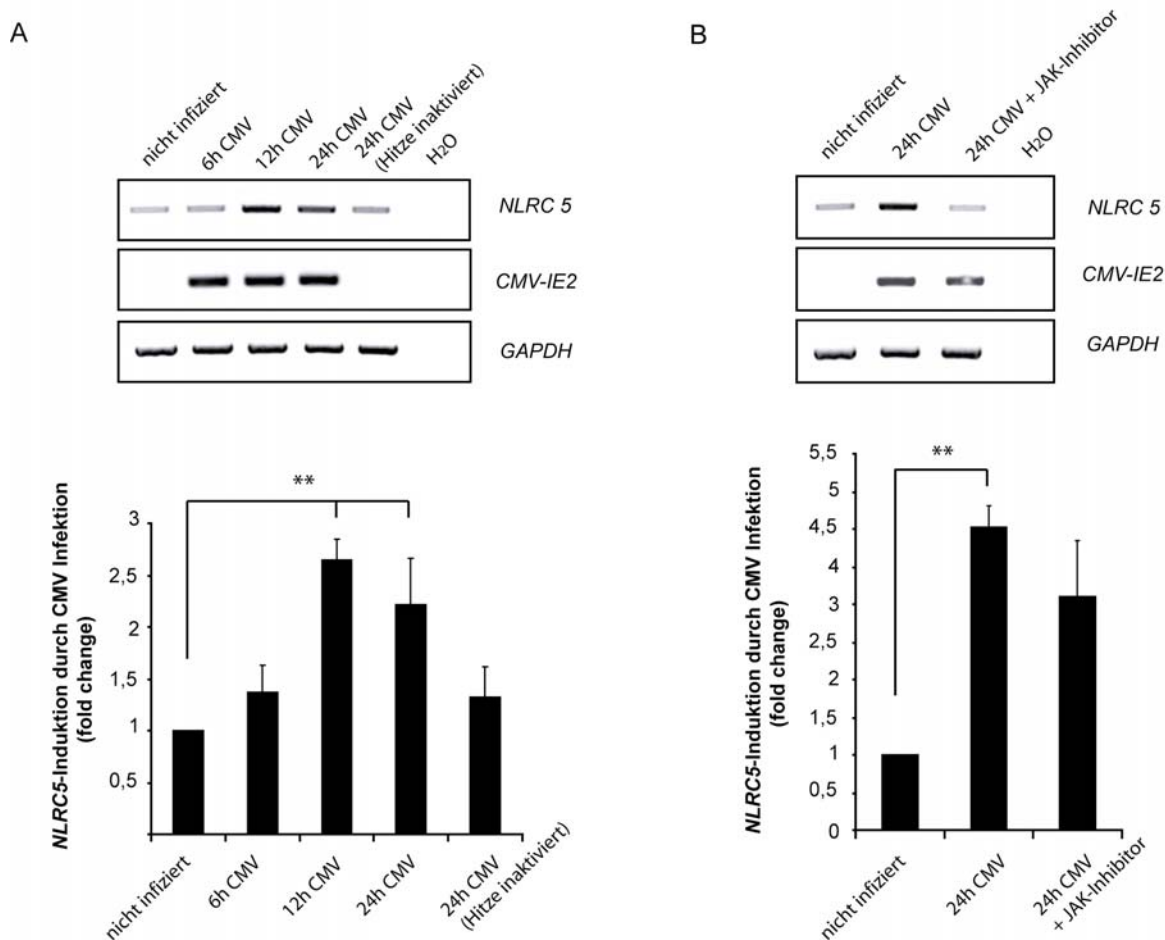


Abb. 4-12: Expression von *NLRC5* nach viraler Infektion.

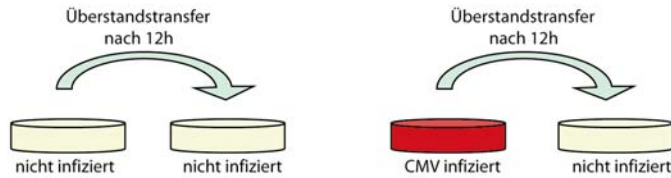
Dargestellt ist jeweils eine RT-PCR (oben) und der Median einer qRT-PCR (unten) von zwei Versuchen mit jeweils zwei Messungen (**, $p < 0,01$). (A) HFF-Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit Zytomegalievirus (CMV) inkubiert. (B) Mit CMV infizierte HFF-Zellen wurden während der 24 h Infektion zusätzlich mit 30 nM JAK-Inhibitor inkubiert.

beobachten, wobei nur das aktive Virus eine Zunahme von *NLRC5* bewirkte. Die hitzeinaktivierten Partikel hatten keinen Effekt auf den mRNA Level von *NLRC5*.

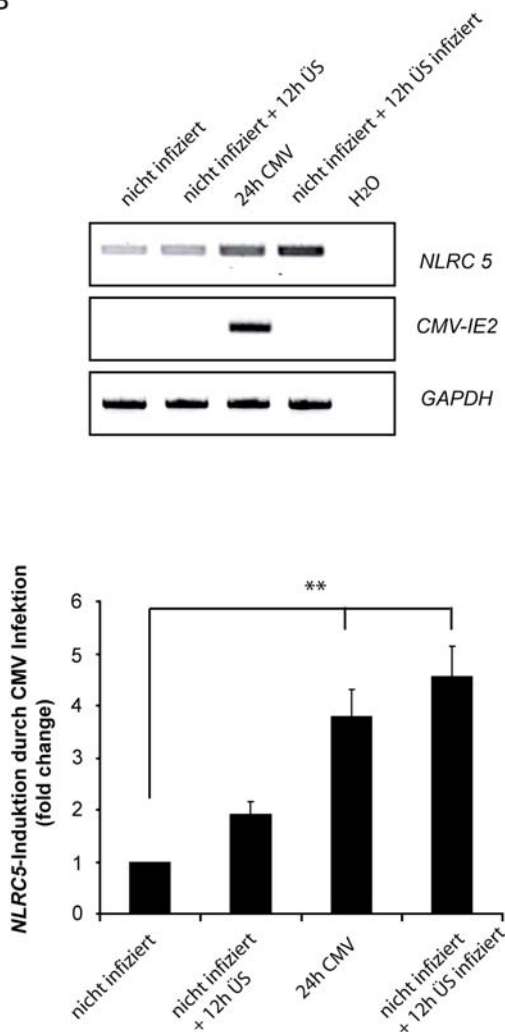
Die vorhergehenden Experimente zeigten, dass es durch $IFN-\gamma$ zu einer Zunahme der *NLRC5* mRNA-Level in den Zellen kommt. Da $IFN-\gamma$ ein entscheidendes Signal nach einer viralen

Infektion darstellt, sollte in einem weiteren Versuch geklärt werden, ob es durch die Infektion zu einer Regulation von *NLRC5* über den JAK/STAT Signalweg kommt. Dafür wurden HFF-Zellen zusätzlich zu dem Virus für 24 h mit einem JAK-Inhibitor inkubiert. Der JAK-Inhibitor blockiert die Phosphorylierung von STAT, was zu einer Unterbrechung der Signalkaskade führt. Das Resultat war eine Verminderung der *NLRC5* Expression (Abb. 4-

A



B



C

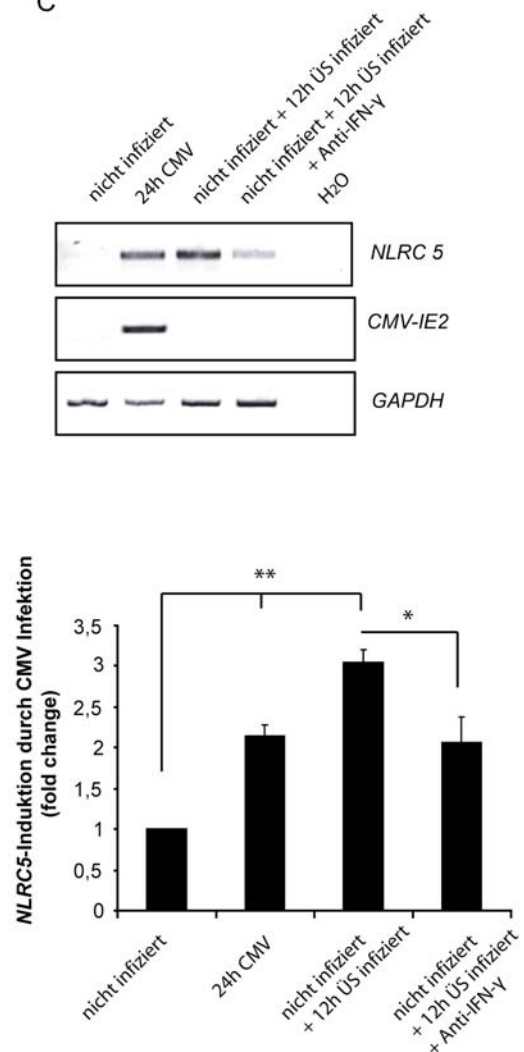


Abb. 4-13: Expression von *NLRC5* durch CMV induziertes IFN- γ .

(A) Schematische Versuchsanordnung der Experimente mit Transfer von Zellüberstand. (B) Überstandstransfer von CMV infizierten Zellen auf nicht infizierte Zellen. Dargestellt ist jeweils eine RT-PCR (oben) und der Median einer QRT-PCR (unten) von zwei Versuchen mit jeweils zwei Messungen (**, $p < 0,01$). (C) Der Überstand (ÜS) von CMV-infizierten HFF-Zellen wurde vor dem Transfer 1 h mit Interferon gamma Antikörper (Anti-IFN- γ) inkubiert. Dargestellt ist jeweils eine RT-PCR (oben) und der Median einer QRT-PCR (unten) von zwei Versuchen mit jeweils zwei Messungen (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

12B). Das Vorliegen intakter CMV Partikel schien anscheinend nicht den direkten Auslöser für die erhöhte Regulation von *NLRC5* darzustellen. Um zu überprüfen, ob sezernierte Zytokine für eine autokrin verstärkte mRNA-Expression von *NLRC5* verantwortlich sind, wurde in einem weiteren Experiment der Überstand von infizierten HFF-Zellen nach 12 h auf nicht infizierte Zellen übertragen (Abb. 4-13A). Über eine Kontroll-PCR gegen CMV-IE2 wurde überprüft, ob die Ergebnisse nicht durch eine Kontamination mit intakten Viren zustande gekommen waren. Wie in Abb. 4-13B gezeigt, bewirkte der Überstand von infizierten Zellen bei nicht infizierten Zellen eine Zunahme der mRNA-Expression von *NLRC5*. Dies deutet darauf hin, dass im Überstand befindliche, lösliche Faktoren (z.B. Zytokine) für eine autokrin induzierte Regulation von *NLRC5* verantwortlich sein könnten. Da es sich bei den von infizierten Zellen sezernierten Substanzen um eine komplexe Mischung verschiedener Faktoren handelt, sollte in einem weiteren Experiment überprüft werden, ob für die Regulation von *NLRC5* das Zytokin IFN- γ verantwortlich war. Dafür wurde der Überstand von infizierten Zellen vor dem Transfer auf nicht infizierte Zellen für 1 h mit einem antagonistischem IFN- γ Antikörper inkubiert. Über RT-PCR gegen CMV-IE2 wurde zusätzlich überprüft, ob der Überstand frei von infektiösen Viren war. Wie in Abb. 4-13C deutlich zu sehen, resultierte die Zugabe des IFN- γ -Antikörpers in einer signifikanten Reduktion von *NLRC5* mRNA.

4.6 Expression von *NLRC5* unter proinflammatorischen Bedingungen

Die Tatsache, dass es bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. der Wegener'scher Granulomatose (Morbus Wegener, MW) zu einer erhöhten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ (Muller et al. 2000, Monteleone et al. 2002) kommt, führte dazu, die Expression von *NLRC5* in Biopsien von Patienten mit Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Wegener (MW) im Vergleich zu gesunden Probanden zu untersuchen. Bisher wurde nur für Cu ein erhöhter Level von pSTAT1 beschrieben (Schreiber et al. 2002). Da dieser Transkriptionsfaktor zu einer verstärkten Expression von JAK/STAT spezifischen Signalen führt, könnte dies eventuell zu einer verstärkten Expression von *NLRC5* führen.

Die Patientenproben zeigten im Vergleich zu den gesunden Probanden keine erhöhte Expression von *NLRC5* (Abb. 4-14A, B). Selbst bei CU-Patienten, die einen erhöhten

pSTAT1-Level haben, zeigte sich im Vergleich zu gesunden Probanden keine veränderte *NLRC5* mRNA-Expression.

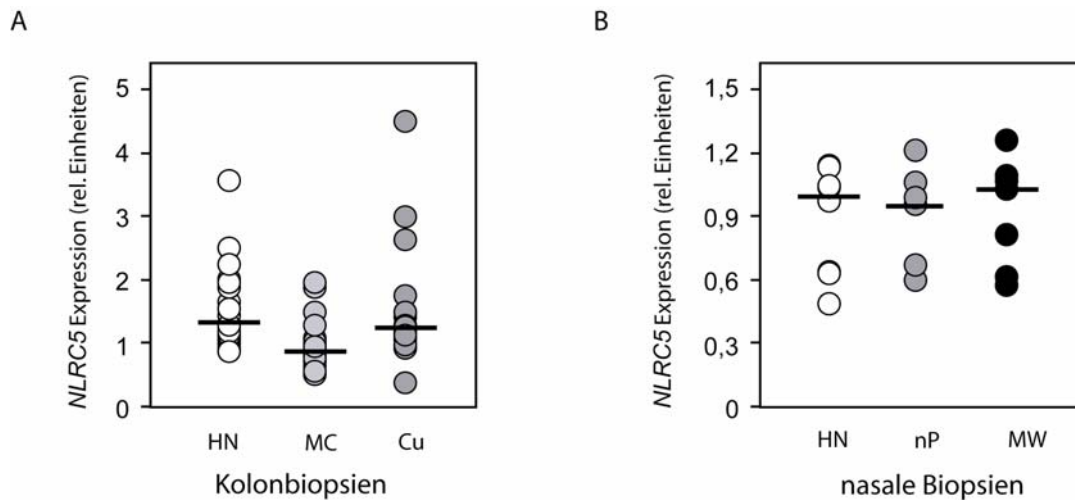


Abb. 4-14: Expressionsanalyse von *NLRC5* in verschiedenen Biopsien.

Gesamt-RNA wurde aus Biopsien von gesunden Testpersonen (*healthy normals*, HN) und von Probanden mit Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (Cu), Morbus Wegener (MW) sowie mit nasaler Polyposis (nP) isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels RT-PCR wurde die Expression von *NLRC5* analysiert und gegen *GAPDH* normalisiert. Die Expression wurde densitometrisch mit dem Programm ImageJ ausgewertet. Von allen Proben wurde der Median berechnet (Kolonbiopsien: HN, n=20; MC, n=20; Cu, n=20; nasale Biopsien HN, n=8; MW, n=9; nP, n=6). (A) Expression von *NLRC5* in Kolonbiopsien. (B) Expression von *NLRC5* in nasalen Biopsien.

4.7 Untersuchungen zur Funktion von NLRC5

4.7.1 Etablierung einer exogen aktivierbaren NLRC5-Chimäre

Um NLRC5 künstlich zu oligomerisieren und damit zu aktivieren wurde die CARD von NLRC5 vor den Leserahmen zweier FK506-binding protein (FKBP)₂ Monomere kloniert (Abb. 4-15A). Die Expression wurde mittels Immunoblot getestet (Abb. 4-15B). FKBP ist ein 12kDa großes Protein, welches durch einen exogen zugefügten synthetischen Dimerisierer (AP20187) künstlich oligomerisiert (Spencer et al. 1996). Native Immunoblot-Analysen zeigten, dass sich in der Zelle nach Zugabe des Linkers ein natürliches Dimer-Gleichgewicht einstellt (Abb. 4-15C). Mit dieser künstlich aktivierbaren Chimäre war es möglich, NLRC5 induzierte Signalwege zu untersuchen.

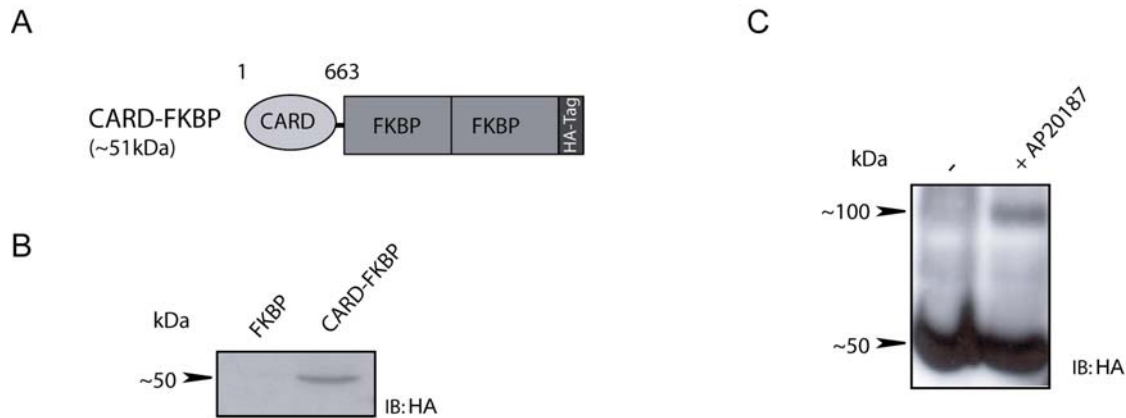


Abb: 4-15: Künstlich aktivierbare NLRC5-Chimäre.

(A) Fusionskonstrukt. (B) SDS-Gel mit Proteinlysaten aus transient transfizierten HeLaS3 Zellen. (C) Natives Glyciningel mit künstlich aktivierter Chimäre. Die Zellen wurden für 24 h mit 0,1% AP20187 inkubiert.

4.7.2 Analyse der Rolle von NLRC5 bei Apoptose und Proliferation

Einige Mitglieder der NLR-Proteinfamilie (NLRP1, NLRP3, NLRC4, NAIP) stellen essentielle molekulare Komponenten des Inflammasom-Multiproteinkomplexes dar (Martinon et al. 2002, Zamboni et al. 2006, Franchi et al. 2007). Dieser Signalkomplex vermittelt über Aktivierung von Caspase-1 die Prozessierung und die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β , kann unter bestimmten Umständen aber auch an der Vermittlung von Apoptose beteiligt sein (Martinon und Tschopp 2007, Ting et al. 2008b). Um eine mögliche Rolle von NLRC5 beim Apoptose-Prozess aufzudecken, wurde mit Hilfe eines RNAi-basierten Ansatzes die *NLRC5* RNA spezifisch herunterreguliert und die Zellviabilität mittels MTT-Assay und programmierter Zelltod mittels Caspase-Glo[®]-3/7 Assay quantifiziert. Da die Anwesenheit von doppelsträngige (ds) RNA in eukaryotische Zellen zu einer antiviralen Antwort führen kann (Bridge et al. 2003, Sledz et al. 2003, Persengiev et al. 2004) und dadurch die Zytokin-Familie der Interferone induziert wird (Haque und Williams 1998, Stark et al. 1998), wurde die Expression des Markergens 2',5'-*Oligoadenylate synthetase 1* (*OAS1*) als Kontrolle für unspezifische zelluläre Reaktion auf dsRNA genommen. Es zeigte sich bei Verwendung der spezifischen siRNA gegen *NLRC5* eine leichte aber deutlich detektierbare Reduktion des *OAS1* Levels in Zellen im Vergleich zu Kontroll-siRNA (vergl. 4.7.6, Abb. 4-24).

Zur Quantifizierung von Zellviabilität wurde ein MTT-Assay verwendet. Hier zeigte sich in HeLaS3- und SW480-Zellen durch die Verwendung der siRNAs gegen *NLRC5* kein Unterschied zu den Kontrollen (Abb. 4-16A). Die Zellen wurden zusätzlich mit 1000 U/ml

IFN- γ stimuliert. Auch hier war kein Unterschied zur Kontrolle detektierbar. Die Reduktion von *NLRC5* führte in beiden Experimenten zu keiner Abnahme der Zellviabilität. In Abb. 4-16A wurde exemplarisch das Ergebnis einer siRNA gegen *NLRC5* im Vergleich zu der Kontroll-siRNA gezeigt. In einem zusätzlichen Caspase Glo[®]-3/7-Assay wurde luminometrisch die Aktivität von Caspase 3 und 7 mit der künstlich aktivierbaren *NLRC5* Chimäre gemessen. Die Caspasenaktivität gibt einen direkten Hinweis auf eine Induktion von Apoptose in den Zellen. Mit der Chimäre transfizierte HeLaS3-Zellen zeigten nach Aktivierung keinen Unterschied zu den Kontrollen in der Caspase-Aktivität (Abb. 4-16B). Da *NLRC5* keinen Einfluss auf apoptotische Prozesse in der Zelle hatte, sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob die Expression von *NLRC5* Einfluss auf die verschiedenen Stadien der Zellteilung hat. Die Zellteilung wird in vier verschiedene Stadien unterteilt. Mit Propidiumjodid (PI)-Färbung von Kern-DNA ist es möglich, durch FACS-

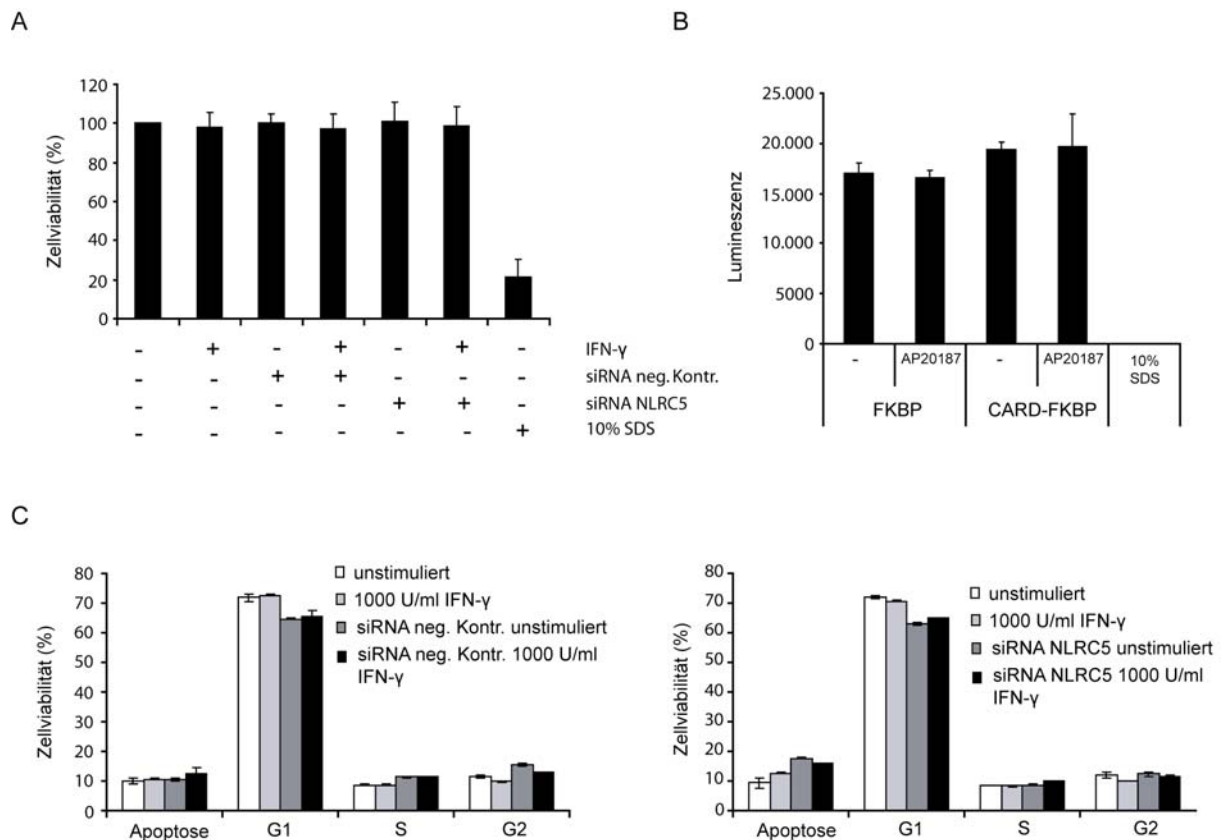


Abb. 4-16: Einfluss von *NLRC5* auf Apoptose und Zellproliferation.

(A) MTT-Assay mit 75 nM siRNA transfizierten HeLaS3-Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen (n=3). (B) Caspase-Glo[®]-3/7-Assay von HeLaS3-Zellen, die mit FKBP- oder CARD-FKBP-Plasmiden transfiziert wurden. Die Zellen wurden wie angegeben 24 h vor der Messung mit 0,1% AP20187 inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen (n=3). (C) Proliferationsassay mit 75 nM siRNA transfizierten HeLaS3-Zellen. Um die einzelnen Mitosephasen im FACS zu messen, wurden die Zellen für 3 h mit Propidiumjodid inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen (n=3).

Analyse den Gehalt an nukleärer DNA zu quantifizieren und so den Anteil der Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase zu bestimmen.

HeLaS3-Zellen wurden mit siRNA transfiziert und zusätzlich mit 1000 U/ml IFN- γ stimuliert. Die mit siRNA gegen *NLRC5* transfizierten Zellen zeigten gegenüber Kontroll-siRNA keine Veränderung in den einzelnen Phasen (Abb. 4-16C). Eine Reduktion von *NLRC5* führt zu keiner Veränderung in den einzelnen Phasen der Proliferation. Exemplarisch wurde das Ergebnis nur für eine siRNA gegen *NLRC5* im Vergleich zu der Kontroll-siRNA gezeigt.

