

**Charakterisierung der CARD-Domäne  
des NOD-*like* Rezeptors NLRC5**

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

vorgelegt von  
**Anna Zaslowski**

Kiel, 2014



Erster Gutachter: Prof. Dr. Joachim Grötzinger

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Axel Scheidig

Tag der mündlichen Prüfung: 18 März 2015

Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Eric Beitz

Prof. Dr. Joachim Grötzinger

Prof. Dr. Axel Scheidig

Prof. Dr. Frank Sönnichsen

Zum Druck genehmigt:

gez. \_\_\_\_\_, Dekan

# INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis .....	III
Zusammenfassung.....	1
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Pattern Recognition Receptors .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 NOD-like-Rezeptoren .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Domänenstruktur .....	4
1.2.2 Aktivierung .....	6
1.2.3 Funktion .....	7
<b>1.3 NLRC5 – Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat CARD domain containing 5 .....</b>	<b>9</b>
1.3.1 Domänenstruktur und Vorkommen.....	9
1.3.2 Funktion .....	10
<b>1.4 CARD – Caspase activation and recruitment domain .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>17</b>
<b>2 MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Puffer und Lösungen .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Nährmedien und Mikroorganismen .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Klonierung der NLRC5 CARD.....</b>	<b>22</b>
2.3.1 Oligonukleotide .....	23
2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion.....	24
2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	25
2.3.4 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	25
2.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA .....	25
2.3.6 Restriktionsverdau und Ligation .....	26
2.3.7 Transformation von <i>E. coli</i> D5H $\alpha$ .....	27
2.3.8 Analyse der hergestellten Vektorkonstrukte .....	27
2.3.9 Amplifizierung und Isolierung von Plasmid-DNA .....	29
<b>2.4 Heterologe Proteinsynthese der NLRC5 CARD in <i>E. coli</i> .....</b>	<b>29</b>
2.4.1 Transformation von <i>E. coli</i> KRX und BL21(DE3) .....	29
2.4.2 Heterologe Proteinsynthese in <i>E. coli</i> .....	30
2.4.3 Anlegen von <i>E. coli</i> Dauerkulturen.....	31
<b>2.5 Reinigung der NLRC5 CARD.....</b>	<b>31</b>
2.5.1 Zellaufschluss und Isolierung der Einschlusskörper .....	31
2.5.2 Affinitätschromatographie unter denaturierten Bedingungen .....	32
2.5.3 Renaturierung der Thioredoxin-CARD .....	32
2.5.4 Konzentration von Proteinlösungen .....	33
2.5.5 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	33

2.5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	34
2.5.7 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen .....	34
2.5.8 Proteolytische Spaltung der Thioredoxin-CARD .....	34
2.5.9 Reinigung der CARD mittels SEC .....	35
2.5.10 Reinigung der CARD mittels RP-HPLC .....	36
<b>2.6 Spektroskopische Untersuchungen der NLRC5 CARD .....</b>	<b>36</b>
2.6.1 CD-Spektroskopie .....	36
2.6.2 NMR-Spektroskopie .....	38
<b>2.7 Identifizierung von Interaktionspartnern der NLRC5 CARD .....</b>	<b>38</b>
2.7.1 Zellaufschluss und Herstellung von Zelllysaten .....	39
2.7.2 Kopplung der Thioredoxin-CARD an die Sepharose .....	41
2.7.3 Inkubation der Sepharose mit Zelllysaten .....	41
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Synthese und Reinigung der rekombinanten NLRC5 CARD .....</b>	<b>43</b>
3.1.1 Synthese der Thioredoxin-CARD in <i>E. coli</i> und Reinigung der Einschlusskörper .....	43
3.1.2 Renaturierung und proteolytische Spaltung der Thioredoxin-CARD .....	46
3.1.3 Reinigung mittels SEC .....	48
3.1.4 Reinigung mittels RP-HPLC .....	50
<b>3.2 Analyse der Sekundärstruktur der NLRC5 CARD .....</b>	<b>51</b>
3.2.1 Untersuchung mittels CD-Spektroskopie .....	51
3.2.2 Untersuchung der Temperaturstabilität .....	52
3.2.3 Erhöhung der Stabilität .....	54
<b>3.3 Analyse der Tertiärstruktur der NLRC5 CARD .....</b>	<b>56</b>
3.3.1 Synthese in Minimalmedium .....	56
3.3.2 Das HSQC-Spektrum .....	57
3.3.3 Stabilität .....	60
<b>3.4 Identifizierung von Interaktionspartnern der NLRC5 CARD .....</b>	<b>63</b>
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>68</b>
<b>5 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>79</b>
Danksagung .....	86
<b>6 ANHANG .....</b>	<b>87</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AD	<i>Acidic transactivation domain</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AMPs	Antimikrobielle Proteine
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BIR	<i>Baculovirus inhibitory repeat</i>
BLS	<i>Bare lymphocyte syndrome</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CACYBP	<i>Calcylin-binding protein</i>
CITA	<i>Class I transactivator</i>
CIITA	<i>Class II transactivator</i>
CARD	<i>Caspase (activation and) recruitment domain</i>
CAPS	Cryopyrin-assoziiertes periodisches Syndrom
CD	Circulardichroismus
CD4+,CD8+	<i>Cluster of differentiation 4+/ 8+</i>
CED-4	<i>Cell death protein 4</i>
COP	<i>CARD-only protein</i>
DAMP	<i>Damage associated molecular patterns</i>
DC	Dendritische Zelle
DD	<i>Death domain</i>
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes H <sub>2</sub> O
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Enk	Enterokinase
GST	<i>Glutathione-S-transferase</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GuHCl	Guanidinhydrochlorid
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
HMGB1	<i>High mobility group protein box 1</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
ICEBERG	<i>Caspase recruitment domain-containing protein 18</i>
INF	Interferon
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LB	<i>Luria Bertoni</i>
LMP2	<i>Low molecular mass protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
β2M	β-2Mikroglobulin
MAMP	<i>Microbe associated molecular pattern</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>

MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MRW	<i>Mean residue weight ellipticity</i>
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
NACHT	<i>Neuronal apoptosis inhibitor protein, Major histocompatibility complex class II transactivator, Plant het gene product involved in vegetative incompatibility, Telomerase-associated protein 1</i>
NAP1L1	<i>Nucleosome assembly protein 1-like 1</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhance of activated B-cells</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLR	<i>NOD-like-Rezeptor/Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing receptor</i>
NLRC5	<i>Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat CARD domain containing 5</i>
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanz</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding and oligomerization domain</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	<i>Pathogen associated molekular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PYD	<i>Pyrin domain</i>
RAIDD	<i>RIP associated Ich-1/CED homologous protein with death domain</i>
RG	Reaktionsgefäß
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene 1</i>
RIP-2	<i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2</i>
RLR	RIG-I-like-Rezeptor
RNA	<i>Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RP-HPLC	<i>Reverse phase high performance liquid chromatography, Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie</i>
R-Protein	Resistenz-Protein
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium lauryl sulfate, Natriumlaurylsulfat</i>
SEC	<i>Size-exclusion chromatography, Größenausschlusschromatographie</i>
SNW1	<i>SNW domain containing 1</i>
STAND	<i>Signal transduction ATPases with numerous domains</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TAP1	<i>Transporter associated with antigen processing 1</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline and Tween 20</i>

TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll- <i>like</i> -Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
ÜN	Über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	<i>Weight/volume</i> , Gewicht/Volumen
YY1	<i>Ying Yang 1</i>

## Zusammenfassung

### Charakterisierung der CARD-Domäne des NOD-like Rezeptors NLRC5

*Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat CARD domain containing 5* (NLRC5) ist ein cytosolischer *Pattern recognition receptor* (PRR), der eine ungewöhnliche Funktion erfüllt. NLRC5 ist nicht nur in Prozesse der angeborenen Immunantwort involviert, was die klassische Funktion von PRRs ist. Seine Hauptaufgabe ist die Transaktivierung von *Major histocompatibility complex* (MHC) Klasse I-Genen. Die Struktur des humanen NLRC5 ist zurzeit nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Effektor-domäne des humanen NLRC5, eine mutmaßliche *Caspase activation and recruitment domain* (CARD), strukturell und funktionell untersucht.

Die humane CARD wurde erfolgreich als Fusionsprotein in *E. coli* synthetisiert und in mehreren Schritten gereinigt. Untersuchungen der gereinigten Domäne mittels CD- und NMR-Spektroskopie zeigten, dass die rekombinante CARD  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturelemente enthält und eine Tertiärstruktur besitzt.

Zurzeit sind keine Interaktionspartner der humanen CARD bekannt. Deshalb wurde die gereinigte Domäne in Form eines Fusionsproteins mit Lysaten aus humanen Zellen inkubiert um anschließend mittels Massenspektrometrie potentielle Bindungspartner zu identifizieren.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse stellen eine Grundlage dar, um die Struktur der humanen CARD von NLRC5 aufzuklären zu können.

## Summary

### **Characterisation of the CARD Domain of the NOD-like Receptor NLRC5**

The cytosolic pattern recognition receptor (PRR) nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat CARD domain containing 5 (NLRC5) has an unusual function. NLRC5 is not only involved in the process of innate immunity, which is the classical function of PRRs. Its major function is the transactivation of major histocompatibility complex (MHC) class I genes. The structure of the human NLRC5 is presently unknown.

The effector domain of the human NLRC5 is predicted to be a caspase activation and recruitment domain (CARD). This domain was structurally and functionally characterised in the present work.

The human CARD was successfully produced in *E. coli* and purified in several steps. Investigations of the purified domain by CD and NMR spectroscopy showed that the recombinant CARD contains  $\alpha$ -helical secondary structural elements and has a tertiary structure.

Interaction partners of the human CARD are presently unknown. Therefore the purified CARD fusion protein was incubated with lysates from human cells and potential binding partners were analysed afterwards by mass spectrometry.

The achieved results in the present work represent a basis for the structural determination of the human NLRC5 CARD.

## 1 EINLEITUNG

Zum Schutz vor Infektionen besitzen Organismen ein Immunsystem. Bei den Vertebraten kann zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem unterschieden werden. Das angeborene Immunsystem reagiert auf Pathogene unspezifisch, d.h. die Informationen zur Abwehr sind im Genom festgelegt und können nicht angepasst werden. Das adaptive Immunsystem dagegen richtet sich spezifisch gegen Pathogene und wird im Laufe des Lebens fortwährend entwickelt. Nach Kontakt mit einem neuen Krankheitserreger entsteht eine spezifische Immunantwort, durch welche das Pathogen gezielt bekämpft wird. Gleichzeitig wird die Information in Form von Gedächtniszellen gespeichert und kann nach erneutem Kontakt mit dem Pathogen schnell abgerufen werden [1].

Die Oberflächen des Organismus, wie z.B. die Haut und Schleimhäute, stellen erste Barrieren dar, die das Eindringen von Krankheitserregern verhindern. Durchbricht ein Pathogen diese Barrieren, wird es als Fremdkörper von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt. Diese bekämpfen den Eindringling, lösen eine Entzündungsreaktion am Infektionsort aus und aktivieren das adaptive Immunsystem, damit dieses bei Bedarf angreifen kann [1].

### 1.1 *Pattern Recognition Receptors*

Das angeborene Immunsystem erkennt Pathogene mit Hilfe von Rezeptoren, den sog. *Pattern recognition receptors* (PRRs). Diese erkennen konservierte Strukturen von Pathogenen, die sog. *Pathogen associated molecular patterns* (PAMPs). Da diese Motive nicht nur bei Pathogenen, sondern bei Mikroben im Allgemeinen konserviert sind, wurde der Begriff auf *Microbe associated molekular patterns* (MAMPs) erweitert. Obwohl PRRs unspezifisch Strukturen von Mikroben erkennen, können sie dennoch die meisten Pathogene identifizieren. Ihre Liganden sind konservierte repetitive Strukturen, wie z.B. das Peptidoglycan der bakteriellen Zellwand, Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien, virale und bakterielle Nukleinsäuren sowie das Flagellin der bakteriellen Flagellen. PRRs erkennen auch Strukturen des

eigenen Organismus, die bei Zellschäden freigesetzt werden, sog. *Damage associated molekular patterns* (DAMPs). PRRs werden von Zellen exprimiert, die im Körper zuerst auf eingedrungene Pathogen treffen. Das sind Immunzellen, wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen (DCs) sowie bestimmte Arten von Epithelzellen [1].

Zur Gruppe der PRRs gehören unter anderem: Rezeptoren der Phagozytose wie der *Scavenger*-Rezeptor, chemotaktische Rezeptoren wie der fMet-Leu-Phe-Rezeptor, sowie Rezeptoren, welche in intrazellulären Signalkaskaden die Produktion von Effektormolekülen der angeborenen Immunantwort induzieren.

Zu der letztgenannten Gruppe gehören die *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs), die *NOD-like*-Rezeptoren (NLRs), die *RIG-I-like*-Rezeptoren (RLRs) und die *C-type-lectin*-Rezeptoren (CLRs). Die Aktivierung dieser Rezeptoren durch MAMPs oder DAMPs führt zur Hochregulierung von Genen der Entzündungsreaktion. Dazu gehören proinflammatorische Cytokine wie Interleukin (IL)-1, IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , Chemokine, Interferone (IFNs) vom Typ I und antimikrobielle Proteine (AMPs) [2].

Die Aktivierung von TLRs und NLRs in Makrophagen und DCs beeinflusst auch das adaptive Immunsystem. Die Art des Liganden bestimmt dabei welche Cytokine und sonstige stimulierende Moleküle produziert werden. Diese wiederum leiten die Art der adaptiven Immunantwort ein, die zur Abwehr des Pathogens benötigt wird.

## **1.2 NOD-like-Rezeptoren**

### **1.2.1 Domänenstruktur**

Die *NOD-like*-Rezeptor(NLR)-Familie wurde um das Jahr 2000 erstmals beschrieben. Die 22 Mitglieder besitzen eine dreigliedrige Domänenstruktur. Zentral liegt die namensgebende *Nucleotide-binding and oligomerization domain* (NOD) [3]. Im N-Terminus befinden sich die *Leucine-rich repeats* (LRRs). Um sowohl die NOD-Domäne als auch die LRR als charakteristische Kennzeichen der Familie hervorzuheben und um weitere Unstimmigkeiten bezüglich der Namensgebung zu vermeiden, wurde

der Proteinfamilie im Jahr 2008 eine neue offizielle Nomenklatur gegeben: *Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing receptors (NLRs)* [4].

Im N-Terminus der NLRs sind unterschiedliche Effektordomänen vorzufinden: *Acidic transactivation domain (AD)*, *Baculovirus inhibitory repeat (BIR)-like domain*, *Caspase (activation and) recruitment domain (CARD)* und *Pyrin domain (PYD)*. Die Mitglieder der NLR-Familie werden entsprechend ihrer Effektordomänen in vier Gruppen unterteilt: NLRA, -B, -C und -P (Abb. 1-1 A) [5].

Das NTP-bindende und -hydrolysierende NOD-Modul von NLRs setzt sich aus drei Einheiten zusammen: der *sog. NACHT-Domäne* und den Subdomänen *NACHT-associated domains (NAD) 1 und 2* (Abb. 1-1 B) [6, 7]. NACHT ist ein Akronym für Mitglieder, in welchen die Domäne ursprünglich gefunden wurde [8].

Die LRR ist eine Region, die sich aus wiederholenden Einheiten zusammensetzt und in der die Aminosäure Leucin besonders oft vorkommt. LRRs vermitteln im Allgemeinen Interaktionen mit anderen Proteinen [9].

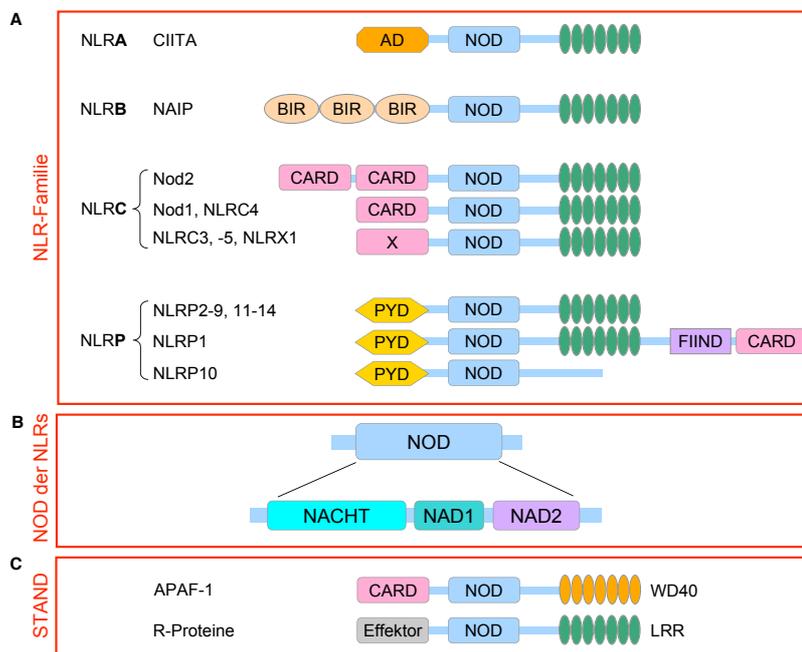


Abb. 1-1: Domänenstruktur der NOD-like-Rezeptor-Familie

**A:** Unterteilung der NLR-Familie in Abhängigkeit von der Art ihrer C-terminalen Effektordomäne(n). Die Effektordomänen von NLRC3, NLRC5 und NLRX1 werden als „untypische“ CARDS oder „CARD-verwandte“ Domänen bezeichnet. **B:** Das NOD-Modul der NLRs besteht aus den drei Subdomänen NACHT, NAD1 und NAD2. **C:** Die STAND-Proteine APAF-1 und die pflanzlichen R-Proteine mit anderen als die hier aufgeführten Effektordomänen. Die einheitlich in ihrer Länge dargestellten LRR- und WD40-Regionen variieren bei einzelnen Proteinen. Die Abb. wurde abgewandelt nach [5].

## 1.2.2 Aktivierung

NLRs gehören zur Gruppe der *Signal transduction ATPases with numerous domains* (STAND) [10]. Zu den STAND-Proteinen zählen auch unter anderem die Resistenz (R) Proteine der pflanzlichen Immunabwehr und das apoptotische Protein *Apoptotic protease activating factor 1* (APAF-1). Diese Proteine haben einen ähnlichen Domänenaufbau mit einem konservierten NOD-Modul (Abb. 1-1 C) [3]. Die NOD der STAND-Proteine bindet NTPs und besitzt NTPase-Aktivität. Außerdem vermittelt die NOD die Assoziierung eines STAND-Proteins zu Oligomeren [11].

Für einige NLRs wurde gezeigt, dass sie bzw. ihre NOD spezifisch ATP binden und ATPase-Aktivität aufweisen [12-16]. NLRP1 dagegen wird durch verschiedene NTPs aktiviert [17]. Eine weitere Ausnahme stellt CIITA (*class II transactivator*) dar, welches GTP bindet [18].

STAND-Proteine fungieren in Prozessen der Signalweiterleitung als molekulare Schalter. Das Modell des Aktivierungsmechanismus basiert auf den Erkenntnissen, die anhand des bereits erforschten APAF-1 gemacht wurden und wird auch für die NLRs angewendet (Abb. 1-2): Nach allgemeiner Auffassung fungiert die LRR der NLRs als Sensordomäne und besitzt autoinhibitorische Funktion, indem sie das inaktive ADP-bindende Monomer stabilisiert. Die Erkennung eines MAMPs/DAMPs über die Sensordomäne führt zu einer Konformationsänderung. Die geschlossene Form wird freigegeben und geht in die offene ATP-bindende aktive Form über. Dies führt zu Assemblierung des NLR über die NOD zu einem Oligomer. Die Effektor-domäne leitet das Signal weiter, indem sie weitere Proteine rekrutiert. Auf diese Weise werden Multiproteinkomplexe aufgebaut. In Analogie zum sog. Apoptosom, welches von APAF-1 aufgebaut wird, spricht man bei den Oligomeren der NLRs von Nodosomen und Inflammasomen [11, 19].

Die Aktivität von gereinigtem *full-length* NLRP1 wurde bereits *in vitro* untersucht. Die Abfolge der Ereignisse entsprach dem vorgeschlagenen Modell und eine ringförmige Proteinstruktur war im Elektronenmikroskop sichtbar [17]. Darüber hinaus verlieren NLRs ihre Funktion sobald eine Mutation im NTP-bindenden Motiv der NOD vorliegt [12-14, 20, 21].

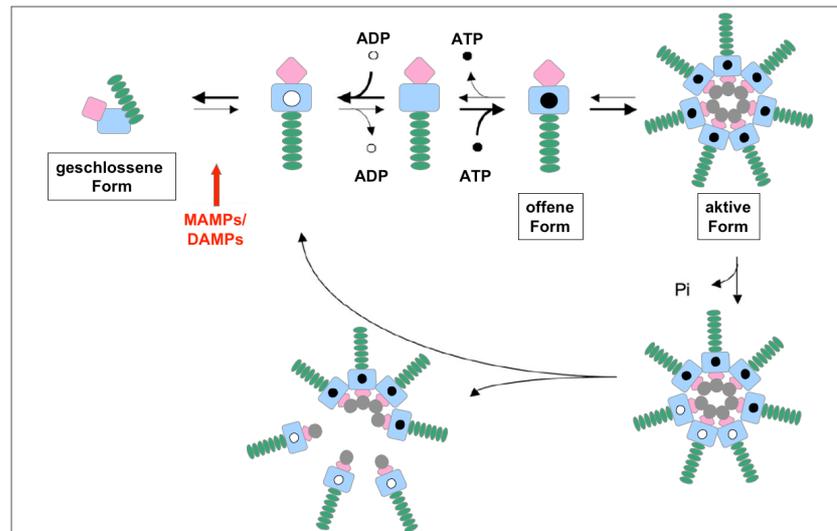


Abb. 1-2: **Aktivierungsmechanismus von NOD-like-Rezeptoren**

Nach Erkennung eines Aktivators wird die geschlossene ATP-bindende Form (aus-Position) des NLRs in die offene aktive Form überführt, wobei ADP gegen ATP ausgetauscht wird (an-Position). Das aktivierte NLR oligomerisiert und stellt eine Plattform dar, die weitere *downstream*-Signalproteine rekrutiert. Die ATP-Hydrolyse schaltet das *Signaling* aus und versetzt das Protein wieder in die aus-Position. Grün = Sensordomäne, blau = NOD, rosa = Effektor-domäne, grau = rekrutiertes Protein. Die Abb. wurde abgewandelt nach [11].

### 1.2.3 Funktion

Die NLRs sind im Cytosol lokalisiert. Sie erkennen sie nicht nur MAMPs von intrazellulären Pathogenen, sondern auch die von extrazellulär lebenden Bakterien, nachdem ihre Bestandteile ins Cytosol befördert wurden [22]. Darüber werden NLRs auch von DAMPs aktiviert und sind somit in der Lage auch auf Gewebeerletzungen oder Gefahrenmoleküle aus der Umwelt zu reagieren und daraufhin eine Immunreaktion einzuleiten [23].