4.7.3 Identifizierung von NLRC5-abhängigen intrazellulären Signaltransduktionsprozessen

Um zu analysieren, welche intrazellulären Signalwege durch NLRC5 beeinflusst werden können, wurden Signalweg-spezifische Reporterassays unter Verwendung von exogen aktivierbarem NLRC5-FKBP durchgeführt. Die folgenden regulatorischen Elemente wurden dabei mit Hilfe von Dual Luciferase Assay untersucht: *activator* protein 1 (AP-1), gamma-interferon activation sequence (GAS), heat shock element (HSE), interferon-specific response element (ISRE), nuclear factor of activated T-cells (NFAT) und nuclear transcription factor kappaB (NF- κ B). Da eine Überexpression von NLR Proteinen auch in Abwesenheit des Liganden zu einer Autoaktivierung führen kann (Inohara et al. 2000), wurde für die Untersuchung zusätzlich NLRC5-GFP verwendet. In einem parallelen Ansatz wurden die oben genannten signalwegsspezifischen Reportergenkonstrukten in Kombination mit der künstlich aktivierbaren NLRC5-Chimäre oder NLRC5-GFP in HeLaS3- und HEK293-Zellen getestet (Abb. 4-17).

Überraschenderweise hatte NLRC5 keine Effekt auf die bisher mit NLR-Proteinen assoziierten Signalwege AP-1 und NF- κ B. Zusätzlich wurden die Signalwege die über HSE und NFAT Bindestellen reguliert werden nicht beeinflusst.

Stattdessen aktivierte NLRC5 Reportergene, die eine *consensus binding sites* ISRE und GAS enthielten (Abb. 4-18). Diese regulatorischen Elemente repräsentieren die Hauptbindestellen für die STAT-Familienmitglieder (Goodbourn et al. 2000, Ehret et al. 2001).

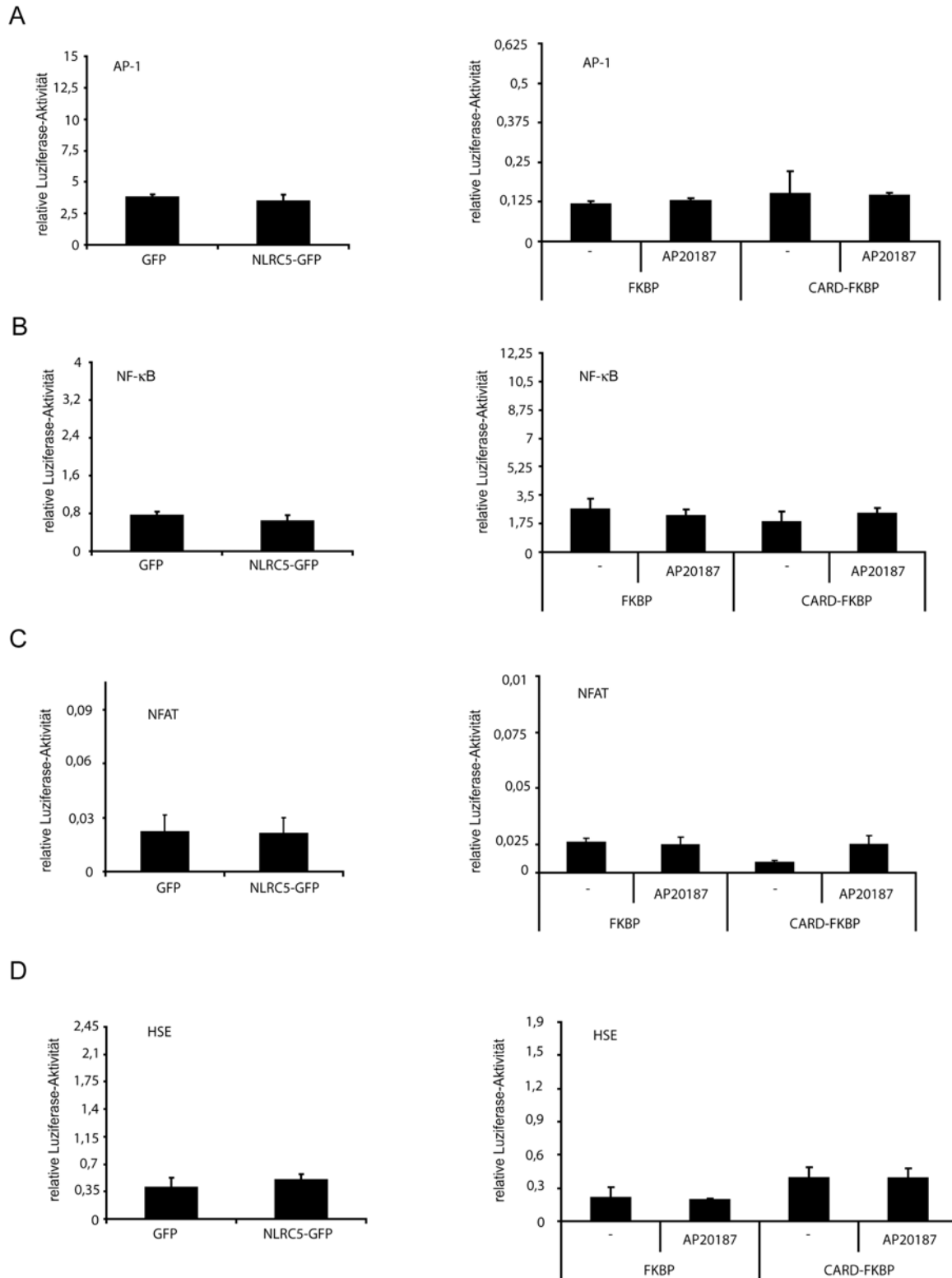


Abb. 4-17: Signaltransduktionsprozesse downstream von NLRC5.

(A-D) HeLaS3-Zellen wurden im 96-well Format mit NLRC5-GFP/ CARD-FKBP (22,5 ng) und den Reportergenen (22,5 ng) für *activator protein 1* (AP-1), *nuclear transcription factor kappaB* (NF-κB), *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) und *heat shock element* (HSE) transfiziert. Die mit den FKBP Konstrukten transfizierten Zellen wurden für 24 h mit 0,1% AP20187 inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen (n=3).

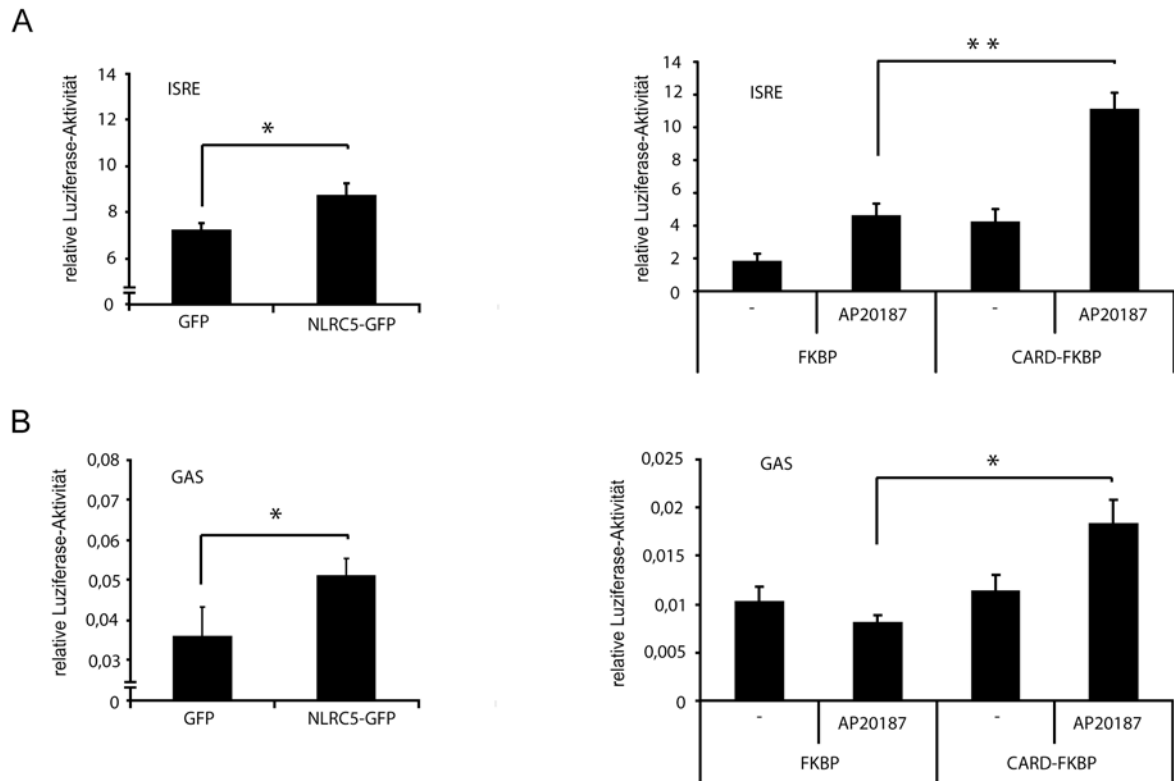


Abb. 4-18: Regulation von ISRE- und GAS-abhängigen Signalwegen durch NLRC5.

(A, B) HeLaS3-Zellen wurden im 96-well Format mit NLRC5-GFP/CARD-FKBP (22,5 ng) und den Reportergenen (22,5 ng) für *interferon-specific response element* (ISRE) und *gamma-interferon activation sequence* (GAS) transfiziert. Die mit den FKBP-Konstrukten transfizierten Zellen wurden wie angegeben für 24 h mit 0,1% AP20187 inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen (n=3; *, p < 0,05; **, p < 0,01).

4.7.4 Einfluss von NLRC5 auf den STAT1-Signalweg

Um zu überprüfen, ob die oben beschriebenen Daten basierend auf Luziferasemessungen auch auf Ebene der Transkriptionsfaktoren nachzuweisen sind, wurde der Phosphorylierungsstatus von STAT1 untersucht. Die Phosphorylierung von STAT1 ist essentiell für die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege. Dafür wurden HeLaS3-Zellen mit der künstlich aktivierbaren CARD-FKBP Chimäre transfiziert und die Oligomerisierung zu zwei verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von AP20187 induziert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit IFN- γ stimuliert, um STAT1 in den aktivierten phosphorylierten Zustand pSTAT1 zu bringen. Ein Immunoblot gegen die verschiedenen Phosphorylierungszustände von STAT1 zeigte in beiden Zelllinien das aktivierte NLRC5 zu einer verstärkten Phosphorylierung von STAT1 in den Zellen führte (Abb. 4-19A, B). Der pSTAT1-Gehalt war in diesen Zellen etwa doppelt so hoch wie in den Kontrollen. Die Proteinmenge von STAT1 wurde hingegen durch die Aktivierung von NLRC5 nicht beeinflusst.

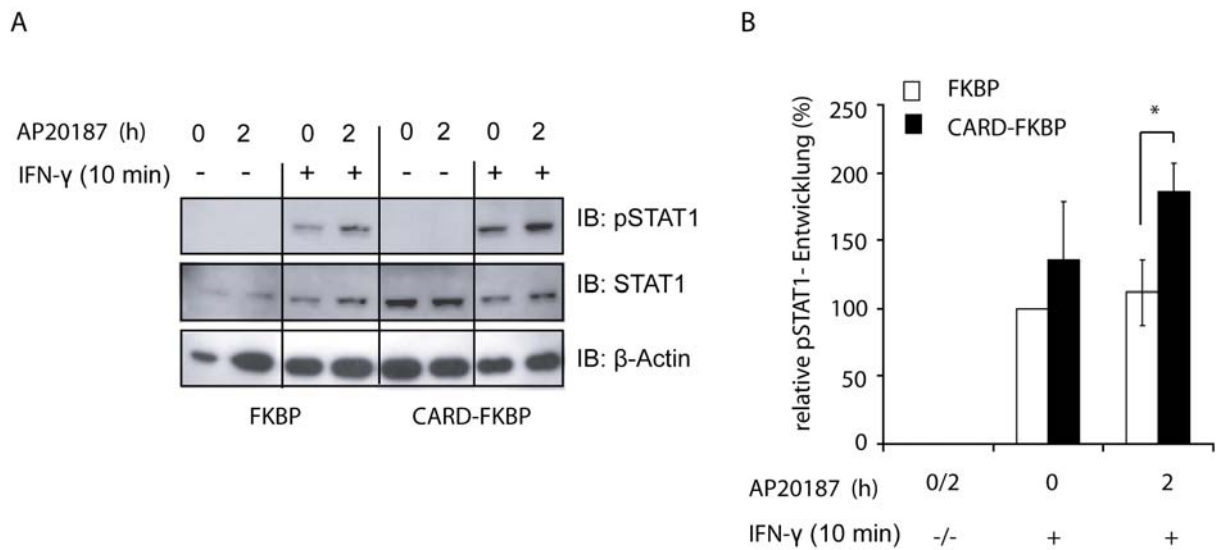


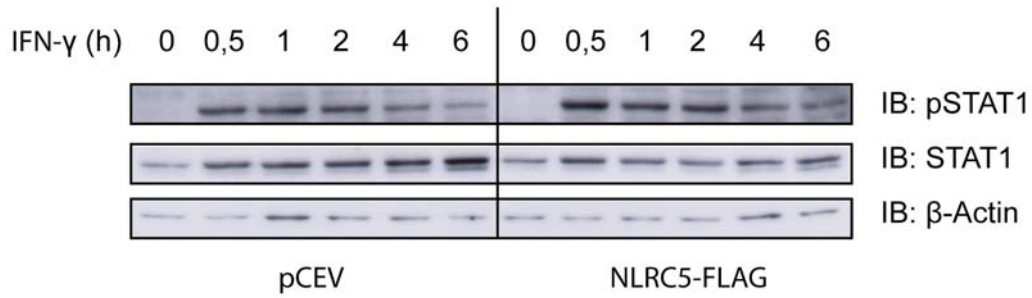
Abb. 4-19: Einfluss von aktiviertem NLRC5 auf den pSTAT1-Level.

(A, B) HeLaS3-Zellen wurden mit FKBP oder CARD-FKBP transient transfiziert und wie angegeben mit 1000 U/ml Interferon gamma (IFN- γ) stimuliert. Mittels eines Immunoblottes (IB) wurde die STAT1-Phosphorylierung detektiert. (B) Densitrometrische Auswertung der Phosphorylierung von STAT1 in HeLaS3-Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert des relativen pSTAT1-Level normalisiert am STAT1-Level (n=2; *, p < 0,05).

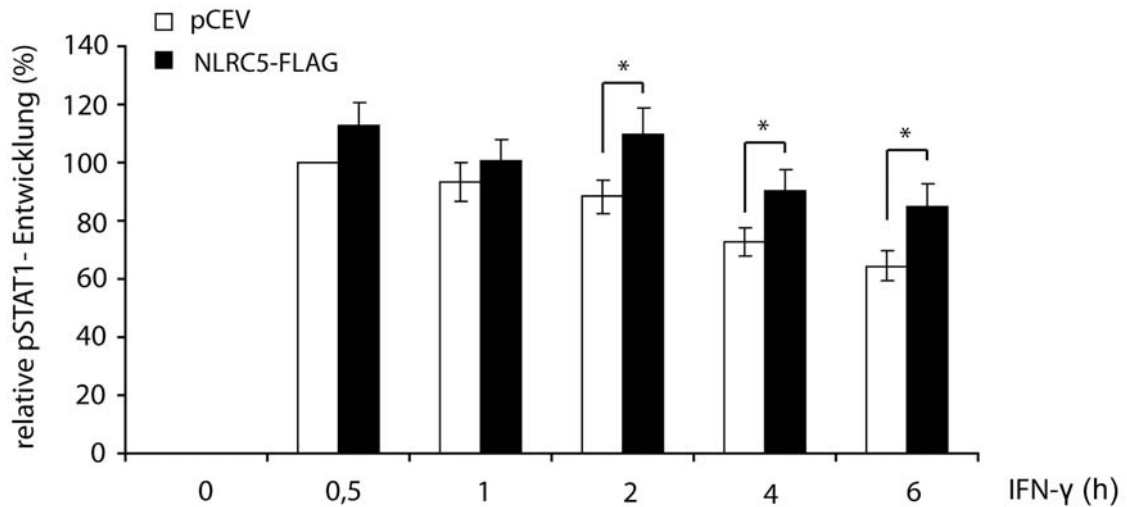
Um den Einfluss von NLRC5 auf die STAT1-Phosphorylierung über die Zeit zu betrachten, wurden HeLaS3-Zellen transient mit dem NLRC5-FLAG-Konstrukt transfiziert und die Zellen über verschiedene Zeitpunkte mit IFN- γ stimuliert (Abb. 4-20A, B). In den Kontrollen nahm der pSTAT1-Level bereits nach der ersten Stunde wieder ab. Die NLRC5-FLAG transfizierten Zellen zeigten im Vergleich zu den Kontrollen bereits am Anfang ungefähr 10% mehr pSTAT1. Der erhöhte pSTAT1-Level blieb bis zwei Stunden nach der Stimulation erhalten. Erst danach nahm der pSTAT1-Gehalt in den Zellen langsam ab. Der Gehalt war zwei Stunden nach der Stimulation noch immer ungefähr 20% über dem der Kontrollen.

Mittels *NLRC5-Gene-silencings* sollte untersucht werden, ob endogenes NLRC5 an der Phosphorylierung von STAT1 beteiligt ist. Dafür wurden HeLaS3-Zellen für 48 h mit 75 nM siRNA gegen *NLRC5* transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit 1000 U/ml IFN- γ stimuliert. Es zeigte sich kein Unterschied des pSTAT1 Levels mit siRNA gegen *NLRC5* behandelten Zellen gegenüber Zellen die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden (Abb. 4-20C).

A



B



C

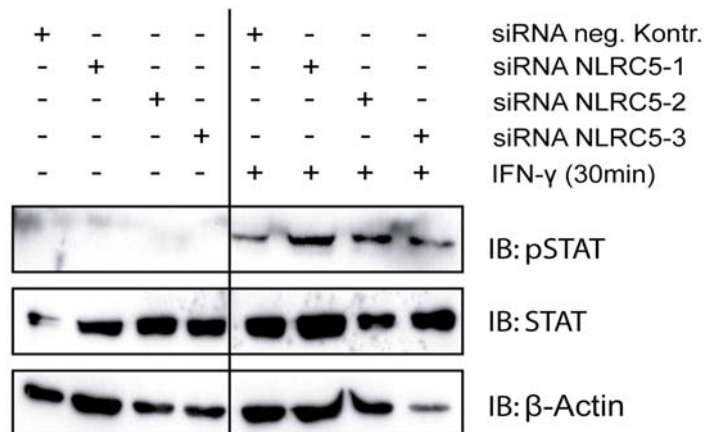


Abb. 4-20: Einfluss von transfizierten und endogenem NLRC5 auf die STAT1-Phosphorylierung.

(A, B) HeLaS3-Zellen wurden mit pCEV oder NLRC5-FLAG transfiziert und über die angegebenen Zeitpunkte mit Interferon gamma (IFN-γ, 1000 U/ml) stimuliert. Mittels eines Immunoblots (IB) wurde die STAT1-Phosphorylierung detektiert. (B) Densitometrische Auswertung der Phosphorylierung von STAT1 in HeLaS3-Zellen über die Zeit. Dargestellt ist Mittelwert des relativen pSTAT1-Level normalisiert am STAT1-Level (n=3; *, p < 0,05). (C) HeLaS3-Zellen wurden wie angegeben mit 75 nM siRNA transfiziert. Die Zellen wurden für 30 min mit 1000 U/ml Interferon gamma (IFN-γ) stimuliert. Mittels eines Immunoblots (IB) wurde die STAT1-Phosphorylierung detektiert.

4.7.5 Autokrine transkriptionelle Regulation von *NLRC5*

Da die hier dargestellten Daten auf eine spezifische Aktivierung der ISRE- und GAS-Signalwege durch *NLRC5*-Aktivierung hindeuten und gleichzeitig *NLRC5* als Zielgen des JAK/STAT-Signalweges identifiziert worden ist, sollte im folgenden gezeigt werden, ob *NLRC5* eine autokrine Regulation seiner Promotoraktivität bewirken kann. Dafür wurden HeLaS3-Zellen mit der *NLRC5*-FKBP Chimäre und dem *NLRC5*-Promotor-Reportergenkonstrukt kotransfiziert. Nach der exogenen Aktivierung kam es zu keiner erhöhten Luziferase-Aktivität in den Zellen (Abb. 4-21). Somit stellt *NLRC5* nach diesen Daten kein Zielgen seiner eigenen Signalkaskade dar.

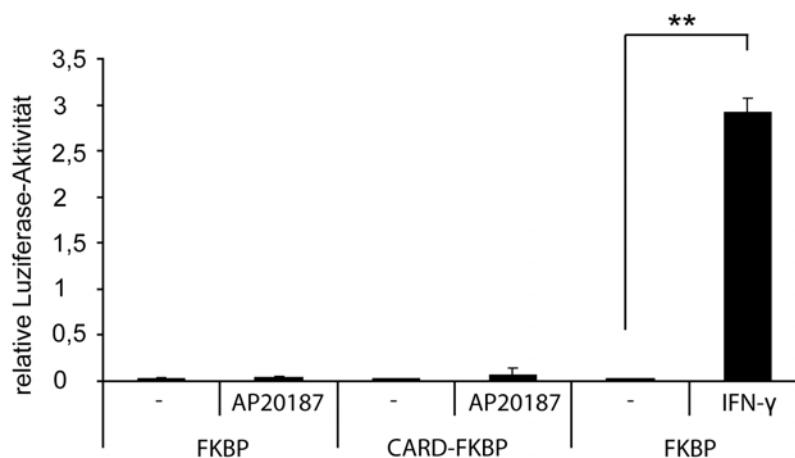


Abb. 4-21: Analyse zur möglichen autokrinen Regulation von *NLRC5*.

In einem 96-well Format wurden HeLaS3-Zellen mit *NLRC5* Promotor (22,5 ng) und FKBP oder CARD-FKBP (22,5 ng) kotransfiziert und für 24 h wie angegeben stimuliert (AP20187 0,1%, IFN-γ - Interferon gamma 2.500 U/ml). Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen (n=3; **, p < 0,01).

4.7.6 Identifizierung von Zielgenen des *NLRC5* Signalgeschehens

Um zu analysieren, ob die Regulation von ISRE- und GAS-enthaltenden Sequenzen auch auf Zielgenebene zu detektieren war, wurden potenzielle Zielgene per RT-PCR analysiert. Bei den Zielgenen handelt es sich um Gene, die eine Rolle bei Immunreaktionen spielen. Das Überexpressionskonstrukt *NLRC5*-GFP wurde in die epithelialen HeLaS3-Zellen transfiziert, nach 24 h Gesamt-RNA isoliert und auf cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die Expression von den verschiedenen Zielgenen mittels RT-PCR überprüft (Abb. 4-22A). Die Überexpression zeigte einen erheblichen Anstieg der Transkriptmenge von *IFN-α*, *repressor of protein kinase/interferon-inducible double stranded RNA-dependent inhibitor (PRKRIR)* und von *OAS1*. Im Gegensatz dazu wurde die Expression von *STAT1*, *IL-12α*, *DEAD (Asp-*

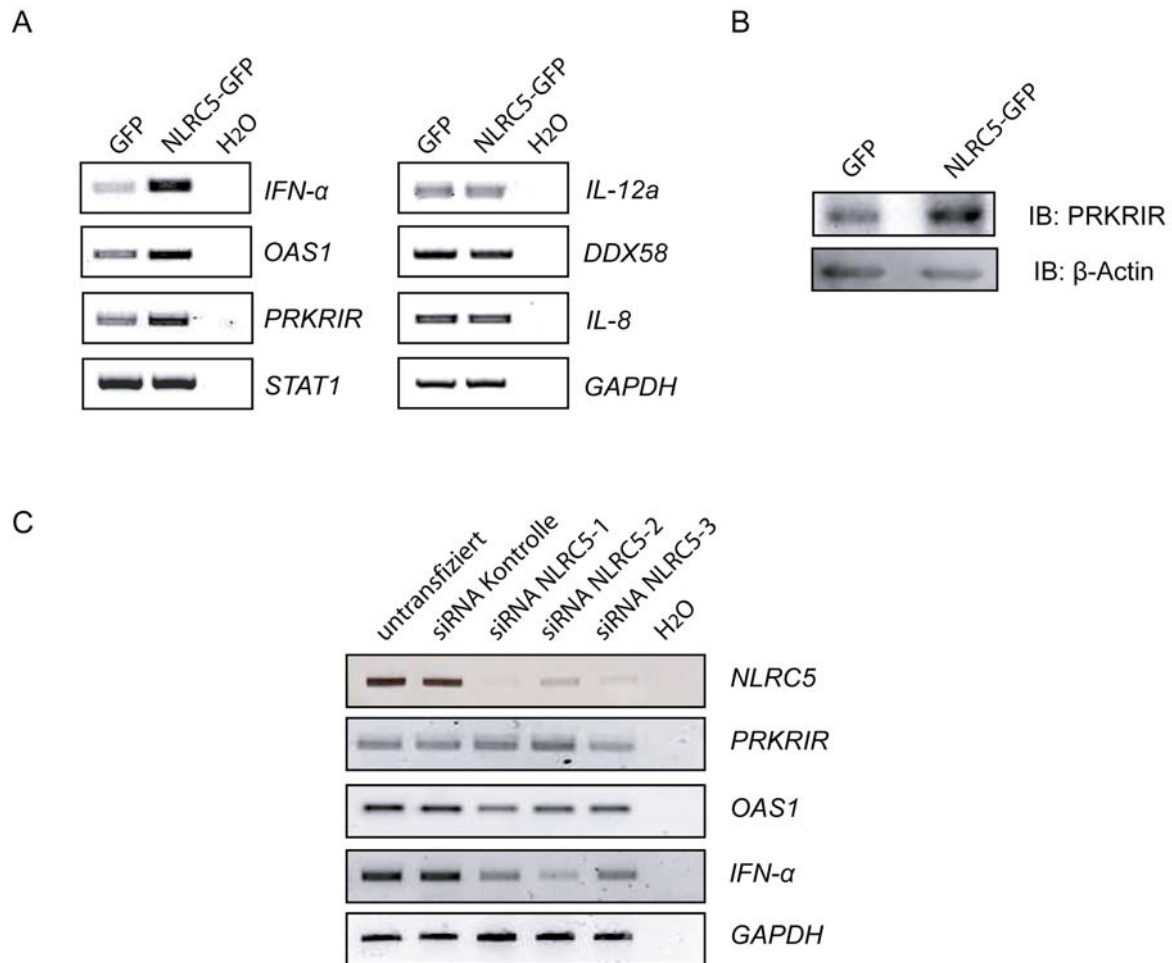


Abb. 4-22: Regulation von verschiedenen Genen durch NLRC5.

(A) RT-PCR von verschiedenen Genen in HeLaS3-Zellen nach Überexpression von NLRC5. DDX58 - *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58*, IFN- α - Interferon alpha, IL - Interleukin, OAS1 - *2',5'-Oligoadenylate synthetase 1*, PRKRIR - *repressor of protein kinase/interferon-inducible double stranded RNA-dependent inhibitor*, STAT1 - *signal transducer and activator of transcription 1*. (B) Immunoblot (IB) von Gesamtproteinlysaten aus HeLaS3-Zellen gegen PRKRIR. (C) RT-PCR von verschiedenen Genen in HeLaS3-Zellen nach Transfektion mit 75 nM siRNA für 48 h. IFN- α - Interferon alpha, OAS1 - *2',5'-Oligoadenylate synthetase 1*, PRKRIR - *repressor of protein kinase/interferon-inducible double stranded RNA-dependent inhibitor*.

Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58 (DDX58) und *IL-8*, einem Chemokin unter Kontrolle von NF- κ B und AP-1 Promotor-Bindestellen, nicht beeinflusst.

Zusätzlich wurde exemplarisch die Proteinexpression von PRKRIR nach Überexpression von NLRC5-GFP mittels Immunoblot überprüft (Abb. 4-22B). Durch die Überexpression kommt es zu einer starken Zunahme der PRKRIR-Proteinmenge, übereinstimmend mit der Zunahme auf Transkriptebene.

Um die funktionellen Konsequenzen des *NLRC5-Gene-silencing* auf die Genexpression von antiviralen Zielgenen zu untersuchen wurden HeLaS3-Zellen für 48 h mit 75 nM siRNA gegen *NLRC5* transfiziert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Expression wurde mittels RT-PCR (Abb. 4-22C) und zusätzlich für

PRKRIR mittels Immunoblot untersucht (Daten nicht gezeigt). Mit siRNA gegen *NLRC5* behandelte Zellen zeigten eine Reduktion des *OAS1* und *IFN- α* Levels. Keine Beeinflussung hatte die siRNA auf den *PRKRIR*-Level der Zellen.

4.8 Rolle von NLRC5 bei antibakteriellen Abwehrmechanismen

4.8.1 Synergismus zwischen NLRC5 und NOD2

In der Vergangenheit konnten verschiedene funktionelle Interaktionen und Wechselwirkungen innerhalb der NLR-Familie gezeigt werden (Damiano et al. 2004, Hsu et al. 2008, Wagner et al. 2009). Dabei zeigte sich u.a., dass die NACHT-Domänen nicht nur homophil- spezifisch an ihren Gegenpart binden, sondern auch mit anderen NACHT-Domänen der Proteinfamilie in Interaktion treten. Bisher wurde die damit verbundene Signaltransduktion nur für NLRC4 untersucht. Ursprünglich ist NLRC4 als Caspase-1 Aktivator beschrieben, der über die N-terminale CARD mit der CARD von pro-Caspase-1 assoziiert (Geddes et al. 2001, Poyet et al. 2001). Durch heterotypische NACHT-NACHT

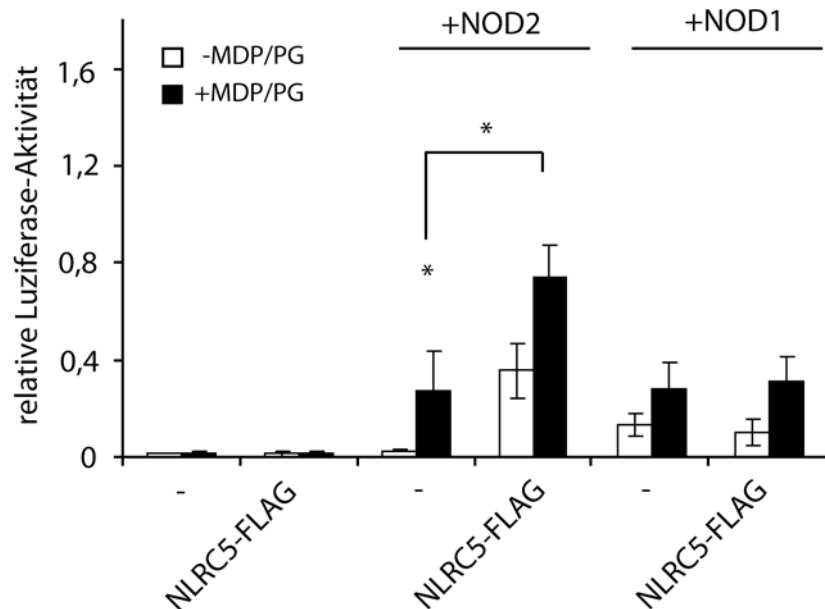


Abb. 4-23: NLRC5 verstärkt die NOD2-abhängige NF- κ B-Aktivierung.

Luziferaseassay in HEK293-Zellen mit NF- κ B-Reportergen (*96-well* Format). HEK293-Zellen wurden mit dem NF- κ B-Reportergen (15 ng) und wie angegeben mit NLRC5-FLAG (15 ng), NOD2-FLAG (3 ng) und NOD1 (3 ng) transfiziert. Die Zellen wurden wie angegeben mit Muramyl-dipeptid (MDP, 10 μ g/ml) oder Peptidoglycan (PG, 10 μ g/ml) stimuliert. Anschließend wurde luminometrisch die Luziferase-Aktivität gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen (n=3; *, p < 0,05).

Interaktionen bindet NLRC4 an verschiedene andere NACHT-enthaltende Proteine und übt einen direkten Einfluss auf die NF- κ B- und Caspase-1-Aktivierung (IL-1 β Sekretion) aus (Damiano et al. 2004). Daher lag es nahe, NOD1 und NOD2 auf eine mögliche Interaktion mit NLRC5 zu überprüfen. Da HEK293-Zellen kein endogenes NOD2 exprimieren (Ogura et al. 2001b), wurde für die Interaktionsversuche diese Zelllinie verwendet. HEK293-Zellen wurden mit NLRC5, dem NF- κ B-Luziferase- Reportergenkonstrukt und NOD2 bzw. NOD1 kotransfiziert und die Aktivierung von NF- κ B über Luziferaseaktivität gemessen (Abb. 4-23). Die Kotransfektion von NOD1 und NLRC5 zeigte keine Änderung in der Luziferaseaktivität. Währenddessen zeigte

NLRC5 in Kombination mit NOD2 nach MDP Stimulierung eine Verdopplung der NF- κ B-Aktivierung. Im Vergleich zu der NOD2-vermittelten NF- κ B-Aktivierung sollte die NLRC5-abhängige Regulation von ISRE-enthaltenden Sequenzen untersucht werden. HEK293-Zellen wurden mit NOD2, dem ISRE-Luziferase-Reportergen und NLRC5 kotransfiziert. NOD2 alleine hatte keinen Einfluss auf die Luziferase-Aktivität. Bei einer Kotransfektion von NOD2 und NLRC5 war hingegen eine signifikante Zunahme der Luziferase-Aktivität gegenüber nur NLRC5 messbar (Abb. 4-24). Die Daten deuten darauf hin, dass es bei Koexpression von NOD2 und NLRC5 zu einer Interaktion kommen könnte.

NOD2 trägt dazu bei, dass Zellen gegen zytotoxische Bakterien besser geschützt sind (Hisamatsu et al. 2003b). Da es auf

Signaltransduktionsebene zu einem Synergismus der beiden NLR-Proteine gekommen war, sollte der Einfluss diese Wechselwirkung gegenüber invadierenden Bakterien in einem weiteren Zellinvasionsassay untersucht werden. Für das Experiment wurden HEK293-Zellen verwendet, die stabil mit einem NOD2-Überexpressionskonstrukt transfiziert wurden. Die Zellen wurden transient mit NLRC5 transfiziert und die Bakterieninvasion mittels

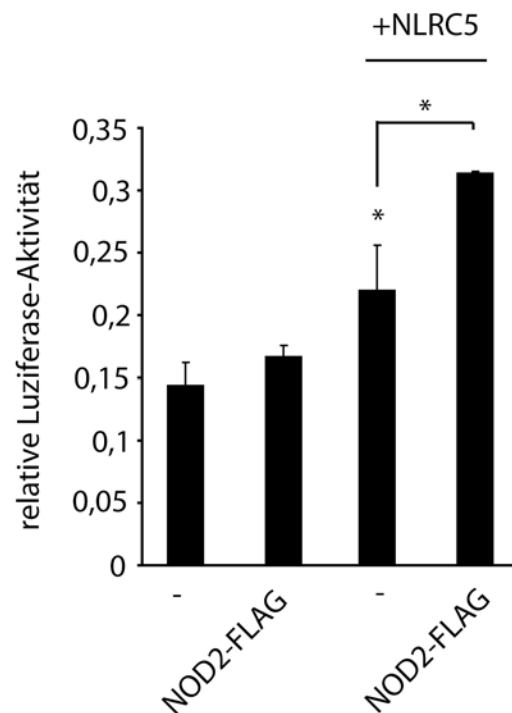
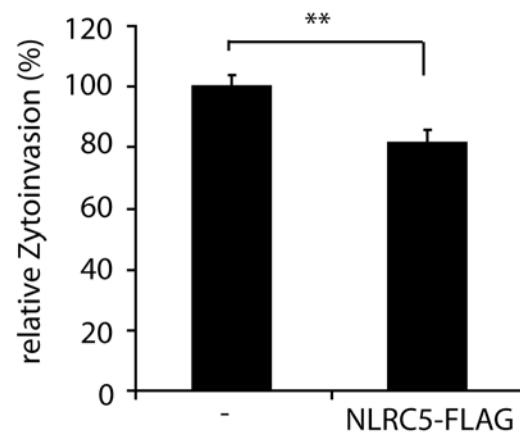


Abb. 4-24: NOD2 verstärkt die NLRC5-abhängige ISRE-Aktivierung.

HEK293-Zellen wurden mit ISRE-Reportergen (15 ng) und wie angegeben mit NOD2-FLAG (3 ng) und NLRC5-FLAG (15 ng) transfiziert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen (n=3; *, p < 0,05).

Durchflusszytometrie gemessen. Bei einer Koexpression von NOD2 und NLRC5 nahm der Schutz der Zellen gegenüber invadierende Bakterien um ungefähr 20% zu (Abb. 4-25).

Abb. 4-25: Zytoinvasion von *L. monocytogenes* in stabilen NOD2-exprimierenden HEK293-Zellen. Stabil NOD2-exprimierende HEK293-Zellen wurden mit NLRC5-FLAG (0,5 µg) transfiziert (12-well Format). Die bakterielle Invasion wurde mittels FACS gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Messungen (n=3; **, p < 0,01).



4.8.2 Physikalische Interaktion von NLRC5 und NOD2

Die vorhergehenden Ergebnisse zeigten, dass es bei einer Überexpression von NLRC5 und NOD2 zu erhöhten Aktivierung der spezifischen Signalwege und einem besseren Schutz gegen zytoinvasive Bakterien kommt. In Kolokalisationsstudien sollte daraufhin untersucht werden, ob diese funktionelle Interaktion auch auf Ebene subzellulärer Lokalisation der beiden Proteine nachweisbar ist. HeLaS3-Zellen wurden mit NOD2-GFP und NLRC5-DsRed kotransfiziert (Abb. 4-26A). Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten eine zytoplasmatische Lokalisation der beiden Proteine. NLRC5 war dabei vollständig im Zytoplasma lokalisiert, während NOD2 auch mit der Zellmembran assoziiert vorliegen kann (Till et al. 2008). In der Überlagerung der beiden Lokalisationsbilder war eine Kolokalisation der beiden Proteine erkennbar.

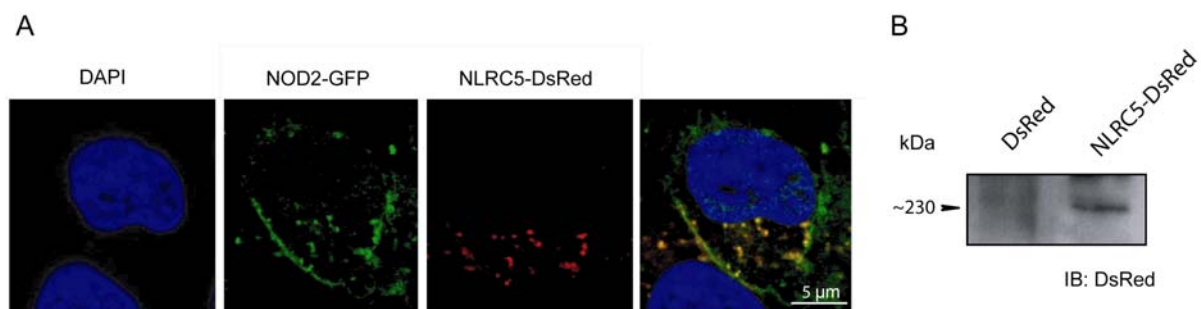


Abb. 4-26: Kolokalisation von NLRC5 und NOD2

(A) Mit NLRC5-DsRed und NOD2-GFP kotransfizierte HeLaS3-Zellen. Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt. (B) Immunoblot (IB) von NLRC5-DsRed transfizierten Zellen.

4.8.3 Proteininteraktion mit NOD2

Parallel zur Kollokalisationsuntersuchung wurde über Immunopräzipitationen überprüft, ob eine direkte Protein-Protein-Interaktion nachweisbar ist. Zusätzlich sollten dabei Rückschlüsse auf die interagierenden Domänen gezogen werden. Wird NOD2-GFP und die einzelnen Domänen von NLRC5-FLAG in der Zelle überexprimiert, interagiert NOD2 mit allen Domänen außer der CARD (Abb. 4-27A). Um die einzelnen interagierenden Domänen

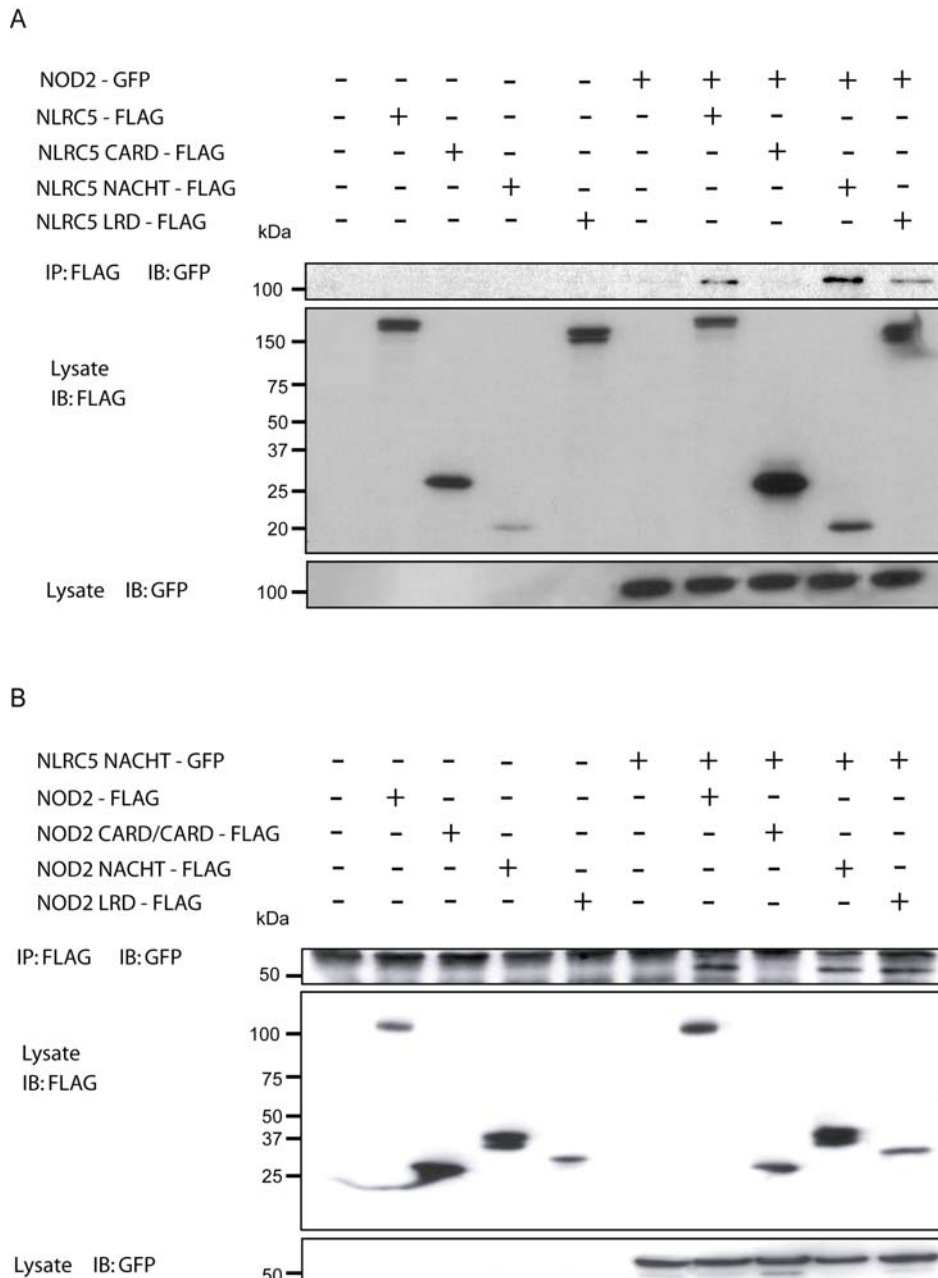


Abb. 4-27: Interaktion von NOD2 mit NLRC5.

HEK293-Zellen wurden wie angegeben kotransfiziert. (A) Im Präzipitat wurde mittels Immunoblot (IP) mit einem FLAG-Antikörper kopräzipitiertes NOD2-GFP nachgewiesen. (B) Im Präzipitat wurde mittels IP mit einem FLAG-Antikörper kopräzipitiertes NLRC5-NACHT-GFP nachgewiesen.

besser zu klassifizieren wurden zwei weitere IPs mit der NACHT-Domäne und der LRD von NLRC5 in Kombination mit den einzelnen Domänen von NOD2 durchgeführt. Abbildung 4-27B zeigt die IP der NACHT von NLRC5 mit den Domänen von NOD2. Dabei kam es zu einer heterophilen NACHT/NACHT, sowie NACHT/LRR Bindung von NLRC5 und NOD2. Die NACHT-Domäne von NLRC5 assoziierte nicht mit der CARD von NOD2. Da die NACHT-Domänen von NLRC5 und NOD2 sehr ähnlich sind, konnte es sich bei der heterophilen NACHT (NLRC5) - LRD (NOD2) Bindung um eine unspezifische Wechselwirkung zu handeln. Um diese näher zu untersuchen wurde die LRD von NLRC5 mit den einzelnen Domänen von NOD2 kotransfiziert (Daten nicht gezeigt). Die LRD von NLRC5 interagiert nur mit der NACHT-Domäne von NOD2. Für die heterophile NOD2-NLRC5 Bindung ist daher nach den vorliegenden Daten nur die NACHT-Domäne von beiden Proteinen verantwortlich.

4.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammengefasst konnte im Laufe der Arbeit der NLR-Vertreter NLRC5 bezüglich seiner genomischen Organisation und Domänenstruktur charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die spezifische Sekretion von IFN- γ nach einer viralen Infektion zu einer verstärkten Expression von NLRC5 führt. Dabei verstärkt überexprimiertes und exogen aktivierbares NLRC5 den IFN- γ -abhängigen JAK/STAT Signalweg. NLRC5 führte zu einer verstärkten und länger anhaltenden Phosphorylierung von STAT1. Des Weiteren führte NLRC5 zu einer verstärkten mRNA Expression von antiviralen Genen, die über den ISRE-Signalweg reguliert werden. Ferner konnte eine funktionelle und physikalische Interaktion mit dem NLR-Mitglied NOD2 gezeigt werden, die einen positiven Einfluss auf die Abwehr gegen zytoinvasive Bakterien hat.

Somit stellt NLRC5 nach den vorliegenden Daten einen wichtigen molekularen Bestandteil der angeborenen Immunabwehr dar.

5 Diskussion

Die Familie der NLR-Proteine stellt einen essentiellen Bestandteil des angeborenen Immunsystems für die Erkennung von Pathogenen und deren Abwehr dar. Mutationen in NLR Genen können dazu führen, dass Pathogene oder DAMPs nicht erkannt werden und es zu unkontrollierten Entzündungsreaktionen kommt. Bisher wurden verschiedene NLRs beschrieben, deren Gene allelische Varianten aufweisen, die mit diversen entzündlichen Krankheiten assoziiert sind (Chen et al. 2008, Rosenstiel et al. 2008). Genetische Varianten von NOD2 sind z.B. mit Morbus Crohn und dem Blau-Syndrom assoziiert (Hampe et al. 2001, Hugot et al. 2001, Ogura et al. 2001a, Wang et al. 2002), während NLRP3 u.a. mit Muckle-Wells-Syndrom, familiären Mittelmeerfieber und Morbus Crohn in Verbindung gebracht wird (Hoffman et al. 2001, Villani et al. 2009). Diese genetischen Befunde unterstreichen die Wichtigkeit der NLRs als essentielle Effektorproteine des Immunsystems. Das Verständnis der Wirkungsweise von NLRs und deren Regulation könnte in Zukunft für neue therapeutische Ansätze eine wichtige Rolle spielen (Mathews et al. 2008). Bisher wurden nur wenige Mitglieder dieser Protein-Familie funktionell charakterisiert. Ziel dieser Arbeit war es, das NLR-Familienmitglied NLRC5 funktionell zu charakterisieren.

Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass NLRC5 in antivirale Abwehrmechanismen eingebunden sein könnte. Darüberhinaus konnte eine physikalische und funktionelle Interaktion von NLRC5 und NOD2 gezeigt werden. Diese Interaktion hat Einfluss auf beteiligt Signalkaskaden und zelluläre Programme.

5.1 Nutzen und Grenzen verwendeter Zelllinien und Methoden

Viele der Erkenntnisse, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, beruhen auf *in vitro*-Untersuchungen. Eine Übertragung auf *in vivo*-Zustände ist daher kritisch zu betrachten. Ein Großteil der Experimente wurde an definierten Zelllinien durchgeführt. Dabei handelt es sich um Tumorzellen, die sich beliebig züchten und vermehren lassen. Da die Zelllinien nur aus einer Zellart bestehen, sind sie biologisch betrachtet „sauberer“ als primäre Zellen. Primäre Zellen werden durch Explantation aus lebendem Gewebe gewonnen und können daher Verunreinigungen durch andere Zelltypen aufweisen. Des Weiteren reagieren die immortalisierten Zelllinien meistens weniger empfindlich auf zytotoxische Stimuli als primäre Zellen, was sich in den Ergebnissen widerspiegeln kann. Ein weiterer Nachteil von Zelllinien

kann eine fehlende Ligandenerkennung durch eine mangelnde Expression von Oberflächenrezeptoren sein. HEK293-Zellen exprimieren z.B. keinen TLR4 und reagieren nicht auf eine Stimulation mit LPS (Chow et al. 1999, Beutler 2000). Aus diesen Gründen wurde, um eine möglichst allgemeine Aussage treffen zu können, die meisten Experimente in zwei oder mehr Zelllinien wiederholt. Um allgemeingültigere Aussagen über die Funktion von NLRC5 zu treffen, müssen daher in Zukunft weitere Experimente mit primären Zellen und in Tierversuchen durchgeführt werden, um die hier dargestellten Prozesse unter *in vivo* Bedingungen zu analysieren.

Es zeigte sich, dass NLRC5 eine Rolle bei der Abwehr von invadierenden Viren hat. Daher wurden für die Infektionsexperimente das Zytomegalievirus (CMV) als Infektionsmodell benutzt. Da die Infektion von humanen Vorhaut- (HFF-) Zellen mit CMV als virales Infektionsmodell akzeptiert und ausreichend gut etabliert ist (Hobom et al. 2000, Schierling et al. 2005), wurde für die virale Infektion dieser Zelltyp verwendet. Da es verschiedene Klassen von Viren gibt, ist eine Verallgemeinerung der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse schwierig. Bei CMV handelt es sich um einen behüllten dsDNA-Virus-Vertreter, die Ergebnissen können daher nicht stellvertretend für die Infektion mit anderen Virusarten betrachtet werden. Zusätzliche Untersuchungen mit den verschiedenen Virustypen wie z.B. Hepatitis-C-Virus (behüllter, ss[+]RNA-Virus), Influenza (behüllter, ss[-]RNA-Virus), Adenoviren (unbehüllte, dsVirus), Enteroviren (unbehüllte, ss[+]RNA-Virus) oder Retroviren wie z.B. HIV (behüllter, ss[+]RNA-Viren mit dsDNA-Zwischenstufe) können und werden zu einem besseren Verständnis von NLRC5 beitragen. Da in dieser Arbeit allerdings gezeigt wurde, dass die Regulation von NLRC5 über eine autokrine IFN- γ -abhängige Signalgebung vermittelt wird, ist davon auszugehen, dass Infektionsmodelle unter Benutzung anderer Virustypen zu ähnlichen Ergebnissen führen werden, solange das gewählte Infektionsmodell zur Sekretion von IFN- γ führt.