Für einige NLRs wurden bereits ihre MAMPs/DAMPs identifiziert. Eine direkte Interaktion der Liganden mit der LRR-Region wurde bis jetzt jedoch nur für wenige NLRs nachgewiesen. Aus diesem Grund spricht man bei NLRs oftmals von Sensoren statt von Rezeptoren. Nod1 (NLRC1) und Nod2 (NLRC2) binden direkt über ihre LRR-Regionen spezifisch Bausteine der bakteriellen Zellwand. Nod1 wird dabei von D-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure aktiviert und Nod2 von Muramyl-dipeptid [16, 24-29]. NLRX1 bindet direkt über die LRR-Region an RNA [30].

Etwa die Hälfte der vorhergesagten NLRs wurde bis jetzt charakterisiert. NLRs erfüllen Funktionen in der Immunantwort: Sie erkennen Gefahrenmoleküle, aktivieren oder inhibieren inflammatorische Signalwege und regulieren die Antigenpräsentation. Typische Sensoren von MAMPs/DAMPs sind Nod1, Nod2, NLRC4, NLRP1 und NLRP3 [31]. Da Mutationen in den NLR-Genen mit zahlreichen humanen Erkrankungen assoziiert sind, besteht großes Interesse an der Erforschung der NLR-Familie. Dabei handelt es sich oftmals um chronische Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen.

Nod1 und Nod2 bilden nach Aktivierung Nodosomen, was zur Produktion von proinflammatorischen Cytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  führt [32]. Mutationen in der LRR von Nod2 führten zur Veranlagung an Morbus Crohn zu erkranken, einer chronischen Entzündung des gesamten Verdauungstrakts. Dagegen sind Mutationen im NOD-Modul von Nod2 mit dem Blau-Syndrom assoziiert, bei welchem Haut und Gelenke chronisch entzündet [5].

NLRC4, NLRP1 und NLRP3 bilden nach Aktivierung Inflammasome aus. Das Inflammasom besteht aus mehreren Kopien des jeweiligen NLR sowie Caspase-1, welche pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 prozessiert. Die freigesetzten Cytokine fördern die Ausbildung einer Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe [5]. *Gain-of-function* Mutationen in NLRP3 (Cryopyrin) führen zu einem konstitutiv aktiven Inflammasom mit übermäßiger Produktion des entzündungsfördernden Cytokins IL-1 $\beta$ . Die resultierenden Erkrankungen werden als Cryopyrin-assoziiertes periodisches Syndrom (CAPS) bezeichnet. Dabei handelt es sich um Entzündungen, die einen nicht-mikrobiellen Ursprung haben, indem DAMPs in Form von Kristallen oder Aggregaten, die aus beschädigten Zellen stammen, das Inflammasom stimulieren. So kann z.B. die Ablagerung von Harnsäurekristallen in Gelenken zu Aktivierung des Inflammasoms und damit zu chronischen Entzündungen führen, was die Entstehung von Gicht zur Folge haben kann [5, 23].

CIITA und NLRC5 regulieren die Antigenpräsentation [33]. Mutationen in CIITA führen zum *Bare lymphocyte syndrome* (BLS), einem schweren angeborenen Immundefekt.

## 1.3 NLRC5 – *Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat CARD domain containing 5*

### 1.3.1 Domänenstruktur und Vorkommen

#### *Domänenstruktur von NLRC5*

*Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat CARD domain containing 5* (NLRC5, NOD27) weist eine ungewöhnlich lange LRR-Region, eine „untypische“ CARD und ein Kernlokalisationsignal auf (Abb. 1-3). Der Rezeptor ist mit einer theoretischen Größe von 204 kDa das größte Mitglied der NLR-Familie, die im Durchschnitt zwischen 80 kDa und 120 kDa besitzen [34]. Auf mRNA-Ebene wurden bereits mehrere Isoformen von *Nlrc5* vorhergesagt, ihre Existenz auf Proteinebene wurde jedoch bisher nicht bestätigt [35].



Abb. 1-3: **Domänenstruktur von NLRC5**

Zwischen der „untypischen“ CARD und dem NOD-Modul von NLRC5 liegt das zweiteilige Kernlokalisationsignal NLS (*Nuclear localisation signal*).

Phylogenetisch sind die NLR-Mitglieder NLRC5 und *Class II transactivator* (CIITA) am nächsten miteinander verwandt [20, 36]. Eine der CIITA-Isoformen besitzt neben ihrer AD eine zusätzliche N-terminale CARD [37]. Darüber hinaus weisen NLRC5 und CIITA auch funktionelle Ähnlichkeiten auf. Die zwei Rezeptoren sind zum einen die einzigen Mitglieder der NLR-Familie, die ein Kernlokalisationsignal besitzen. Zum anderen benötigen NLRC5 und CIITA eine intakte NOD, um in den Kern zu translozieren und um *Major histocompatibility complex*(MHC)-Gene zu aktivieren [18, 20, 38, 39]. Des Weiteren sind NLRC5 und CIITA in der Lage mit sich selbst zu assoziieren [40, 41].

### ***Vorkommen von NLRC5***

*Nlrc5* wird beim Menschen und bei der Maus in verschiedenen Geweben konstitutiv exprimiert. Die höchsten Mengen an *Nlrc5*-mRNA sind in Organen des Immunsystems wie Milz, Knochenmark und Lymphknoten sowie in der Lunge und im Darm zu finden. [35, 36, 42, 43]. *Nlrc5* wird vorwiegend in Immunzellen exprimiert. Die stärkste Expression von *Nlrc5* erfolgt in Zellen der lymphatischen Reihe: CD4+ T-Zellen, CD8+ T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen. Zellen der myeloiden Reihe wie Monozyten weisen eine mäßige Expression von *Nlrc5* auf [35, 44, 45].

Die Expression von *Nlrc5* wird in besonders hohem Maße durch IFN- $\gamma$  induziert. Jedoch auch Typ I IFNs, IFN- $\alpha$  und - $\beta$ , sowie MAMPs wie LPS oder virale Nukleinsäuren, können die Expression von *Nlrc5* induzieren [20, 35, 36, 43, 44]. Im Falle der MAMPs erfolgt die Induktion von *Nlrc5* sekundär nach autokriner Sekretion von IFNs [43, 44].

### ***Subzelluläre Lokalisation von NLRC5***

NLRC5 ist im Cytosol und im Zellkern lokalisiert, hauptsächlich liegt es jedoch im Cytosol vor. Diese Verteilung besteht sowohl im Grundzustand als auch nach Induktion der Expression von endogenem oder ektopisch überexprimiertem *Nlrc5* [20, 36].

## **1.3.2 Funktion**

### ***Regulation der MHC Klasse I-Genexpression durch NLRC5***

Die Funktion von NLRC5 ist die transkriptionelle Regulation von Genen der Antigenpräsentation- und prozessierung der MHC Klasse I.

Das adaptive Immunsystem bekämpft über den MHC Klasse I-Weg intrazelluläre Pathogene und Tumorzellen. MHC Klasse I-Moleküle werden auf der Oberfläche von kernhaltigen Zellen exprimiert. Ihre Funktion ist die Präsentation von Peptidfragmenten an cytotoxische (CD8+) T-Zellen. Sämtliche cytosolische Proteine der Zelle werden dazu auf der Zelloberfläche auf MHC Klasse I-Komplexen präsentiert. Pathogeninfizierte Zellen oder entartete Tumorzellen exprimieren Proteine, die nicht der physiologischen Proteinzusammensetzung einer gesunden Zelle entsprechen.

Cytotoxische T-Zellen erkennen diese exponierten Antigene und töten die betroffenen Zellen. MHC Klasse I-Komplexe bestehen aus einer variablen „schweren Kette“, die beim Menschen von den *Human leucocyte antigen (HLA)*-Genen codiert wird, und der invariablen  $\beta$ -2Mikroglubulin ( $\beta$ 2M)-Untereinheit [1].

Der NLR CIITA (*Class II transactivator*) ist ein essentieller Transaktivator, sog. „*master regulator*“, von MHC Klasse II-Genen [46]. Mit der Entdeckung von NLRC5 wurde auch der essentielle Faktor zur Regulation der Expression von MHC Klasse I-Genen gefunden [47].

NLRC5 ist für die konstitutive und induzierte Expression von MHC Klasse I-Genen verantwortlich und wird als CITA (*Class I transactivator*) bezeichnet. Es transaktiviert auch das Gen für  $\beta$ 2M sowie weitere Gene, welche in die MHC Klasse I-Antigenprozessierung involviert sind: Die Untereinheit des Immunoproteasoms *Low molecular mass protein (LMP2)* und den Antigentransporter *Transporter associated with antigen processing 1 (TAP1)*, der Antigene ins Endoplasmatisches Retikulum transloziert (Abb. 1-4) [20].

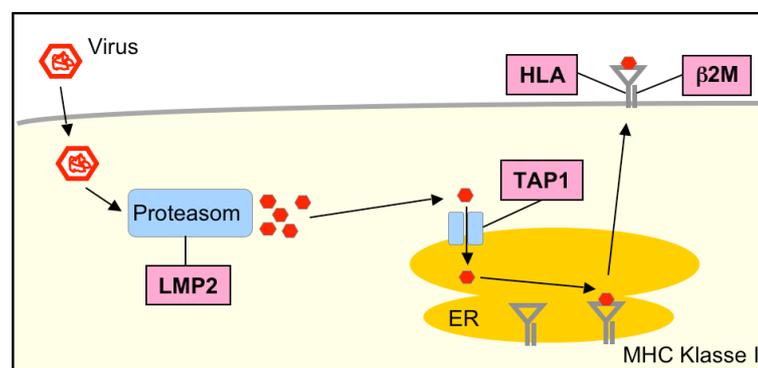


Abb. 1-4: **Antigenpräsentation über den MHC Klasse I-Weg**

Endogene Antigene, z.B. virale Proteine oder Tumorantigene, werden durch das Immunoproteasom in Peptidfragmente zerlegt. Diese werden von dem TAP1-Transporter ins ER überführt. Im ER werden die Antigene auf MHC Klasse I-Moleküle gebunden. Anschließend werden die Antigen-MHC Klasse I-Komplexe zur Zelloberfläche transportiert und an die cytotoxische T-Zellen präsentiert. Genprodukte, die von NLRC5 reguliert werden, sind in Boxen hervorgehoben. Die Abb. wurde abgewandelt nach [47].

Die Funktion von NLRC5 in der Regulation von MHC Klasse I-Genen wurde auch *in vivo* mit *Nlrc5*-defizienten Mäusen bestätigt [44, 45, 48-50]. *Nlrc5*-Knockout-Mäuse zeigen äußerlich keine Auffälligkeiten [50]. Die Organe Milz, Thymus, Niere und Ileum dieser Tiere weisen jedoch Defekte in der Expression von *HLA*,  $\beta$ 2m, *Lmp2* und *Tap1*

auf [48, 49]. Insbesondere in *Nlrc5*-defizienten CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen, aber auch in Antigenpräsentierende Zellen (APCs) sind die Expressionslevel von MHC Klasse I-Genen reduziert [44, 45, 48, 50].

NLRC5 reguliert die MHC Klasse I-Antigenpräsentation und schützt dadurch den Organismus vor Infektionen durch intrazelluläre Pathogene [44, 48, 49]. Mit einem intrazellulär lebenden Bakterium infizierte *Nlrc5*-Knockout-Mäuse haben eine verminderte Fähigkeit das Pathogen zu eliminieren, da in diesen Tieren die Aktivierung, Proliferation und cytotoxische Aktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen eingeschränkt ist [48, 49].

### ***Aktivierungsmechanismus von MHC Klasse I-Genen durch NLRC5***

Der Aktivierungsmechanismus von MHC Klasse II-Genen durch CIITA ist weitestgehend aufgeklärt. Von diesem wurde ein Modell für die Aktivierung von MHC Klasse I-Genen durch NLRC5 abgeleitet (Abb. 1-5): IFN- $\gamma$  und Typ I IFNs aktivieren den *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT)1-Signalweg. Der Transkriptionsfaktor STAT1 induziert die Expression von *Nlrc5* [43]. NLRC5 transloziert in den Zellkern, wo es mit bestimmten Transkriptionsfaktoren assoziiert. Der Multiproteinkomplex stellt das sog. NLRC5- bzw. CITA-*enhanceosome* dar, welches spezifisch an Promotoren von MHC Klasse I-Genen bindet, weitere Transkriptionsfaktoren rekrutiert und die Gene Aktiviert [45, 51].

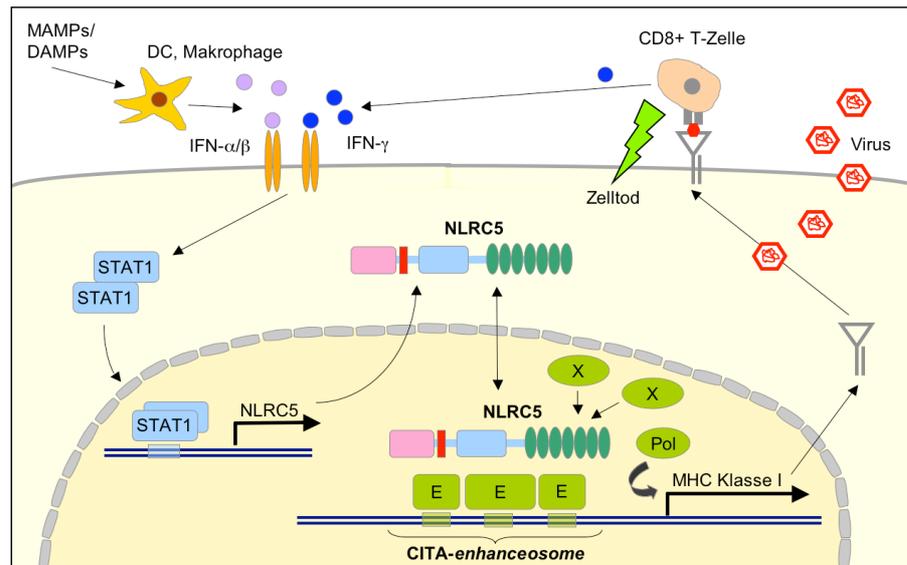


Abb. 1-5: **NLRC5 transaktiviert MHC Klasse I-Gene während der Abwehr von intrazellulären Pathogenen**

DCs und Makrophagen erkennen MAMPs/DAMPs und sezernieren daraufhin Typ I IFNs, welche die Expression von *Nlrc5* über den STAT1-Signalweg induzieren. Im Zellkern ist NLRC5 an der Ausbildung des CITA-*enhanceosome* beteiligt, das an die MHC Klasse I-Promotoren bindet, weitere Transkriptionsfaktoren sowie Chromatin-modifizierende Enzyme (Pol = RNA-Polymerase, X) rekrutiert und die Transkription aktiviert. Nach Infektion der Zelle werden Antigene des Pathogens prozessiert und als Antigen-MHC Klasse I-Komplexe an die cytotoxischen T-Zellen präsentiert, welche die infizierte Zelle töten. Aktivierte cytotoxische (CD8+) T-Zellen setzen IFN- $\gamma$  frei und induzieren somit die Expression von *Nlrc5*. Die Abb. wurde abgewandelt nach [49, 52].

### ***Regulation von inflammatorischen und antiviralen Signalwegen durch NLRC5***

NLRC5 erfüllt in Abhängigkeit von seiner Lokalisation verschiedene Funktionen. Während es im Zellkern die MHC Klasse I-Genexpression reguliert, beeinflusst es im Cytoplasma Signalwege der angeborenen Immunantwort [52]. Diese weiteren Funktionen von NLRC5 sind zurzeit noch nicht vollständig geklärt und Studien liefern zum Teil widersprüchliche Ergebnisse.

NLRC5 inhibiert die antivirale Immunantwort [36, 42, 50]. Es interagiert mit den PRRs *Retinoic acid inducible gene I* (RIG-I) und *Melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA5), die virale RNA im Cytosol erkennen, und hemmt dadurch die Signalwege der Rezeptoren [42]. Andere Studien zeigen, dass NLRC5 die antivirale Immunantwort verstärkt [35, 43].

NLRC5 inhibiert den proinflammatorischen *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B)-Signalweg [36, 42, 50], indem es mit einem Faktor des

Signalwegs interagiert [42]. Diese Aussage wird in andere Studien jedoch widerlegt [35, 45, 49, 53].

NLRC5 hat eine Funktion in der Ausbildung eines Inflammasoms, da es die Prozessierung des Cytokins IL-1 $\beta$  verstärkt und mit den Komponenten des NLRP3-Inflammasoms interagiert [41, 49, 53]. Kumar et al. (2010) konnten dagegen keine Beteiligung von NLRC5 an diversen Inflammasomen feststellen [53].

Erkenntnisse über die Funktion von NLRC5 in der Regulation von MHC Klasse I-Genen sind von besonderer Bedeutung. Sie könnten in der Transplantations- und Tumorbiologie sowie für die Bekämpfung von Infektionskrankheiten angewendet werden [34].

#### **1.4 CARD – *Caspase activation and recruitment domain***

CARD-enhaltende Proteine erfüllen Funktionen in der Apoptose und in der Immunabwehr, wobei sie zu Proteinkomplexen assemblieren [54]. Die CARD bestehen aus ca. 90 bis 100 Aminosäuren und wurde 1997 beschrieben [55]. Sie vermittelt homotypische Protein-(CARD-CARD)-Interaktionen und ist in Rezeptoren/Sensormolekülen, Caspasen, Kinasen, Adapter- und Regulatorproteinen zu finden.

CARD-enhaltende Rezeptoren/Sensorproteinen rekrutieren nach Aktivierung weitere CARD-enhaltende Proteine wie z.B. Pro-Caspasen oder Kinasen (Abb. 1-6).

So bindet APAF-1 das unter apoptotischen Bedingungen freigesetzte Cytochrom c und assembliert mit Pro-Caspase-9 über CARD-CARD-Interaktionen zum Apoptosom. Durch ihre benachbarte Lage werden die Pro-Caspase-9-Moleküle autoaktiviert und aktivieren daraufhin Effektorcaspasen, die wiederum den Zelltod einleiten [56].

Die NLRs NLRC4, NLRP1, NLRP3 bilden Inflammasome. Sie werden durch DAMPs oder MAMPs aktiviert und rekrutieren die inflammatorische Pro-Caspase-1. Diese prozessiert die Cytokinorstufen pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 [57, 58]. Die Freisetzung der proinflammatorischen Cytokine führt zur Ausbildung einer Entzündungsreaktion. NLRC4 interagiert direkt über seine CARD mit der Pro-Caspase-1. Die NLRPs 1 und 3

benötigen dagegen das CARD-enhaltende Adapterprotein *Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD* (ASC) [5].

Nod1 und Nod2 bilden Nodosome, indem sie nach Aktivierung die CARD-enhaltenden Kinase *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2* (RIP-2) rekrutieren. RIP-2 aktiviert proinflammatorische Signalwege, was ebenfalls zu Entzündungsreaktionen führt [59-61].

Die CARD-enhaltenden PRRs RIG-I und MDA5 werden durch intrazelluläre virale RNA aktiviert. Danach assoziieren sie mit dem CARD-enhaltenden Adapterprotein *mitochondrial antiviral-signaling protein* (MAVS), was die antivirale Immunantwort einleitet [2].

Darüber hinaus sind weitere CARD-enhaltende Proteine bekannt, die in apoptotischen und immunologischen Prozessen als Regulatoren agieren, z.B. binden die *CARD-only proteins* (COPs) Caspase-1 und beeinflussen so die Assemblierung von Inflammasomen [62-65].

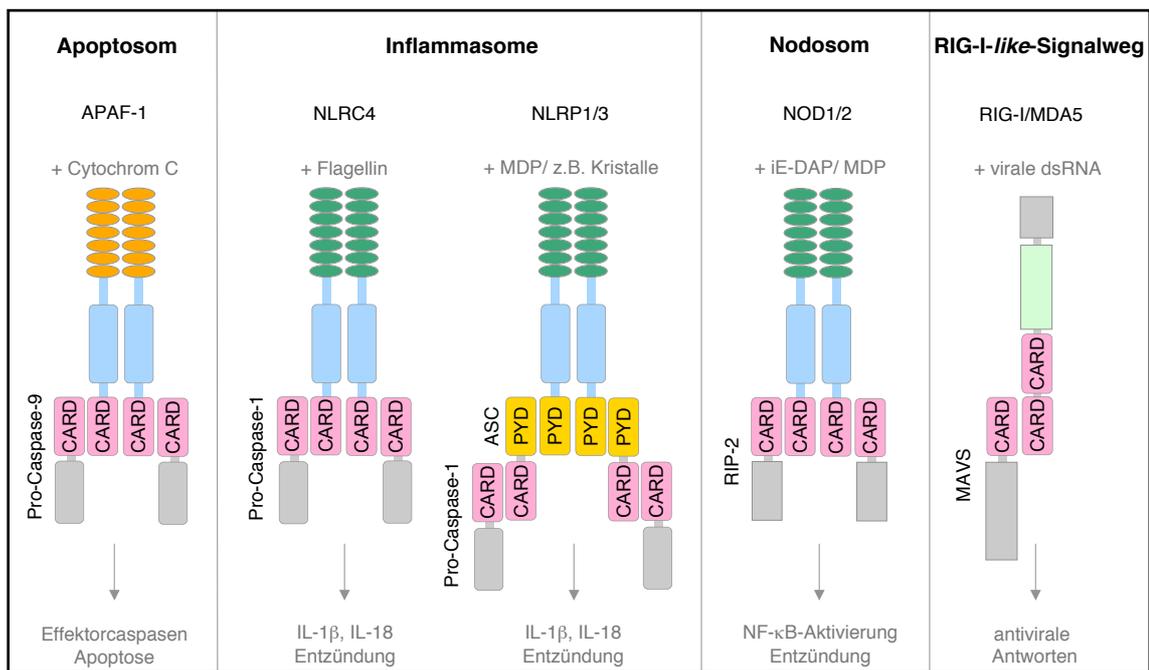


Abb. 1-6: **Multiproteinkomplexe assemblieren durch CARD-CARD-Interaktionen**

Apoptotische und inflammatorische Multiproteinkomplexe wie das Apoptosom, die Inflammasome und Nodosome assemblieren durch homotypische Interaktionen zwischen CARDs und PYDs. Nach Bindung/Erkennung von MAMPs oder DAMPs durch den Rezeptor/Sensor wird ein Multiproteinkomplex assembliert und das spezifische Signal wird weitergeleitet. Die Abb. abgewandelt nach [5, 62].

Die CARD gehört zu der Superfamilie von Proteinen mit einem sog. *death domain* (DD) *fold* [54]. Sie DD-Superfamilie ist eine der größten Klassen von Domänen, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln [66]. Sie beinhaltet vier Gruppen, neben CARD enthält sie auch die PYD der NLRs.

Charakteristisch für die Struktur der CARD ist ihre globuläre Faltung, bestehend aus einem Bündel von 6 amphipathischen  $\alpha$ -Helices. Diese sind antiparallel in einer sog. „*greek key*“-Topologie angeordnet, wobei der hydrophobe Kern der CARDS von konservierten Aminosäuren gebildet wird [66-69].

Die CARD-CARD-Interaktionen beruhen unter anderem auf elektrostatischen Wechselwirkungen: Ein positiv geladener Bereich der einen CARD interagiert mit einem negativ geladenen Bereich der anderen CARD [62, 70]. Dieses Wissen basiert hauptsächlich auf dem strukturell aufgeklärten CARD-CARD-Komplex aus APAF-1 und Pro-Caspase-9 [71].

Bis auf die drei Rezeptoren Nod2, RIG-I und MDA-5, welche zwei CARDS sog. Tandem-CARDS besitzen, weisen die übrigen CARD-enthaltenden Proteine jeweils nur eine CARD auf. Einige Proteine deren CARD strukturell aufgeklärt wurde sind in Tab. 1-1 aufgelistet.

Tab. 1-1: **Strukturen von CARDS**

<b>Proteinfamilie bzw. Funktion</b>	<b>Proteine mit CARD(s)</b>
Apoptose	APAF-1 [67, 71-73], <i>Cell death protein 4</i> (CED-4) [74], Pro-Caspase-9 [71, 75]
NLRs	Nod1 [76-78], NLRP1 [69]
RIG-I-like-Signalweg	RIG-I [79, 80], MAVS [81]
Adapterproteine	<i>RIP associated Ich-1/CED homologous protein with death domain</i> (RAIDD) [82], ASC [83]
Regulatorproteine	<i>Caspase recruitment domain-containing protein 18</i> (ICEBERG) [68], CARD8 [84]

Einige Effektor-domänen der NLRs wurden bereits strukturell aufgeklärt: Die CARDS von Nod1 und NLRP1, sechs PYDs verschiedener NLRPs sowie eine der BIR-Domänen von NAIP. Letztere weist jedoch keinen *DD-fold* auf [85].

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Struktur der N-terminalen Effektor-domäne des humanen NLRC5 aufgeklärt werden. Basierend auf Sequenzalignments weist die NLRC5 CARD eine geringe Ähnlichkeit zu anderen CARD-Domänen auf und wird deshalb als eine untypische CARD bezeichnet [19, 36, 86]. *Albrecht und Takken* (2006) wiederum bezeichnen die Domäne als eine klassische CARD, die evolutionär mit anderen CARD-Domänen verwandt ist [7]. Die strukturelle Untersuchung der humanen NLRC5 CARD sollte klären, ob die Domäne tatsächlich eine untypische Tertiärstruktur besitzt, und dabei helfen die Funktion der Domäne besser zu verstehen.

NLRC5 ist ein Transaktivator von MHC Klasse I-Genen und erfüllt Funktionen in der angeborenen Immunabwehr. Die Funktion der CARD während dieser Prozesse ist nicht vollständig geklärt und Interaktionspartner dieser mutmaßlichen Protein-Protein-bindenden Domäne sind unbekannt. Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Arbeit potentielle Interaktionspartner der humanen CARD von NLRC5 identifiziert werden, was Aufschluss über die Funktion der CARD geben sowie Rückschlüsse auf die Funktion des NLRC5 erlauben würde.

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Carl Roth GmbH & Co. KG, AppliChem GmbH und Sigma-Aldrich GmbH bezogen.

### 2.1 Puffer und Lösungen

#### Lagerung von DNA

##### **Tris-HCl-Puffer**

50 mM, pH 8,0

#### DNA-Gelelektrophorese

##### **1x TBE-Puffer**

89 mM Tris

89 mM Borsäure

2 mM EDTA, pH 8,0

##### **Agarosegel**

0,6-1 % Agarose

ad 100 ml TBE-Puffer

##### **6x DNA-Ladepuffer**

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylencyanol FF

30 % Glycerol

#### SDS-PAGE

##### **1x SDS-PAGE-Laufpuffer**

25 mM Tris-HCl

192 mM Glycin

0,1 % SDS

pH 8,6

##### **5x SDS-PAGE-Ladepuffer (Lämmli-Puffer)**

**reduzierend/nicht-reduzierend**

3,2 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8

1,5 g SDS

4,3 ml Glycerol

Spatelspitze Bromphenolblau

+ / - 2,5 ml  $\beta$ ME

ad 10 ml dH<sub>2</sub>O

Tab. 2-1: **Zusammensetzung für ein Polyacrylamidgel der Gelstärke 1 mm**

Stammlösung	15 %iges Trenngel	10 %iges Trenngel	7,5 %iges Sammelgel
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	-	0,62 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,6)	1,5 ml	1,5 ml	-
Acrylamid/	3 ml	2 ml	0,62 ml
Bisacrylamid 30/0,8 %			
dH <sub>2</sub> O	1,37 ml	2,37 ml	1,2 ml
SDS 10 %	60 µl	60 µl	25 µl
APS 10 %	60 µl	60 µl	25 µl
TEMED	3 µl	3 µl	3 µl

Coomassie-Färbung**Coomassie-Färbelösung**

25 % Methanol (v/v)  
 10 % Eisessig (v/v)  
 0,1 % Coomassie-G250 (w/v)

**Coomassie-Entfärber**

10 % Methanol (v/v)  
 10 % Eisessig (v/v)

Colloidal-Coomassie-Färbung500 ml **Fixierlösung**

250 ml Methanol  
 10 ml Phosphorsäure  
 240 ml dH<sub>2</sub>O

500 ml **Äquibrierungslösung**

10 ml Phosphorsäure  
 305 ml dH<sub>2</sub>O  
 170 ml Methanol  
 85 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 > (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zuletzt unter Rühren hinzufügen

500 ml **Colloidal-Coomassie-Färbelösung**

0,2 g Coomassie-G250  
 170 ml Methanol  
 10 ml Phosphorsäure  
 305 ml dH<sub>2</sub>O  
 85 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 > Coomassie-G250 in Methanol lösen, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zuletzt unter Rühren hinzufügen

Isolierung von Einschlusskörperchen

<b>1x PBS</b>	<b>1x PBS, 0,2 % Tween</b>	<b>Disaggregationspuffer</b>
137 mM NaCl	137 mM NaCl	50 mM Tris-HCl
2,7 mM KCl	2,7 mM KCl	6 M GuHCl (< 99,7 %)
10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 mM TCEP
1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 8,0
pH 7,2	0,2 % Tween	
	pH 7,2	

Denaturierende Affinitätschromatographie

<b>Waschpuffer 1</b>	<b>Waschpuffer 2</b>	<b>Elutionspuffer</b>
50 mM Tris-HCl	50 mM Tris-HCl	50 mM Tris-HCl
6 M GuHCl	6 M GuHCl (≥ 99,7 %)	6 M GuHCl (≥ 99,7 %)
6 mM TCEP	6 mM TCEP	250 mM Imidazol
pH 8,0	pH 8,0	6 mM TCEP
		pH 8,0

Renaturierung

**Renaturierungspuffer**

50 mM Tris  
100 mM NaCl  
0,05 mM TCEP  
pH 8,0 bei 4°C

Größenausschlusschromatographie (Size-exclusion chromatography, SEC)

**SEC-Puffer**

50 mM Tris  
100 mM NaCl  
0,15 mM TCEP  
pH 8,0 bei 4°C

Reversed phase-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

Wasser mit 0,1 % Trifluoressigsäure (Carl Roth GmbH & Co)

Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure (Carl Roth GmbH & Co)

Identifizierung von Interaktionspartnern

**Lysepuffer 1**

PBS (pH 7,2)

2 mM EDTA

5 mM DTT<sup>#</sup>

Proteaseinhibitoren\*<sup>#</sup>

**Lysepuffer 2**

50 mM Tris

150 mM NaCl

2 mM EDTA

0,5 % Triton X-100

5 % Glycerol

5 mM DTT<sup>#</sup>

Proteaseinhibitoren\*<sup>#</sup>

\*complete EDTA-free (Roche)

<sup>#</sup> Zugabe kurz vor Verwendung des Puffers

Western Blot

**Transferpuffer**

25 mM Tris-HCl

186 mM Glycin

20 % Methanol

**TBS-Puffer**

50 mM Tris-HCl

200 mM NaCl

pH 7,2

**TBST-Puffer**

50 mM Tris-HCl

200 mM NaCl

0,05 % Tween

pH 7,2

## 2.2 Nährmedien und Mikroorganismen

Nährmedien

**LB-Medium, (LB-Agarplatten)**

25 g LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl)

ad 1 l dH<sub>2</sub>O

(12 g Agar-Agar, bakteriologisch pro 1 l)

> Autoklavieren,

nach Abkühlen Zugabe von 2 ml Ampicillin (50 mg/ml in 50 % EtOH)

**M9-Minimalmedium**

7,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 2 H<sub>2</sub>O  
 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 2 g NaCl  
 ad 1 l dH<sub>2</sub>O  
 > Autoklavieren, Zugabe von:  
 0,41 g MgCl<sub>2</sub> • 6 H<sub>2</sub>O  
 1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> • SO<sub>4</sub>  
 1,98 g α-D(+)-Glucose • H<sub>2</sub>O  
 1,5 ml Biotin (0,1 mg/ml in dH<sub>2</sub>O)  
 1,5ml Thiamin (1 mg/ml in H<sub>2</sub>O)  
 1 ml Carbenicillin-Dinatriumsalz  
 (100 mg/ ml in H<sub>2</sub>O)

**<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N-M9-Minimalmedium**

7,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 2 H<sub>2</sub>O  
 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 2 g NaCl  
 ad 1 l dH<sub>2</sub>O  
 > Autoklavieren, Zugabe von:  
 0,247 g MgSO<sub>4</sub>  
 0,817 g <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl  
 1,86 g α-D(+)-<sup>13</sup>C-Glucose  
 1,5 ml Biotin (0,1 mg/ml in dH<sub>2</sub>O)  
 1,5ml Thiamin (1 mg/ml in H<sub>2</sub>O)  
 1 ml Carbenicillin-Dinatriumsalz  
 (100 mg/ ml in H<sub>2</sub>O)

Mikroorganismen

Tab. 2-2: **Verwendete *Escherichia coli* Stämme**

<i>E. coli</i> Stamm	Anwendung, Eigenschaften
DH5α	Vervielfältigung von Plasmiden
KRX, BL21(DE3), C43(DE3)	Proteinsynthese; schützt rekombinantes Protein vor Proteasen
Origami(DE3)	Proteinsynthese; erlaubt die Ausbildung von Disulfidbrücken im Cytoplasma
Rosetta(DE3)	Proteinsynthese; erhöht die Expression von Proteinen, die seltene Codons enthalten
BLR(DE3)	Proteinsynthese; stabilisiert Plasmide, die repetitive Sequenzen enthalten

**2.3 Klonierung der NLRC5 CARD**

Die kodierende Sequenz der CARD von NLRC5 wurde in den Expressionsvektor pET32a(+) (Novagen – Merck Millipore) kloniert. Dieser ermöglicht die Expression des

*gene of interest* als ein Fusionsprotein mit dem Thioredoxin und dem His-tag am N-Terminus. Um das Thioredoxin proteolytisch abspalten zu können, wurde zusätzlich eine Schnittstelle für die Endoprotease Enterokinase (Invitrogen AG – Life Technologies AG) eingefügt. Die Domänenstruktur des Fusionsproteins (Thioredoxin-CARD) ist in Abb. 2-1 dargestellt. Die Vektorkarte des pET32(+) ist im Anhang zu finden (Abb. 6-1).

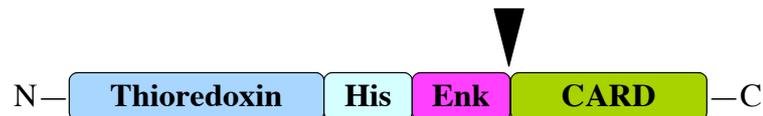


Abb. 2-1: Domänenstruktur von Thioredoxin-CARD

Im N-Terminus befindet sich das Thioredoxin gefolgt von dem His-tag (His) und der Schnittstelle für die Enterokinase (Enk), welche C-terminal von ihrer Erkennungssequenz (schwarzes Dreieck) spaltet.

### 2.3.1 Oligonukleotide

Die Oligonucleotide (Primer) zur Amplifizierung der CARD wurden von Metabion International AG synthetisiert. Die Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) der Primer wurden mit dem *online*-Programm von Sigma-Aldrich berechnet. Der *forward*-Primer besitzt am 5'-Ende einen Überhang, der eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bg*III (Fermentas – Thermo Scientific) sowie die Erkennungssequenz für die Enterokinase enthält. Der Überhang des *reverse*-Primers enthält am 5'-Ende die Restriktionsschnittstelle für *Hind*III (Fermentas – Thermo Scientific) sowie ein Stopcodon.

Schutzbasen-*Bg*III-Enk-CARD *forward*-Primer

5' GAAGATCTGACGACGACGACAAGATGGACCCCGTTGGC 3'

39 bp,  $T_m$  79 °C (15 bp,  $T_m$  60 °C)

Schutzbasen-*Hind*III-Stop-CARD *reverse*-Primer

5' CCCAAGCTTCTAACTCAGCAGCAGCACCTCC 3'

31 bp,  $T_m$  75 °C (19 bp,  $T_m$  66 °C)

### 2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) zur Amplifizierung der kodierenden Sequenz der CARD wurde nach dem unten aufgeführten Schema mit der *Pfu*-DNA-Polymerase (Fermentas – Thermo Fischer Scientific) in einem Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Als Matrize diente ein Plasmid, welches die kodierende Sequenz des NLRC5 enthielt. Diese wurde von der Firma GENEART AG synthetisiert. Nach Durchführung der PCR wurde der PCR-Ansatz elektrophoretisch überprüft (2.3.3).

#### PCR-Ansatz:

	Endkonzentration ( $\mu$ l)
10x <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase-Puffer + MgSO <sub>4</sub>	1x (5 $\mu$ l)
dNTP-Mix*	0,2 mM je dNTP (1 $\mu$ l)
<i>forward</i> -Primer	2 $\mu$ M (1 $\mu$ l einer 100 $\mu$ M Lösung)
<i>reverse</i> -Primer	2 $\mu$ M (1 $\mu$ l einer 100 $\mu$ M Lösung)
Matrize (Plasmid mit NLRC5-Sequenz)	500 ng
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	2,5 U (1 $\mu$ l)
ad 50 $\mu$ l dH <sub>2</sub> O	

#### PCR-Programm:

	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
2x Schritte 2. bis 4.		
2. Denaturierung	95 °C	30 sek
3. <i>Annealing</i>	55 °C	30 sek
4. <i>Extension</i>	72 °C	150 sek
25x Schritte 5. bis 7.		
5. Denaturierung	95 °C	30 sek
6. <i>Annealing</i>	69 °C	30 sek
7. <i>Extension</i>	72 °C	150 sek
8. <i>Finale extension</i>	72 °C	5 min

### 2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten in 6x DNA-Ladepuffer erfolgte mittels 0,8-1 %iger Agarosegele in TBE-Puffer in einer Elektrophoresekammer (Bio-Rad). Die Elektrophorese wurde für ca. 1 h bei 100 V durchgeführt. Das Agarosegel wurde in einem Ethidiumbromidbad für ca. 30 min inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend im Gel mittels eines UV-Transilluminators (Biometra) bei einer Wellenlänge von 312 nm detektiert.

### 2.3.4 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten (PCR-Produkte und Plasmide) aus Agarosegelen wurde das DNA-Gemisch mittels Elektrophorese getrennt gefolgt von Detektion der DNA mit Ethidiumbromid (2.3.3). Das gewünschte DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell auf einem UV-Tisch (Biometra) bei einer Wellenlänge von 312 nm aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die Gelextraktion erfolgte mit dem „*PCR clean-up Gel extraction*“-Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) nach Angaben des Herstellers, wobei die DNA mit 50 mM Tris (pH 8,0) oder dH<sub>2</sub>O von der Säule eluiert wurde.

### 2.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration einer DNA-Lösung (gereinigte PCR-Produkte oder Plasmide) wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei der Wellenlänge von 260 nm mit dem Spektralphotometer „NanoDrop“ (Peqlab Biotechnologie) bestimmt. Die Formel zur Berechnung der DNA-Konzentration lautet:  $c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$  (V: Verdünnungsfaktor, F: Multiplikationsfaktor 50 für dsDNA). Verunreinigungen der DNA-Lösung durch Proteine wurden aus dem Verhältnis der Absorptionen bei  $\lambda$  260 nm zu  $\lambda$  280 nm ermittelt.

### 2.3.6 Restriktionsverdau und Ligation

**Restriktionsverdau von PCR-Produkt und Plasmid:** Das PCR-Produkt wurde gerichtet über die Schnittstellen *Bgl*III und *Hind*III in den Vektor pET32a(+) kloniert. Ca. 8  $\mu$ g des gereinigten PCR-Produkts und 5  $\mu$ g des pET32a(+)-Vektors wurden in einem Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *Bgl*III und *Hind*III ÜN bei 37 °C in einem Heizblock (Thermomixer *compact*, Eppendorf) inkubiert und elektrophoretisch getrennt (2.3.3). Die DNA-Banden des PCR-Produkts und des linearisierten Vektors wurden aus dem Gel extrahiert (2.3.4). Der linearisierte und gereinigte Vektor wurde mit der alkalischen Phosphatase (*FastAP*) (Fermentas – Thermo Fischer Scientific) für 10 min bei 37 °C dephosphoryliert, das Enzym wurde anschließend deaktiviert. Die Konzentration der DNA-Fragmente wurde photometrisch bestimmt (2.3.5).

#### Restriktionsverdau von dem PCR-Produkt und dem pET32a(+)-Vektor:

	PCR-Produkt	pET32a(+)
PCR-Produkt/pET32a(+)	8 $\mu$ g	5 $\mu$ g
10x R(red)-Puffer	1x (5 $\mu$ l)	1x (5 $\mu$ l)
<i>Bgl</i> III (10 U/ $\mu$ l)	20 U (2 $\mu$ l)	20 U (2 $\mu$ l)
<i>Hind</i> III (10 U/ $\mu$ l)	20 U (2 $\mu$ l)	20 U (2 $\mu$ l)
dH <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l	ad 50 $\mu$ l
	> 37 °C, ÜN	> 37 °C, ÜN

#### Dephosphorylierung des linearisierten pET32a(+)-Vektors:

pET32a(+) prozessiert mit <i>Bgl</i> III & <i>Hind</i> III	1 $\mu$ g (18 $\mu$ l)
10x Fast AP-Puffer	1x (2 $\mu$ l)
Alkalische Phosphatase (1 U/ $\mu$ l)	1,5 U (1,5 $\mu$ l)
	> 10 min, 37 °C
	> 10 min, 75 °C

**Ligation:** Für die Ligation wurden das prozessierte und gereinigte PCR-Produkt sowie der linearisierte, gereinigte und dephosphorylierte Vektor eingesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 1 h bei 22 °C und anschließend ÜN bei 4 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, welcher nur den geschnittenen Vektor, Puffer und

die T4-DNA-Ligase (Fermentas – Thermo Fischer Scientific) jedoch nicht das PCR-Produkt enthielt.

Ligation des PCR-Produkts mit dem pET32a(+)-Vektor:

PCR-Produkt prozessiert mit <i>Bgl</i> III & <i>Hind</i> III	100 ng
pET32a(+)linearisiert mit <i>Bgl</i> III & <i>Hind</i> III	25 ng
10x T4-DNA-Ligase-Puffer	1x (2 $\mu$ l)
T4-DNA-Ligase	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l
> 1 h, 22 °C und ÜN, 4°C	

### 2.3.7 Transformation von *E. coli* D5H $\alpha$

50  $\mu$ l chemisch kompetente *E. coli* D5H $\alpha$ -Zellen (hergestellt im Labor von Herrn Prof. Dr. Joachim Grötzinger) wurden auf Eis aufgetaut. 9  $\mu$ l des Ligationsansatzes (2.3.6) wurden zu den Zellen gegeben, der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und die Zellen wurden 10-30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 sek bei 42 °C in einem Heizblock. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt, mit 450  $\mu$ l RT-warmen LB-Medium versetzt und für 30 min bei 37 °C und leichtem Schütteln in einem Heizblock inkubiert. Die Zellsuspension wurde für 2 min bei 8000 x g in einer Tischzentrifuge (Heraeus Fresco21, Thermo Scientific) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 200  $\mu$ l LB-Medium aufgenommen. 10  $\mu$ l, 50  $\mu$ l und 100  $\mu$ l der Zellsuspension wurden jeweils auf LB-Agarplatten ausplattiert und ÜN bei 37 °C in einem Brutschrank (WTC Binder) inkubiert. Am folgenden Tag wurde Zellmaterial von 10 Kolonien für eine Kolonie-PCR verwendet (2.3.8).

### 2.3.8 Analyse der hergestellten Vektorkonstrukte

Der Nachweis für eine erfolgreiche Klonierung des PCR-Produkts in den pET32a(+)-Vektor erfolgte mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung. Dazu wurden 10 Kolonien mittels Kolonie-PCR untersucht, indem Zellmaterial einer Kolonie mit einer

Pipettenspitze abgenommen, zunächst strichförmig auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen und anschließend in einen vorgelegten PCR-Reaktionsansatz überführt wurde. Die LB-Agarplatte wurde ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Die PCR wurde mit den Klonierungs-Primern (2.3.1) und der *GoTaq*-DNA-Polymerase (Promega) nach dem unten aufgeführten Schema in einem Thermocycler durchgeführt. Das Kolonie-PCR-Reaktionsprodukt wurde elektrophoretisch getrennt und die DNA wurde detektiert (2.3.3).

PCR-Ansatz:

	<b>Pro Kolonie, Endkonzentration (µl)</b>
5x <i>GoTaq</i> -DNA-Polymerase-Puffer	1x (10 µl)
MgCl <sub>2</sub>	25 mM (5 µl)
dNTP-Mix*	0,2 mM je dNTP (1 µl)
<i>forward</i> -Primer	2 µM (1 µl einer 100 µM Lösung)
<i>reverse</i> -Primer	2 µM (1 µl einer 100 µM Lösung)
<i>GoTaq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	1,25 U (0,25 µl)
dH <sub>2</sub> O	ad 50 µl
Kolonie von einer LB-Agarplatte	1x

PCR-Programm:

	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
1. Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
2x Schritte 2. bis 4.		
2. Denaturierung	95 °C	30 sek
3. <i>Annealing</i>	69 °C	30 sek
4. <i>Extension</i>	72 °C	100 sek
5. <i>Finale extension</i>	72 °C	5 min
6. Pause	4 °C	∞

Zwei positive Klone, mit deren Zellmaterial ein DNA-Fragment gewünschter Größe amplifiziert wurde, wurden für die anschließende Sequenzierung ausgewählt. Dazu wurde das Zellmaterial der jeweiligen Klone von der Agarplatte entnommen und für die Plasmidisolierung verwendet (2.3.9). Die Sequenzierung wurde von der Firma GATC

Biotech AG durchgeführt. Dabei wurden pET32a(+)-spezifische Primer verwendet, welche das PCR-Produkt am 5'- und 3'-Ende flankierten.