5.2 NLRC5 als Vertreter der NLR-Genfamilie

5.2.1 Struktur von NLRC5

Die LRD-Struktur von NLRC5 weist gegenüber anderen Mitgliedern der NLR-Familie eine ungewöhnliche Architektur auf. Die einzelnen LRRs von NLRC5 sind über die ganze Domäne unregelmäßig verteilt. Die LRD ist die Sensorregion der Proteine für konservierte pathogene Strukturen (PAMPs) oder endogene Moleküle, die mit zellulärer Gefahr assoziiert werden (DAMPs) (Benko et al. 2008). Bei einigen beschriebenen NLR-Proteinen zeigte sich

die LRD als ein hoch selektiver Sensor, der nur einen bestimmten Liganden erkennt, während andere in der Lage sind, eine ganze Bandbreite von Liganden zu erkennen. Zum Beispiel kommt es nur zur Initiierung einer Signalkaskade, sobald NLRC4 im Zytosol das bakterielle Protein Flagellin erkennt (Franchi et al. 2006, Miao et al. 2006), wohingegen bei NLRP3 verschiedene Bakterien (z.B. *L. monocytogenes*, *S. aureus*), microbielle Toxine (z.B. Maitotoxin, Aerolysin) (Sutterwala et al. 2006) endogene DAMPs (z.B. Harnsäure (Martinon et al. 2006)) oder auch Umwelteinflüsse (z.B. Quarz, Asbest (Dostert et al. 2008)) zur Aktivierung führen. Dabei ist bisher unklar, ob es zu einem direkten Kontakt des Liganden mit der LRD kommt oder ob die Bindung indirekt über unbekannte Interaktionspartner eingeleitet wird. Um abschließend die genauen Eigenschaften, die sich eventuell durch diese unregelmäßige Verteilung der LRR bei NLRC5 ergibt genauer zu erklären sind daher weitere Experimente nötig. Dabei würde sich als Methode die Kristallstrukturanalyse anbieten. Die dreidimensionale Struktur der LRD könnte Aufschlüsse auf molekulare Mechanismen der LRD-Aktivierung liefern und mögliche Unterschiede zu LRDs von weiteren NLRs sowie Informationen über die molekularen Grundlagen der Ligandenerkennung liefern.

Bisher konnte der genaue Bereich der LRD von NLRC5, welcher an einer Entstehung dieser Modifikation beteiligt ist und welchen Einfluss dieser auf eine Aktivierung und die damit nachgeschaltete Signalgebung hat, nicht charakterisiert werden. Einen Hinweis auf eine komplexere Struktur der LRD von NLRC5 bietet der Nachweis einer Doppelbande bei Überexpression in HEK293 Zellen. Erste Untersuchungen der Aminosäuresequenz von NLRC5 zeigten keine potentiellen Glykosylierungsmotive. In weiteren Analysen sollte daher NLRC5 im Hinblick auf mögliche posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Ubiquitinierung untersucht werden. Zusätzlich könnten weitere Experimente mit Deletionsmutanten von verschiedenen Bereichen der LRD mittels Immunoblot Aufschluss darüber geben, welche Teile der LRR Domäne an der Modifikation beteiligt sind. Ebenfalls könnte mit diesen Konstrukten die nachgeschaltete Signalgebung mittels Reportergenassay dahingehend untersucht werden, welchen Einfluss die mögliche Modifikation auf die nachgeschalteten Signalgebung hat.

5.2.2 Gewebsspezifische Expression von NLRC5

Expressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene zeigten, dass *NLRC5* ein ubiquitär exprimiertes Gen ist. Eine Expression war in allen getesteten Geweben und Zelllinien nachzuweisen. Die höchste Level von *NLRC5* mRNA war im Gehirn und in der Lunge zu finden. Ein effektiver immunologischer Schutzmechanismus ist in diesen beiden Organen für

den Organismus überlebensnotwendig. Das Gehirn ist die zentrale Schaltstelle, Schäden durch Infektionen könnten fatale Folgen für den Organismus haben. Die Lunge ist hingegen die wichtigste Kontaktstelle für die Auseinandersetzung des Körpers mit Pathogenen aus der Luft. Kommt es schon hier zu einer ersten Abwehr, kann das Infektionsgeschehen schon in frühen Stadien effektiv bekämpft werden. Da die NLR zytosolische Rezeptoren des angeborenen Immunsystems darstellen und an Barriereorganen eine wichtige Rolle spielen, deutet dieser Befund darauf hin, dass NLRC5 eventuell eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr im Lungenepithel spielen könnte, wohingegen z.B. NOD2 primär an der Abwehr im Gastrointestinaltrakt beteiligt ist (Hisamatsu et al. 2003b, Rosenstiel et al. 2003, Carneiro et al. 2004). Zukünftige Studien sollten sich daher damit beschäftigen, die potentielle Rolle von NLRC5 bei infektiösen und chronisch entzündlichen Erkrankungen mit Lungenbeteiligung zu untersuchen (vergl. 5.2.4).

5.2.3 Subzelluläre Lokalisation von NLRC5

Die meisten bisher charakterisierten NLR-Proteine sind primär im Zytoplasma lokalisiert. Die einzigen Ausnahmen sind CIITA (Steimle et al. 1993), welches eine Kernlokalisationssequenz aufweist, und NLRX1 (Moore et al. 2008, Tattoli et al. 2008), welches mitochondrial lokalisiert ist. In *silico*-Untersuchungen zeigten für NLRC5 keine speziellen Zielsequenzen für bestimmte Kompartimente in der Zelle. Diese Vorhersage wurde durch fluoreszenzmikroskopische Analysen bestätigt. NLRC5 ist ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Endgültige Aussagen können aber erst weiterführende Analysen zeigen, in denen Interaktionspartner von NLRC5 aufgeklärt werden. NOD2 hat ebenfalls eine primär zytoplasmatische Lokalisation, kann aber durch Interaktion mit membranständigen Proteinen z.B. CD147 (Till et al. 2008), DUOX2 (Lipinski et al. in rev.) oder ERBIN (McDonald et al. 2005) an der Zytoplasmamembran lokalisiert sein. Um potentielle Proteininteraktionspartner von NLRC5 zu identifizieren und damit Rückschlüsse auf Lokalisation oder Funktion zu erhalten, bietet sich die Methode des *yeast-two-Hybrid Screening*-Verfahrens an. Hierbei werden Fusionsproteine in einem Hefe-Zellsystem benutzt, um über Reportergene neue Protein-Protein Interaktionspartner zu finden. In derzeit angelaufenen Studien wird die CARD von NLRC5 benutzt, um potentielle Interaktionspartner zu identifizieren. Sollten sich hierbei gefundene Interaktionspartner mit Hilfe anderer Methodik (z.B. IP) verifizieren lassen, bieten diese neuen Daten einen guten Ansatzpunkt, um die zelluläre Bedeutung von NLRC5 näher zu charakterisieren.

5.2.4 Regulation von NLRC5 bei chronischen Erkrankungen

Allelische Varianten von verschiedenen NLR-Genen sind mit einer Vielzahl von chronischen Erkrankungen assoziiert (Schreiber et al. 2005, Rosenstiel et al. 2007, Wilmanski et al. 2008). Mutationen im NOD2-Gen begünstigen u.a. die Entwicklung der entzündlichen Darmerkrankung (*inflammatory bowel disease* - IBD) Morbus Crohn. Morbus Crohn ist eine der beiden Hauptformen von IBD. Die zweite Hauptform ist Colitis ulcerosa. Bei beiden Erkrankungen kommt es zu einer erhöhten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, u.a. IFN- γ (Monteleone et al. 2002). Bisher wurde nur für Colitis ulcerosa zusätzlich zur erhöhten IFN- γ -Konzentrationen auch eine verstärkte Bildung von phosphorylierten STAT1 nachgewiesen (Schreiber et al. 2002). Bei der Wegener-Granulomatose (Morbus Wegener – MW) handelt es sich um eine chronische, nekrotisierende Entzündung der Gefäße in den oberen und unteren Atemwegen. Sie geht einher mit einer Granulombildung. Bei dieser Erkrankung wurde ebenfalls eine erhöhte Expression von IFN- γ festgestellt (Muller et al. 2000). Da es sowohl bei IBD als auch bei MW zu einer erhöhten Expression von IFN- γ kommt, wurde in den Erkrankungen die Expression von NLRC5 in Patientenproben untersucht. Bei keiner der betreffenden Patientengruppen konnte ein veränderter mRNA-Level von *NLRC5* beobachtet werden. Dies ist eventuell durch die komplexen Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zytokinen zurückzuführen. Eventuell könnte aber die Analyse unterschiedlicher Gewebe (z.B. der Lymphknoten oder peripherer Blutzellen) andere Daten liefern, die die Diskrepanz zwischen den *in vitro* Daten und den Patientenproben erklären. Eine dritte Erklärung wäre, dass sich der hier beobachtete Effekt nur auf Ebene bestimmter Zelltypen zeigen lässt und diese Regulation deshalb bei der Analyse ganzer Gewebestücke nicht nachweisbar ist.

Da die in dieser Arbeit vorgestellten Expressionsstudien eine starke Expression von *NLRC5* in den Lungen zeigten (vergl. 5.2.2), sollten sich weitere Studien mit infektiösen und chronischen Erkrankungen im Lungenbereich (z.B. Tuberkulose, Sarkoidose oder *chronic obstructive lung disease* [COPD]) befassen. Hierbei wäre es besonders interessant, die Rolle von NLRC5 im funktionellen Wechselspiel mit anderen *pattern recognition receptors* (PRRs) aufzuklären (wie z.B. im Hinblick auf die Interaktion mit NOD2 bei der Pathogenese von Tuberkulose (Ferwerda et al. 2005) und Sarkoidose (Kanazawa et al. 2005)).

5.3 Rolle von NLRC5 bei viraler und bakterieller Infektion

5.3.1 Spezifische zytokinabhängige Regulation von NLRC5

Anhand einer Promotoranalyse wurde gezeigt, dass *NLRC5* nur durch IFN- γ , nicht aber durch TNF- α reguliert wird. Regulatorische Eigenschaften von IFN- γ auf die Expression eines Mitglieds der NLR-Familie ist kein unbekannter Mechanismus. Für *NOD1* (Hisamatsu et al. 2003a) und *NOD2* werden ebenfalls durch IFN- γ reguliert, zusätzlich wird *NOD2* in Epithelzellen über TNF- α reguliert (Rosenstiel et al. 2003). Rosenstiel et al. zeigten, dass es bei einer Kostimulation von TNF- α und IFN- γ zu einer verstärkten Promotoraktivität im Vergleich zu den einzelnen Stimuli kommt. Kostimulationsexperimente mit verschiedenen Zytokinen konnten für NLRC5 bisher keine Effekte auf *NLRC5* mRNA Level zeigen.

Eine IFN- γ -vermittelte Signalgebung erfolgt über die membrangebundenen IFN-Rezeptoren IFNGRI und IFNGRII (Bach et al. 1997, Pestka et al. 1997). Über den JAK/STAT-Signalweg wird STAT1 phosphoryliert (Chen et al. 1998), anschließend erfolgt der Transport in den Zellkern (Abb. 5-1) (Decker et al. 1991). Über *in silico* Analysen wurden verschiedene

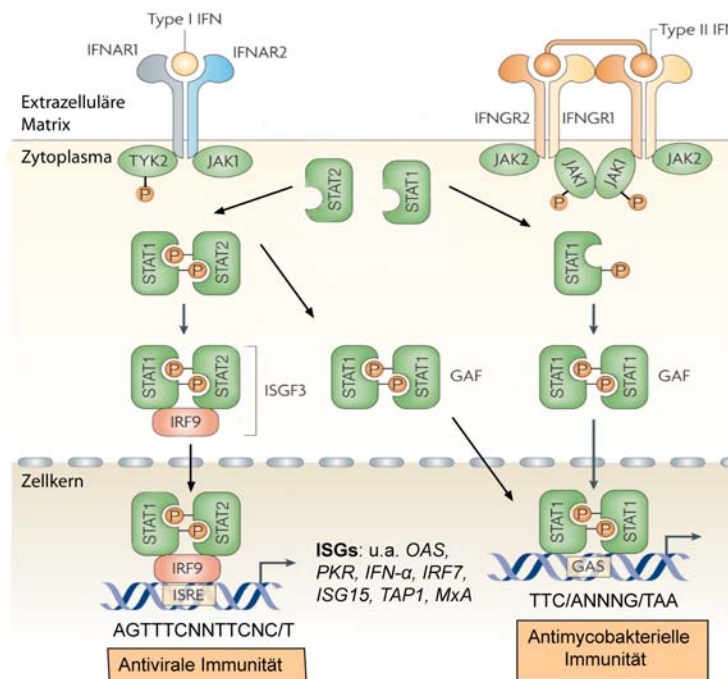


Abb. 5-1: Schematische Darstellung der Interferon (IFN)-Signaltransduktionskaskade.

GAS - *gamma-interferon activation sequence*, GAF - *IFN- γ -activated factor*, IFNAR - IFN- α/β -Rezeptor, IFNGR - IFN- γ -Rezeptor, IRF - Interferon-regulatorischer Faktor, ISG - Interferon-stimuliertes Gen, ISGF - *IFN-stimulated gene factor*, ISRE - *interferon-specific response element*, JAK - Janus Kinase, MxA - *myxovirus resistance gene*, OAS - 2',5'-Oligoadenylate Synthetase, PKR - Protein Kinase R, STAT - *signal transducer and activator of transcription*, TAP - *transporter associated with antigen processing*, TYK - Tyrosine Kinase.
verändert nach (Platanias 2005, Katze et al. 2008, Sadler and Williams 2008)

potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren in der NLRC5-Promotoregion identifiziert. Sie enthält zwei individuelle STAT-Bindestellen, wobei eine mit einer NF- κ B-Bindestelle überlappt. Diese Art von überlappenden Transkriptionsfaktor-Bindestellen wurde bei einer Vielzahl von Genen in deren regulatorischen Regionen gefunden, die mit Antworten auf Entzündungsprozesse assoziiert sind. Im besonderen die Promotorregionen von *acute phase proteins* (APP) sind ein Beleg für die ungewöhnliche Anhäufung dieser regulatorischen Elemente. Die Sequenzen tragen dazu bei, dass bei Verletzungen und lokaler Entzündung die verschiedenen APPs als Antwort gebildet werden (Gabay und Kushner 1999). Des weiteren befinden sich auf der Promotorregion von NLRC5 noch drei weitere NF- κ B-Bindestellen. Deletionen der regulatorischen STAT-Bindestellen bestätigten eine Regulation ausschließlich durch IFN- γ . Ein zusätzlicher regulatorischer Einfluss auf NLRC5-Promoteraktivität zeigte sich durch die dritte NF- κ B-Bindestelle vor dem Startcodon. Durch die Unterdrückung der beiden Signalwege durch einen pharmakologischer JAK-Inhibitor und einen I κ B α -Superrepressor konnte die Promotoraktivität stärker inhibiert werden als durch Blockade nur eines Signalwegs. Daraus folgt, dass wahrscheinlich NLRC5, wie bei anderen NLRs (z.B. NOD1, NOD2) schon beschrieben über den STAT- und den NF- κ B-Signalweg reguliert werden kann. Bisher konnte nur IFN- γ als Stimulus für den STAT-Signalweg beschrieben werden. Klassische NF- κ B aktivierende Stimuli, wie z.B. TNF- α oder LPS zeigten keinen regulatorischen Einfluss auf die Expression von NLRC5. Es bleibt zu klären, welche weiteren Faktoren für eine Regulation von NLRC5 verantwortlich sind.

Interferone, u.a. auch IFN- γ , bilden eine zentrale zelluläre Antwort auf eine virale Infektion (Levy und Garcia-Sastre 2001, Samuel 2001). In der Zelle werden virale Partikel von RLH oder TLR3, -4, -7, -8 oder -9 erkannt (Kawai und Akira 2006). Über die Interferonregulatorischen Faktoren (IRF) 3 und 7 wird die Expression von Interferonen reguliert. Diese verstärkte Expression von u.a. IFN- γ war indirekt an einer erhöhten NLRC5 mRNA-Expression nach einer viralen Infektion messbar. Wurde der IFN- γ -Signalweg mittels eines pharmakologischen JAK-Inhibitors blockiert oder das sezernierte IFN- γ durch einen Antikörper gebunden, kam es zu keiner Signalweiterleitung und keiner verstärkten Transkription von NLRC5.

Da es sich bei dem hier verwendeten CMV um ein behülltes dsDNA-Virus handelt, ist der Mechanismus der Erkennung und Signalinduktion in HFF Zellen nicht klar definierbar, da diese Zellen keinen TLR9 besitzen (Harwani et al. 2007). Bisher wurde nur für TLR9 als aktivierendes Motiv Cytosin-phosphatidyl-Guanosin (CpG)-enthaltende DNA beschrieben (Hemmi et al. 2000). CpG-Regionen sind Bereiche auf der DNA, die einen erhöhten GC-

Gehalt aufweisen. Diese CpG-Bereiche kommen in einer großen Häufigkeit im Genom von Bakterien und Viren vor (Karlin et al. 1994, Krieg et al. 1995). Alle anderen hier relevanten PRRs erkennen verschiedene RNA-Formen, entweder dsRNA und/oder ssRNA (Kawai und Akira 2006). Da als Konsequenz der RLH- bzw. TLR-Aktivierung eine verstärkte IL-12-Freisetzung beschrieben wurde (D'Andrea et al. 1992, Ryffel 1997, Goriely et al. 2008) und daraus eine erhöhte IFN- γ -Sekretion resultieren kann, kann durch den vorliegenden Datensatz bisher keiner der erwähnten Rezeptoren ausgeschlossen werden. Die IL-12-Regulation erfolgt über den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Dabei führen die TLRs über das Adaptorprotein MyD88 zu einer induzierten nukleären Translokation von NF- κ B, während die RLHs direkt NF- κ B aktivieren können (Robbins und Rossi 2005, Thompson und Locarnini 2007).

5.3.2 Rolle von NLRC5 bei der Aktivierung antiviraler Signalwege

Obwohl für verschiedene Mitglieder der NLR-Proteinfamilie eine Aktivierung von NF- κ B- und/oder MAPK – Signalwegen gezeigt wurde (Bertin et al. 1999, Inohara et al. 1999, Ogura et al. 2001b, Martinon et al. 2002, Srinivasula et al. 2002, Zamboni et al. 2006, Franchi et al. 2007), kam es entgegen der Erwartung zu keiner Aktivierung der AP-1- und NF- κ B-abhängigen Signalwege durch NLRC5-Aktivierung oder Überexpression. Stattdessen zeigten die Ergebnisse, dass künstlich oligomerisiertes und überexprimiertes NLRC5 zu einer Aktivierung von ISRE- und GAS-regulierten Promotorelementen führt. Diese regulatorischen Elemente repräsentieren die Hauptbindestellen der STAT Familie. Die Bindung von IFN- α/β an seine Rezeptoren aktiviert die intrazellulären, an die Membran gebundenen IFN-Typ I Kinasen JAK1 und TYK2. Nach einer Bindung von IFN- α/β kommt es zu einer Phosphorylierung von STAT1 und STAT2. Die beiden STATs bilden Heterodimere und komplexieren anschließend mit IRF9 (Harada et al. 1996). Der entstandene Transkriptionsfaktorkomplex, *IFN-stimulated gene factor (ISGF) 3*, transloziert in den Kern und bindet dort verstärkt an ISRE-*consensus* Bindestellen. Im Gegensatz hierzu binden nach einer IFN- γ -Stimulation STAT1/1 Homodimere bevorzugt an GAS-*consensus*-Bindestellen (Aaronson und Horvath 2002) (Abb. 5-1). Die Spezifität der beschriebenen Signalwege manifestiert sich also in der Rekrutierung unterschiedlich zusammengesetzter Transkriptionsfaktor-Komplexe. Die Aktivierung der verschiedenen Signalwege konnte in der vorliegenden Arbeit bisher nur durch künstlich oligomerisiertes und überexprimiertes NLRC5 nachgewiesen werden. Aus den hier erhobenen Daten lässt sich nicht unmittelbar auf die Identität des endogenen Liganden von NLRC5 schließen. Bisher konnten nur von einigen

wenigen Vertretern der NLR-Familie die Liganden beschrieben werden. Als Liganden wurden dabei verschiedene endo- sowie exogene Faktoren beschrieben. Da es sich bei NLRC5 um ein NLR mit möglichen antiviralen Eigenschaften handelt, könnte es sich bei dem unbekanntem Liganden um einen viralen Bestandteil oder um ein spezifisch nach einer viralen Infektion gebildetes DAMP handeln. Bisherige Versuche mit viralen Bestandteilen brachten bei der Suche nach einem Liganden keine Resultate. Ein weiterer Schwerpunkt zukünftiger Projekte sollte deshalb die Aufklärung der Identität des NLRC5-Liganden darstellen. Ein möglicher Ansatz dafür wäre das *Screening* einer Substanzbibliothek. Hierfür könnte man NLRC5-FLAG benutzen, und die Aktivierung des ISRE-Signalweg quantifizieren. Nähere Informationen über die Identität des Liganden würden bei einer eventuell späteren pharmakologischen Anwendung von Nutzen sein.

5.3.3 NLRC5 aktiviert antivirale Verteidigungsmechanismen

Eine weitere Bestätigung, dass NLRC5 eine Rolle bei der antiviralen Antwort der Zelle spielt, zeigten Experimente zum Phosphorylierungsstatus von STAT1. Künstlich aktiviertes und überexprimiertes NLRC5 führte zu einem höheren pSTAT1-Level in epithelialen Zellen, wobei es durch oligomerisiertes NLRC5 zu einer Verdoppelung des relativen pSTAT1-Levels kam. Über eine Zeitreihe war eine verstärkte pSTAT1-Bildung länger zu beobachten als in den Kontrollen. NLRC5 scheint bei der Reaktion als Verstärker zu fungieren, da es nur Einfluss auf die Phosphorylierung, aber nicht auf den Proteinlevel von STAT1 hatte. Dieses Ergebnis erklärt auch, warum NLRC5 keinen Einfluss auf eine eigene Regulation hatte. NLRC5 kann nur zu einer verstärkten Bildung von phosphoryliertem STAT1 beitragen. Es ist nicht in der Lage zu einer IFN- γ -unabhängigen Phosphorylierung von STAT1 zu führen und damit zytokinunabhängig die eigene Regulation zu beeinflussen.

Das NLRC5 nicht essentiell wichtig für eine Phosphorylierung von STAT1 ist, zeigten Experimente mit siRNA gegen *NLRC5*. Durch die Verwendung von siRNA kam es in HeLaS3 Zellen im Vergleich zu Kontroll-siRNA zu keinem veränderten pSTAT1- Level in den Zellen. Bisher konnte die Bedeutung von NLRC5 als Schutzmechanismus gegen virale Infektion nicht direkt gezeigt werden. NLRC5 bewirkt zwar eine verstärkte Phosphorylierung von STAT1, es bleibt aber zu klären wie essentiell diese gesteigerte Bildung für die epitheliale Barriere ist.

Ein weiterer wichtiger Punkt für weiterführende Analysen ist, wie es auf molekularer Ebene zu einer verstärkten Bildung von pSTAT1 durch NLRC5 kommt Die Regulation von pSTAT1

kann über einen direkten Kontakt zu NLRC5 geschehen, oder indirekt über eventuelle Adaptorproteine. So könnte die Suche nach einem Interaktionspartner z.B. mittels des in 5.2.3 erwähnten *yeast-two Hybrid* Verfahrens wichtige Informationen geben, wie diese Interaktion funktioniert.

Bisher sind neben NLRC5 bis jetzt nur NLRX1 und NALP3 als weitere NLR-Familienmitglieder mit einer viralen Immunantwort in Verbindung gebracht worden. Für die Mehrzahl der NLRs (z.B. NOD1, NOD2, NAIP) wurde eine Beteiligung an Verteidigungsmechanismen gegen pathogene Bakterien gezeigt (Inohara und Nunez 2001, Bonen et al. 2003, Chamaillard et al. 2003, Girardin et al. 2003a). NLRX1 interagiert mit dem *mitochondrial antiviral signalling adaptor* (MAVS) in der äußeren Membran von Mitochondrien und repräsentiert einen Kontrollmechanismus für eine mitochondriale antivirale Immunantwort (Moore et al. 2008). Die Aktivierung von MAVS führt zu einer schnellen Produktion von antiviralen Zytokinen wie z.B. Typ1 Interferone. Des Weiteren ist NLRX1 durch verschiedene pro-inflammatorische Stimuli mittels der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Lage, den NF- κ B- und den JNK-Signalweg zu initiieren (Tattoli et al. 2008). Neueste Untersuchungen zeigten ebenfalls eine spezifische Erkennung des Grippe-Virus durch Komponenten des ASC/NLRP3-Inflammasoms, wobei die genaue Funktion von NLRP3 in diesem Kontext noch nicht geklärt werden konnte (Ichinohe et al. 2009).