### 2.3.9 Amplifizierung und Isolierung von Plasmid-DNA

Die Amplifizierung von Plasmid-DNA erfolgte in unterschiedlich großen Maßstäben. Von einer *E. coli* Kolonie wurde Zellmaterial mit einer Pipettenspitze entnommen, in ein Reaktionsgefäß (RG) oder ein Kolben mit LB-Medium überführt und ÜN bei 37 °C bei 180 UpM in einem Schüttelinkubator (Multitron Standard, Infors) inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Plasmid-DNA mit dem entsprechenden Plasmidreinigungs-Kit nach Angaben des Herstellers isoliert (Tab. 2-3).

Tab. 2-3: **Amplifizierung von Plasmiden**

	<b>Mini-Prep</b>	<b>Midi-Prep</b>	<b>Maxi-Prep</b>
LB-Medium [Vol]	2 ml	150 ml	350 ml
Inkubationsgefäß	13 ml-RG	350 ml-Kolben	1 l-Kolben
Plasmidreinigungs-Kit	<i>NucleoSpin Plasmid*</i>	<i>PureYield Plasmid Midiprep System**</i>	<i>NucleoBond PC*</i>

\* Macherey-Nagel, \*\*Promega

## 2.4 Heterologe Proteinsynthese der NLRC5 CARD in *E. coli*

### 2.4.1 Transformation von *E. coli* KRX und BL21(DE3)

Die Transformation der *E. coli* Expressionsstämme KRX und BL21 (DE3) wurde wie unter 2.3.7 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden jedoch die chemisch kompetenten Zellen mit 0,5-1  $\mu$ l (ca. 0,5-3  $\mu$ g) der Plasmidlösung versetzt. Des Weiteren wurden 10  $\mu$ l der Zellsuspension auf eine LB-Agarplatte ausplattiert.

### 2.4.2 Heterologe Proteinsynthese in *E. coli*

#### *Proteinsynthese in Vollmedium*

Die heterologe Synthese der Thioredoxin-CARD erfolgte in dem *E. coli* Stamm KRX in LB-Medium. Eine 150 ml-Vorkultur wurde in einem 350 ml-Schikanekolben mit Zellmaterial angeimpft und ÜN bei 37 °C und 180 UpM im Schüttelinkubator inkubiert. Dabei wurde entweder Zellmaterial einer frisch transformierten Kolonie von einer Agarplatte oder Zellmaterial von einer Dauerkultur (2.4.3) eingesetzt. Am folgenden Tag wurde die OD<sub>600</sub> der Zellsuspension mit einem Spektralphotometer (Hitachi, Tokio, Japan) bestimmt. Eine 1 l-Hauptkultur wurde mit der Vorkultur in einem 2 l-Schikanekolben angeimpft, so dass die resultierende Zellsuspension der Hauptkultur eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,08 aufwies. Diese wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von 0,1 % L-Rhamnose-Monohydrat (Promega) für 3 h bei 37 °C und 180 UpM.

Für Testexpressionen wurden 150 ml-Hauptkulturen in 350 ml-Schikanekolben mit jeweils 4 ml einer Vorkultur angeimpft. Die Induktion der Genexpression erfolgte in Abhängigkeit von dem eingesetzten *E. coli* Stamm mit 1 mM IPTG oder mit 0,1 % L-Rhamnose-Monohydrat.

#### *Proteinsynthese in Minimalmedium*

Für die Herstellung der <sup>13</sup>C und <sup>15</sup>N-markierten Thioredoxin-CARD wurde das rekombinante Protein in dem *E. coli* Stamm BL21(DE3) in M9-Minimalmedium synthetisiert. Das Medium enthielt <sup>13</sup>C und <sup>15</sup>N als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquellen. Einen Tag vor der Synthese des rekombinanten Proteins wurden die BL21(DE3)-Zellen mit dem Plasmid pET32a(+)-CARD transformiert. Mit diesem Material wurden am folgenden Morgen vier 2 ml-Vorkulturen in 13 ml-RGs angeimpft und bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Ca. 8 h später wurden 400 ml einer zweiten Vorkultur in einem 1 l-Schikanekolben mit 8 ml der ersten Vorkultur angeimpft und ÜN bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die OD<sub>600</sub> der Zellsuspension gemessen. Eine 1 l-Hauptkultur in einem 2 l-Schikanekolben wurde mit der zweiten Vorkultur angeimpft, so dass die Hauptkultur zu Beginn eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,08 aufwies. Die Genexpression wurde bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,7 durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert, nach 2 h wurden die Zellen geerntet.

Die Testexpression wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Dabei wurde jedoch nicht-isotopenmarkiertes M9-Minimalmedium verwendet.

### **2.4.3 Anlegen von *E. coli* Dauerkulturen**

50  $\mu$ l einer *E. coli* Kultur, KRX oder BL21(DE3), wurden mit 450  $\mu$ l Glycerol versetzt, durchmischt und bei -80 °C eingefroren.

## **2.5 Reinigung der NLRC5 CARD**

### **2.5.1 Zellaufschluss und Isolierung der Einschlusskörper**

#### *Ernte der Zellen und Zellaufschluss*

*E. coli* Zellen einer 1 L-Kultur wurden unmittelbar nach Beendigung der Expression geerntet. Dazu wurden die Zellen für 10 min bei 8000 x g und 4 °C sedimentiert (RC-5B, Sorvall). Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment wurde in 35 ml PBS (pH 7,2) bzw. 50 mM Acetatpuffer (pH 5) mit einem kleinen Spatel resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen, indem die Zellsuspension dreimal für 1 min mit 35-40% Ultraschall (Sonoplus, Bandelin electronic) auf Eis behandelt wurde. Zwischen den einzelnen Ultraschallbehandlungen wurde die Probe für jeweils 5 min auf Eis abgekühlt. Das Zellysate wurde bei 40000 x g und 4 °C für 45 min zentrifugiert (Ser 92E2367, Beckman), der Überstand wurde verworfen und aus dem Sediment wurden die Einschlusskörperchen isoliert.

#### *Isolierung der Einschlusskörper*

Das Sediment der aufgeschlossenen Zellen wurde in 35 ml PBS (pH 7,2), 0,2 % Tween bzw. 50 mM Acetatpuffer (pH 5), 0,2 % Tween resuspendiert, für 1 min mit 35-40% Ultraschall auf Eis behandelt und für 45 min bei 40000 x g und RT zentrifugiert. Diese Prozedur wurde zweimal mit PBS (pH 7,2) bzw. 50 mM Acetatpuffer (pH 5) wiederholt. Das finale Sediment wurde in Disaggregationspuffer aufgenommen und auf einem Rollenmischgerät (Hecht Assistent RM5) ÜN bei RT inkubiert. Ein Sediment,

das aus einer 1 l-Zellkultur gewonnen wurde, wurde in ca. 4-8 ml Disaggregationspuffer gelöst. Am folgenden Tag wurde die Probe für 45 min bei 20000 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Polypeptidketten.

### **2.5.2 Affinitätschromatographie unter denaturierten Bedingungen**

Die Reinigung der Thioredoxin-CARD erfolgte mittels immobilisierter Metallchelat-Affinitätschromatographie. Für das rekombinante Protein, welches aus einer 1 l-Zellkultur isoliert wurde, wurden ca. 0,5-1 ml NTA-Agarose (*slurry* 50 %, QIAGEN) verwendet. Die NTA-Agarose wurde in ein 15-ml RG überführt und äquilibriert, indem sie zweimal mit ca. 2-3 ml Waschpuffer 1 gewaschen wurde. Dazu wurde die NTA-Agarose in dem Waschpuffer 1 resuspendiert, mehrfach vorsichtig invertiert und für 3 min in einer Zentrifuge mit einem *swingout*-Rotor (Sigma 4-16K) bei 100 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Die äquilibrierte NTA-Agarose wurde mit den Polypeptidketten in Disaggregationspuffer für 1-3 h bei RT bzw. ÜN bei 4 °C auf einem Rollenmischgerät inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 600 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt. Die NTA-Agarose wurde zwei bis dreimal mit ca. 2-3 ml Waschpuffer 1 und einmal mit Waschpuffer 2 gewaschen. Von den Überständen wurden jeweils 15 µl gesammelt. Die Thioredoxin-CARD wurde eluiert, indem die NTA-Agarose in ca. 1-3 ml Elutionspuffer aufgenommen und für 1 h bei RT bzw. ÜN bei 4 °C auf einem Rollenmischgerät inkubiert wurde. Der Überstand wurde gesammelt und die Reinigung mittels SDS-PAGE überprüft.

### **2.5.3 Renaturierung der Thioredoxin-CARD**

Die Renaturierung der Thioredoxin-CARD erfolgte mittels Dialyse. Dazu wurden 5-7 mg der Thioredoxin-CARD in Elutionspuffer mit Disaggregationspuffer auf 20 ml aufgefüllt, mit 50 mM DTT versetzt und ca. 1 h bei RT inkubiert. Die Polypeptidketten wurden in Dialyseschläuche (ZelluTrans, *Molecular weight cut-off* (MWCO) 4-6 kDa, Flachbreite 46 mm, Carl Roth GmbH + Co. KG) überführt und zweimal gegen jeweils 4 l Dialysepuffer für 4 h bzw. ÜN bei 4 °C dialysiert (zweimal 200-fache Verdünnung).

Das Dialysat wurde mit TCEP ad 0,25 mM versetzt und für 10 min bei 5000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Volumen der Proteinlösung wurde auf ca. 5-7 ml eingeeengt (2.5.4).

### 2.5.4 Konzentration von Proteinlösungen

Das Konzentrieren von Proteinlösungen erfolgte mit Hilfe von Amicon-Rührzellen (Amicon – Merck Millipore) mit den Volumen 3 ml, 10 ml und 50 ml. Filtermembranen entsprechender Passform und Ausschlussgröße (MWCO 3 oder 10 kDa, Amicon – Merck Millipore) wurden vor der Anwendung nach Angaben des Herstellers mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und in die Rührzelle eingespannt. Die Rührzelle wurde auf einen Magnetrührer gestellt, mit der Proteinlösung befüllt und an eine Stickstoffleitung angeschlossen. Die Proteinlösung wurde vorsichtig mit Hilfe des Magnetrührers durchmischt und unter einem Druck von ca. 1-2 bar eingeeengt.

### 2.5.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration einer Lösung wurde mit dem Spektralphotometer „NanoDrop“ bestimmt. Dazu wurde die gemessene Extinktion bei der Wellenlänge von 280 nm durch den spezifischen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  [(mg/ml)<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>] dividiert, welcher für die Thioredoxin-CARD und für die CARD mit dem *online*-Programm *Protein Calculator* v3.4 ermittelt wurde. Das Programm berechnete für die Thioredoxin-CARD  $\epsilon_{280\text{ nm}} = 1,13 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und für die CARD  $\epsilon_{280\text{ nm}} = 1,6 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

$$c \frac{[mg]}{ml} = \frac{E}{\epsilon [(mg/ml)^{-1} cm^{-1}] \cdot d [cm]}$$

c = Proteinkonzentration der Lösung

E = Extinktion bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$

$\epsilon$  = spezifischer Extinktionskoeffizient bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$

d = Schichtdicke; NanoDrop führt eine interne Umrechnung durch, so dass 1 cm gilt

### **2.5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe von Gieß-Ständern hergestellt (Glasplatten und Mini-PROTEAN *Tetra Cell Casting Stand*, Bio-Rad). Ein 10 % bzw. 15 % Trenngel wurde gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels, wurde dieses mit einem 7 % Sammelgel überschichtet, in welches ein Probentaschen-Kamm der Stärke 1 mm eingebracht wurde.

Die Proben wurden mit 2x bzw. 5x Lämmli-Puffer versetzt, für 5 min bei 95 °C in einem Heizblock (HLC BT 130-2) inkubiert und in die Probentaschen des Gels pipettiert. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 200 V (Mini-PROTEAN *Tetra Cell*-Elektrophoresekammer und Netzgerät, Bio-Rad). Nach Durchführung der Elektrophorese wurde das Gel gefärbt (2.5.7).

### **2.5.7 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen**

#### *Coomassie-Färbung*

Die Polyacrylamidgele wurden ÜN und bei RT auf einem Schwenktisch (Jürgens GFL) in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Die Gele wurden anschließend in Coomassie-Entfärber mehrere Stunden ggf. ÜN bis zum gewünschten Entfärbungsgrad unter Schwenken bei RT entfärbt.

#### *Colloidal-Coomassie-Färbung*

Die Polyacrylamidgele wurden zunächst ÜN und bei RT unter Schwenken in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurden die Gele dreimal für je 30 min mit dH<sub>2</sub>O bei RT gewaschen und danach für 1 h mit Äquilibrierungslösung und ÜN mit Coomassie-Färbelösung inkubiert. Zuletzt wurden die Gele mit dH<sub>2</sub>O bis zum gewünschten Entfärbungsgrad entfärbt.

### **2.5.8 Proteolytische Spaltung der Thioredoxin-CARD**

Die Thioredoxin-CARD wurde mittels Enterokinase in 50 mM Tris (pH 8,0), 100 mM NaCl, 0,25 mM TCEP proteolytisch gespalten. Zunächst wurde in einer Testreihe die

notwendige Menge an Enterokinase ermittelt. Jeweils 12  $\mu\text{g}$  der Thioredoxin-CARD (0,8 mg/ml) wurden in einem 1,5 ml-RG mit 0,03 U, 0,02 U und 0,01 U Enterokinase versetzt, was 2,5 U, 1,6 U und 0,8 U Enterokinase pro 1 mg Fusionsprotein entsprach. Zu den Kontrollansätzen wurde keine Enterokinase hinzugegeben. Die Proben wurden entweder ÜN bei 25 °C auf einem Heizblock oder bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Ansätze mit Lämmli-Puffer versetzt und das Proteingemisch wurde elektrophoretisch getrennt.

Für die proteolytische Spaltung von der Thioredoxin-CARD in einem größeren Ansatz wurden pro 1 mg Fusionsprotein (0,8-1 mg/ml) 0,2 U Enterokinase eingesetzt und ÜN bei RT inkubiert.

### **2.5.9 Reinigung der CARD mittels SEC**

Vor Durchführung der SEC wurde der SEC-Puffer gefiltert und entgast. Dazu wurde dieser zunächst auf ca. 4 °C abgekühlt und der pH-Wert wurde am pH-Meter (SevenEasy, Mettler-Toledo) eingestellt. Um den SEC-Puffer zu filtern, wurde auf einer 1 l-Schott-Flasche ein Filteraufsatz (Satorius AG) mit einer Filtermembran (0,22  $\mu\text{m}$  Porengröße, 47 mm, Merck Millipore) angebracht. Der SEC-Puffer wurde in den Filteraufsatz gegossen und mit Hilfe einer Pumpe (Ilmvac GmbH) in die Schott-Flasche filtriert. Zum Entgasen des SEC-Puffers wurde dieser mit einem Rührfisch in eine 1 l-Saugflasche überführt. Die Flasche wurde auf einen Magnetrührer gestellt, mit einem Gummistopfen verschlossen und an die Pumpe für ca. 30 min angeschlossen. Der SEC-Puffer wurde anschließend ÜN auf 4 °C abgekühlt.

Die SEC erfolgte mit einer Superdex75-Säule (HiLoad 16/60 Superdex75 pg, GE Healthcare) unter Verwendung eines ÄKTA-Systems (GE Healthcare) bei 4 °C. Zunächst wurde die Säule mit zweifachem Säulenvolumen (240 ml) mit dem SEC-Puffer äquilibriert. Die Proteinlösung, welche die proteolytisch verdaute Thioredoxin-CARD enthielt, wurde auf 1,5 ml-RGs verteilt und für 10 min bei 20000 x g und 4 °C in einer Tischzentrifuge (Heraeus Fresco21, Thermo Scientific) zentrifugiert. 4 ml dieser Proteinlösung wurden vorsichtig mit einer Kanüle in eine 5-10 ml Spritze (Omnifix, Braun AG) aufgezogen, dabei wurde vermieden das ausgefallene Präzipitat aufzuwirbeln. Anschließend wurde die Proteinlösung über das Injektionsventil in das ÄKTA-System injiziert. Die SEC wurde bei einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt,

wobei die Detektion bei einer Wellenlänge von 280 nm erfolgte. Das Eluat im Bereich des Volumens von 40-90 ml wurde in 2 ml-Fractionen gesammelt und zu drei Lösungen (A, B und C) vereinigt. Diese wurden konzentriert und mittels SDS-PAGE analysiert. Bei der Reinigung der CARD im größeren Maßstab wurde das Eluat im Bereich von 70-90 ml (Peak C) gesammelt, mit TCEP ad 0,25 mM versetzt und auf ca. 4 ml eingengt (2.5.4).

### **2.5.10 Reinigung der CARD mittels RP-HPLC**

Die mittels SEC angereicherte CARD wurde mit 0,2 % TFA versetzt. die Proteinlösung wurde auf 1,5 ml-RGs verteilt und für 10 min bei 20000 x g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand, ohne das Präzipitat aufzuwirbeln, in ein 2 ml-HPLC-Gläschen überführt. Die RP-HPLC (Shimadzu) erfolgte unter Verwendung einer C18-HPLC-Säule (Protein & Peptide C18, S/N E041001-4-2, GraceVydac) und einem von 2 % auf 98 % ansteigenden Acetonitrilgradienten. Dabei betrug die Flussrate 1 ml/min und die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm. Das Eluat im Bereich der Retentionszeiten von 26-27 min wurde in 0,2 ml-Fractionen gesammelt. Die Fractionen wurden vereint und in ein 15 ml- bzw. 50 ml-RG überführt. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt.

Die Lösung wurde bei -20 °C ÜN eingefroren. Am darauf folgenden Tag wurde der Deckel des RG mit Löchern versehen und die gefrorene Proteinlösung wurde gefriergetrocknet (Marin Christ GmbH). Nach Abschluss des Vorgangs wurde das Lyophilisat für 10 min bei 5000 x g in einer Zentrifuge mit einem *swingout*-Rotor zentrifugiert und bis zum Rekonstituieren bei 4 °C gelagert.

## **2.6 Spektroskopische Untersuchungen der NLRC5 CARD**

### **2.6.1 CD-Spektroskopie**

Die CARD wurde in 0,01 % TFA (pH 2,8) rekonstituiert und die Proteinkonzentration wurde mit 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  bestimmt. Ein Teil der Proteinlösung wurde mit 0,01 % TFA, ein

anderer mit 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,3), 0,2 mM TCEP 1:20 auf 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  verdünnt. Von beiden Proben wurden Circular dichroismus(CD)-Spektren in 0,1 cm Quarzküvetten (Hellma) mit einem CD-Spektrometer (J-720 Jasco Inc) aufgenommen. Die Elliptizität der Proteinlösungen wurde in dem Bereich von  $\lambda$  195-250 nm bei RT gemessen, wobei die Messdaten in einem Abstand von 1 nm aufgenommen wurden. Pro Probe wurden drei CD-Spektren gemessen und daraus das arithmetische Mittel ermittelt. Das gleiche Verfahren erfolgte mit dem Leerwert, der anschließend abgezogen wurde.

Die Elliptizität wurde in [mgrad] gemessen, die Werte wurden danach in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest  $\theta_{MRW}$  (*mean residue weight ellipticity*) umgewandelt. Diese gibt die molare Elliptizität für ein Protein mit individuellen Resten an und ermöglicht somit den Vergleich verschiedener Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten.

$$\theta_{MRW} [grad * cm^2 * dmol^{-1}] = 100 * 0,001 * \frac{\theta\lambda [grad]}{c [g/L] * \frac{1}{Mr [g/mol]} * N * d [cm]}$$

$\theta\lambda$  = Elliptizität bei gegebener Wellenlänge [grad]

c = Proteinkonzentration [g/l]

Mr = Molekulargewicht [g/mol]

N = Anzahl der Aminosäuren

d = Weglänge der Küvette [cm]

Faktor 0,001 wandelt [mgrad] in [grad] um

Für die Aufnahme der Schmelzkurve wurde die CARD auf Eis in 0,01 % TFA rekonstituiert und auf 0,06  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  verdünnt. In einer 0,1 mm Quarzküvette wurde zunächst ein CD-Spektrum in dem Bereich von  $\lambda$  195-250 nm bei 4 °C mit Hilfe eines Temperaturreglers (Haake WL 26) aufgenommen. In derselben Küvette wurde anschließend die Schmelzkurve aufgenommen. Dazu wurde die Elliptizität bei konstanter Wellenlänge von 222 nm und aufsteigender Temperatur von 4 °C auf 87 °C gemessen, wobei die Temperatur um 1 °C pro Minute erhöht wurde. Nach Abkühlen der Probe auf 4 °C wurde ein CD-Spektrum in dem Bereich von  $\lambda$  195-250 nm erneut bei 4 °C aufgenommen.

Die Aufnahme des CD-Spektrums der CARD nach Durchführung der NMR-Experimente erfolgte mit einer Proteinlösung der Konzentration  $0,075 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  in einer  $0,05 \text{ cm}$  Quarzküvetten (Hellma) bei RT.

### 2.6.2 NMR-Spektroskopie

Die gefriergetrocknete CARD wurde in  $330 \mu\text{l}$   $0,01 \%$  TFA (pH 2,8),  $7 \%$   $\text{D}_2\text{O}$  (sterilfiltriert) rekonstituiert. Anschließend wurde die Proteinlösung in einem  $1,5 \text{ ml}$ -RG für  $20 \text{ min}$  bei  $20000 \times g$  zentrifugiert und ohne das Präzipitat aufzuwirbeln in ein neues  $1,5 \text{ ml}$ -RG überführt. Nach ca.  $5 \text{ h}$  wurde die Probe mit  $0,5 \text{ mM}$  TCEP versetzt und mittels einer ausgezogenen Pasteurglaspipette in ein NMR-Röhrchen (Shigemi, Inc.) überführt. Die NMR-Experimente wurden von Herrn Prof. Dr. Frank Sönnichsen, Institut für Organische Chemie, Spektroskopische Abteilung, CAU Kiel, durchgeführt.

## 2.7 Identifizierung von Interaktionspartnern der NLRC5 CARD

Um potentielle Interaktionspartner der CARD zu identifizieren, wurde die rekombinante Thioredoxin-CARD kovalent an die *NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow* gekoppelt (GE Healthcare) und mit Zelllysaten der humanen T-Zelllinie Jurkat inkubiert. Dabei wurden zwei Experimente durchgeführt, die sich im verwendeten Lysepuffer 1 oder 2 voneinander unterschieden. Jedes Experiment bestand aus vier Ansätzen: Der Ansatz zur Untersuchung potentieller Interaktionspartner der CARD sowie drei Kontrollansätzen, die der Aussage über die Spezifität einer Interaktion dienen sollten (Tab. 2-3). So gibt die Inkubation der Thioredoxin-CARD mit dem Lysepuffer Informationen darüber aus, ob während der Durchführung des Experiments das SDS-Gel kontaminiert wurde, z.B. mit Proteinen, die vom Experimentator stammten. Mit der Kontrolle, bei der das Kontrollprotein mit dem Zelllysate inkubiert wurde, sollte überprüft werden, ob Proteine des Zelllysats an das Thioredoxin binden. Als Kontrollprotein diente ein Fusionsprotein, welches aus dem Thioredoxin und dem Theromacin, einem Protein des Blutegels, bestand und eine Größe von  $25 \text{ kDa}$  aufwies.

Die Inkubation der Sepharose mit dem Zellysat gibt Aufschluss darüber, ob unspezifische Interaktionen mit der Matrix vorliegen.

Tab. 2-3: Ansätze zur Identifizierung von Interaktionspartnern der CARD

	Kopplung an die Sepharose	Inkubation der Sepharose
1.) K*	Thioredoxin-CARD	Lysepuffer
2.)	Thioredoxin-CARD	Zellysat
3.) K	Kontrollprotein (Thioredoxin-Theromacin)	Zellysat
4.) K	-	Zellysat

\* K = Kontrolle

#### *Reinigung und Renaturierung des Kontrollproteins*

Das Kontrollprotein wurde in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert, wobei es in der Zelle zu Einschlusskörpern aggregierte. Diese wurden wie unter 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben isoliert und mittels Affinitätschromatographie, jedoch ohne Zugabe des Reduktionsmittels, gereinigt. Für die Renaturierung wurde ein Glutathion-redox-System verwendet. Dazu wurden 50 mg des Kontrollproteins in 50 mM Tris (pH 8), 6 M GuHCl mit demselben auf 167 ml aufgefüllt und die Proteinlösung wurde auf Eis gekühlt. 833 ml eiskaltes dH<sub>2</sub>O (mit 4 mM reduziertem und 0,4 mM oxidiertem Glutathion) wurden in einer 1 l-Flasche auf einem Magnetrührer bei 4 °C gerührt. Währenddessen wurde mit Hilfe eine Schlauchpumpe die Proteinlösung tröpfchenweise in die 1 l-Flasche überführt. Nach Abschluss dieser Prozedur wurde die Lösung zwei Tage lang bei 4 °C gerührt, anschließend auf 25 ml konzentriert und gegen 50 mM Tris (pH 8) dialysiert.

#### **2.7.1 Zellaufschluss und Herstellung von Zellysaten**

Die Jurkat Zellen wurden in Zellkulturschalen oder -flaschen bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> in dem Medium Gibco RPMI 1640, 10 % Fetales Kälberserum, Penicillin/Streptomycin (Life Technologies) kultiviert. Für eine Interaktionsstudie wurden insgesamt 240 ml Zellsuspension bis zu einer Zelldichte von ca. 4,5 x 10<sup>5</sup>/ml kultiviert. Da nach mehrtägiger Inkubation der Zellen das Medium

evaporierte, standen bei der Ernte der Zellen insgesamt 210 ml Zellsuspension zur Verfügung. Damit wurden pro Ansatz  $3,1 \times 10^7$  Zellen verwendet.

Zum Aufschluss der Zellen wurde die Zellsuspensionen auf Eis vereinigt und für 10 min bei 4 °C und 5000 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS (pH 7,2) gewaschen, mit Lysepuffer auf 24 ml aufgefüllt, auf drei 15 ml-RGs verteilt und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen für 1 min mit 10-20 % Ultraschall behandelt. Anschließend wurde die Suspension auf 2 ml-RGs verteilt und für 15 min bei 4 °C und 20000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und direkt für die Interaktionsstudie eingesetzt.

### *Western Blot*

Das durch Sonifizieren hergestellte Zelllysate wurde auf das Vorliegen von Proteinen des Zellkerns untersucht. Als Negativkontrolle diente ein Zelllysate, welches mittels Triton X-100 hergestellt wurde. Dazu wurden die Zellen in einem 1 %igen Triton X-100 Lysepuffer für 30 min bei 4 °C auf einem Rollenmischgerät inkubiert und anschließend für 15 min bei 4 °C und 20000 x g zentrifugiert. Die Zelllysate wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Der Western Blot wurde mit einem Tank-Blotting-System (Bio-Rad) durchgeführt. Dazu wurde das SDS-Gel in ein Sandwich mit Nitrocellulose-Membran (Merk Millipore) und Whatman-Papier eingespannt und in die mit Transferpuffer gefüllte Blotting-Kammer gestellt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 60 min bei 100 V.

Die Membran wurde anschließend in ein rundes verschließbares 50 ml-RG überführt und mit TBS-Puffer, 5 % *bovine serum albumin* (BSA) für 1 h bei RT auf einem Rollenmischgerät blockiert. Danach wurde die Membran mit dem primären  $\alpha$ -Histone-Antikörper (96C10, Cell Signaling Technology) in einer 1:1000 Verdünnung in TBST-Puffer, 2 % BSA ÜN bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit TBST-Puffer für je 10 min gewaschen und mit dem sekundären  $\alpha$ -Maus-Antikörper, an welchen die Peroxidase gekoppelt war, in einer 1:10000 Verdünnung in TBST, 2 % BSA für 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal mit TBST-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz.

### 2.7.2 Kopplung der Thioredoxin-CARD an die Sepharose

Da Proteine nicht in Tris-Puffer an die Sepharose gebunden werden können, wurden die Thioredoxin-CARD gegen 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,9), 0,2 mM TCEP und das Kontrollprotein gegen 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,9) dialysiert.

Pro Experiment wurden vier Ansätze verwendet, wobei pro Ansatz 50  $\mu$ l der Sepharose (*slurry*) eingesetzt wurden. Die Sepharose wurde stets mit abgeschnittenen Pipettenspitzen pipettiert. 250  $\mu$ l Sepharose wurden in einem 1,5 ml-RG fünfmal mit eiskalter 1 mM HCl und fünfmal mit eiskaltem 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,9) gewaschen. Dabei wurde die Sedimentation der Sepharose durch Zentrifugation für 2 min bei 4 °C und 70 x g beschleunigt. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen, so dass stets ein Flüssigkeitsfilm die Sepharose bedeckte.

Die aktivierte Sepharose wurde auf vier 1,5 ml-RGs verteilt und mit 200  $\mu$ g der Thioredoxin-CARD, 200  $\mu$ g des Kontrollproteins oder nur mit Phosphatpuffer versetzt. Die Ansätze wurden mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,9), 0,2 mM TCEP im Falle der Thioredoxin-CARD und mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,9) im Falle des Kontrollproteins sowie der Sepharose ohne Protein auf ca. 1,2 ml aufgefüllt. Die RGs wurden ÜN bei 4 °C auf einem Mischgerät über Kopf invertiert.

Am darauf folgenden Tag wurde die Sepharose sedimentiert und der Überstand wurde abgenommen. Um freie Bindungsstellen der Sepharose zu blockieren, wurde diese mit ca. 1,2 ml 100 mM Tris (pH 8,4), 0,25 mM TCEP versetzt und die RGs wurden für ca. 6 h bei 4 °C über Kopf invertiert. Die Sepharose wurde anschließend zweimal mit Lysepuffer, 5 % BSA und zweimal mit Lysepuffer 1 gewaschen.

Die Kopplung der Fusionsproteine an die Sepharose wurde überprüft, indem vor sowie nach Inkubation der Proteinlösungen mit der Sepharose Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert wurden.

### 2.7.3 Inkubation der Sepharose mit Zelllysaten

In 15 ml-RGs wurden jeweils 8 ml Zelllysate oder Lysepuffer vorgelegt, die beladene bzw. nicht-beladene Sepharose wurde hinzu gegeben und auf 10 ml mit Lysepuffer aufgefüllt. Die Ansätze wurden 1 h im Falle der ersten Interaktionsstudie und 5 h im Fall der zweiten Interaktionsstudie bei 4 °C auf einem Rollenmischgerät inkubiert.

Anschließend wurden die Sepharosen dreimal mit ca. 5 ml Lysepuffer gewaschen, wobei die Ansätze für 1 min bei 4 °C und 100 x g zentrifugiert wurden. Die Sepharosen wurden in 1,5 ml-RGs überführt, der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Sepharosen wurde mit 20  $\mu$ l 2x Lämmli-Puffer versetzt, erhitzt und mittels SDS-PAGE analysiert.

### 3 ERGEBNISSE

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der mutmaßlichen CARD von NLRC5. Die Domäne wurde kloniert und als Fusionsprotein mit dem Thioredoxin heterolog in *E. coli* synthetisiert. Das rekombinante Protein aggregierte in der Zelle und bildete Einschlusskörper. Diese wurden isoliert und das Fusionsprotein wurde gereinigt und renaturiert. Danach folgten die proteolytische Abspaltung des Thioredoxins von der CARD und die Reinigung dieser mittels SEC und RP-HPLC. Die rekombinante CARD wurde mittels CD-Spektroskopie zunächst auf das Vorliegen von Sekundärstrukturelementen untersucht. Anschließend wurden von dem Protein die folgenden NMR-Spektren aufgenommen: 2D  $^1\text{H}^{15}\text{N}$  HSQC, 2D HNCACB, 2D HN(CO)CACB und 2D HCC(CO)HN.

Um die Funktion der CARD zu untersuchen, wurde die Thioredoxin-CARD kovalent an Sepharose gekoppelt und mit Lysaten von humanen Zellen inkubiert. Anschließend wurden die potentiellen Interaktionspartner mittels Massenspektrometrie analysiert.

#### 3.1 Synthese und Reinigung der rekombinanten NLRC5 CARD

##### 3.1.1 Synthese der Thioredoxin-CARD in *E. coli* und Reinigung der Einschlusskörper

Die CARD von NLRC5, bestehend aus den ersten 92 N-terminalen Aminosäuren, wurde von *Kuenzel et al.*, (2010) beschrieben [43]. Die kodierende Sequenz der Domäne wurde entweder mit einem N-terminalen His-tag (His-CARD) oder einem Thioredoxin-His-tag (Thioredoxin-CARD) in *E. coli* heterolog exprimiert. Dabei soll Thioredoxin die Löslichkeit des rekombinanten Proteins, an welches es fusioniert wurde, erhöhen.

Um den optimalen Expressionsstamm zu ermitteln, wurden beide Konstrukte in verschiedenen *E. coli* Stämmen im kleinen Maßstab exprimiert. Keines der getesteten *E. coli* Stämme synthetisierte die His-CARD (nicht gezeigt). Dagegen war auf den SDS-Gelen nach Induktion der Genexpression der Thioredoxin-CARD eine zusätzliche

Proteinbande zwischen 25 kDa und 35 kDa sichtbar (Abb. 3-1), die mit dem theoretischen Molekulargewicht von 27 kDa des Fusionsproteins übereinstimmt. Bei den Stämmen KRX und Origami war die Proteinbande deutlich zu erkennen (Spur 2, 4), bei den Stämmen BL21 und BLR dagegen wies sie eine geringe Intensität auf (Spur 10, 12). In den Stämmen ROS und C43 wurde das Fusionsprotein nicht synthetisiert (Spur 6, 8).

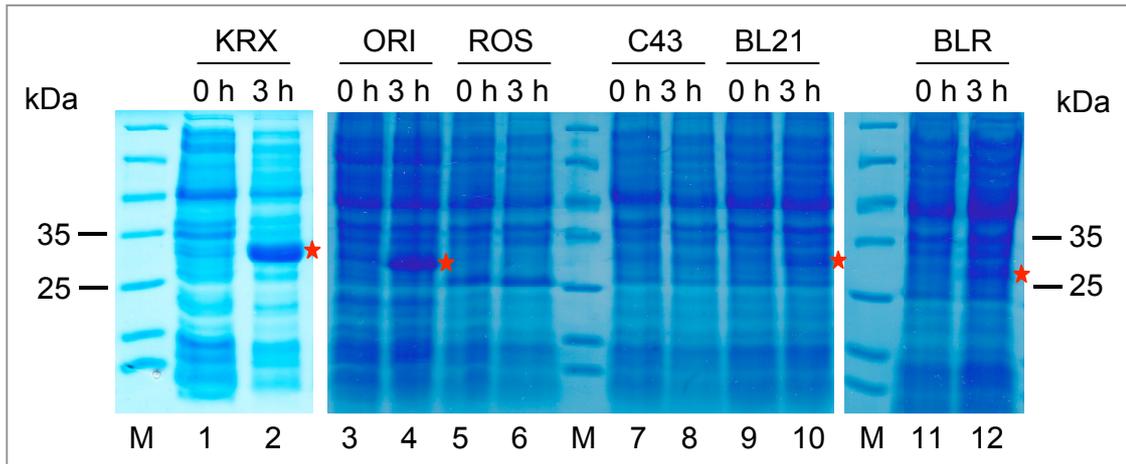


Abb. 3-1: SDS-PAGE zur Überprüfung der heterologen Synthese der Thioredoxin-CARD

Die Expression von Thioredoxin-CARD wurde in den *E. coli* Stämmen KRX, Origami (ORI), Rosetta (ROS), C43, BL21 und BLR in LB-Medium induziert. Vor und drei Stunden nach Induktion der Expression wurden Proben von den Kulturen entnommen, mit Lämmli-Puffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert (Coomassie-Färbung). M = Marker.

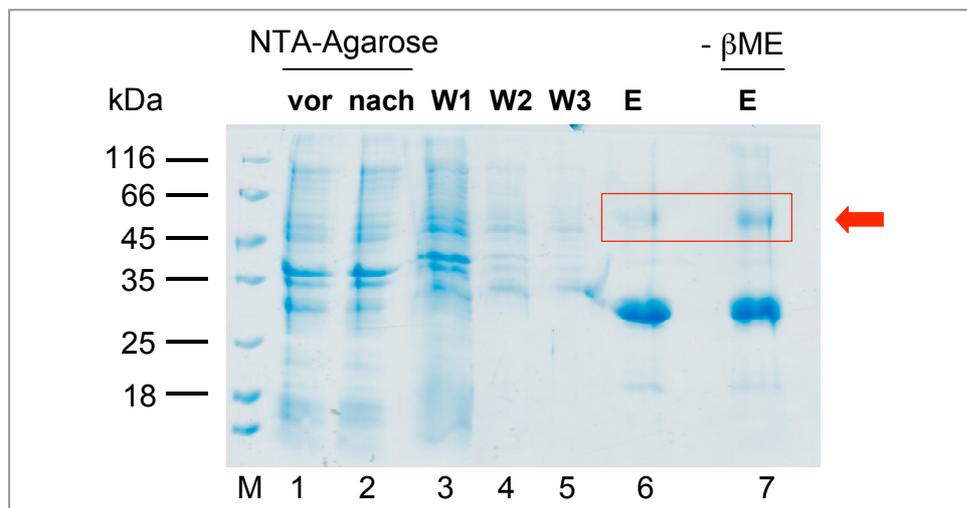
Spur 1, 3, 5, 7, 9, 11: Vor Induktion der Genexpression

Spur 2, 4, 6, 8, 10, 12: 3 h nach Induktion der Genexpression

Anschließend wurde überprüft ob die *E. coli* Stämme das rekombinante Fusionsprotein in löslicher Form synthetisierten. Dazu wurden die Zellen aufgeschlossen, die Zelllysate jeweils in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion getrennt und mittels SDS-PAGE nach Vorliegen der Proteinbande zwischen 25 kDa und 35 kDa untersucht (nicht gezeigt). Da die unlöslichen Fraktionen stets die Proteinbande zwischen 25 kDa und 35 kDa enthielten, deutet dies darauf hin, dass die Thioredoxin-CARD in den getesteten *E. coli* Stämmen in Form von Einschlusskörpern synthetisiert wird.

Für die Synthese der Thioredoxin-CARD im größeren Maßstab wurde der *E. coli* Stamm KRX ausgewählt.

Nach Synthese der Thioredoxin-CARD wurden die Einschlusskörper isoliert und die aggregierten Polypeptidketten in Disaggregationspuffer solubilisiert. Um Verunreinigungen, wie Proteine und DNA zu entfernen, wurde die Thioredoxin-CARD mittels Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Mittels SDS-PAGE wurde eine erfolgreiche Reinigung der Thioredoxin-CARD nachgewiesen (Abb. 3-2). Nach Inkubation der solubilisierten Polypeptidketten mit der NTA-Agarose war in dem Überstand weiterhin die Proteinbande der Thioredoxin-CARD zwischen 25 kDa und 35 kDa zu sehen (Spur 2). Das Eluat enthielt hauptsächlich die Thioredoxin-CARD. Daneben enthielt es eine Proteinbande zwischen 18 kDa und 25 kDa sowie eine zwischen 45 kDa und 66 kDa (Spur 6, 7). Die letztgenannte wies unter nicht-reduzierenden (Spur 7) im Vergleich zu reduzierenden Bedingungen (Spur 6) eine stärkere Intensität auf.



**Abb. 3-2: SDS-PAGE zur Überprüfung der Reinigung der Thioredoxin-CARD mittels Affinitätschromatographie**

In Disaggregationspuffer solubilisierte Polypeptidketten wurden mit NTA-Agarose inkubiert. Diese wurde mehrfach gewaschen und mit Elutionspuffer inkubiert. Bei den einzelnen Schritten wurden Proben entnommen, mit Lämmli-Puffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert (Coomassie-Färbung). W = Waschschrift, E = Elution, M = Marker.

- Spur 1: Vor Inkubation mit NTA-Agarose
- Spur 2: Überstand nach Inkubation mit NTA-Agarose
- Spur 3, 4, 5: Überstände nach Waschen der NTA-Agarose
- Spur 6: Eluat, reduzierender Lämmli-Puffer
- Spur 7: Eluat, nicht-reduzierender Lämmli-Puffer

### 3.1.2 Renaturierung und proteolytische Spaltung der Thioredoxin-CARD

Im nächsten Schritt wurde das gereinigte Fusionsprotein mittels Dialyse renaturiert. Da NLRC5 im Cyto- und Karyoplasma, wo reduzierende Bedingungen herrschen, lokalisiert ist und die CARD drei Cysteinreste enthält, wurde während der Renaturierung und der Reinigungsprozesse stets ein reduzierendes Milieu durch Zugabe von DTT oder TCEP aufrechterhalten. Um optimale Renaturierungsbedingungen zu finden, wurde das Fusionsprotein im kleinen Maßstab gegen unterschiedliche Puffer mit den pH-Werten von 4 bis 11 dialysiert. Bei den pH-Werten zwischen 7 und 9 wurden dabei die höchsten Ausbeuten erzielt (nicht gezeigt). Da zwischen dem Thioredoxin und der CARD eine Schnittstelle für die Enterokinase liegt und das Enzym ein pH-Optimum von 8 hat, wurde dieser pH-Wert für die Renaturierung des Fusionsproteins im größeren Maßstab ausgewählt. Mittels SDS-PAGE wurde die lösliche Thioredoxin-CARD im Dialysat nachgewiesen (Abb. 3-3). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen war eine zusätzliche Proteinbande geringer Intensität zwischen 45 kDa und 66 kDa sichtbar (Spur 2), die unter reduzierenden Bedingungen nicht vorhanden war (Spur 1).

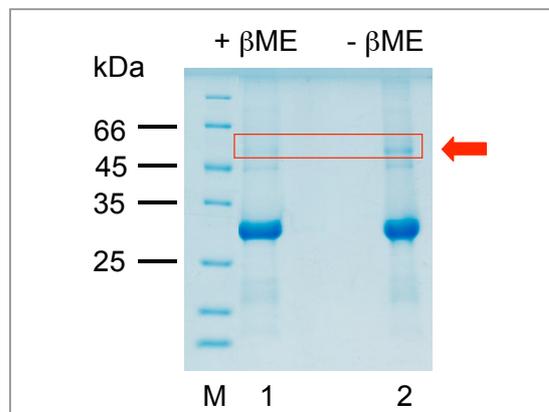


Abb. 3-3: SDS-PAGE zur Überprüfung der Renaturierung der Thioredoxin-CARD

Die in Elutionspuffer solubilisierte Thioredoxin-CARD wurde mittels Dialyse renaturiert. Das Dialysat wurde konzentriert, zentrifugiert und der Überstand mittels SDS-PAGE untersucht (Coomassie-Färbung). M = Marker.

Spur 1: Reduzierender Lämmli-Puffer

Spur 2: Nicht-reduzierender Lämmli-Puffer

Nach Renaturierung des Fusionsproteins wurde der Thioredoxin-His-tag von der CARD proteolytisch durch Verwendung von Enterokinase abgespalten. Zunächst wurden in einer Testreihe die optimalen Bedingungen für die kontrollierte Proteolyse ermittelt.

Dazu wurden Ansätze mit unterschiedlichen Konzentrationen an Enterokinase bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Mittels SDS-PAGE wurde anschließend die proteolytische Spaltung der Thioredoxin-CARD nachgewiesen (Abb. 3-4). In den Ansätzen waren vier Proteinbanden zu erkennen: Die Thioredoxin-CARD zwischen 25 kDa und 35 kDa sowie drei weitere Proteinbanden unterhalb von 25 kDa. Die Intensität der Thioredoxin-CARD nahm mit zunehmender Enterokinase-Konzentration und Temperatur ab (Spur 2, 3, 4 und 6, 7, 8). Die Intensität der Proteinbande bei ca. 18 kDa nahm mit zunehmender Enzymmenge bei 4 °C zu (Spur 2, 3, 4), bei 25 °C nahm sie dagegen ab (Spur 6, 7, 8). Die Proteinbande zwischen 14,4 kDa und 18 kDa wies bei höherer Temperatur eine höhere Intensität auf. Bei der Proteinbande unterhalb von 14,4 kDa handelt es sich um die CARD, die eine theoretische Größe von 10,6 kDa aufweist. Die Verwendung von 2,5 U Enterokinase pro 1 mg Fusionsprotein bei 25 °C resultierte in einer fast vollständigen Spaltung der Thioredoxin-CARD (Spur 6). Der Vergleich der Ergebnisse, die aus den Inkubationen mit 2,5 U und 1,6 U Enterokinase pro 1 mg Fusionsprotein bei 25 °C erzielt wurden, zeigte, dass bei Verwendung der doppelten Enzymmenge zwar die Intensität der Thioredoxin-CARD deutlich abnahm, die Intensität der CARD jedoch fast unverändert blieb (Spuren 6, 7). Für die kontrollierte Proteolyse im größeren Maßstab wurden pro 1 mg Fusionsprotein 2 U an Enterokinase eingesetzt.