Für die Klärung, ob NLRC5 zusätzlich zu einer Aktivierung von ISRE- und GAS-regulatorischen Elementen beiträgt, wurde in diesem Zusammenhang exemplarisch die Genexpression einiger über ISRE-*consensus sites* regulierter potentieller Zielgene analysiert (Abb. 5-1). Überexprimiertes NLRC5 führte in epithelialen HeLaS3-Zellen zu einer verstärkten Expression der mRNAs von *IFN- α* , *OAS1* und *PRKRIR*. Für *PRKRIR* wurde die erhöhte Expression zusätzlich auf Proteinebene gezeigt. Keinen Einfluss hat NLRC5 auf die Transkription des NF- κ B-abhängigen Chemokins IL-8. Erstaunlicherweise zeigten HeLaS3-Zellen die mit siRNA gegen NLRC5 transfiziert wurden, einen signifikant geringeren Genexpressionslevel von *IFN- α* und *OAS1*. Die signifikante Herunterregulation von *OAS1* ist mit großer Wahrscheinlichkeit kein unspezifischer Effekt, da *OAS1* als antivirales Zielgen bekannt ist, welches als zelluläre Antwort auf virale Infektion normalerweise hochreguliert wird (Hovnanian et al. 1998). Aufgrund dieses Mechanismus wird *OAS1* häufig als Kontrollgen im Rahmen von siRNA-basierten Experimenten herangezogen. Die Expression von *PRKRIR* wurde nicht beeinträchtigt. Da NLRC5 anscheinend ein entscheidender Faktor bei der Genexpression von *IFN- α* und *OAS1* ist, scheint NLRC5 bereits vor einer

Virusinfektion von Bedeutung für die Zellen zu sein. Offenbar hält NLRC5 die Zellen in einem Grundverteidigungsstatus, entfaltet seine ganze Wirkung aber erst nach Aktivierung und bewirkt dann eine verstärkte Expression von antiviralen Zielgenen. Die einzelnen regulierten Gene, die bisher gezeigt werden konnten, sind dabei an verschiedenen antiviralen Prozessen beteiligt. IFN- α führt zur Bildung von antiviralen Proteinen sowie zu einem autokrinen Rückkopplungsmechanismus über den JAK/STAT-Signalweg. Durch ISGF3 vermittelt findet eine fortlaufende Expression von IFN- α statt (Platanias 2005). Des Weiteren werden die Nachbarzellen durch die Sekretion von IFN- α stimuliert, selber IFN- α und antivirale Proteine zu bilden. OAS-Proteine repräsentieren eine Gruppe von IFN-induzierbaren Enzymen, die eine Aktivierung der RNase L vermitteln, welche wiederum virale RNA degradiert. Das führt dazu, dass eine virale Replikation unterbunden wird (Sadler und Williams 2008). PRKRIR kodiert für ein Protein, welches zuerst als Regulator für P58(IPK) identifiziert wurde, ein zellulärer Inhibitor der RNA-abhängigen Protein Kinase (PKR) (Gale et al. 1998). PRKRIR wird u.a. direkt durch virale RNA aktiviert. Aktiviertes PRKRIR reguliert eine Vielzahl von Signalwegen über Mechanismen, die noch nicht alle verstanden sind. Eine wichtige Funktion ist die Inhibierung der Translation durch Phosphorylierung des eukaryontischen Initiationsfaktors eIF2 α (Sadler und Williams 2008). Da die hier dargestellten Zielgene nur exemplarische Vertreter aus dem gesamten NLRC5-spezifischen Targetgen-Profil darstellen, könnten zukünftige Studien sich mit der Charakterisierung des gesamten durch NLRC5 vermittelten Genexpressionsmusters beschäftigen. Hierfür könnte man z.B. die in dieser Arbeit beschriebene künstlich aktivierbare NLRC5 Chimäre benutzen, um mit Hilfe eines genomweiten Genexpressions-Arrays (z.B. Affymetrix GenChip-basiert) das gesamte Spektrum der über NLRC5 regulierten Transkripte aufzuklären. Da unsere bisherigen Experimente nicht ausschließen, dass neben den beschriebenen Signalwegen (GAS, ISRE) auch andere, hier nicht untersuchte Signalkaskaden über NLRC5 aktiviert werden, könnte sich durch die Interaktion dieser verschiedenen Signalwege ein völlig unerwartetes Genexpressionsprofil ergeben. Die hierdurch identifizierten Zielgene könnten dazu beitragen, nicht nur die NLRC5-vermittelten sondern allgemein durch NLRs vermittelten molekularen Signalprozesse besser verstehen zu lernen.

5.3.4 Hypothetisches Modell zur Wirkungsweise von NLRC5

Aus den bisher erhobenen Daten lässt sich das unten dargestellte Modell für die mögliche zelluläre Wirkungsweise von NLRC5 ableiten. Es zeigt NLRC5 als zentralen Baustein des

angeborenen Immunsystems und vereinigt die beobachteten Effekte bei sowohl viraler als auch bakterieller Infektion (Abb. 5-2).

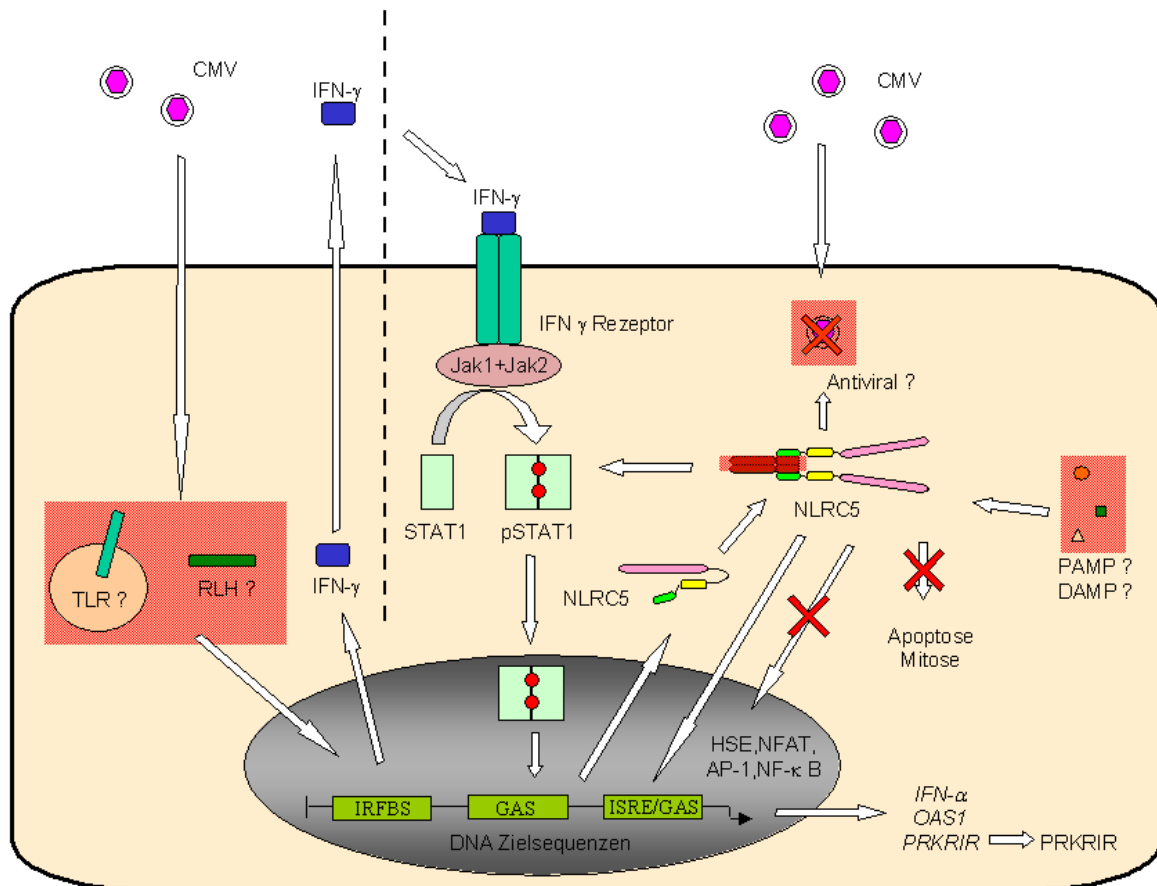


Abb. 5-2. Hypothetische Darstellung der Regulation und Wirkung von NLRC5.

Die rot umrandeten Felder zeigen die unbekannt Faktoren, die in dieser Arbeit nicht geklärt werden konnten. AP-1 - activator protein 1, CMV – Zytomegalievirus, DAMP - damage-associated-molecular-patterns, GAS - gamma-interferon activation sequence, HSE - heat shock element, IFN - Interferon, IRFBS – IFN-regulatory factor-binding site, ISRE - interferon-specific response element, JAK - Janus Kinase, NFAT - nuclear factor of activated T-cells, NF-κB - nuclear factor kappaB, NLRC5 - nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and CARD domain containing 5, OAS1 - 2',5'-Oligoadenylate Synthetase 1, PAMP - pathogen-associated molecular pattern, PRKRIR - repressor of protein kinase/interferon-inducible double stranded RNA-dependent inhibitor, RLH – retinoic acid inducible gene-1 (RIG-I)-like RNA Helikasen, STAT - signal transducer and activator of transcription, TLR - Toll-like Rezeptor

Nach einer viralen Infektion kommt es über TLRs oder RLH zu einer verstärkten Expression von IFN-γ. IFN-γ wird aus der Zelle sezerniert und bewirkt in einer autokrinen Regulation eine Aktivierung antiviralen Abwehrmechanismen. Einer dieser Abwehrreaktionen ist die verstärkte Expression von NLRC5 über STAT und NF-κB *transcription-binding-sites*. Das zytoplasmatisch lokalisierte NLRC5 erfüllt daraufhin in der Zelle verschiedene Funktionen. Zum einen bewirkt es über bisher unbekannte Mechanismen eine verstärkte und länger anhaltende Phosphorylierung von STAT1. Des weiteren kommt es zu einer verstärkten Expression von antiviralen Zielgenen wie *IFN-α*, *OAS1* und *PRKRIR* über *ISRE-binding sites*

in deren Promotoren. Inwiefern NLRC5 gegen Viren direkt wirken kann, ist bisher noch nicht geklärt.

5.4 Die Bedeutung von NLRC5 für die NOD2-abhängige Signaltransduktion und die epitheliale Barriere

5.4.1 Heterotypische Interaktion von NLRC5 und NOD2

Neueste Untersuchungen von NLR-Proteinen zeigten, dass es innerhalb der NLRs nicht nur zu heterotypischen NACHT-NACHT Interaktionen (Damiano et al. 2004) kommt, sondern dass die EBDs ebenfalls zu physischen Interaktionen zwischen einzelnen NLRs beitragen können (Hsu et al. 2008, Wagner et al. 2009). Damiano et al. beschrieb eine heterotypische Interaktion für NLRC4, welche über die NACHT-Domäne mit weiteren NLRs (NOD1, NOD2, NLRP1) interagiert. In diesem Zusammenhang zeigte sich eine negative Regulation der NOD1- und NOD2-vermittelten NF- κ B-Aktivierung und einer Reduktion der NLRC4-abhängigen IL-1 β -Sekretion. Neueste Untersuchungen anhand von *yeast-two Hybrid-Verfahren* zeigten, dass es aber auch zu einer EBD-vermittelten Interaktion zwischen verschiedenen NLRs kommen kann (Wagner et al. 2009). Bisher waren für die EBDs nur Interaktionen zu den jeweiligen Adaptorproteinen beschrieben (NOD1-RIP2 (Bertin et al. 1999, Inohara et al. 1999), NOD2-RIP2 (Ogura et al. 2001b), NLRC4-ASC (Geddes et al. 2001, Masumoto et al. 2003), NLRP3-ASC (Manji et al. 2002)). Die Experimente legen nahe, dass es zwischen NLRs zusätzlich zu der NACHT-NACHT-vermittelten Interaktion ebenfalls zu einer EBD-basierten Interaktion kommen kann (Wagner et al. 2009). Die Autoren zeigten, dass die EBD von NOD2 mit EBDs weiteren NLR-Familienmitgliedern (NLRP3 und NLRP12) interagiert. Eine dazu unabhängige Publikation zeigte zusätzlich eine EBD-vermittelte Interaktion zwischen NOD2 und NLRP1 (Hsu et al. 2008). Der NLR-Komplex aktivierte Caspase-1 in Anwesenheit von MDP.

Bei Interaktionsexperimenten mit verschiedenen NLR-Proteinen (NOD1, NOD2 und NLRC3) mit NLRC5 zeigte nur die Kombination von NOD2 mit NLRC5 eine verstärkte Aktivierung der spezifischen Signalwege. Bei einer Kotransfektion von NOD2 mit NLRC5 kam es zu einer verstärkten NOD2-abhängigen NF- κ B-Aktivierung und einer gesteigerten NLRC5-abhängigen ISRE-Aktivierung (Abb. 5-3). Immunoprecipitationsversuche zeigten, dass die Interaktion über die NACHT-Domäne reguliert wird. Die Ergebnisse werden analog durch die oben erwähnten Arbeiten von Damiano et al. und Wagner et al. bestätigt. Unklar ist bisher,

wie es zu dieser spezifischen Regulation der heterotypischen NACHT-Interaktion kommt. Stammbaumanalysen zeigten eine enge Verwandtschaft der NACHT-Domänen von NOD1 und NOD2 (Harton et al. 2002), wobei nur NOD2 mit NLRC5 zu einer verstärkten NOD2-abhängigen NF- κ B- und zu einer NLRC5-abhängige ISRE-Antwort führte.

Eine Koexpression von NOD2 und NLRC5 hatte nicht nur Einfluss auf die spezifisch regulierten Signalwege. Zusätzlich kam es zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *L. monocytogenes*. Durch die Interaktion der beiden NLR-Familienmitglieder zeigte sich eine Verstärkung des zytoprotektiven Effektes gegen invadierende Bakterien. Eine doppelte Funktion von NLRC5 hätte für den Organismus viele Vorteile, da schon seit längerem bekannt ist, dass eine Vireninfection von einer sekundären Bakterieninfektion begleitet werden kann (Hers et al. 1958, Lindsay et al. 1970). Da der Organismus aufgrund der viralen Infektion geschwächt ist, können Bakterien leichter in den Körper eindringen, sich vermehren und zu weiteren Krankheiten führen. Die Neuraminidasen des Virus begünstigen dabei eine spätere bakterielle Infektion (Peltola et al. 2005). Die viralen Neuraminidasen spalten Sialinsäurereste der Kohlenhydrate auf der Zelloberfläche und generieren dadurch mehr bakterielle Bindestellen. Virales Hämagglutinin, welches auf der Zelloberfläche von infizierten Zellen exprimiert wird, führt ebenfalls zu einer erhöhten Bindung von Bakterien (Okamoto et al. 2003). Im speziellen Fall von Influenza führt diese sekundäre Infektion im Durchschnitt bei 25% der Patienten zum Tod (Simonsen 1999). Zusätzlich konnte an mit *L. monocytogenes* infizierten Mäusen gezeigt werden, dass im Anfangsstadium der Infektion u.a. eine verstärkte mRNA-Expression von *IL-12* und *IFN- γ* (Iizawa et al. 1992, Xiong et al. 1994) stattfindet. Durch die Expression dieser beiden Zytokine bewirkt der Organismus in der frühen Phase der Infektion einen Schutz gegen Bakterien und Viren (Chen et al. 1989, Dunn und North 1991, Nakane et al. 1992). Daher könnte es für den Organismus vorteilhaft sein, wenn antiviral wirkende Proteine eine Doppelaufgabe erfüllen und auch an antibakteriellen Prozessen beteiligt sind.

Bisher ist nur für NOD2 bekannt, dass es nach einer Aktivierung zu Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden z.B. β -Defensinen (Voss et al. 2005) aber auch zur Induktion von direkten antimikrobiellen Prozessen kommt (Eitel et al. 2008). Für NLRC5 konnte in dieser Arbeit bisher keine Verbindung zu direkten antimikrobiellen Prozessen oder der Freisetzung antimikrobieller Faktoren gezeigt werden. Die Daten deuten darauf hin, dass es durch Aktivierung von NLRC5 zu einer Verstärkung eben dieser Schutzmechanismen kommen könnte. Es wird weiterhin zu klären sein, ob neben den bisher bekannten Effekten auch zusätzliche Wirkungsweisen von NLRs an der antimikrobiellen Aktivität beteiligt sind.

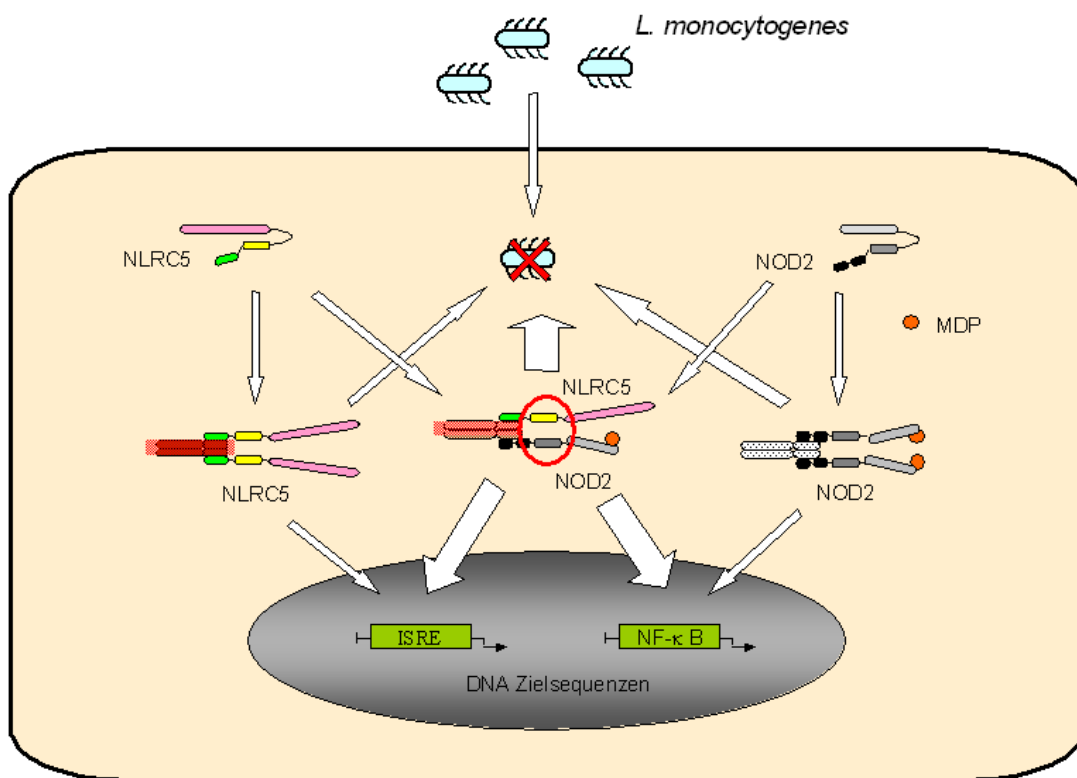


Abb. 5-3. Hypothetisches Modell der Interaktion von NLRC5 und NOD2 und dessen Einfluss auf bestimmte Signalwege.

Die Stärke der Pfeile gibt die Stärke des Signales wider. Der rote Kreis zeigt die interagierenden Domänen an. Das rot umrandete Feld zeigt den unbekannten Faktor, der in dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte. GAS - *gamma-interferon activation sequence*, ISRE - *interferon-specific response element*, NF-κB - *nuclear factor kappaB*, NLRC5 - *nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and CARD domain containing 5*, MDP – Muramyl-dipeptid, NOD2 - *nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*.

5.4.2 Bedeutung der heterotypischen NLR-Proteininteraktion

Die noch relativ wenig erforschten Interaktionen zwischen NLR-Proteinen scheint wichtiger und bedeutender für die Verteidigung gegen Pathogen zu sein als bisher angenommen. Ein gutes Beispiel dafür ist der in dieser Arbeit untersuchte NLR-Vertreter NLRC5. NLRC5 ist an der Regulation antiviraler Gene beteiligt. Durch eine Interaktion mit NOD2 kommt es zu einer verstärkten ISRE-abhängigen Genregulation. Durch die Interaktion der beiden NLR-Proteine könnte es zu einer gegenseitig verstärkten Genregulation kommen. Die Daten der vorliegenden Arbeit liefern einen ersten Hinweis, dass die Interaktion verschiedener NLR Familienmitglieder zu einer Diversifizierung und Modulation der einzelnen Signalkaskaden führen kann. Dadurch wäre, vergleichend zu den TLRs, trotz einer begrenzter Anzahl von Rezeptoren, das angeborene Immunsystem in der Lage einen auf die Situation abgestimmten Schutz zu vermitteln.

Diese und darauf aufbauende Untersuchungen werden nicht nur einen besseren Einblick auf die Funktionsweise von NLRC5 geben, sondern mit dazu beitragen, die Bedeutung der NLR-Proteinfamilie im Hinblick auf das angeborene Immunsystem besser zu verstehen.

6 *Ausblick*

NLRC5 scheint an der Erkennung und eventuell an der Abwehr von Viren beteiligt zu sein. Da die bisherigen Daten alle auf *in vitro* Experimenten basieren und eine Übertragung auf *in vivo* Zustände nicht ohne weiteres möglich ist, könnten v.a. weiterführende Experimente mit NLRC5 defizienten, sog. *Knockout* (KO)-Mäusen interessante Einblicke in die Rolle von NLRC5 *in vivo* erbringen. Während der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit einem kommerziellen Partner bereits die ersten Schritte zur Etablierung transgener *Nlrc5* KO-Mäuse durchgeführt. Die entsprechenden Tiere werden derzeit im lokalen Tierhaus expandiert und für Experimente vorbereitet. Sollte sich herausstellen, daß der konventionelle *Knockout* von *Nlrc5* zu erhöhter Letalität der Mauslinien beiträgt, würde es sich anbieten, als alternative Strategie einen konditionalen *Knockout* zu etablieren. Beim konventionellen *Knockout* wird ein essentielles Gensegment durch gezielte Insertion permanent zerstört. Das inaktivierte Gen wird in die Keimbahn eingebracht, woraufhin dessen Funktion durchgehend in allen Geweben verloren geht. Im Gegensatz hierzu wird beim konditionalen *Knockout* nur in einem bestimmten Gewebe- bzw. Zelltyp inaktiviert. Hierbei wird eine Cre- Rekombinase verwendet, die unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors (z.B. Villin für das intestinale System) steht. Mit diesem System ist es möglich die Genregulation unter örtliche und/oder zeitliche Kontrolle zu stellen.

In der Arbeit zeigte sich eine funktionelle und physische Interaktion von NLRC5 und NOD2. Bisher konnte die Bedeutung der Interaktion verschiedener NLRs nur mit Hilfe von *in vitro* Experimenten gezeigt werden. Durch die Verwendung von Doppel- oder Trippel-*Knockout*-Tieren wäre es möglich, den Einfluss von NLRC5 und weiteren NLRs für das angeborene Immunsystem besser zu verstehen.

Mittels dieser Methode lassen sich neue zukünftige Untersuchungen ableiten, die zu einem besseren Verständnis der NLR-Familie beitragen können.

Im Speziellen könnten sich mit Hilfe dieser Ansatz folgende Fragen beantworten lassen:

- Wie wichtig ist NLRC5 für die epitheliale Barriere insbesondere im Gehirn und Lungenbereich?
 - Welche Bedeutung hat NLRC5 für die epitheliale Barriere bei Viren- und/oder Bakterieninfektionen?

- Kann NLRC5 einer verstärkten Ausprägung von Krankheiten im Bereich der Lungen- und Atemwege entgegenwirken?
- Wie wichtig ist für das angeborene Immunsystem die Interaktion verschiedene NLRs in Bezug auf die epitheliale Abwehr?
 - Führt eine Interaktion verschiedener NLRs zu einem besseren Schutz gegen invadierende Pathogene?
 - Welche Bedeutung hat eine Interaktion auf eine Ausprägung von chronischen Erkrankungen?

Die molekulare Charakterisierung von NLRC5 und seiner Rolle bei viralen und bakteriellen Infektionsgeschehen könnte wichtige Hinweise geben, welche Bedeutung die NLRs für das angeborene Immunsystem haben. Zusätzlich könnte das bessere Verständnis in Zukunft neue interessante Therapie-Strategien oder Ansatzpunkte für Frühdiagnose und Therapie von Infektionskrankheiten liefern.

7 Zusammenfassung

NOD-like Rezeptoren (NLR) repräsentieren eine Gruppe von intrazellulären Sensor-Proteinen des angeborenen Immunsystems, die pathogen-assoziierte Moleküle (PAMPs) oder andere zytosolische Gefahrensignale (DAMPs) erkennen. Ihre essentielle Rolle für die Verteidigung gegen Pathogene wird dadurch unterstrichen, dass Mutationen in den NLR-Genen mit einer großen Bandbreite von entzündlichen Krankheiten assoziiert wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde die genomische Organisation, die Regulation und Funktionsweise des NLR-Familienmitglieds NLRC5 untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass NLRC5 an antiviralen Signalprozessen beteiligt ist. Nach einer viralen Infektion kommt es zu einer erhöhten Expression von IFN- γ , was durch autokrine Mechanismen zu einer erhöhten Expression von NLRC5 führt. An dieser transkriptionellen Kontrolle sind Komponenten der *gamma-interferon activation sequence* (GAS) Signalkaskaden beteiligt. Künstlich aktiviertes NLRC5 bewirkt die Aktivierung von zwei bisher nicht mit NLR-Proteinen assoziierten Signalwegen. Die Aktivierung von *interferon-specific response element* (ISRE)- und GAS-Promotorelementen führt zu einer gesteigerten Expression von antiviralen Zielgenen (*IFN- α* , *OAS1*, *PRKRIR*). Zusätzlich führte Überexpression oder künstliche Oligomerisierung von NLRC5 zu einer verstärkten und über einen längeren Zeitraum andauernden Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT1, der an der Vermittlung von antiviralen Prozessen beteiligt ist. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass NLRC5 einen wichtigen molekularen Schalter des GAS/ISRE-Signalwegs repräsentiert, der dazu beiträgt, antivirale Verteidigungsmechanismen zu aktivieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zusätzlich eine bisher nicht beschriebene Interaktion zwischen zwei NLR-Mitgliedern. Durch homophile NACHT-NACHT – Interaktion zwischen NLRC5 und NOD2 kommt es zu einer verstärkten NOD2-abhängigen NF- κ B- und NLRC5-vermittelten ISRE-Aktivierung. Koexpression beider Proteine vermittelt außerdem einen erhöhten Schutz gegen bakterielle Zytotoxikose im *Listeria monocytogenes* – Infektionsmodell.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die protektiven Eigenschaften von NLR-Proteinen innerhalb des angeborenen Immunsystems und die damit verbundenen aktivierten Signalkaskaden weit vielfältiger sind als bisher angenommen. Die Interaktion zwischen den

verschiedenen NLR-Familienmitgliedern scheint dabei ein nicht zu unterschätzender Faktor zu sein, der in Zukunft stärker beachtet werden sollte.