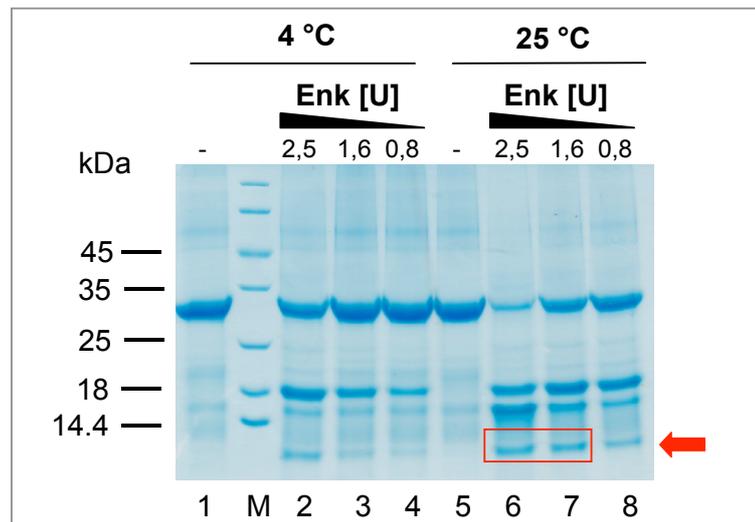


Abb. 3-4: Überprüfung der proteolytischen Spaltung der Thioredoxin-CARD

Die renaturierte Thioredoxin-CARD wurden mit 2,5 U, 1,6 U oder 0,8 U Enterokinase pro 1 mg Thioredoxin-CARD über Nacht bei 4 °C oder 25 °C inkubiert. Die Ansätze wurden zentrifugiert und die Überstände mittels SDS-PAGE analysiert (Coomassie-Färbung). M = Marker, Enk = Enterokinase, U = Unit.

Spur 1-4: Inkubation bei 4 °C

Spur 5-8: Inkubation bei 25 °C

### 3.1.3 Reinigung mittels SEC

Nach proteolytischer Spaltung der Thioredoxin-CARD wurde die CARD von den übrigen Proteinen bzw. Proteinfragmenten gereinigt. Das Proteingemisch wurde dazu mittels SEC mit einer Superdex75-Säule nach dem Molekulargewicht der Proteine getrennt (Abb. 3-5). Das Chromatogramm zeigte drei Peaks bei 48 ml (Peak A), 59 ml (Peak B) und 78 ml (Peak C).

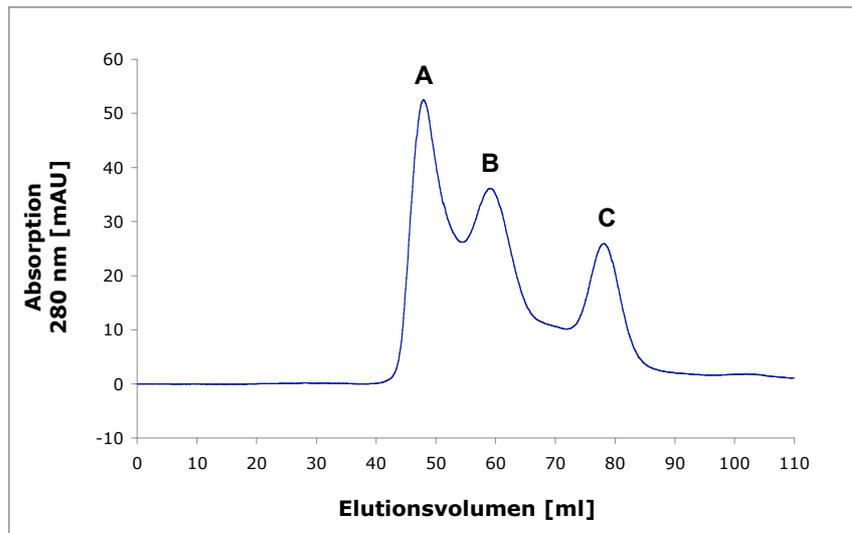


Abb. 3-5: **Chromatogramm der SEC zur Reinigung der CARD**

Nach proteolytischer Spaltung der Thioredoxin-CARD mit Enterokinase, wurde das Proteingemisch mit einer Superdex75-Säule chromatographisch getrennt.

Das Eluat wurde zwischen 40 ml und 90 ml fraktioniert, die Fraktionen wurden zu den drei Lösungen A, B und C vereint, konzentriert und mittels SDS-PAGE untersucht (Abb. 3-6). Die Lösung A enthielt außer der Thioredoxin-CARD mehrere Proteinbanden unterhalb von 25 kDa, die geringe Intensitäten aufwiesen (Spur 2, 5). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen waren weitere Proteinbanden mit geringen Intensitäten oberhalb von 35 kDa zu sehen (Spur 5), die unter reduzierenden Bedingungen nicht vorhanden waren (Spur 2). Somit enthält die Lösung A Dimere und Multimere, die durch intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Proteinen bzw. Proteinfragmenten entstanden sind. In der Lösung B waren zwei Proteinbanden zwischen 14,4 kDa und 18 kDa zu sehen (Spur 3, 6). Die Lösung C enthielt

hauptsächlich die CARD sowie geringe Mengen der zwei Proteinbanden zwischen 14,4 kDa und 18 kDa (Spur 4, 7).

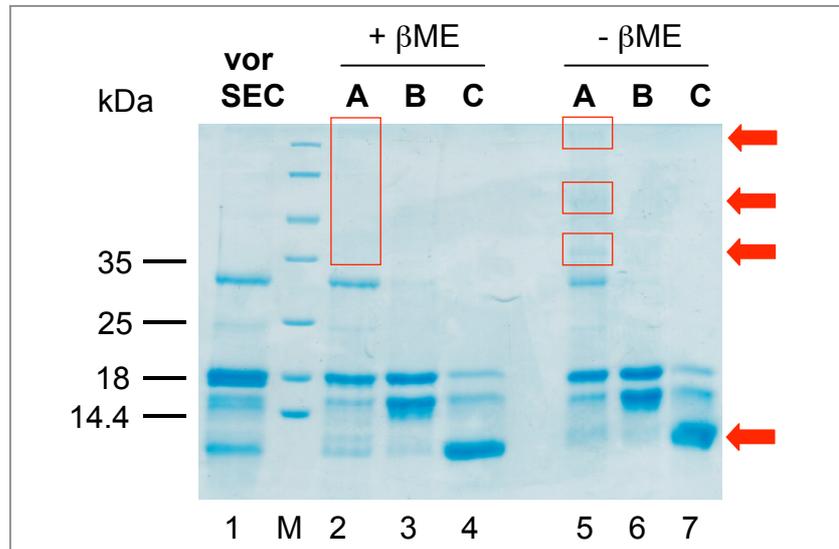


Abb. 3-6: **SDS-PAGE von den vereinigten Fraktionen A, B und C aus der SEC**

Nach Durchführung der SEC wurden die Fraktionen entsprechend der drei im Chromatogramm sichtbaren Peaks gesammelt und konzentriert. Proben von diesen Proteinlösungen (A, B und C) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen (Coomassie-Färbung). M = Marker.

Spur 1: Thio redoxin-CARD proteolytisch gespalten vor Durchführung der SEC

Spur 2-4: Reduzierender Lämmli-Puffer

Spur 5-7: Nicht-reduzierender Lämmli-Puffer

Die Proteinlösung C, welche die CARD enthielt, wurde konzentriert. Ab einer bestimmten Proteinkonzentration präzipitierte jedoch die Domäne (nicht gezeigt). Der theoretische isoelektrische Punkt der CARD liegt bei pH 5. Oberhalb und unterhalb von diesem sollte die Domäne eine negative bzw. positive Gesamtladung enthalten. Generell wird angenommen, dass Proteine mit einer gleichartigen Gesamtladung eine geringere Tendenz zu Aggregation aufweisen, da sie sich aufgrund der Oberflächenladung abstoßen. Im Falle der CARD konnte die Proteinkonzentration jedoch sowohl in Tris-Puffer (pH 8) als auch nach vorheriger Erniedrigung des pH-Wertes unterhalb von 5 nicht erhöht werden (nicht gezeigt). Auch Additive wie Arginin oder Glutaminsäure konnten die Stabilität des Proteins nicht erhöhen (nicht gezeigt) [87].

### 3.1.4 Reinigung mittels RP-HPLC

Da die Lösung C, welche die angereicherte CARD enthielt, weitere Proteine beinhaltete, war ein weiterer Reinigungsschritt nötig. Dazu wurde das Proteingemisch mittels RP-HPLC nach Hydrophobizität der Moleküle getrennt (Abb. 3-7). Bei der Retentionszeit von 26,6 min (84,77 % Acetonitril) war im Chromatogramm ein Peak sichtbar. Das Eluat zwischen 26 min und 27 min wurde gesammelt und die Probe wurde gefriergetrocknet.

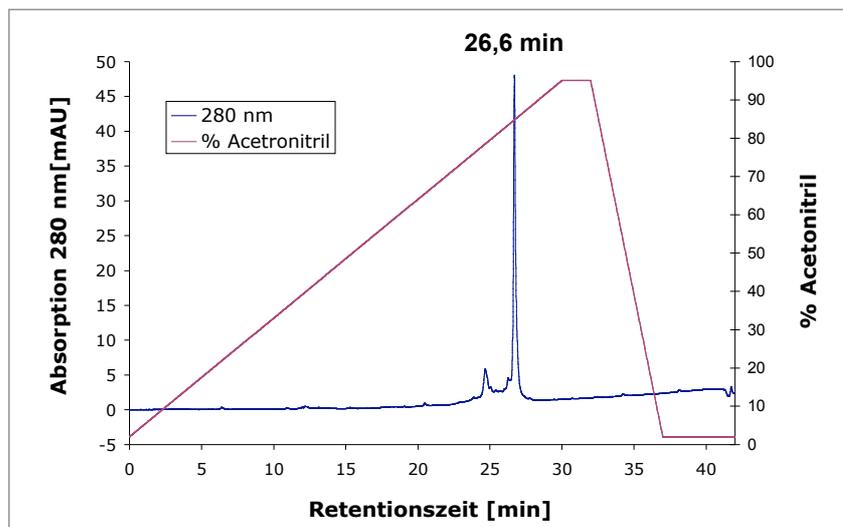


Abb. 3-7: Chromatogramm der RP-HPLC zur Reinigung der CARD

Die Proteinlösung mit der angereicherten CARD wurde mit einer C18-Säule unter Anwendung eines von 2 % auf 98 % ansteigenden Acetonitrilgradienten getrennt. Die Fraktion zwischen 26 min und 27 min wurde gesammelt.

Das Lyophilisat wurde in 0,01 % TFA (pH 2,8) rekonstituiert und mittels SDS-PAGE untersucht (Abb. 3-8). Unter reduzierenden Bedingungen war ausschließlich die Proteinbande der CARD unterhalb von 14,4 kDa zu sehen (Spur 2). Dagegen war unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine weitere Proteinbande mit geringer Intensität bei ca. 18 kDa zu erkennen (Spur 3).

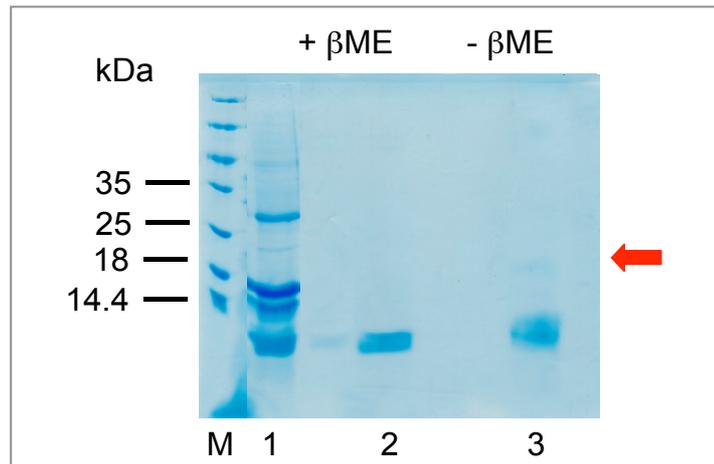


Abb. 3-8: SDS-PAGE der Fraktion aus der RP-HPLC

Die Fraktion aus der RP-HPLC wurde gefriergetrocknet. Die Probe wurde in 0,01 % TFA (pH 2,8) rekonstituiert, zentrifugiert und der Überstand wurde unmittelbar auf ein SDS-Gel aufgetragen (Colloidal Coomassie-Färbung). M = Marker.

Spur 1: Thioredoxin-CARD proteolytisch gespalten vor Durchführung der SEC

Spur 2: Reduzierender Lämmli-Puffer

Spur 3: Nicht-reduzierender Lämmli-Puffer

Die Gelbande unterhalb von 14,4 kDa (Abb. 3-8) wurde als die NLRC5 CARD mittels Massenspektrometrie identifiziert. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde auch die Masse der in 0,01 % TFA rekonstituierten CARD untersucht. Sie stimmte mit der theoretischen Masse der Domäne überein. Die Experimente wurden von Dr. Barbara Gregorius aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Andreas Tholey, Institut für Experimentelle Medizin, CAU Kiel, durchgeführt.

## 3.2 Analyse der Sekundärstruktur der NLRC5 CARD

### 3.2.1 Untersuchung mittels CD-Spektroskopie

*Albrecht und Takken*, (2006) sagten für die CARD von NLRC5 sechs  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturelemente vorher [7]. Mittels CD-Spektroskopie wurde überprüft ob die rekombinante CARD Sekundärstrukturelemente enthält. Das Protein wurde in 0,01 % TFA (pH 2,8) rekonstituiert und ein Teil dieser Lösung wurde in Phosphatpuffer (pH 7,3), 0,2 mM TCEP verdünnt. Mit beiden Proteinlösungen wurden CD-Spektren von 195 nm bis 250 nm gemessen (Abb. 3-9). Diese wiesen Charakteristika auf, die für ein

$\alpha$ -helikales Protein typisch sind: Die Spektren enthielten zwei Minima, eines bei 222 nm und das andere bei 208 nm, und gingen bei ca. 200 nm steil in den positiven Bereich über. Darüber hinaus ähnelten sich die Verläufe der beiden CD-Spektren.

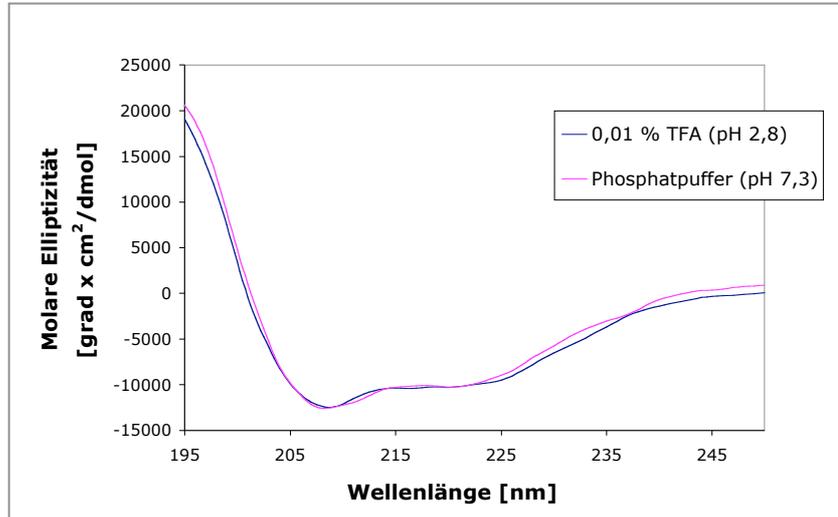
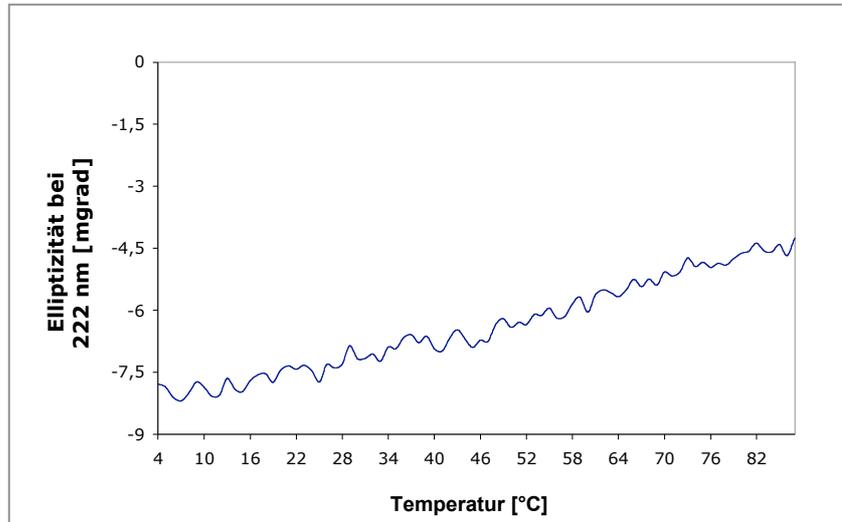


Abb. 3-9: **CD-Spektren der rekombinanten CARD**

Die CD-Spektren von der CARD wurden in 0,01 % TFA (pH 2,8) (blau) und in 19 mM Phosphatpuffer (pH 7,3), 0,19 mM TCEP (rosa) aufgenommen.

### 3.2.2 Untersuchung der Temperaturstabilität

Mittels der CD-Spektroskopie wurde die Temperaturstabilität der rekombinanten CARD untersucht. Dazu wurde die CARD in 0,01 % TFA von 4 °C auf 87 °C erhitzt und währenddessen die Elliptizität bei 222 nm gemessen (Abb. 3-10). Die Kurve lag im negativen Bereich und nahm mit steigender Temperatur von ca. -7,5 mdeg bei 4 °C auf ca. -4,5 mdeg bei 87 °C gradlinig ab. Das Spektrum zeigte, dass die CARD bei 87 °C etwa 60 % der Sekundärstrukturelemente enthielt.



**Abb. 3-10: Schmelzkurve zur Untersuchung der Temperaturstabilität der CARD**

Die CARD in 0,01 % TFA wurde mit 1 °C pro min von 4 °C auf 87 °C erhitzt. Die Elliptizität wurde währenddessen bei 222 nm gemessen.

Unmittelbar vor und nach Messung der Schmelzkurve wurde von der CARD jeweils ein CD-Spektrum von 195 nm bis 250 nm aufgenommen (Abb. 3-11). Das CD-Spektrum, welches nach dem Erhitzen gemessen wurde (grün), zeigte im Vergleich zu dem, das davor aufgenommen wurde (blau), geringere Werte der Elliptizität. Durch Multiplikation dieser Werte (grün) mit einem Faktor wurde das CD-Spektrum an das davor aufgenommenen angepasst (gestrichelt blau). Die Überlagerung verdeutlicht, dass die CD-Spektren vor und nach Erhitzen des Proteins ähnliche, jedoch nicht identische, Kurvenverläufe aufweisen. Das CD-Spektrum nach Erhitzen der CARD zeigte insbesondere einen abweichenden Kurvenverlauf im Bereich zwischen 195 nm und 205 nm.

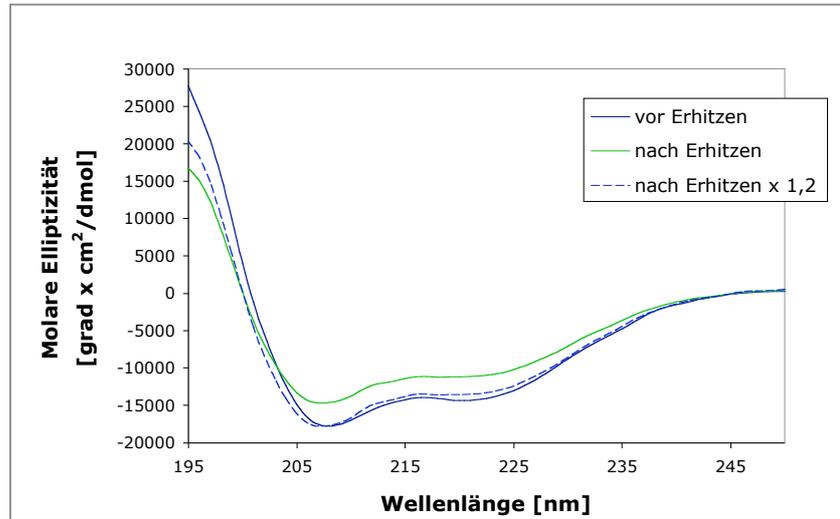


Abb. 3-11: **CD-Spektren der CARD vor und nach Messung der Schmelzkurve**

Von der CARD in 0,01 % TFA wurde bei 4 °C ein CD-Spektrum gemessen (blau). Die Schmelzkurve wurde aufgenommen, die Probe auf 4 °C abgekühlt und ein CD-Spektrum wurde erneut gemessen (grün). Die Werte des CD-Spektrums nach Erhitzen des Proteins wurden mit dem Faktor 1,2 multipliziert (gestrichelt blau).

### 3.2.3 Erhöhung der Stabilität

Um zu überprüfen ob sich im sauren Milieu Disulfidbrücken zwischen den CARD-Molekülen bilden, wurde die CARD in 0,01 % TFA sowohl für fünf Stunden als auch für fünf Wochen bei 4 °C inkubiert und die Proben anschließend mittels SDS-PAGE untersucht (Abb. 3-12). Nach fünfständiger Inkubation war auf dem SDS-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen zusätzlich zu der CARD unterhalb von 14,4 kDa eine weitere Proteinbande zwischen 18 kDa und 25 kDa zu erkennen, die unter reduzierenden Bedingungen nicht vorhanden war (Spur 1 und 2). Nach 5 Wochen waren unter nicht-reduzierenden Bedingungen vier weitere Proteinbanden sichtbar (Spur 4). Die erste befand sich zwischen 18 kDa und 25 kDa, die zweite zwischen 25 kDa und 35 kDa, die dritte zwischen 35 kDa und 45 kDa und die Letzte bei über 116 kDa. Die Intensitäten dieser Proteinbanden nahmen von der untersten zu der obersten hin ab. Somit bildet die CARD im sauren pH-Bereich bereits nach wenigen Stunden intermolekulare Disulfidbrücken. Bei den drei Proteinbanden zwischen 18 kDa und 45 kDa könnte es sich um Di-, Tri- und Tetramere handeln, da ihre theoretischen Molekulargewichte ca. 21 kDa, 32 kDa und 42 kDa betragen. Die Proteinbande bei über 116 kDa könnte Oligomere bzw. Aggregate repräsentieren.