8 Abstract

NOD-like receptors (NLRs) represent a group of intracellular proteins of the innate immune system which recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or other cytosolic danger signals (DAMPs). Mutations in NLR genes have been linked to a variety of inflammatory diseases underscoring their pivotal role in host defense and immunity. This work describes the genomic organisation and regulation of the human NLR-family member NLRC5. The results show that NLRC5 is involved in antiviral signal processes. Viral infection induced an increased expression of IFN- γ , and led through an autocrine mechanism, to an enhanced expression of *NLRC5*. The transcription is regulated by components of the gamma-interferon activation sequence (GAS) cascade. Artificial oligomerisation of NLRC5 lead to an activation of two new signal transduction pathways, which were until now not associated with NLR proteins. The activation of interferon-specific response element (ISRE)- and GAS-promotor elements resulted in an enhanced expression of antiviral target genes (*IFN- α* , *OAS1*, *PRKRIR*). Additionally, overexpression or enforced oligomerisation of NLRC5 led to an increase in phosphorylation of the transcription factor STAT1, which is involved in antiviral processes. The results indicate that NLRC5 represents an important molecular regulator for the GAS/ISRE-pathway and helps to activate antiviral defense programmes.

Furthermore, the results show a new interaction between two members of the NLR-family. The homophilia NACHT-NACHT – interaction between NLRC5 and NOD2 induce an increased NOD2-dependent NF- κ B- and NLRC5-mediated ISRE-activation. Co-expression of both proteins mediated an increased protection against the cytoinvasive bacteria *Listeria monocytogenes*.

The results suggest that the protective properties of NLR-proteins for the innate immunity with the associated signal cascades are multifaceted. They also underpin the importance of understanding the interactions between different NLR-family members in immune response to infections and highlight the need in future investigations.

9 Literaturverzeichnis

- Aaronson, D. S. and Horvath, C. M. (2002). "A road map for those who don't know JAK-STAT." Science **296**(5573): 1653-5.
- Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J. and Ram, S. J. (2004). "Image Processing with ImageJ." Biophotonics International **11**(7): 36-42.
- Akira, S., Takeda, K. and Kaisho, T. (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." Nat Immunol **2**(8): 675-80.
- Albrecht, M., Domingues, F. S., Schreiber, S. and Lengauer, T. (2003). "Identification of mammalian orthologs associates PYPAF5 with distinct functional roles." FEBS Lett **538**(1-3): 173-7.
- Albrecht, M. and Takken, F. L. W. (2006). "Update on the domain architectures of NLRs and R proteins." Biochemical and Biophysical Research Communications **339**(2): 459-462.
- Bach, E. A., Aguet, M. and Schreiber, R. D. (1997). "The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling." Annu Rev Immunol **15**: 563-91.
- Baeuerle, P. A. and Baltimore, D. (1988). "I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor." Science **242**(4878): 540-6.
- Benedict, M. A., Hu, Y., Inohara, N. and Nunez, G. (2000). "Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9." J Biol Chem **275**(12): 8461-8.
- Benko, S., Philpott, D. J. and Girardin, S. E. (2008). "The microbial and danger signals that activate Nod-like receptors." Cytokine **43**(3): 368-73.
- Bent, A. F., Kunkel, B. N., Dahlbeck, D., Brown, K. L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J. and Staskawicz, B. J. (1994). "RPS2 of Arabidopsis thaliana: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes." Science **265**(5180): 1856-60.
- Bertin, J., Nir, W. J., Fischer, C. M., Tayber, O. V., Errada, P. R., Grant, J. R., Keilty, J. J., Gosselin, M. L., Robison, K. E., Wong, G. H., Glucksmann, M. A. and DiStefano, P. S. (1999). "Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB." J Biol Chem **274**(19): 12955-8.
- Beutler, B. (2000). "Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor." Curr Opin Immunol **12**(1): 20-6.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.

- Bonen, D. K., Ogura, Y., Nicolae, D. L., Inohara, N., Saab, L., Tanabe, T., Chen, F. F., Foster, S. J., Duerr, R. H., Brant, S. R., Cho, J. H. and Nunez, G. (2003). "Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan." Gastroenterology **124**(1): 140-6.
- Bonizzi, G. and Karin, M. (2004). "The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity." Trends Immunol **25**(6): 280-8.
- Bouchier-Hayes, L. and Martin, S. J. (2002). "CARD games in apoptosis and immunity." EMBO **3**(7): 616-621.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A.-L. and Iggo, R. D. (2003). "Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells." Nat Genet. **34**(3): 263-4.
- Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol **25**(2): 169-93.
- Carneiro, L. A., Travassos, L. H. and Philpott, D. J. (2004). "Innate immune recognition of microbes through Nod1 and Nod2: implications for disease." Microbes Infect **6**(6): 609-16.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M. A., Foster, S. J., Mak, T. W., Nunez, G. and Inohara, N. (2003). "An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid." Nat Immunol **4**(7): 702-7. Epub 2003 Jun 6.
- Chen, G., Shaw, M. H., Kim, Y. G. and Nunez, G. (2008). "Nod-like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease." Annu Rev Pathol.**4**: 365-98
- Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, J. E., Jr. and Kuriyan, J. (1998). "Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA." Cell **93**(5): 827-39.
- Chen, Y., Nakane, A. and Minagawa, T. (1989). "Recombinant murine gamma interferon induces enhanced resistance to *Listeria monocytogenes* infection in neonatal mice." Infect Immun **57**(8): 2345-9.

- Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J. and Gusovsky, F. (1999). "Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction." J Biol Chem **274**(16): 10689-92.
- Coligan, J. E., Dunn, B., Ploegh, H. L., Speicher, D. W. and Wingfield, P. T. (1995). "Current protocols in Protein Science." John Wiley & Sons Inc **1**.
- Damiano, J. S., Oliveira, V., Welsh, K. and Reed, J. C. (2004). "Heterotypic interactions among NACHT domains: implications for regulation of innate immune responses." Biochem J **381**(Pt 1): 213-9.
- D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N. M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., Chan, S. H., Kobayashi, M., Young, D., Nickbarg, E. and et al. (1992). "Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells." J Exp Med **176**(5): 1387-98.
- Dausset, J., Cann, H., Cohen, D., Lathrop, M., Lalouel, J. M. and White, R. (1990). "Centre d'etude du polymorphisme humain (CEPH): collaborative genetic mapping of the human genome." Genomics **6**(3): 575-7.
- Davidson, J., Milton, A. S. and Rotondo, D. (1990). "A study of the pyrogenic actions of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta: interactions with a steroidal and a non-steroidal anti-inflammatory agent." Br J Pharmacol **100**(3): 542-6.
- Decker, T., Lew, D. J., Mirkovitch, J. and Darnell, J. E. (1991). "Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor." EMBO J. **10**(4): 927-32.
- Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B. T. and Tschopp, J. (2008). "Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica." Science **320**(5876): 674-7.
- Dubreix-Daloz, L., Dupoux, A. and Cartier, J. (2008). "IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins." Cell Cycle **7**(8): 1036-46.
- Dunn, P. L. and North, R. J. (1991). "Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis." Infect Immun **59**(9): 2892-900.
- Ehret, G. B., Reichenbach, P., Schindler, U., Horvath, C. M., Fritz, S., Nabholz, M. and Bucher, P. (2001). "DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites." J Biol Chem **276**(9): 6675-88.
- Eitel, J., Krull, M., Hocke, A. C., N'Guessan, P. D., Zahlten, J., Schmeck, B., Slevogt, H., Hippenstiel, S., Suttorp, N. and Opitz, B. (2008). "Beta-PIX and Rac1 GTPase mediate trafficking and negative regulation of NOD2." J Immunol **181**(4): 2664-71.

- Enkhbayar, P., Kamiya, M., Osaki, M., Matsumoto, T. and Matsushima, N. (2004). "Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins." Proteins **54**(3): 394-403.
- Faustin, B. and Reed, J. C. (2008). "Sunburned skin activates inflammasomes." Trends Cell Biol **18**(1): 4-8.
- Ferwerda, G., Girardin, S. E., Kullberg, B. J., Le Bourhis, L., de Jong, D. J., Langenberg, D. M., van Crevel, R., Adema, G. J., Ottenhoff, T. H., Van der Meer, J. W. and Netea, M. G. (2005). "NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of Mycobacterium tuberculosis." PLoS Pathog **1**(3): 279-85.
- Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T. D., Ozoren, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E. P. and Nunez, G. (2006). "Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages." Nat Immunol **7**(6): 576-82.
- Franchi, L., Kanneganti, T. D., Dubyak, G. R. and Nunez, G. (2007). "Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K⁺ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria." J Biol Chem **282**(26): 18810-8.
- Gabay, C. and Kushner, I. (1999). "Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation." N Engl J Med **340**(6): 448-54.
- Gale, M., Jr., Blakely, C. M., Hopkins, D. A., Melville, M. W., Wambach, M., Romano, P. R. and Katze, M. G. (1998). "Regulation of interferon-induced protein kinase PKR: modulation of P58IPK inhibitory function by a novel protein, P52rIPK." Mol Cell Biol **18**(2): 859-71.
- Geddes, B. J., Wang, L., Huang, W. J., Lavellee, M., Manji, G. A., Brown, M., Jurman, M., Cao, J., Morgenstern, J., Merriam, S., Glucksmann, M. A., DiStefano, P. S. and Bertin, J. (2001). "Human CARD12 is a novel CED4/Apaf-1 family member that induces apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **284**(1): 77-82.
- Ghosh, S. and Karin, M. (2002). "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle." Cell **109** **Suppl**: S81-96.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M. K., Labigne, A., Zahringer, U., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Bertin, J., Sansonetti, P. J. and Philpott, D. J. (2003a). "Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan." Science **300**(5625): 1584-7.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J. and Sansonetti, P. J. (2003b). "Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection." J Biol Chem **278**(11): 8869-72.

- Girardin, S. E., Jehanno, M., Mengin-Lecreux, D., Sansonetti, P. J., Alzari, P. M. and Philpott, D. J. (2005). "Identification of the critical residues involved in peptidoglycan detection by Nod1." J Biol Chem **280**(46): 38648-56.
- Girardin, S. E., Tournebize, R., Mavris, M., Page, A. L., Li, X., Stark, G. R., Bertin, J., DiStefano, P. S., Yaniv, M., Sansonetti, P. J. and Philpott, D. J. (2001). "CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*." EMBO Rep **2**(8): 736-42. Epub 2001 Jul 19.
- Goodbourn, S., Didcock, L. and Randall, R. E. (2000). "Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures." J Gen Virol **81**(Pt 10): 2341-64.
- Goriely, S., Neurath, M. F. and Goldman, M. (2008). "How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members." Nat Rev Immunol **8**(1): 81-6.
- Hajjar, A. M., O'Mahony, D. S., Ozinsky, A., Underhill, D. M., Aderem, A., Klebanoff, S. J. and Wilson, C. B. (2001). "Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin." J Immunol **166**(1): 15-9.
- Hampe, J., Cuthbert, A., Croucher, P. J., Mirza, M. M., Mascheretti, S., Fisher, S., Frenzel, H., King, K., Hasselmeier, A., MacPherson, A. J., Bridger, S., van Deventer, S., Forbes, A., Nikolaus, S., Lennard-Jones, J. E., Foelsch, U. R., Krawczak, M., Lewis, C., Schreiber, S. and Mathew, C. G. (2001). "Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations." Lancet **357**(9272): 1925-8.
- Haque, S. J. and Williams, B. R. (1998). "Signal transduction in the interferon system." Semin Oncol **25**(1 Suppl 1): 14-22.
- Harada, H., Matsumoto, M., Sato, M., Kashiwazaki, Y., Kimura, T., Kitagawa, M., Yokochi, T., Tan, R. S., Takasugi, T., Kadokawa, Y., Schindler, C., Schreiber, R. D., Noguchi, S. and Taniguchi, T. (1996). "Regulation of IFN-alpha/beta genes: evidence for a dual function of the transcription factor complex ISGF3 in the production and action of IFN-alpha/beta." Genes Cells **1**(11): 995-1005.
- Harton, J. A., Linhoff, M. W., Zhang, J. and Ting, J. P.-Y. (2002). "Cutting Edge: CATERPILLER: A Large Family of Mammalian Genes Containing CARD, Pyrin, Nucleotide-Binding, and Leucine-Rich Repeat Domains." J Immunol **169**(8): 4088-4093.

- Harwani, S. C., Lurain, N. S., Zariffard, M. R. and Spear, G. T. (2007). "Differential inhibition of human cytomegalovirus (HCMV) by toll-like receptor ligands mediated by interferon-beta in human foreskin fibroblasts and cervical tissue." *Virology* **4**: 133.
- Hasegawa, M., Yang, K., Hashimoto, M., Park, J. H., Kim, Y. G., Fujimoto, Y., Nunez, G., Fukase, K. and Inohara, N. (2006). "Differential release and distribution of Nod1 and Nod2 immunostimulatory molecules among bacterial species and environments." *J Biol Chem* **281**(39): 29054-63.
- Hayden, M. S., West, A. P. and Ghosh, S. (2006). "NF-kappaB and the immune response." *Oncogene* **25**(51): 6758-80.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." *Nature* **408**(6813): 740-5.
- Hers, J. F., Masurel, N. and Mulder, J. (1958). "Bacteriology and histopathology of the respiratory tract and lungs in fatal Asian influenza." *Lancet* **2**(7057): 1141-3.
- Hiller, S., Kohl, A., Fiorito, F., Herrmann, T., Wider, G., Tschopp, J., Grutter, M. G. and Wuthrich, K. (2003). "NMR structure of the apoptosis- and inflammation-related NALP1 pyrin domain." *Structure* **11**(10): 1199-205.
- Hisamatsu, T., Suzuki, M. and Podolsky, D. K. (2003a). "Interferon-gamma augments CARD4/NOD1 gene and protein expression through interferon regulatory factor-1 in intestinal epithelial cells." *J Biol Chem* **278**(35): 32962-8.
- Hisamatsu, T., Suzuki, M., Reinecker, H. C., Nadeau, W. J., McCormick, B. A. and Podolsky, D. K. (2003b). "CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells." *Gastroenterology* **124**(4): 993-1000.
- Hobom, U., Brune, W., Messerle, M., Hahn, G. and Koszinowski, U. H. (2000). "Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes." *J Virol* **74**(17): 7720-9.
- Hoffman, H. M., Mueller, J. L., Broide, D. H., Wanderer, A. A. and Kolodner, R. D. (2001). "Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome." *Nat Genet* **29**(3): 301-5.
- Hofmann, K., Bucher, P. and Tschopp, J. (1997). "The CARD domain: a new apoptotic signalling motif." *Trends Biochem Sci* **22**(5): 155-6.
- Honda, K. and Taniguchi, T. (2006). "IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors." *Nat Rev Immunol* **6**(9): 644-58.

- Hovnanian, A., Rebouillat, D., Mattei, M. G., Levy, E. R., Marie, I., Monaco, A. P. and Hovanessian, A. G. (1998). "The human 2',5'-oligoadenylate synthetase locus is composed of three distinct genes clustered on chromosome 12q24.2 encoding the 100-, 69-, and 40-kDa forms." Genomics **52**(3): 267-77.
- Hsu, L. C., Ali, S. R., McGillivray, S., Tseng, P. H., Mariathasan, S., Humke, E. W., Eckmann, L., Powell, J. J., Nizet, V., Dixit, V. M. and Karin, M. (2008). "A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to Bacillus anthracis infection and muramyl dipeptide." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(22): 7803-8.
- Hugot, J.-P., Mathias, C., Habib, Z., Suzanne, L., Jean-Pierre, C., Jacques, B., Sven, A., Curt, T., A., O. M. C., Miquel, G., Vibeke, B., Yigael, F., Antoine, C., Robert, M., Pierre, L.-P., Corine, G.-R., Jeanne, M., Jean-Frederic, C., Mourad, S. and Gilles, T. (2001). "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease." Nature **411**(6837): 599-603.
- Ichinohe, T., Lee, H. K., Ogura, Y., Flavell, R. and Iwasaki, A. (2009). "Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses." J Exp Med **206**(1): 79-87.
- Iizawa, Y., Brown, J. F. and Czuprynski, C. J. (1992). "Early expression of cytokine mRNA in mice infected with Listeria monocytogenes." Infect Immun **60**(10): 4068-73.
- Inohara, N., del Peso, L., Koseki, T., Chen, S. and Nunez, G. (1998). "RICK, a novel protein kinase containing a caspase recruitment domain, interacts with CLARP and regulates CD95-mediated apoptosis." J Biol Chem **273**(20): 12296-300.
- Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J. and Nunez, G. (1999). "Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB." J Biol Chem **274**(21): 14560-7.
- Inohara, N., Koseki, T., Lin, J., del Peso, L., Lucas, P. C., Chen, F. F., Ogura, Y. and Nunez, G. (2000). "An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways." J Biol Chem **275**(36): 27823-31.
- Inohara, N. and Nunez, G. (2001). "The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens." Oncogene **20**(44): 6473-81.
- Inohara, N. and Nunez, G. (2003). "NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis." Nat Rev Immunol **3**(5): 371-82.
- Inohara, N., Ogura, Y. and Nunez, G. (2002). "Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens." Curr Opin Microbiol **5**(1): 76-80.

- Into, T., Kiura, K., Yasuda, M., Kataoka, H., Inoue, N., Hasebe, A., Takeda, K., Akira, S. and Shibata, K. (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.
- Iyer, L. M., Leipe, D. D., Koonin, E. V. and Aravind, L. (2004). "Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases." J Struct Biol **146**(1-2): 11-31.
- Kabesch, M., Peters, W., Carr, D., Leupold, W., Weiland, S. K. and von Mutius, E. (2003). "Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations." J Allergy Clin Immunol **111**(4): 813-7.
- Kaiser, V. and Diamond, G. (2000). "Expression of mammalian defensin genes." J Leukoc Biol **68**(6): 779-84.
- Kanazawa, N., Okafuji, I., Kambe, N., Nishikomori, R., Nakata-Hizume, M., Nagai, S., Fuji, A., Yuasa, T., Manki, A., Sakurai, Y., Nakajima, M., Kobayashi, H., Fujiwara, I., Tsutsumi, H., Utani, A., Nishigori, C., Heike, T., Nakahata, T. and Miyachi, Y. (2005). "Early-onset sarcoidosis and CARD15 mutations with constitutive nuclear factor-kappaB activation: common genetic etiology with Blau syndrome." Blood **105**(3): 1195-7.
- Kang, D. C., Gopalkrishnan, R. V., Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A. M. and Fisher, P. B. (2002). "mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 637-42.
- Kanneganti, T. D., Ozoren, N., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J. H., Franchi, L., Whitfield, J., Barchet, W., Colonna, M., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E. P., Akira, S. and Nunez, G. (2006). "Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3." Nature **440**(7081): 233-6.
- Karlin, S., Doerfler, W. and Cardon, L. R. (1994). "Why is CpG suppressed in the genomes of virtually all small eukaryotic viruses but not in those of large eukaryotic viruses?" J Virol **68**(5): 2889-97.
- Katze, M. G., Fornek, J. L., Palermo, R. E., Walters, K. A. and Korth, M. J. (2008). "Innate immune modulation by RNA viruses: emerging insights from functional genomics." Nat Rev Immunol **8**(8): 644-54.
- Kawai, T. and Akira, S. (2006). "Innate immune recognition of viral infection." Nat Immunol **7**(2): 131-7.

- Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Nunez, G., Janeway, C. A., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. (2002). "RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems." Nature **416**(6877): 194-9.
- Kobayashi, K. S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G. and Flavell, R. A. (2005). "Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract." Science **307**(5710): 731-4.
- Koonin, E. V. and Aravind, L. (2000). "The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation." Trends Biochem Sci **25**(5): 223-4.
- Koseki, T., Inohara, N., Chen, S. and Nunez, G. (1998). "ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5156-60.
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A. and Klinman, D. M. (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." Nature **374**(6522): 546-9.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Leipe, D. D., Koonin, E. V. and Aravind, L. (2004). "STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer." J Mol Biol **343**(1): 1-28.
- Levy, D. E. and Garcia-Sastre, A. (2001). "The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion." Cytokine Growth Factor Rev **12**(2-3): 143-56.
- Li, J., Moran, T., Swanson, E., Julian, C., Harris, J., Bonen, D. K., Hedl, M., Nicolae, D. L., Abraham, C. and Cho, J. H. (2004). "Regulation of IL-8 and IL-1beta expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations." Hum Mol Genet **13**(16): 1715-25. Epub 2004 Jun 15.
- Lindsay, M. I., Jr., Herrmann, E. C., Jr., Morrow, G. W., Jr. and Brown, A. L., Jr. (1970). "Hong Kong influenza: clinical, microbiologic, and pathologic features in 127 cases." Jama **214**(10): 1825-32.
- Lipinski, S, Till, A., Sina C., Grasberger H., Schreiber S. and Rosenstiel P. (2009). "DUOX2-derived reactive oxygen species are effectors of NOD2-mediated antibacterial responses." in revision, JCS **122**: 3522-30

- Malone, C. L., Vesole, D. H. and Stinski, M. F. (1990). "Transactivation of a human cytomegalovirus early promoter by gene products from the immediate-early gene IE2 and augmentation by IE1: mutational analysis of the viral proteins." J Virol **64**(4): 1498-506.
- Manji, G. A., Wang, L., Geddes, B. J., Brown, M., Merriam, S., Al-Garawi, A., Mak, S., Lora, J. M., Briskin, M., Jurman, M., Cao, J., DiStefano, P. S. and Bertin, J. (2002). "PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B." J Biol Chem **277**(13): 11570-5. Epub 2002 Jan 10.
- Martinon, F., Burns, K. and Tschopp, J. (2002). "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta." Mol Cell **10**(2): 417-26.
- Martinon, F., Hofmann, K. and Tschopp, J. (2001). "The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation." Curr Biol **11**(4): R118-20.
- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. and Tschopp, J. (2006). "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." Nature **440**(7081): 237-41.
- Martinon, F. and Tschopp, J. (2007). "Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation." Cell Death Differ **14**(1): 10-22.
- Masumoto, J., Dowds, T. A., Schaner, P., Chen, F. F., Ogura, Y., Li, M., Zhu, L., Katsuyama, T., Sagara, J., Taniguchi, S., Gumucio, D. L., Nunez, G. and Inohara, N. (2003). "ASC is an activating adaptor for NF-kappa B and caspase-8-dependent apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **303**(1): 69-73.
- Masumoto, J., Taniguchi, S., Ayukawa, K., Sarvotham, H., Kishino, T., Niikawa, N., Hidaka, E., Katsuyama, T., Higuchi, T. and Sagara, J. (1999). "ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells." J Biol Chem **274**(48): 33835-8.
- Mathews, R. J., Sprakes, M. B. and McDermott, M. F. (2008). "NOD-like receptors and inflammation." Arthritis Res Ther **10**(6): 228.
- McCarthy, J. V., Ni, J. and Dixit, V. M. (1998). "RIP2 is a novel NF-kappaB-activating and cell death-inducing kinase." J Biol Chem **273**(27): 16968-75.
- McDonald, C., Chen, F. F., Ollendorff, V., Ogura, Y., Marchetto, S., Lecine, P., Borg, J. P. and Nunez, G. (2005). "A role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling." J Biol Chem **280**(48): 40301-9.

- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**(2): 135-45.
- Meylan, E. and Tschopp, J. (2006). "Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses." Mol Cell **22**(5): 561-9.
- Miao, E. A., Alpujch-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I. and Aderem, A. (2006). "Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf." Nat Immunol **7**(6): 569-75.
- Molofsky, A. B., Byrne, B. G., Whitfield, N. N., Madigan, C. A., Fuse, E. T., Tateda, K. and Swanson, M. S. (2006). "Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts Legionella pneumophila infection 10.1084/jem.20051659." J. Exp. Med. **203**(4): 1093-1104.
- Monteleone, I., Vavassori, P., Biancone, L., Monteleone, G. and Pallone, F. (2002). "Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease." Gut **50 Suppl 3**: III60-4.
- Moore, C. B., Bergstralh, D. T., Duncan, J. A., Lei, Y., Morrison, T. E., Zimmermann, A. G., Accavitti-Loper, M. A., Madden, V. J., Sun, L., Ye, Z., Lich, J. D., Heise, M. T., Chen, Z. and Ting, J. P. (2008). "NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity." Nature **451**(7178): 573-7.
- Moynagh, P. N. (2005). "TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway." Trends Immunol **26**(9): 469-76.
- Muller, A., Trabant, A., Gloeckner-Hofmann, K., Seitzer, U., Csernok, E., Schonermarck, U., Feller, A. C. and Gross, W. L. (2000). "Localized Wegener's granulomatosis: predominance of CD26 and IFN-gamma expression." J Pathol **192**(1): 113-20.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-50.
- Nakane, A., Numata, A. and Minagawa, T. (1992). "Endogenous tumor necrosis factor, interleukin-6, and gamma interferon levels during Listeria monocytogenes infection in mice." Infect Immun **60**(2): 523-8.
- Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nunez, G. and Cho, J. H. (2001a). "A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease." Nature **411**(6837): 603-6.

- Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F. F., Yamaoka, S. and Nunez, G. (2001b). "Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB." J Biol Chem **276**(7): 4812-8.
- Okamoto, S., Kawabata, S., Nakagawa, I., Okuno, Y., Goto, T., Sano, K. and Hamada, S. (2003). "Influenza A virus-infected hosts boost an invasive type of Streptococcus pyogenes infection in mice." J Virol **77**(7): 4104-12.
- Ong, E. K., Suphioglu, C., Singh, M. B. and Knox, R. B. (1990). "Immunodetection methods for grass pollen allergens on western blots." Int Arch Allergy Appl Immunol **93**(4): 338-43.
- Opitz, B., Vinzing, M., van Laak, V., Schmeck, B., Heine, G., Gunther, S., Preissner, R., Slevogt, H., Dje N'Guessan, P., Eitel, J., Goldmann, T., Flieger, A., Suttorp, N. and Hippenstiel, S. (2006). "Legionella pneumophila induced IFN β in lung epithelial cells via IPS-1 and IRF3 which also control bacterial replication." JBC.
- Peltola, V. T., Murti, K. G. and McCullers, J. A. (2005). "Influenza virus neuraminidase contributes to secondary bacterial pneumonia." J Infect Dis **192**(2): 249-57.
- Persengiev, S. P., Zhu, X. and Green, M. R. (2004). "Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs)." Rna **10**(1): 12-8.
- Pestka, S., Kotenko, S. V., Muthukumaran, G., Izotova, L. S., Cook, J. R. and Garotta, G. (1997). "The interferon gamma (IFN-gamma) receptor: a paradigm for the multichain cytokine receptor." Cytokine Growth Factor Rev **8**(3): 189-206.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Phizicky, E. M. and Fields, S. (1995). "Protein-protein interactions: methods for detection and analysis." Microbiol Rev **59**(1): 94-123.
- Pils, S., Schmitter, T., Neske, F. and Hauck, C. R. (2006). "Quantification of bacterial invasion into adherent cells by flow cytometry." J Microbiol Methods **65**(2): 301-10.
- Pizzorno, M. C., O'Hare, P., Sha, L., LaFemina, R. L. and Hayward, G. S. (1988). "trans-activation and autoregulation of gene expression by the immediate-early region 2 gene products of human cytomegalovirus." J Virol **62**(4): 1167-79.
- Platanias, L. C. (2005). "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling." Nat Rev Immunol **5**(5): 375-86.

- Poyet, J. L., Srinivasula, S. M., Tnani, M., Razmara, M., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E. S. (2001). "Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1." J Biol Chem **276**(30): 28309-13.
- Proell, M., Riedl, S. J., Fritz, J. H., Rojas, A. M. and Schwarzenbacher, R. (2008). "The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences." PLoS ONE **3**(4): e2119.
- Rasband, W. S. (1997-2005). "ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>."
- Rast, J. P., Smith, L. C., Loza-Coll, M., Hibino, T. and Litman, G. W. (2006). "Genomic insights into the immune system of the sea urchin." Science **314**(5801): 952-6.
- Ren, T., Zamboni, D. S., Roy, C. R., Dietrich, W. F. and Vance, R. E. (2006). "Flagellin-deficient Legionella mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity." PLoS Pathog **2**(3): 175-83.
- Riedl, S. J., Li, W., Chao, Y., Schwarzenbacher, R. and Shi, Y. (2005). "Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP." Nature **434**(7035): 926-33.
- Robbins, M. A. and Rossi, J. J. (2005). "Sensing the danger in RNA." Nat Med **11**(3): 250-1.
- Rosenstiel, P., Fantini, M., Bräutigam, K., Kühbacher, T., Waetzig, G. H., Seeger, D. and Schreiber, S. (2003). "TNF-alpha and IFN-gamma Regulate the Expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells." Gastroenterology **124**(4): 1145-9.
- Rosenstiel, P., Jacobs, G., Till, A. and Schreiber, S. (2008). "NOD-like receptors: Ancient sentinels of the innate immune system." Cell Mol Life Sci **65**(9): 1361-77.
- Rosenstiel, P., Till, A. and Schreiber, S. (2007). "NOD-like receptors and human diseases." Microbes Infect **9**(5): 648-57.
- Roy, N., Mahadevan, M. S., McLean, M., Shutler, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., Baird, S., Besner-Johnston, A., Lefebvre, C., Kang, X. and et al. (1995). "The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy." Cell **80**(1): 167-78.
- Ryffel, B. (1997). "Interleukin-12: role of interferon-gamma in IL-12 adverse effects." Clin Immunol Immunopathol **83**(1): 18-20.
- Sadler, A. J. and Williams, B. R. (2008). "Interferon-inducible antiviral effectors." Nat Rev Immunol **8**(7): 559-68.

- Saleh, A., Srinivasula, S. M., Acharya, S., Fishel, R. and Alnemri, E. S. (1999). "Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation." J Biol Chem **274**(25): 17941-5.
- Samuel, C. E. (2001). "Antiviral actions of interferons." Clin Microbiol Rev **14**(4): 778-809.
- Sandor, F., Latz, E., Re, F., Mandell, L., Repik, G., Golenbock, D. T., Espevik, T., Kurt-Jones, E. A. and Finberg, R. W. (2003). "Importance of extra- and intracellular domains of TLR1 and TLR2 in NFkappa B signaling." J Cell Biol **162**(6): 1099-110.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Schierling, K., Buser, C., Mertens, T. and Winkler, M. (2005). "Human cytomegalovirus tegument protein ppUL35 is important for viral replication and particle formation." J Virol **79**(5): 3084-96.
- Schindler, C., Levy, D. E. and Decker, T. (2007). "JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines." J Biol Chem **282**(28): 20059-63.
- Schreiber, S., Rosenstiel, P., Albrecht, M., Hampe, J. and Krawczak, M. (2005). "Genetics of Crohn Disease, an archetypal inflammatory Barrier Disease." Nat Rev Genet **6**: 376-388.
- Schreiber, S., Rosenstiel, P., Hampe, J., Nikolaus, S., Groessner, B., Schottelius, A., Kuhbacher, T., Hamling, J., Folsch, U. R. and Seegert, D. (2002). "Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease." Gut **51**(3): 379-385.
- Shuai, K. and Liu, B. (2003). "Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system." Nat Rev Immunol **3**(11): 900-11.
- Simonsen, L. (1999). "The global impact of influenza on morbidity and mortality." Vaccine **17**: 3-10.
- Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H. and Williams, B. R. (2003). "Activation of the interferon system by short-interfering RNAs." Nat Cell Biol **5**(9): 834-9.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**(3): 503-17.
- Spencer, D. M., Belshaw, P. J., Chen, L., Ho, S. N., Randazzo, F., Crabtree, G. R. and Schreiber, S. L. (1996). "Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization." Curr Biol **6**(7): 839-47.

- Srinivasula, S. M., Poyet, J. L., Razmara, M., Datta, P., Zhang, Z. and Alnemri, E. S. (2002). "The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1." J Biol Chem **277**(24): 21119-22.
- Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H. and Schreiber, R. D. (1998). "How cells respond to interferons." Annu Rev Biochem **67**: 227-64.
- Steimle, V., Otten, L. A., Zufferey, M. and Mach, B. (1993). "Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome)." Cell **75**(1): 135-46.
- Sutterwala, F. S., Ogura, Y., Zamboni, D. S., Roy, C. R. and Flavell, R. A. (2006). "NALP3: a key player in caspase-1 activation." J Endotoxin Res **12**(4): 251-6.
- Takeda, K. and Akira, S. (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." Int Immunol **17**(1): 1-14.
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-76.
- Tanabe, T., Chamailard, M., Ogura, Y., Zhu, L., Qiu, S., Masumoto, J., Ghosh, P., Moran, A., Predergast, M. M., Tromp, G., Williams, C. J., Inohara, N. and Nunez, G. (2004). "Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition." Embo J **23**(7): 1587-97.
- Tattoli, I., Carneiro, L. A., Jehanno, M., Magalhaes, J. G., Shu, Y., Philpott, D. J., Arnoult, D. and Girardin, S. E. (2008). "NLRX1 is a mitochondrial NOD-like receptor that amplifies NF-kappaB and JNK pathways by inducing reactive oxygen species production." EMBO Rep **9**(3): 293-300.
- Thalappilly, S., Sadasivam, S., Radha, V. and Swarup, G. (2006). "Involvement of caspase 1 and its activator Ipaf upstream of mitochondrial events in apoptosis." Febs J **273**(12): 2766-78.
- Thome, M., Hofmann, K., Burns, K., Martinon, F., Bodmer, J. L., Mattmann, C. and Tschopp, J. (1998). "Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1." Curr Biol **8**(15): 885-8.
- Thompson, A. J. and Locarnini, S. A. (2007). "Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response." Immunol Cell Biol **85**(6): 435-45.
- Till, A., Rosenstiel, P., Brautigam, K., Sina, C., Jacobs, G., Oberg, H. H., Seeger, D., Chakraborty, T. and Schreiber, S. (2008). "A role for membrane-bound CD147 in NOD2-mediated recognition of bacterial cytoinvasion." J Cell Sci **121**(Pt 4): 487-95.

- Ting, J. P., Lovering, R. C., Alnemri, E. S., Bertin, J., Boss, J. M., Davis, B. K., Flavell, R. A., Girardin, S. E., Godzik, A., Harton, J. A., Hoffman, H. M., Hugot, J. P., Inohara, N., Mackenzie, A., Maltais, L. J., Nunez, G., Ogura, Y., Otten, L. A., Philpott, D., Reed, J. C., Reith, W., Schreiber, S., Steimle, V. and Ward, P. A. (2008a). "The NLR gene family: a standard nomenclature." Immunity **28**(3): 285-7.
- Ting, J. P., Willingham, S. B. and Bergstralh, D. T. (2008b). "NLRs at the intersection of cell death and immunity." Nat Rev Immunol **8**(5): 372-9.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Tschopp, J., Martinon, F. and Burns, K. (2003). "NALPs: a novel protein family involved in inflammation." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(2): 95-104.
- Villani, A. C., Lemire, M., Fortin, G., Louis, E., Silverberg, M. S., Collette, C., Baba, N., Libioulle, C., Belaiche, J., Bitton, A., Gaudet, D., Cohen, A., Langelier, D., Fortin, P. R., Wither, J. E., Sarfati, M., Rutgeerts, P., Rioux, J. D., Vermeire, S., Hudson, T. J. and Franchimont, D. (2009). "Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility." Nat Genet **41**(1): 71-6.
- Voss, E., Wehkamp, J., Wehkamp, K., Stange, E. F., Schroder, J. M. and Harder, J. (2005). "NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2." J Biol Chem **30**: 30.
- Wagner, R. N., Proell, M., Kufer, T. A. and Schwarzenbacher, R. (2009). "Evaluation of Nod-like receptor (NLR) effector domain interactions." PLoS ONE **4**(4): e4931.
- Wang, X., Kuivaniemi, H., Bonavita, G., Mutkus, L., Mau, U., Blau, E., Inohara, N., Nunez, G., Tromp, G. and Williams, C. J. (2002). "CARD15 mutations in familial granulomatosis syndromes: a study of the original Blau syndrome kindred and other families with large-vessel arteritis and cranial neuropathy." Arthritis Rheum **46**(11): 3041-5.
- White, S. H., Wimley, W. C. and Selsted, M. E. (1995). "Structure, function, and membrane integration of defensins." Curr Opin Struct Biol **5**(4): 521-7.
- Wilmanski, J. M., Petnicki-Ocwieja, T. and Kobayashi, K. S. (2008). "NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases." J Leukoc Biol **83**(1): 13-30.

- Xiong, H., Kawamura, I., Nishibori, T. and Mitsuyama, M. (1994). "Cytokine gene expression in mice at an early stage of infection with various strains of *Listeria* spp. differing in virulence." Infect Immun **62**(9): 3649-54.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. and Fujita, T. (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." Nat Immunol **5**(7): 730-7.
- Yuan, J. and Horvitz, H. R. (1992). "The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death." Development **116**(2): 309-20.
- Zamboni, D. S., Kobayashi, K. S., Kohlsdorf, T., Ogura, Y., Long, E. M., Vance, R. E., Kuida, K., Mariathasan, S., Dixit, V. M., Flavell, R. A., Dietrich, W. F. and Roy, C. R. (2006). "The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection." Nat Immunol **7**(3): 318-25.

10 Anhang

10.1 Nomenklatur der NLR-Genfamilie

Tab. 10-1: Übersicht der humanen NLR-Genfamilie
verändert nach (Ting et al. 2008a)

NLR Family	Genname (Abkürzung)	Name (Vollständig)	andere Namen	Domänenstruktur	Proteinsequenz
NLRA	<i>CIITA</i>	class II, major histocompatibility complex, transactivator	<i>NLRA</i> ; <i>MHC2TA</i> ; <i>C2TA</i>	(CARD)-AD-NACHT-NAD-LRR	NP_000237
NLRB	<i>NAIP</i>	NLR family, apoptosis inhibitory protein	<i>NLRB1</i> ; <i>BIRC1</i> ; <i>CLR5.1</i>	BIR3x-NACHT-LRR	NP_004527
NLRC	<i>NOD1</i>	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	<i>NLRC1</i> ; <i>CARD4</i> ; <i>CLR7.1</i>	CARD-NACHT-NAD-LRR	NP_006083
NLRC	<i>NOD2</i>	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2	<i>NLRC2</i> ; <i>CARD15</i> ; <i>CD</i> ; <i>BLAU</i> ; <i>IBD1</i> ; <i>PSORAS1</i> ; <i>CLR16.3</i>	CARD2x-NACHT-NAD-LRR	NP_071445
NLRC	<i>NLRC3</i>	NLR family, CARD domain containing 3	<i>NOD3</i> ; <i>CLR16.2</i>	CARD-NACHT-NAD-LRR	NP_849172
NLRC	<i>NLRC4</i>	NLR family, CARD domain containing 4	<i>CARD12</i> ; <i>CLAN</i> ; <i>CLR2.1</i> ; <i>IPAF</i>	CARD-NACHT-NAD-LRR	NP_067032
NLRC	<i>NLRC5</i>	NLR family, CARD domain containing 5	<i>NOD27</i> ; <i>CLR16.1</i>	CARD-NACHT-NAD-LRR	NP_115582
NLRP	<i>NLRP1</i>	NLR family, pyrin domain containing 1	<i>NALP1</i> ; <i>DEFCAP</i> ; <i>NAC</i> ; <i>CARD7</i> ; <i>CLR17.1</i>	PYD-NACHT-NAD-LRR-FIIND-CARD	NP_127497
NLRP	<i>NLRP2</i>	NLR family, pyrin domain containing 2	<i>NALP2</i> ; <i>PYPAF2</i> ; <i>NBS1</i> ; <i>PAN1</i> ; <i>CLR19.9</i>	PYD-NACHT-NAD-LRR	NP_060322
NLRP	<i>NLRP3</i>	NLR family, pyrin domain containing 3	<i>CIAS1</i> ; <i>PYPAF1</i> ; <i>Cryopyrin</i> ; <i>CLR1.1</i> ; <i>NALP3</i>	PYD-NACHT-NAD-LRR	NP_004886
NLRP	<i>NLRP4</i>	NLR family, pyrin domain containing 4	<i>NALP4</i> ; <i>PYPAF4</i> ; <i>PAN2</i> ; <i>RNH2</i> ; <i>CLR19.5</i>	PYD-NACHT-NAD-LRR	NP_604393
NLRP	<i>NLRP5</i>	NLR family, pyrin domain containing 5	<i>NALP5</i> ; <i>PYPAF8</i> ; <i>MATER</i> ; <i>PAN11</i> ; <i>CLR19.8</i>	PYD-NACHT-NAD-LRR	NP_703148
NLRP	<i>NLRP6</i>	NLR family, pyrin domain containing 6	<i>NALP6</i> ; <i>PYPAF5</i> ; <i>PAN3</i> ; <i>CLR11.4</i>	PYD-NACHT-NAD-LRR	NP_612202
NLRP	<i>NLRP7</i>	NLR family, pyrin domain containing 7	<i>NALP7</i> ; <i>PYPAF3</i> ; <i>NOD12</i> ; <i>PAN7</i> ; <i>CLR19.4</i>	PYD-NACHT-NAD-LRR	NP_996611
NLRP	<i>NLRP8</i>	NLR family, pyrin domain containing 8	<i>NALP8</i> ; <i>PAN4</i> ; <i>NOD16</i> ; <i>CLR19.2</i>	PYD-NACHT-NAD-LRR	NP_789781
NLRP	<i>NLRP9</i>	NLR family, pyrin domain containing 9	<i>NALP9</i> ; <i>NOD6</i> ; <i>PAN12</i> ; <i>CLR19.1</i>	PYD-NACHT-NAD-LRR	NP_789790
NLRP	<i>NLRP10</i>	NLR family, pyrin domain containing 10	<i>NALP10</i> ; <i>PAN5</i> ; <i>NOD8</i> ; <i>PYNOD</i> ; <i>CLR11.1</i>	PYD-NACHT-NAD	NP_789791
NLRP	<i>NLRP11</i>	NLR family, pyrin domain containing 11	<i>NALP11</i> ; <i>PYPAF6</i> ; <i>NOD17</i> ; <i>PAN10</i> ; <i>CLR19.6</i>	PYD-NACHT-NAD-LRR	NP_659444
NLRP	<i>NLRP12</i>	NLR family, pyrin domain containing 12	<i>NALP12</i> ; <i>PYPAF7</i> ; <i>Monarch1</i> ; <i>RNO2</i> ; <i>PAN6</i> ; <i>CLR19.3</i>	PYD-NACHT-NAD-LRR	NP_653288
NLRP	<i>NLRP13</i>	NLR family, pyrin domain containing 13	<i>NALP13</i> ; <i>NOD14</i> ; <i>PAN13</i> ; <i>CLR19.7</i>	PYD-NACHT-NAD-LRR	NP_789780
NLRP	<i>NLRP14</i>	NLR family, pyrin domain containing 14	<i>NALP14</i> ; <i>NOD5</i> ; <i>PAN8</i> ; <i>CLR11.2</i>	PYD-NACHT-NAD-LRR	NP_789792
NLRX	<i>NLRX1</i>	NLR family member X1	<i>NOD9</i> ; <i>CLR11.3</i>	X-NACHT-NAD-LRR	NP_078894

AD - acidic activation domain; CARD - caspase activating and recruitment domain; LRR - leucine-rich repeat; NACHT - domain present in NAIP, CIITA, HET-E and TP-1; BIR - baculovirus inhibitor of apoptosis repeat; PYD - pyrin domain; NAD - NACHT-associated domain

10.2 Übersicht über RLHs und TLRs

Tab. 10-2: Humane RLHs und TLRs.

verändert nach (Takeda et al. 2003, Honda and Taniguchi 2006)

TLR	Lokalisation	Pathogen			
		Bakterium	Virus	Pilz	Parasiten
RIG-I	Zytoplasma		dsRNA		
MDA5	Zytoplasma		dsRNA		
TLR1/TLR2	Zellmembran	Triacyllipopeptide Lipoarabinoman (Mycobakterium) OspA Porin PorB		Hefe/Zymosan	Glycosylphosphatidyl Inisitol verlinkte Proteine (<i>T.cruzi</i>)
TLR2/TLR6	Zellmembran	Diacyl Lipopeptide LTA Peptidoglycan		Hefe/Zymosan	Glycosylphosphatidyl Inisitol verlinkte Proteine (<i>T.cruzi</i>)
TLR3	Endosom		dsRNA		
TLR4	Zellmembran	Lipopolysaccharid Flavolpin HSP60	Fusionsprotein (RSV)		
TLR5	Zellmembran	Flagellin			
TLR7	Endosom		einzelsträngige RNA		
TLR8	Endosom		einzelsträngige RNA		
TLR9	Endosom	unmethylierte CpG DNA	unmethylierte CpG DNA	unmethylierte CpG DNA	

dsRNA - doppelsträngige RNA; HSP - Hitze-Schock-Protein; MDA5 - *melanoma differentiation-associated gene 5*; RIG-I - *retinoic acid inducible gene*;
TLR - Toll-like Rezeptor

10.3 Verwendete Kits

Tab. 10-3: Bezeichnung und Name des Herstellers verwendeter Kits.

Bezeichnung	Hersteller
Big Dye Terminator Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
Caspase Glo®-3/7 Assay	Promega, Mannheim
DC Protein Assay	BioRad, München
Dnase I	Qiagen, Hilden
Dual-Luciferase-Assay	Promega, Mannheim
ECL-PLUS	Amersham Biosciences, Braunschweig
MiniElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
MiniElute PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
MTT-Assay	Promega, Mannheim
Platinum Taq DNA polymerase high fidelity Kit	Invitrogen, Frankfurt
QIAfilter Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega, Mannheim
QIAshredder Homogenizer Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Wizard SV Genomic DNA Purification System	Promega, Mannheim
CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim

10.4 Verwendete Chemikalien, Zusätze und Enzyme

Tab. 10-4: Bezeichnung und Name des Herstellers verwendeter Chemikalien, Zusätze und Enzyme.

Bezeichnung	Hersteller
6-Aminocaprinsäure	Merck, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30:0,8)	BioRad, München
Agar Noble	BD Biosciences, Heidelberg
Agarose	Eurogentec, Berlin
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, München
AmpliTaq DNA Polymerase	Roche, Mannheim
AP20187	Ariad, Cambridge, USA
Bacillol	Bode Chemie, Hamburg
Bacto-Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto-Yeast Extract	BD Biosciences, Heidelberg
Bis-Tris	Roth, Karlsruhe
Bodipy	Invitrogen, Frankfurt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA-Lösung (10mg/ml)	<i>New England Biolabs</i> , Frankfurt
β -Mercaptoethanol	Sigma, München
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Cell Culture Freezing Medium-DMSO	Invitrogen, Frankfurt
CIP, <i>Calf Intestine Phosphatase</i>	<i>New England Biolabs</i> , Frankfurt
DAPI	Sigma, München
DCFH-DA	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
DEPC	Sigma, München
DMSO	Sigma, München
dNTP Set (100 mM-Lösung)	Invitrogen, Frankfurt
<i>EcoRI</i>	<i>New England Biolabs</i> , Frankfurt
EDTA	Calbiochem, Bad Soden
EGF	Peptotech, Hamburg
EGTA	Sigma, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (p.a.)	Merck, Darmstadt
FCS Gold	PAA Laboraties GmbH, Pasching, Österreich
Flagellin	Invivogen, Toulouse, Frankreich
FSL1	Invivogen, Toulouse, Frankreich
FuGENE	Roche, Mannheim
Glycerin	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Hepes	Sigma, München
HKLM	Invivogen, Toulouse, Frankreich
IFN alpha (Hybridform A/D [BgIII])	PBL, NJ, USA
IFN beta	PBL, NJ, USA
IFN gamma	Biosource, Solingen
IL-1 beta	Biosource, Solingen
IL-6	Biosource, Solingen

ANHANG

Imiquimod	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Darmstadt
JAK Inhibitor	Calbiochem (Bad Soden)
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Lipopoplysaccharide	Invivogen, Toulouse, Frankreich
LysoTracker®	Invitrogen, Frankfurt
Magermilchpulver (MMP)	BioRad, München
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
MgSO ₄	Merck, Darmstadt
MitoTracker®	Invitrogen, Frankfurt
Muramyl-dipeptid	Bachem, Heidelberg
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Sigma, München
NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, München
ODN2006 (TypB)	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Pam3CSK4	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Peptidoglycan	Sigma, München
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma, München
Poly(I:C)	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Proteinmarker Precision Plus Protein™ Dual Color	Bio-Rad, München
RPMI-1640 Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Saccharose	Roth, Karlsruhe
<i>Sall</i>	<i>New England Biolabs</i> , Frankfurt
SDS	Calbiochem, Bad Soden
ServaG	Roth, Karlsruhe
SmartLadder DNA Markers	Eurogentec, Köln
ssRNA40	Invivogen, Toulouse, Frankreich
50x TAE Buffer	Invitrogen, Frankfurt
TEMED	Sigma, München
TGF-beta	Biosource, Solingen
TGS protein electrophoresis buffer 10x Tris/Glycin/SDS	BioRad, München
TNF-alpha	R&S Systems
Tris	Merck, Darmstadt
TritonX-100	Merck, Darmstadt
Trypan-Blau-Lösung	Sigma, München
Trypsin/EDTA (1X)	Invitrogen, Frankfurt
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (30% Lösung)	Sigma, München
<i>Xbal</i>	<i>New England Biolabs</i> , Frankfurt
<i>XhoI</i>	<i>New England Biolabs</i> , Frankfurt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

10.5 Verwendete Puffer, Lösungen und Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit A. bidest. angesetzt. Die Medien für die Bakterienkultur wurden autoklaviert und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gekühlt.

Tab. 10-5: Bezeichnung und Zusammensetzung verwendeter Puffer, Lösungen und Medien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x DNA-Ladepuffer	50% (v/v) Glycerol, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) Xylencyanol
25x TAE	1M Tris (pH 8,0), 25mM EDTA, 500mM Essigsäure
2x DLB	20mM Tris (pH 7,4), 2% (w/v) SDS
2x Bis-Tris ACA	200mM Bis-Tris (pH 7), 1M 6-Aminocaprinsäure
4x Trenngelpuffer	1,5M Tris (pH 8,8), 0,4 % (w/v) SDS
4x Sammelgelpuffer	0,5M Tris (pH 6,8), 0,4% (w/v) SDS
5x PBS	40 g/l NaCl, 5,8 g/l Na ₂ HPO ₄ , 1 g/l KH ₂ PO ₄ , 1 g/l KCl
4x SDS-Ladepuffer	200mM Tris (pH 6,8), 40mM DTT, 40% Glycerin, 8% SDS, 0,08% Bromphenolblau
Anodenpuffer 1	30mM Tris, 20% (v/v) Methanol
Anodenpuffer 2	300 mM Tris, 20% (v/v) Methanol
IP-Lysepuffer	1x PBS + 1% Triton X100
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol, 40 mM 6-Aminocaprinsäure
LB-Agarplatten	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar Agar
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
Nativer Proteinladepuffer	500 µl 2x Bis-Tris ACA, 400 µl Saccharose 75%, 50mg ServaG, 100 µl H ₂ O
RIPA	150mM NaCl, 1% NP40, 0,5% Na-desoxychelate, 0,1 % SDS, 50mM Tris, pH 8
S.O.C.-Medium	2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄
<i>Stripping</i> -Puffer 1	62,5mM Tris(pH 6,8), 2 % (w/v) SDS, 0,7 % (v/v) β-Mercaptoethanol
<i>Stripping</i> -Puffer 2	0,4M NaOH, 0,1% SDS (w/v)
TE (pH 7,6; pH 8,0)	10mM Tris/, 1mM EDTA
TTBS	20mM Tris, 137mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween20

10.6 Vektoren

Tab. 10-6: Bezeichnung, Antibiotikaresistenz und Hersteller verwendeter Plasmide.