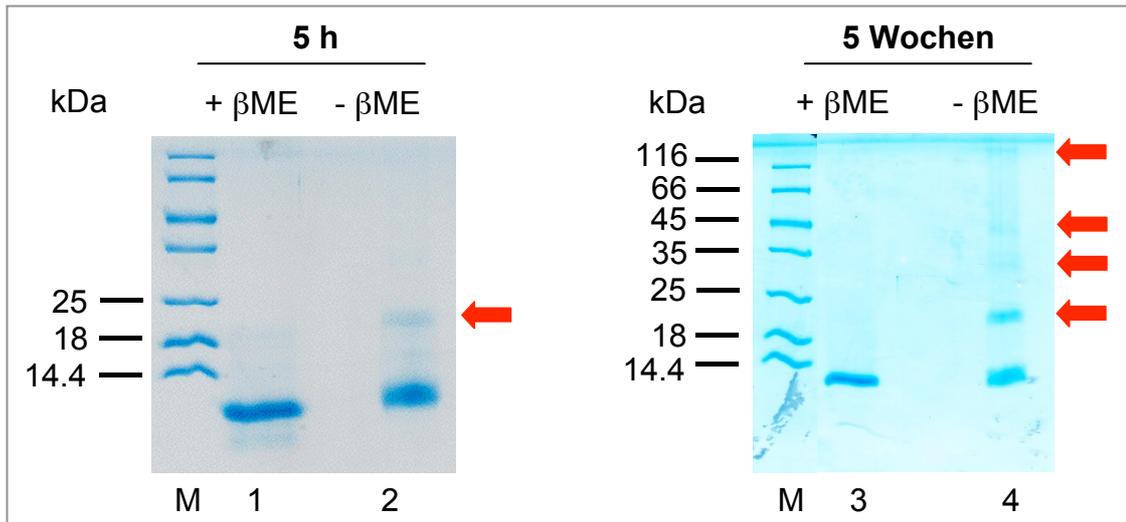


Abb. 3-12: **SDS-PAGE zur Untersuchung der Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken**

Die CARD wurde in 0,01 % TFA rekonstituiert und für 5 Stunden oder 5 Wochen bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit reduzierendem oder nicht-reduzierendem Lämmli-Puffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert (Colloidal-Coomassie-Färbung). M = Marker.

Spuren 1, 2: Inkubation für 5 h

Spuren 3, 4: Inkubation für 5 Wochen

Da die CARD in 0,01 % TFA intermolekulare Disulfidbrücken bildet, wurde untersucht ob durch die Zugabe des Reduktionsmittels TCEP die Stabilität der monomeren CARD verlängert werden kann. Dazu wurde die Probe, welche bereits für fünf Stunden bei 4 °C inkubiert worden ist (Abb. 3-12, Spur 1, 2), mit 0,1 mM TCEP versetzt, für zwei weitere Tage bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert (Abb. 3-13). Nach Inkubation der Probe mit TCEP waren zusätzlich zu der CARD unterhalb von 14,4 kDa weitere Proteinbanden zu sehen (Spur 1). Diese wiesen jedoch im Vergleich zu den entsprechenden Proteinbanden im Kontrollansatz, zu dem kein TCEP hinzu gegeben wurde, geringere Intensitäten auf (Spur 2). Somit wird durch die Zugabe von TCEP die Bildung weiterer Disulfidbrücken verhindert. Sobald diese jedoch entstanden sind, können sie mit 0,1 mM TCEP nicht reduziert werden.

Darüber hinaus migrierten die Proteinbanden der CARD in beiden Spuren des SDS-Gels nicht auf derselben Höhe (Spur 1, 2). Die Probe, welche zuvor mit TCEP versetzt wurde, hatte im Vergleich zu der Kontrolle ohne TCEP eine längere Lauffront.

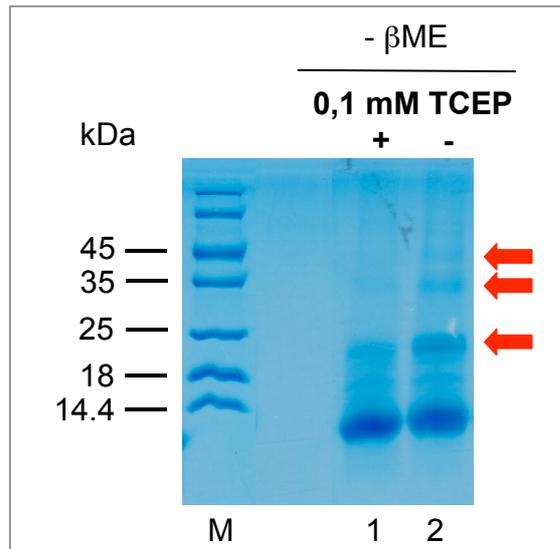


Abb. 3-13: **SDS-PAGE zur Überprüfung der Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken nach Zugabe von TCEP**

Fünf Stunden nach Rekonstitution der CARD in 0,01 % TFA wurde die Probe mit 0,1 mM TCEP versetzt und zwei Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Zu dem Kontrollansatz wurde kein Reduktionsmittel hinzu gegeben. Die Proteinlösungen wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE analysiert (Colloidal-Coomassie-Färbung). M = Marker.

Spur 1: Ohne TCEP, nicht-reduzierender Lämmli-Puffer

Spur 2: Mit TCEP, nicht-reduzierender Lämmli-Puffer

### 3.3 Analyse der Tertiärstruktur der NLRC5 CARD

#### 3.3.1 Synthese in Minimalmedium

Für die Aufnahme von heteronuklearen NMR-Experimenten musste die CARD mit  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Isotopen markiert werden. Dazu wurde die Thioredoxin-CARD in Isotopenmarkierten Minimalmedium synthetisiert. Dabei wurde der *E. coli* Stamm BL21 verwendet, da der Stamm KRX das Fusionsprotein nicht in Minimalmedium produzierte. Das Fusionsprotein war nach Induktion der Genexpression auf dem SDS-Gel sichtbar (Abb. 3-14). Die Intensität der Proteinbande war jedoch gering und nahm auch fünf Stunden nach Induktion der Genexpression nicht zu (Spur 2-6). Des Weiteren begann die  $\text{OD}_{600}$  der Expressionskultur bereits zwei Stunden nach Induktion der Genexpression zu sinken.

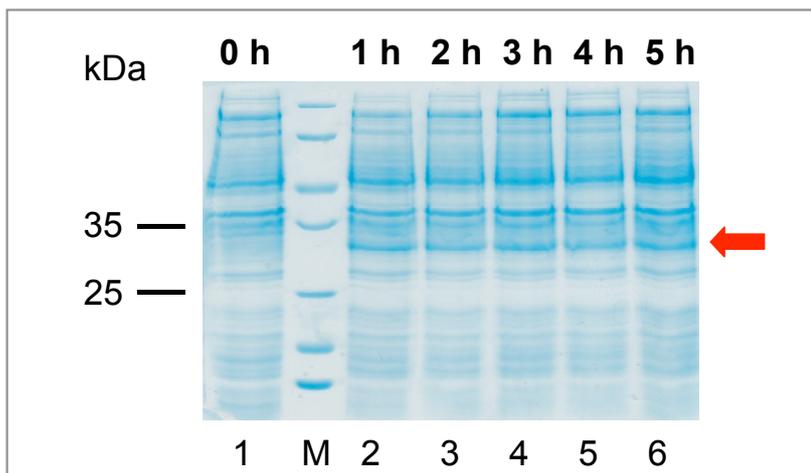


Abb. 3-14: **SDS-PAGE zur Überprüfung der heterologen Synthese der Thioredoxin-CARD in Minimalmedium**

Die Thioredoxin-CARD wurde in dem *E. coli* Stamm BL21 in Minimalmedium synthetisiert. Vor sowie eine bis fünf Stunden nach Induktion der Genexpression wurden Proben aus der Kultur entnommen, mit Lämmli-Puffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert (Coomassie-Färbung). M = Marker.

Spur 1: Vor Induktion der Genexpression

Spur 2-6: 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h nach Induktion der Genexpression

Trotz Änderung der Expressionsbedingungen, wie der Inkubationstemperatur oder des Zeitpunkts der Induktion, konnte die Produktion des Fusionsproteins in dem *E. coli* Stamm BL21 nicht erhöht werden. Die Synthese der Thioredoxin-CARD erfolgte deshalb in insgesamt  $13,5$  l  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierten Minimalmedium.

### 3.3.2 Das HSQC-Spektrum

Die NMR-Experimente wurden mit einer  $44,3 \mu\text{M}$  Proteinlösung ( $175 \mu\text{g}$ ) in  $0,01 \%$  TFA,  $0,5 \text{ mM}$  TCEP,  $7 \%$   $\text{D}_2\text{O}$  von Herrn Prof. Dr. Frank Sönnichsen, Institut für Organische Chemie, Spektroskopische Abteilung, CAU Kiel, durchgeführt.

TFA gilt als ein gutes Lösungsmittel für einige Proteine [88]. Für die Aufnahme von NMR-Proteinspektren ist TFA von Vorteil, insbesondere wenn das Protein in geringer Konzentration vorliegt. Dies hat zwei Gründe, zum einen ist im sauren pH-Bereich der Austausch von  $\text{H}^{\text{N}}$ -Protonen mit Protonen des umgebenden Milieus reduziert, was zur Steigerung der Signalintensität führt. Der optimale pH-Bereich für einen möglichst

langsamen  $H^N$ -Austausch liegt zwischen pH 2 und pH 4 [89]. Zum anderen säuert 0,01 % TFA das Milieu an, aber im Gegensatz zu einem Puffer enthält es keine Ionen. Somit wurden die NMR-Experimente von der CARD in TFA statt im Phosphatpuffer durchgeführt.

Das *Heteronuclear single quantum coherence* (HSQC)-Spektrum kann im Vergleich zu anderen NMR-Proteinspektren schnell aufgenommen werden und gibt Aufschluss darüber, ob die Probe für weitere NMR-Experimente geeignet ist. In einem HSQC-Spektrum werden Signale von Protonen ( $^1H$ ), die an ein Stickstoffatom ( $^{15}N$ ) gebunden sind, detektiert, d.h. jedes Signal repräsentiert eine NH-Bindung. Neben den NH-Gruppen der Peptidbindungen sind auch die NH- und  $NH_2$ -Gruppen der Seitenketten sichtbar. Um zu Bestimmen welches Signal zu welcher Aminosäure gehört, werden jedoch weitere NMR-Spektren wie z.B. das HNCACB und das HN(CO)CACB benötigt.

Von der  $^{13}C/^{15}N$ -markierten CARD wurde zuerst ein HSQC-Spektrum aufgenommen (Abb. 3-15). Es zeigte eine gute Dispersion der Signale und ihre Anzahl im Spektrum schien mit der erwarteten Anzahl der Signale überein zustimmen.

NH-Korrelationen von Seitenketten besitzen charakteristische Werte der chemischen Verschiebung und können dadurch in bestimmten Bereichen eines HSQC-Spektrums erwartet werden. Diese Signale gehen zwar nicht in die Berechnung der Struktur ein, sie können jedoch leicht identifiziert werden und die Werte ihrer chemischen Verschiebungen sind ein Hinweis dafür, ob das Protein strukturiert ist.

In der Literatur werden den NH-Gruppen der Seitenketten Durchschnittswerte für ihre chemischen Verschiebungen zugewiesen. So gilt für die  $NH_2$ -Gruppen von Asparagin (Asn),  $N\delta-H\delta_1$  und  $N\delta-H\delta_2$ , der Wert von 112,79 ppm auf der N-Frequenz, wobei der ersten NH-Gruppe 7,19 ppm und der zweiten 7,24 ppm auf der H-Frequenz zugeordnet werden. Der Durchschnittswert für die  $NH_2$ -Gruppen von Glutamin (Gln),  $N\epsilon-H\epsilon_1$  und  $N\epsilon-H\epsilon_2$ , lautet 111,80 ppm auf der N-Frequenz sowie 7,11 ppm für die erste NH-Gruppe und 7,12 ppm für die zweite auf der H-Frequenz [89].

Mit Hilfe dieser Durchschnittswerte wurden den Signalen im HSQC-Spektrum die  $NH_2$ -Gruppen von Asn und Gln zugeordnet. Darüber hinaus wurden drei Signale von Tryptophan- (Trp)  $N\epsilon-H\epsilon$  und drei von Argininresten (Arg)  $N\epsilon-H\epsilon$  identifiziert, was der Anzahl dieser Aminosäuren in der CARD entspricht. Der Durchschnittswert der

chemischen Verschiebung von Trp N $\epsilon$ -H $\epsilon$  liegt bei 10,11 ppm und der von Arg N $\epsilon$ -H $\epsilon$  bei 7,33 ppm auf der H-Frequenz. Ihre Durchschnittswerte für die N-Frequenzen liegen mit 129,30 ppm und 85,60 ppm außerhalb des dargestellten Ausschnitt des HSQC-Spektrums. Nachdem die NH-Signale gemessen wurden, wurden sie nachträglich entlang der N-Frequenz verschoben, damit sie innerhalb des besagten Ausschnitts sichtbar sind (Abb. 3-15).

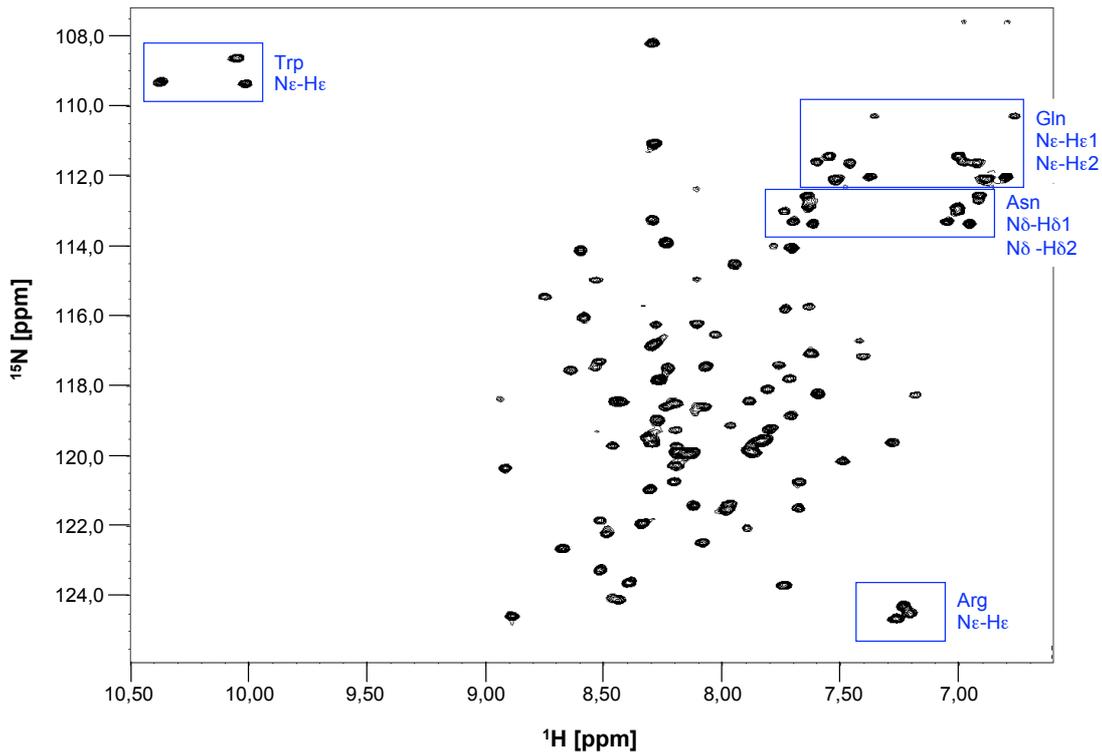


Abb. 3-15: **HSQC-Spektrum der CARD**

Das HSQC-Spektrum wurde von der CARD in 0,01 % TFA, 0,5 mM TCEP aufgenommen. Signale von NH- und NH<sub>2</sub>-Gruppen der Seitenketten von Trp, Arg, Asn und Gln sind hervorgehoben.

Im Laufe von 12 Tagen wurden weitere heteronukleare NMR-Spektren aufgenommen: Das HNCACB-, das NH(CO)CACB- und das HCC(CO)HN-Spektrum. Mit Hilfe dieser Tripelresonanzspektren ist es möglich den Signalen im HSQC-Spektrum entsprechende Aminosäuren der CARD zuzuordnen. Dieser Prozess wird als sequentielle Zuordnung bezeichnet, wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt.

### 3.3.3 Stabilität

Um zu überprüfen, ob die Struktur der CARD sich während der Aufnahme der Tripelresonanzspektren veränderte, wurden in regelmäßigen Abständen HSQC-Spektren aufgenommen und mit dem zu Beginn aufgenommenen verglichen.

Das HSQC-Spektrum, welches nach Aufnahme des letzten Tripelresonanzspektrums gemessen wurde, ähnelte dem zuerst aufgenommenen. Die Verteilung der Signale stimmte in den beiden Spektren in etwa überein, was durch die Überlagerung beider HSQC-Spektren deutlich wurde (Abb. 3-16). Einige Signale wiesen jedoch im Vergleich zum ersten HSQC-Spektrum eine geringere Schärfe auf. Manche waren verschoben und erschienen dadurch in beiden Spektren nicht mehr deckungsgleich. Darüber hinaus enthielt das letzte HSQC-Spektrum vereinzelt Signale, die in dem ersten nicht zu sehen waren, wie z.B. ein viertes Signal im Bereich der NH-Gruppen der Tryptophanreste.

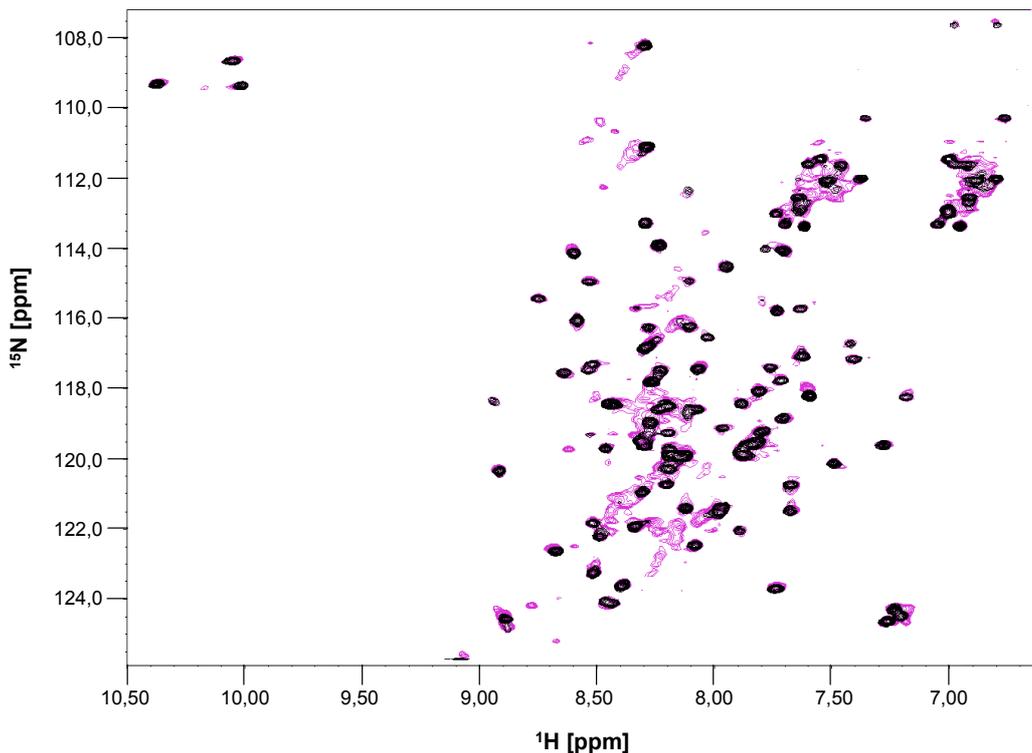


Abb. 3-16: Überlagerung von HSQC-Spektren der CARD

Vor (schwarz) und nach (magenta) Durchführung von Tripelresonanzexperimenten wurden jeweils ein HSQC-Spektrum von der CARD in 0,01 % TFA, 0,5 mM TCEP aufgenommen und übereinander gelegt.

Die Signalverschlechterung des zuletzt aufgenommenen HSQC-Spektrums verdeutlicht (Abb. 3-16), dass die CARD über einen längeren Zeitraum nicht in der ursprünglichen Konformation bleibt. Auch durch die Zugabe von TCEP ad 1,5 mM konnte die CARD nicht wieder in die ursprüngliche Konformation überführt werden, was durch die Aufnahme eines weiteren HSQC-Spektrums überprüft wurde. Aus diesem Grund wurden keine weiteren NMR-Spektren aufgenommen.

Vor Durchführung der NMR-Experimente betrug die Konzentration der CARD 0,47 mg/ml, danach betrug sie 0,3 mg/ml. Nach Abschluss der NMR-Experimente wurde die Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 3-17). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen enthielt die Probe zwei weitere Proteinbanden oberhalb von 18 kDa, was auf das Vorhandensein von intermolekularen Disulfidbrücken deutet (Spur 2). Um diese zu spalten, wurden zu der CARD ad 5 mM TCEP zugegeben. Die Probe wurde über Nacht inkubiert und unter nicht-reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE untersucht (Spur 3). Die zwei zusätzlichen Proteinbanden oberhalb von 18 kDa weisen im Vergleich zu vorher (Spur 2) eine verminderte Intensität auf, waren jedoch weiterhin sichtbar. Darüber hinaus erschien die Proteinbande der CARD unterhalb von 14,4 kDa unter nicht-reduzierenden Bedingungen in Form einer Doppelbande (Spur 3).

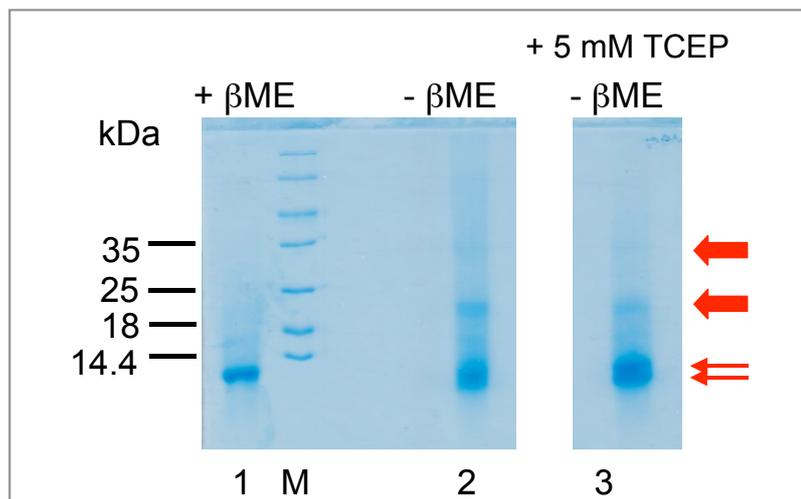


Abb. 3-17: **SDS-PAGE der CARD nach Durchführung von NMR-Experimenten**

Die CARD in 0,1 % TFA, 1,5 mM TCEP wurde zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Ein Teil des Überstands wurde ad 5 mM TCEP versetzt und zwei Tage lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Colloidal Coomassie-Färbung). M = Marker.

Spur 1: 1,5 mM TCEP, reduzierender

Spur 2: 1,5 mM TCEP, nicht-reduzierender Lämmli-Puffer

Spur 3: 5 mM TCEP, nicht-reduzierender Lämmli-Puffer

Die CARD in 0,01 % TFA, 5 mM TCEP wurde anschließend mittels CD-Spektroskopie untersucht (Abb. 3-18). Der Kurvenverlauf entsprach dem eines Proteins mit  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturelementen.