Bezeichnung	Vektor	Antibiotika-resistenz	Hersteller
GFP	pEGFP-N1	Neo/Amp	Clontech, Heidelberg
NOD2-GFP	pEGFP-C	Amp	Rosenstiel, Huse <i>et al.</i> 2006
dsRed	pDsRed-Express	Amp	Clontech, Heidelberg
NOD1-pcDNA 3.1	pcDNA 3.1	Neo/Amp	Rosenstiel, Huse <i>et al.</i> 2006
FLAG	pCEV	Amp	Clontech, Heidelberg
NOD2-FLAG	pCEV	Amp	Rosenstiel, Huse <i>et al.</i> 2006
NOD2 CARD/CARD-FLAG	pCEV	Amp	Rosenstiel, Huse <i>et al.</i> 2006
NOD2 NACHT-FLAG	pCEV	Amp	Rosenstiel, Huse <i>et al.</i> 2006
NOD2 LRD-FLAG	pCEV	Amp	Rosenstiel, Huse <i>et al.</i> 2006
FKBP	pC4M-Fv2E	Amp	Ariad, Cambridge, USA
pGL3B	pGL3B	Amp	Clontech, Heidelberg
pAP-1	pAP-1 Luciferase	Amp	Clontech, Heidelberg
pGAS	pGAS Luciferase	Amp	Clontech, Heidelberg
pISRE	pISRE Luciferase	Amp	Clontech, Heidelberg
pHSE	pHSE Luciferase	Amp	Clontech, Heidelberg
pNFAT	pNFAT Luciferase	Amp	Clontech, Heidelberg
pNF-kappaB	pNF- κ B Luciferase	Amp	Clontech, Heidelberg
IkappaB α -SR	IkappaB α -SR	Amp	Clontech, Heidelberg
pRL-TK	pRL-TK	Amp	Promega, Mannheim

10.7 Oligonukleotide

Tab. 10-7: Verwendete Oligonukleotide.

KP – Klonierungsprimer, M – Mutageneseprimer, RT – reverse Transkriptase PCR, RTq – TaqMan *real-time* quantitative PCR, SP – Sequenzierungsprimer, T_{anneal} – Primerhybridisierungstemperatur

Bezeichnung	Sequenz (5`-3`)	T_{anneal} (C°)	Region	Appli- kation
NLRC5-for	ATGGACCCCGTTGGCCTCCA	60	Komplett	KP
NLRC5-rev	TCAAGTACCCCAAGGGGCCTGG			
NLRC5-1s	GGGTCTGCGTTTCTGTATGG	60	Komplett	SP
NLRC5-2s	CTTTCTGAGGCTCTCAGGGC	60	Komplett	SP
NLRC5-3s	GGGCAGCTGATGGAGACATG	60	Komplett	SP
NLRC5-4s	GGCTGGGAAGACACTCAGGC	60	Komplett	SP
NLRC5-5s	TGTGTCCACGGGTAAAAAGG	60	Komplett	SP
NLRC5-6s	CTATGATGATGGGTTCCACCAGC	60	Komplett	SP
NLRC5-7s	GACCGTGCTTTTGGGGAAG	60	Komplett	SP
NLRC5-8s	CTTTGATGGGCCACGGGT	60	Komplett	SP
NLRC5-9	GATAGCTTTTGGGGCCACTC	60	Komplett	SP

ANHANG

NLRC5-10s	CACAGGGCCAAAGGTTGTAGAG	60	Komplett	SP
NLRC5-11s	GCTTTGCCTCTCTGTCCACAG	60	Komplett	SP
NLRC5-12s	TCCAGGAAGGCCCTCACCT	60	Komplett	SP
NLRC5-13s	TCTGCAAGGCTCTGGGAGG	60	Komplett	SP
NLRC5-14s	GCCTCAGTGAGTGTCTCTGGA	60	Komplett	SP
NLRC5-15s	CTGGAGAAGAATCAGATCACAGCT	60	Komplett	SP
NLRC5-16s	CAGGATGACTCTCTGTTCAGGGTC	60	Komplett	SP
NLRC5P-for	GAGGAGGTCACTCTTCCAGAACC	55	Promotor	KP
NLRC5P-rev	GCTCTGCACGAAACTGAAAGTAGAAG			
NLRC5P-1s	CTCCCATGCATACAGCTCACA	55	Promotor	SP
NLRC5P-2s	CTGACTCCATCCTGGGACAGC	55	Promotor	SP
NLRC5P-m(κ B ₁) for	GGAGCGGGTCTGGGACTTCAT	65	Promotor	M
NLRC5P-m(κ B ₁) rev	ATGAAGTCCCAGGACCCGCTCC			
NLRC5P-m(κ B, STAT) for	CTTCATGCACAGGTAATTCATGTAGGACCA	65	Promotor	M
NLRC5P-m(κ B, STAT) rev	TGGTCCTACATGAAGTACCTGTGCATGAAG			
NLRC5P-m(STAT) for	TCAGCCAGGGGTAGGAGCGAAC	65	Promotor	M
NLRC5P-m(STAT) rev	GTTTCGCTCCTACCCCTGGCTGA			
NLRC5P-m(κ B ₂) for	CCACGTCTCCGTCTTGGGTCC	65	Promotor	M
NLRC5P-m(κ B ₂) rev	GGACCCAAGGACGGAGACGTGG			
NLRC5P-m(κ B ₃) for	GGCTGTGGTGCCAGGGTGTG	65	Promotor	M
NLRC5P-m(κ B ₃) rev	CACACCCTGGCACCACAGCC			
NLRC5C-for	ATGGACCCCGTTGGCCTCCAGCT	60	CARD	KP
NLRC5C-rev	CGGGCCCTTGTTAACCTGGT			
NLRC5N-for	AGGGTGACCGTGCTTTTGGGG	60	NACHT	KP
NLRC5N-rev	CTGGGCGCTGAAGAAGTGATTCACAT			
NLRC5L-for	GGCCCCCTCCCGCATGG	60	LRR	KP
NLRC5L-rev	TCAAGTACCCAAGGGGCCTGG			
NLRC5-for	TGACTTCCTTCTGCGTCTGCACAG	61	659 bp	RT
NLRC5-rev	CATTGTTCGGCAAGCTCCTGGAG			
GAPDH-for	CCAGCCGAGCCACATCGC	56	1167 bp	RT
GAPDH-rev	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT			
CMV-IE2 for	CCCTGATAATCCTGACGAGG	55	234	RT
CMV-IE2 rev	GGTTCTCGTTGCAATCCTCGG			
IFN-a for	ATTCAGCTCTCTGGGCTGTGATC	63	319 bp	RT
IFN-a rev	CATCACACAGGACTCCAGGTCATT			
PRKRIR-for	ATGCCAGAAGTGGGTGGAGAAC	59	475 bp	RT
PRKRIR-rev	AGCCTCATGTCCATCCAGAGGTAT			
OAS1-for	TGGCTCCTCAGGCAAGGGC	59	469 bp	RT
OAS1-rev	TGGTACCAGTGCTTGACTAGGCGG			
IL-8 for	ACCGGAAGGAACCATCTCACT	59	307 bp	RT
IL-8 rev	AAACTTCTCCACAACCCTCTGC			
STAT1-for	CTAGTGGAGTGGAAAGCGGAG	59	356 bp	RT
STAT1-rev	AGAGGTCGTCTCGAGGTCAA			
IL-12a for	CCAGCACAGTGGAGGCCTGT	63	224 bp	RT
IL-12a rev	GATCTGCCTCTTAGGATCCATCAG			

DDX58-for	TGGATTATATCTGCAAGCTGTGTGC	63	477 bp	RT
DDX58-rev	CAATCTCATCGAATCCTGCTGCT			
Hs00260008_m1				QRT

10.8 Antikörper

Tab. 10-8: Verwendete Primärantikörper.

Ms und rb bezeichnet die Spezies des IgG (ms – Maus, rb – Kaninchen). Die Angabe hinter IB und IP bezeichnet die Verdünnung des jeweiligen Antikörpers, die für die jeweiligen Methoden eingesetzt wurde (IB – Immunoblot, IP- Koimmunpräzipitation).

Zielprotein	Bezeichnung	Spezies, Applikation, Verdünnung	Hersteller
β-Actin	Anti-β-Actin	ms, IB 1:60.000	Sigma, München
DsRed	Living Colors DsRed monoclonal antibody	rb, IB 1:1000	Clontech, Heidelberg
FLAG	Anti-FLAG M2 antibody	ms, IB 1:1.000, IP 1:1000	Stratagene, Heidelberg
GFP	A.v. monoclonal antibody (JL-8)	ms, IB 1:1.000, IP 1:1000	Clontech, Heidelberg
HA	HA-tag polyclonal antibody	rb, IB 1:500	Clontech, Heidelberg
IFN-γ	Anti Human IFN-γ	rb, 1:1000	Genzyme, Konstanz
NLRC5	Anti-NLRC5	rb, IB 1:500	Eurogentec, Seraing, Belgien
PRKRIR	PRKRIR	rb, IB 1:1000	Bethyl, Hamburg
pSTAT1	Phospho-STAT1 (Tyr701)	rb, IB 1:1000	Cell Signaling, Frankfurt
STAT1	STAT1	rb, IB 1:1000	Cell Signaling, Frankfurt

Tab. 10-9: Verwendete Sekundärantikörper.

Bezeichnung	Hersteller
anti-Rabbit-HRP	Amersham Biosciences, Braunschweig
anti-Mouse-HRP	Amersham Biosciences, Braunschweig

10.9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von <i>pattern recognition receptors</i> (PRR) in Wirbeltier-Zellen.	2
Abb. 1-2: Domänenstruktur einiger NLR Proteine.	5
Abb. 1-3: Unterfamilien der NLR Proteine.	6
Abb. 1-4: 3D-Modelle der <i>death domain</i> (DD) Superfamilie.	6
Abb. 1-5: Dreidimensionales Strukturmodell und phylogenetischer Stammbaum der NACHT- Domäne.	8
Abb. 1-6: LRD von NOD2.	8
Abb. 1-7: Modell einer NLR Aktivierung und Oligomersisierung basierend auf strukturellen Informationen über APAF-1.	9
Abb. 1-8: Signalwege von bekannten NLRs.	11
Abb. 3-2: Künstliche Oligomerisierung.	46
Abb. 4-1: Genomische Organisation und Proteinstruktur von NLRC5.	48
Abb. 4-2: Fluoreszenzmikroskopie von HeLaS3-Zellen mit angefärbten Organellen.	49
Abb. 4-3: Phylogenetischer Stammbaum von <i>NLRC5</i> .	50
Abb. 4-4: Expression von <i>NLRC5</i> .	51
Abb. 4-5: Regulation der <i>NLRC5</i> -Promotoraktivität.	52
Abb. 4-6: Kostimulation zur Analyse der <i>NLRC5</i> -Promotoraktivität.	53
Abb. 4-7: Analyse des <i>NLRC5</i> mRNA-Levels nach Stimulation.	54
Abb. 4-8: Konzentrations- und zeitabhängige Regulation der <i>NLRC5</i> -Expression.	55
Abb. 4-9: Charakterisierung der <i>NLRC5</i> -Proteinexpression.	56
Abb. 4-10: Analyse regulatorischer Elemente innerhalb des <i>NLRC5</i> -Promotors.	57
Abb. 4-11: Einfluss spezifischer Signalkaskaden auf die <i>NLRC5</i> -Promotoraktivität.	58
Abb. 4-12: Expression von <i>NLRC5</i> nach viraler Infektion.	59
Abb. 4-13: Expression von <i>NLRC5</i> durch CMV induziertes IFN- γ .	60
Abb. 4-14: Expressionsanalyse von <i>NLRC5</i> in verschiedenen Biopsien.	62
Abb. 4-15: Künstlich aktivierbare <i>NLRC5</i> -Chimäre.	63
Abb. 4-16: Einfluss von <i>NLRC5</i> auf Apoptose und Zellproliferation.	64
Abb. 4-17: Signaltransduktionsprozesse <i>downstream</i> von <i>NLRC5</i> .	66
Abb. 4-18: Regulation von ISRE- und GAS-abhängigen Signalwegen durch <i>NLRC5</i> .	67
Abb. 4-19: Einfluss von aktiviertem <i>NLRC5</i> auf den pSTAT1-Level.	68

Abb. 4-20: Einfluss von transfizierten und endogenem NLRC5 auf die STAT1 Phosphorylierung.	69
Abb. 4-21: Analyse zur möglichen autokrinen Regulation von NLRC5.	70
Abb. 4-22: Regulation von verschiedenen Genen durch NLRC5.	71
Abb. 4-23: NLRC5 verstärkt die NOD2-abhängige NF- κ B-Aktivierung.	72
Abb. 4-24: NOD2 verstärkt die NLRC5-abhängige ISRE-Aktivierung.	73
Abb. 4-25: Zytoinvasion von <i>L. monocytogenes</i> in stabilen NOD2-exprimierenden HEK293-Zellen.	74
Abb. 4-26: Kolokalisation von NLRC5 und NOD2.	74
Abb. 4-27: Interaktion von NOD2 mit NLRC5.	75
Abb. 5-1: Schematische Darstellung der Interferon (IFN)-Signaltransduktionskaskade.	82
Abb. 5-2: Hypothetische Darstellung der Regulation und Wirkung von NLRC5.	88
Abb. 5-3: Hypothetisches Modell der Interaktion von NLRC5 und NOD2 und dessen Einfluss auf bestimmte Signalwege.	91

10.10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1: Übersicht über NLR Liganden und beteiligter Signalprozesse.	10
Tab. 1-2: NLR Proteine und ihre assoziierten Krankheiten	13
Tab. 3-1: In der vorliegenden Arbeit verwendete Zelllinien.	17
Tab. 3-2: Ausgesäte Zelldichten für die verschiedenen Experimente.	19
Tab. 3-3: Mengen und Volumina für FuGENE [®] 6-Lipofektion.	22
Tab. 3-4: Mengen und Volumina für Lipofectamine [™] 2000-Transfektion.	23
Tab. 3-5: Filtersätze für Fluoreszenzmikroskopie.	25
Tab. 3-6: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE.	28
Tab. 3-7: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für ein natives Gel.	29
Tab. 3-8: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.	35
Tab. 3-9: Exemplarischer Reaktionsansatz und PCR-Programm einer RT-PCR.	36
Tab. 3-10: Reaktionsansatz und PCR-Programm einer Mutagenese.	36
Tab. 3-11: Zusammensetzung der Taqman-PCR-Reaktion.	38
Tab. 3-12: Verdünnung für die Standardkurve der Taqman-PCR.	38
Tab. 3-13: Exemplarische Zusammensetzung einer Doppelrestriktion.	40
Tab. 3-14: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes für die Inserierung eines DNA-Fragments in ein Plasmid.	41

Tab. 3-15: Reaktionsansatz für die Sequenzierung und Programmierung eines Thermocyclers.	43
Tab. 3-16: Sequenzspezifische Rekombination zur Erstellung von Donor-Vektoren mittels BP Clonase.	44
Tab. 3-17: Sequenzspezifische Rekombination zur Erstellung von <i>Destination</i> -Vektoren mittels LR-Rekombinase.	45
Tab. 10-1: Übersicht der humanen NLR-Genfamilie.	116
Tab. 10-2: Humane RLHs und TLRs.	117
Tab. 10-3: Bezeichnung und Name des Herstellers verwendeter Kits.	117
Tab. 10-4: Bezeichnung und Name des Herstellers verwendeter Chemikalien, Zusätze und Enzyme.	118
Tab. 10-5: Bezeichnung und Zusammensetzung verwendeter Puffer, Lösungen und Medien.	120
Tab. 10-6: Bezeichnung, Antibiotikaresistenz und Hersteller verwendeter Plasmide.	121
Tab. 10-7: Verwendete Oligonukleotide.	121
Tab. 10-8: Verwendete Primärantikörper.	123
Tab. 10-9: Verwendete Sekundärantikörper.	123

10.11 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Vollständige Bezeichnung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APAF-1	<i>apoptotic protease-activating factor1</i>
APP	<i>acute phase proteins</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bid.	Aqua bidestilliert
ARC	<i>apoptosis repressor with CARD</i>
ASC	<i>apoptosis associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BIR	<i>baculovirus inhibitory of apoptosis repeat</i>
BIS-Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris(hydroxymethyl)-methan
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C-	carboxy-
ca.	circa
CACO2	<i>human colon adenocarcinoma</i>
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i>
CATERPILLER	<i>CARD, transcription enhancer, R-(purine)-binding, pyrin, lots of leucine-rich repeats</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CEPH	Centre d'Etude du Polymorphisme Humain
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CIITA	<i>MHC class II transcription factor</i>
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
CLR	<i>Caterpillar</i>
cm ²	Kubikmeter
CMV	Zytomegalievirus
CMV-IE2	CMV immediate early gene 2
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	<i>chronic obstructive lung disease</i>
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
Cu	Colitis Ulcerosa
DAMP	<i>damage-associated-molecular-pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DD	<i>death domain-fold</i>
DDX58	<i>Asp-Glu-Ala-Asp box polypeptide 58</i>
DED	<i>death-effector domain</i>
DLA	Dual Luziferase Assay
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dsDNA	<i>double-stranded DNA</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i>
DTT	Dithiothreitol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>

EBD	<i>effector-binding domain</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal-growth-factor</i>
eLRR	<i>extracytoplasmic leucine-rich repeats</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fadd DD	<i>FAS-associated protein with death domain</i>
Fadd DED	<i>Fadd with death-effector domain</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FIIND	domain with function to find
fmol	Femtomol
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSL1	synthetisches Lipoprotein
g	Gramm oder relative Erdbeschleunigung
GAF	Interferon- γ -activated factor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GAS	<i>gamma-interferon activation sequence</i>
GFP	<i>green fluorecent protein</i>
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
h	Stunde
HEK	<i>human embryonal kidney</i>
HeLa	Henrietta Lacks
HET-E	<i>incompatibility locus protein from Podospora anserina</i>
HFF	<i>human foreskin fibroblasts</i>
HKLM	<i>heat-killed L.monocytogenes</i>
HN	<i>healthy normal individual</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HSE	<i>heat shock element</i>
HT-29	<i>human colon adenocarcinoma</i>
HUGO	Gene Nomenclature Committee
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
IB	Immunoblot
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
IFN	Interferon
IFNAR	IFN- α/β -Rezeptor
IFNGR	IFN- γ -Rezeptor
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
IP	Koimmunpräzipitation
IRF	IFN-regulatorischer Faktor
ISG	Interferon stimulierte Gene
ISGF	IFN-stimulated gene factor
ISRE	<i>interferon-specific response element</i>
I κ B α	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha</i>
I κ B α -SR	I κ B α -Super Repressor
JAK	Janus Kinase
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LB-Medium	Luria-Broth-Medium
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LRD	<i>ligand-recognition domain</i>

LRR	<i>leucine-rich repeats</i>
mA	Miliampere
MAL	<i>MyD88-adaptor-like protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAVS	<i>mitochondrial antiviral signalling adaptor</i>
MC	Morbus Crohn
MCS	<i>multiple cloning sites</i>
MDA	<i>melanoma differentiation-associated gene</i>
MDP	<i>muramyl dipeptide</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Magermilchpulver
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolimbromid
MW	Morbus Wegener
MxA	<i>myxovirus resistance gene</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
N-	Ammino-
NACHT	NAIP, CIITA, HET-E and TP1
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NAIP	<i>neuronal apoptosis inhibitory protein</i>
NALP	<i>NACHT-, LRR- and PYD-domain-containing protein</i>
NB-ARC	nucleotide-binding adaptor shared by APAF-1
NBD	<i>nucleotide-binding domain</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-kappaB</i>
ng	Nanogramm
NLR	NOD-like receptor
NLRC	<i>NLR family, CARD domain containing</i>
NLRP	<i>NLR family, PYD domain containing</i>
NLRX1	<i>NLR family member X1</i>
nM	Nanometer
NOD	<i>nucleotide-binding and oligomerization domain</i>
nP	nasale Polyposis
OAS-1	<i>2',5'-Oligoadenylat-Synthetase-1</i>
ODN2006	synthetische Oligonukleotide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
Pam3CSK4	Pam3CysSerLys4
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PG	Peptidoglykan
PI	Propidiumiodid
PKR	Protein Kinase R
PLB	<i>passive lysis buffer</i>
PMA	<i>phorbol myristate acetat</i>
Poly I:C	<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
PRKRIR	<i>repressor of protein kinase/interferon-inducible ds RNA-dependent inhibitor</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
pSTAT	phosphoryliertes STAT
PVDF	Polyvinylidendifluorid

ANHANG

PYD	<i>pyrin domain</i>
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene 1</i>
RLH	<i>RIG-I-like RNA helicase</i>
RLU	relative Luziferase-Aktivität
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPM1	<i>resistance to P. syringae PV Maculicola 1</i>
RPMI-2650	human nasal septum squamous cell carcinoma
R-Proteine	Resistenz-Proteine
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	<i>reverse transkriptase</i>
RTq-PCR	<i>Real-Time-quantitative-PCR</i>
s	Sekunde
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interference RNA</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SOCS	<i>suppressors of cytokine signaling</i>
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SW-480	<i>human colon adenocarcinoma</i>
Tab.	Tabelle
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin
THP-1	<i>human acute monocytic leukemia</i>
TIR	Toll/IL-1R
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-alpha	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TP1	telomerase-associated protein
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1.3-propandiol
TYK	Tyrosin Kinase
u.i.	<i>uptake index</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units pro Milliliter
UCSC	University of California Santa Cruz
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/V	Gewicht pro Volumen

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von 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. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, den _____

(Sven Künzel)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sven Künzel

Geburtstag: 11.09.1978

Geburtsort: Leipzig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

derzeitige Anschrift: Hasseldieksdammer Weg 7, 24114 Kiel

Schulischer Werdegang

07/1998 Abitur an der Frida-Levy-Gesamtschule, Essen

Zivildienst

08/1998-09/1999 Geriatriezentrum Haus-Berge, Essen

Studium

10/1999-02/2005 Studium Diplom-Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

02/2005 Diplom, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Fächer: Zellbiologie, Zoologie, Pädagogik
Diplomarbeit: Charakterisierung von Mutanten im respiratorischen Elektronentransport des einzelligen Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803
Gesamtnote - gut -

08/2005-09/3009 Promotion am Institut für Klinische Molekularbiologie,
Leitung: Prof. Dr. Stefan Schreiber, Arbeitsgruppe Zellbiologie, Prof. Dr. Philip Rosenstiel, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Publikationen und Tagungsbeiträge

S. Kuenzel, A. Till, M. Winkler, Robert Häsler, H. Fickenscher, S. Schreiber, P. Rosenstiel
“The NOD-like receptor NLRC5 is regulated by IFN- γ and contributes to antiviral signaling”
Journal of Immunology (in revision)

S. Künzel, A. Till, M. Winkler, S. Lipinski, H. Fickenscher, S. Schreiber, P. Rosenstiel
“Functional Characterisation of the NOD-like Receptor NLRC5/NOD27”
2nd Annual Cluster Symposium, Inflammation at Interfaces, Kiel 2009 (Poster)

J. Appel, B. Forberich, S. Künzel, L. Cournac
“Function of Respiratory NDH-1 Complexes and their Effect on Hydrogen Evolution in
Synechocystis sp. PCC6803”
18th Western Photosynthesis Conference, Pacific Grove, California, USA 2009 (Abstract)

A. Till, S. Lipinski, S. Künzel, S. Billmann, J. Gobom, R. Haesler, H. Lehrach, S. Schreiber,
P. Rosenstiel
“Systematic Analysis of NOD2-dependent Transcriptome and Proteome Signature Patterns
upon Muramyl-dipeptide Stimulation“
10. Tagung der Gesellschaft für Signaltransduktion (GST), Weimar 2006 (Poster)

J. Appel, S. Künzel, R. Schulz-Friedrich
”Role and regulation of the bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* 6803”
7th International Hydrogenases Conference, Reading, England 2004 (Poster)
13th International Congress on Photosynthesis, Montréal, Québec, Kanada 2004 (Poster)

Danksagung

Für die Unterstützung während meiner Doktorandenzeit gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Stefan Schreiber für seine Förderung und Unterstützung. In seinem Institut für klinische Molekularbiologie durfte ich in einem exzellenten wissenschaftlichen Umfeld eine sehr interessante Themenstellung bearbeiten.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger Schulz für die Betreuung bei dieser Arbeit, das Interesse an meinem Thema, seine konstruktive Kritik sowie für seine hilfreichen Vorschläge.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Philip Rosenstiel für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, die aufschlussreichen Diskussionen, seine wertvollen Anregungen und die Freiheit, meine eigenen Ideen umsetzen zu können.

Des weiteren bedanke ich mich bei Dr. Andreas Till ganz herzlich für seine stetige Diskussionsbereitschaft und seine Hilfe beim Schreiben meiner Doktorarbeit. Die Diskussionen mit ihm haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei Herrn PD Dr. Michael Winkler vom Institut für Infektionsmedizin. Er ermöglichte es mir, problemlos in seiner Arbeitsgruppe mit Viren infizierte Zellkulturen zu bearbeiten.

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

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für klinische Molekularbiologie, insbesondere an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Zellbiologie, für die freundschaftliche und ungezwungene Arbeitsatmosphäre sowie für die mir jederzeit entgegengebrachte Hilfsbereitschaft.

Bei Melanie Schlapkohl, Tanja Kaacksteen, Yasmin Brodtman, Maren Reffelman und Alina Gräff bedanke ich mich für die experimentelle Unterstützung und Tatkraft sowie die unermüdliche Hilfe bei der Suche nach Plasmiden und Chemikalien.

Mein Dank gilt darüber hinaus Dr. Andreas Till, Dr. Gunnar Jacobs und Nils Grabe für das sorgfältige Korrekturlesen.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei meiner Mutter, meinem Bruder sowie meiner Freundin für die Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Eure liebevolle Unterstützung hat entscheidend zum erfolgreichen Abschluss meines Studiums und der Promotion beigetragen.