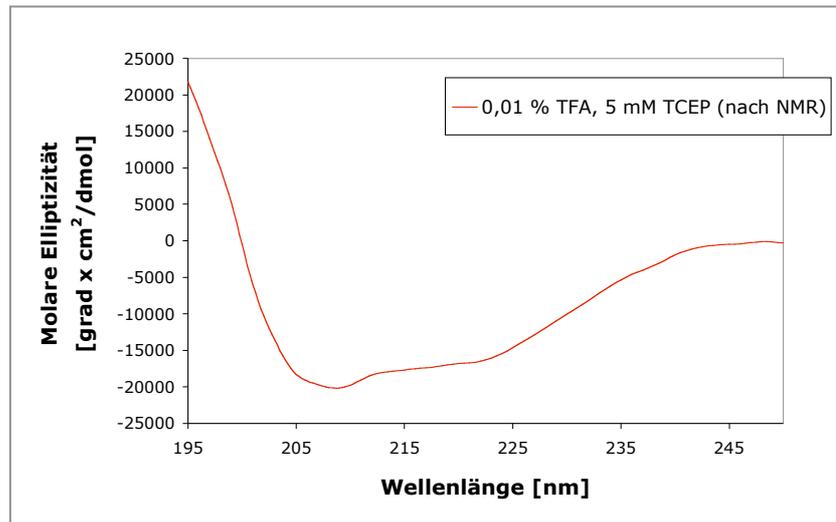


Abb. 3-18: **CD-Spektrum der CARD nach Durchführung von NMR-Experimenten**  
Das CD-Spektrum von der CARD wurde in 0,01 % TFA, 5 mM TCEP aufgenommen.

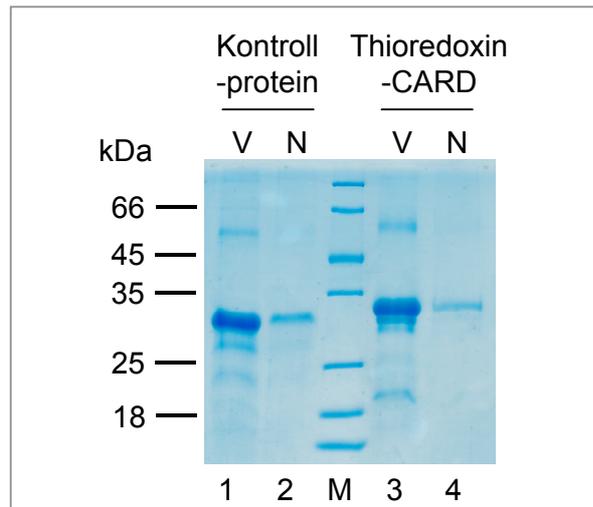
Insgesamt wurden 175  $\mu\text{g}$  der  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -CARD aus 13,5 l Kultur in Minimalmedium isoliert. Dabei wurden aus 1 l Kultur in Minimalmedium ca. 3,3 mg der Thioredoxin-CARD in Disaggregationspuffer gewonnen. Das Fusionsprotein wurde mit einer Ausbeute von ca. 60 % renaturiert. Pro 1 mg der renaturierten Thioredoxin-CARD wurden nach Anwendung der proteolytischen Spaltung, der SEC und der RP-HPLC zwischen 3  $\mu\text{g}$  und 20  $\mu\text{g}$  der CARD gereinigt. Die Ausbeute schwankte sehr stark, da nach Renaturierung des Fusionsproteins ein kontinuierlicher Aggregationsprozess begann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die humane CARD von NLRC5 erfolgreich mit Isotopen markiert, gereinigt und mittels der NMR-Spektroskopie untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigten, dass die rekombinante CARD eine Tertiärstruktur besitzt.

### 3.4 Identifizierung von Interaktionspartnern der NLRC5 CARD

Um neue Interaktionspartner der CARD zu identifizieren wurde die Thioredoxin-CARD mit Zelllysaten inkubiert, und potentielle Bindungspartner wurden mittels Massenspektrometrie analysiert. Dabei wurde die humane T-Zelllinie Jurkat verwendet, da T-Zellen *in vivo* im Vergleich zu anderen Zelltypen eine hohe Expression an *Nlrc5* aufweisen [35, 44], und dem Protein somit in T-Zellen eine entscheidende Funktion zugeschrieben wird. In den Jurkat-Zellen ist, wie auch in vielen anderen Tumorzelllinien, die Expression des endogenen *Nlrc5* nahezu vollständig aufgehoben [44]. Dies hat den Vorteil, dass die rekombinante Domäne nicht mit dem endogenen NLRC5 um potentielle Interaktionspartner konkurrieren muss. Meissner et al. (2010) transfizierten Jurkat Zellen mit *Nlrc5* und zeigten, dass das Protein mit den Promotoren der MHC Klasse I-Gene interagiert und die Synthese von MHC Klasse I-Molekülen stark erhöht [20]. Daraus kann geschlossen werden, dass in den Jurkat Zellen alle Interaktionspartner des NLRC5 zur Verfügung stehen, die notwendig sind um die MHC Klasse I-Gene zu aktivieren.

Die kovalente Bindung der Thioredoxin-CARD an die Sepharose wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 3-19). Nach Inkubation des Fusionsproteins mit der Sepharose war auf dem SDS-Gel die Intensität der Proteinbande der Thioredoxin-CARD zwischen 25 kDa und 35 kDa im Vergleich zu vorher deutlich reduziert (Spur 3, 4). Des Weiteren waren die zwei Proteinbanden zwischen 45 kDa und 66 kDa sowie zwischen 18 kDa und 25 kDa nach Inkubation der Proteinlösung mit der Sepharose nicht mehr auf dem SDS-Gel zu sehen, wobei es sich bei der zuerst genannten um Dimere der CARD handelt (Spur 3, 4). Ähnliche Resultate wurden für das Kontrollprotein, bestehend aus Thioredoxin und Theromacin, einem Protein des Blutegels, beobachtet. Auch bei diesem waren danach die zusätzlichen Proteinbanden nicht mehr zu sehen (Spur 1, 2).



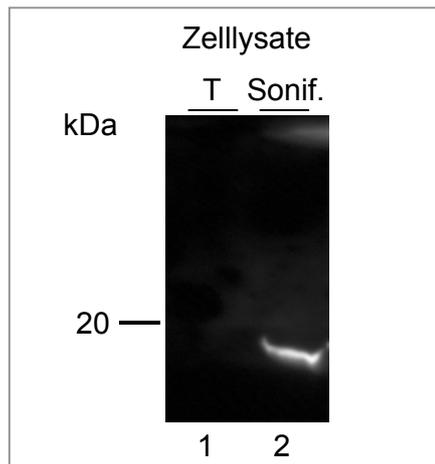
**Abb. 3-19: SDS-PAGE zur Überprüfung der Bindung der Thioredoxin-CARD an die Sepharose**

Die Thioredoxin-CARD und das Kontrollprotein wurden jeweils mit der Sepharose inkubiert. Die Proteinlösungen vor sowie die Überstände nach der Inkubation wurden mittels SDS-PAGE untersucht (Coomassie-Färbung). M = Marker, V = vor, N = nach.

Spur 1, 2: Kontrollprotein, vor und nach Inkubation

Spur 3, 4: Thioredoxin-CARD, vor und nach Inkubation

Da NLRC5 unter anderem eine Funktion als Transkriptionsfaktor erfüllt, sollten für die Durchführung der Interaktionsstudie ein Zelllysate verwendet werden, welches Proteine des Zellkerns enthält. Durch Sonifizieren oder mit Triton X-100 hergestellte Zelllysate wurden mittels Western Blot mit einem  $\alpha$ -Histon-Antikörper auf das Vorliegen von Kernproteinen überprüft (Abb. 3-20). Ausschließlich in den durch Sonifizieren hergestellten Zelllysate war eine Bande unterhalb von 20 kDa sichtbar, die den ca. 20 kDa großen Histonen entsprechen könnte.



**Abb. 3-20: Western Blot zur Überprüfung der Freisetzung von Kernproteinen während der Zellyse**

Humane Zellen wurden entweder durch Sonifizieren oder mit einem Triton X-100-haltigen Lysepuffer aufgeschlossen. Die Zellysate wurden anschließend mittels Western Blot mit einem  $\alpha$ -Histon-Antikörper analysiert. T = Triton x-100, Sonif. = Sonifikation.

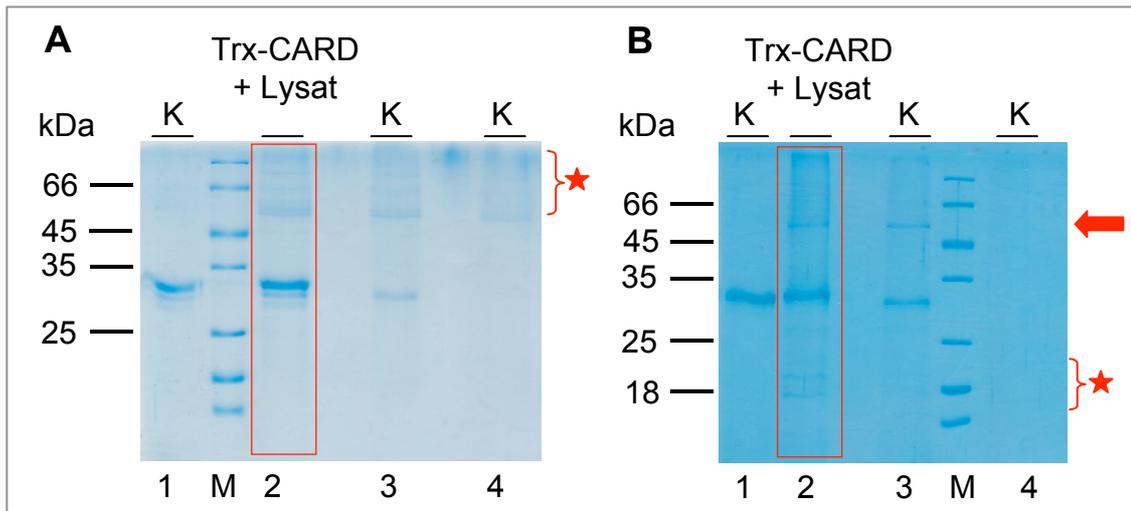
Spur 1: Zellaufschluss mit Triton

Spur 2: Zellaufschluss durch Sonifizieren

Die an Sepharose gebundene Thioredoxin-CARD wurde mit einem Zellysat, welches durch Sonifizieren hergestellt wurde, inkubiert. Anschließend wurden die potentiellen Bindungspartner mittels SDS-PAGE untersucht (Abb. 3-21). Dabei wurden zwei Experimente unter Verwendung unterschiedlicher Lysepuffer durchgeführt. Der PBS-Puffer (Lysepuffer 1) sollte nach der Zellyse cytosolische Proteine und Proteine des Zellkerns enthalten (Abb. 3-21 A). Der Tris-Puffer (Lysepuffer 2) enthielt Triton, das zusätzlich Membranproteine solubilisieren sollte, sowie Glycerol, welches die Stabilität mancher Proteine erhöhen kann (Abb. 3-21 B).

Auf den SDS-Gelen war die Thioredoxin-CARD zwischen 25 kDa und 35 kDa sichtbar (Abb. 3-21 A und B, Spur 1, 2). Im Vergleich dazu zeigte die Proteinbande des Kontrollproteins eine geringere Intensität (Abb. 3-21 A und B, Spur 3). Auf dem ersten SDS-Gel (Abb. 3-21 A) war der Unterschied zwischen diesen Bandenintensitäten nicht so stark ausgeprägt wie auf dem zweitem SDS-Gel (Abb. 3-21 B). Das Vorhandensein dieser Proteinbanden wurde nicht erwartet, da die Fusionsproteine kovalent an die Sepharose gebunden wurden und nicht die Sepharose, sondern die an diese nicht kovalent gebundenen Proteine auf die SDS-Gele aufgetragen wurden. Die Probe des ersten Experiments enthielt mehrere Proteinbanden oberhalb von 45 kDa (Abb. 3-21 A, Spur 2). Diese waren in einer geringeren Intensität jedoch auch in den Kontrollansätzen

sichtbar (Abb. 3-21 A, Spur 3, 4). Die Probe des zweiten Experiments enthielt ebenfalls eine oder mehrere Proteinbanden oberhalb von 45 kDa, die ebenfalls in einem der Kontrollansätze präsent waren (Abb. 3-21 B, Spur 2, 3). Darüber hinaus zeigte das SDS-Gel des zweiten Experiments, dass die Probe zwei Proteinbanden zwischen 18 kDa und 25 kDa enthielt (Abb. 3-21 B, Spur 2), die in den Kontrollansätzen nicht zu sehen waren.



**Abb. 3-21: SDS-PAGE zur Analyse potentieller Interaktionspartner der rekombinanten CARD mittels Massenspektrometrie**

Die an Sepharose gebundene Thioredoxin-CARD wurde mit Zelllysaten inkubiert, **A** Lysepuffer 1, **B** Lysepuffer 2. Anschließend wurden die Proben gemeinsam mit den Kontrollansätzen in Lämmli-Puffer erhitzt und der Überstand wurde mittels SDS-PAGE analysiert (Colloidal-Coomassie-Färbung). M = Marker, K = Kontrolle, Trx-CARD = Thioredoxin-CARD.

- Spur 1: Sepharose-Trx-CARD + Lysepuffer
- Spur 2: Sepharose-Trx-CARD + Zelllysate
- Spur 3: Sepharose-Kontrollprotein + Zelllysate
- Spur 4: Sepharose ohne Protein + Zelllysate

Die Spuren der SDS-Gele, welche die potentiellen Interaktionspartner der CARD enthielten, wurden mittels Massenspektrometrie untersucht (Abb. 3-21 A und B, Spur 2). Die Experimente wurden von Dr. Liam Cassidy aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Andreas Tholey, Institut für Experimentelle Medizin, CAU Kiel, durchgeführt. In den zwei Spuren der SDS-Gele wurden verschiedene cytosolische Proteine, Mitochondrienproteine, sowie zahlreiche Kernproteine, wie z.B. Histone oder Proteine des Spleißprozesses, detektiert (Tab. 3-2).

Tab. 3-2: **Auswahl an potentiellen Interaktionspartnern der CARD**

<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>
<i>Calcyclin-binding protein</i> (CACYPB)	Erfüllt eine Funktion in der Polyubiquitinierung und der damit verbundenen Degradation des $\beta$ -Catenins [90].
Caspase-14	Wird in Epidermiszellen exprimiert und erfüllt eine Funktion in der Ausbildung der Hautbarriere [91].
<i>SNW domain containing 1</i> (SNW1)	Co-Activator des Vitamin D-Rezeptors [92].
<i>High mobility group protein box 1</i> (HMGB1)	Transkriptionsfaktor, der unspezifisch an DNA bindet und diese für andere Faktoren zugänglich macht [93].
<i>Ying Yang 1</i> (YY1)	Ubiquitärer Transkriptionsfaktor, der als Aktivator oder Repressor Gene der Proliferation und Zelldifferenzierung reguliert [94].
<i>Nucleosome assembly protein 1-like 1</i> (NAP1L1)	Transkriptionsfaktor, der die Assemblierung und Disassemblierung von Nucleosomen durch die Assoziation von Histonen an die DNA reguliert [95].

## 4 DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die strukturelle und funktionelle Charakterisierung der humanen CARD des Rezeptors NLRC5. Dazu wurde die Domäne in *E. coli* synthetisiert, gereinigt und mittels CD- und NMR-Spektroskopie untersucht. Um potentielle Interaktionspartner der CARD zu identifizieren wurde darüber hinaus eine Interaktionsstudie durchgeführt.

### *Reinigung und Ausbeute der rekombinanten NLRC5 CARD*

In dieser Arbeit konnten nicht alle NMR-Spektren der CARD aufgenommen werden, die notwendig wären um die Tertiärstruktur der Domäne zu bestimmen. Zum einen war die CARD unter den gegebenen Bedingungen über einen längeren Zeitraum instabil, zum anderen war die Proteinmenge nicht ausreichend um alle NMR-Experimente zügig durchführen zu können.

Nach proteolytischer Spaltung der Thioredoxin-CARD mit der Enterokinase wurden zwei Fragmente mit der Größe von ca. 17 kDa für das Thioredoxin und ca. 10 kDa für die CARD erwartet. Dagegen wurden außer der nicht-gespaltenen Thioredoxin-CARD und der CARD zwei weitere Proteinbanden, bei ca. 18 kDa und zwischen 14,4 kDa und 18 kDa, detektiert (Abb. 3-4). Bei der erstgenannten Proteinbande handelt es sich um das Thioredoxin, aus der die zweite durch unspezifische Proteolyse entsteht. Eine unspezifische Proteolyse durch die Enterokinase wurde bereits beschrieben [96-98].

Die Intensität der CARD im SDS-Gel wurde trotz Verwendung der doppelten Enzymmenge kaum erhöht, obwohl die der Thioredoxin-CARD deutlich verringert wurde (Abb. 3-4, Spur 6, 7). Dies könnte ein erster Hinweis dafür sein, dass die CARD unter den gegebenen Bedingungen nicht stabil ist und ab einer bestimmten Konzentration präzipitiert.

Mittels SEC wurde die CARD bis auf geringe Verunreinigungen aus dem Proteingemisch isoliert (Abb. 3-5). Das nicht-gespaltenen Thioredoxin-CARD eluiert im Ausschlussvolumen der Säule und wies damit ein Molekulargewicht von größer als 75 kDa auf (Abb. 3-4). Möglicherweise lag ein Teil der Fusionsproteine in Form von

Aggregaten vor, weshalb die Enterokinase diese nicht spalten konnte, da ihre Erkennungssequenz nicht zugänglich war.

Während der Konzentrierung der angereicherten CARD präzipitierte die Domäne sowohl in Tris (pH 8) als auch nach vorheriger Ansäuerung der Lösung unterhalb von pH 5. Bei diesen pH-Werten sollte die CARD theoretisch eine negative bzw. positive Gesamtladung aufweisen, durch welche die Moleküle voneinander abgestoßen werden sollten. Da im Falle der CARD dennoch Präzipitation beobachtet wurde, scheint die Domäne nicht aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen zu aggregieren. Möglicherweise treten stattdessen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Molekülen auf. Somit war die CARD unter den getesteten Bedingungen nicht stabil. Nach Erreichen einer bestimmten Konzentration könnte die Domäne die Lösung sättigen und daraufhin präzipitieren.

*Eibl et al.* (2012) konnten die Konzentration der NLRC5 CARD in Phosphatpuffer (pH 7,2) ebenfalls nicht mittels einer Amicon-Rührzelle erhöhen [99]. Dabei geben die Autoren jedoch keine Information darüber wie sie die NLRC5 CARD reinigten. *Humke et al.* (2000) konzentrierten ICEBERG mittels Gefriertrocknung [68]. In der vorliegenden Arbeit wurde die CARD schließlich ebenfalls mittels Gefriertrocknung nach Durchführung der RP-HPLC konzentriert.

Nach Reinigung der CARD mittels RP-HPLC enthielt das SDS-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine schwache Proteinbande bei ca. 18 kDa, die auf intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den CARD-Molekülen beruht. (Abb. 3-8). Ob die Disulfidbrücken während Durchführung der RP-HPLC gebildet wurden und die Fraktion der monomeren CARD verunreinigten oder ob sie erst nach der Rekonstitution des Proteins entstanden, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Die RP-HPLC erfolgte in einem sauren Milieu und die CARD wurde nach Rekonstitution in 0,01 % TFA (pH 2,8), ohne Zugabe eines Reduktionsmittels, unmittelbar auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Auftreten von Disulfidbrücken nach dieser relativ kurzen Inkubationszeit bei einem niedrigen pH-Wert wurde nicht erwartet, denn das Gleichgewicht zur Bildung von Disulfidbrücken im sauren pH-Bereich sollte auf der Seite der offenen Cysteine und nicht auf der von Cystinen liegen. *De Alba* (2009) reinigte ASC, welches eine CARD mit einem Cysteinrest besitzt, auch mittels

HPLC. Anschließend wurde das ASC ebenfalls in einem sauren Milieu, jedoch unter Zugabe von TCEP, rekonstituiert [83].

Die Ausbeute nach Reinigung der CARD von NLRC5 stellte ein großes Problem dar, weil die CARD eine geringe Stabilität aufwies und, wie bereits erwähnt, während der Proteinkonzentrierung präzipitierte. Ein weiterer Grund für die geringe Ausbeute könnte die unspezifische proteolytische Spaltung nicht nur des Thioredoxin sondern auch der CARD sein. Eine unspezifische Aktivität der Enterokinase wurde bereits beschrieben [96, 100]. Diese Vermutung wurde zu einem späteren Zeitpunkt überprüft, wobei auf den SDS-Gelen unterhalb von 14,4 kDa statt einer zwei Proteinbanden direkt übereinander zu sehen waren (Anhang, Abb. 6-2). Die native Enterokinase ist ein Heterodimer aus einer großen und einer kleinen Untereinheit. Letztere stellt die katalytische Untereinheit dar und wird, wie das Holoenzym auch, für die proteolytische Spaltung eingesetzt. Das Holoenzym weist jedoch gegenüber der kleinen katalytischen Untereinheit eine höhere Substratspezifität auf [100, 101]. In dieser Arbeit wurde die katalytische Untereinheit der Enterokinase (Invitrogen) verwendet. Eine potentielle unspezifische Spaltung der CARD hätte möglicherweise durch Verwendung des Holoenzym (Roche) vermieden werden können.

Die Untersuchung von DD-Domänen gilt generell als schwierig, da diese unter physiologischen Bedingungen zu Aggregationen neigen [102]. So konnten z.B. die Strukturen der beiden CARDS von Nod2 bis heute *in vitro* nicht aufgeklärt werden, da diese bei höheren Proteinkonzentrationen oligomerisieren [103].

#### ***Untersuchung der NLRC5 CARD mittels CD-Spektroskopie***

Die ähnlichen Verläufe der CD-Spektren der CARD in 0,01 % TFA (pH 2,8) und in Phosphatpuffer (pH 7,3) deuten darauf hin, dass die rekombinante CARD sowohl im sauren als auch im physiologischen pH-Bereich  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturelemente enthält (Abb. 3-9).

Die typische Schmelzkurve eines hitzeinstabilen Proteins besitzt einen S-förmigen Verlauf, d.h. bei einer bestimmten Temperatur steigt die Elliptizität sprunghaft an, da zu diesem Zeitpunkt das Protein seine Sekundärstrukturelemente verliert. Bei der Schmelzkurve der CARD dagegen nahm die Intensität der Kurve kontinuierlich

lediglich um etwa 40 % ab, wodurch der CARD keine Schmelztemperatur zugewiesen werden kann. Die ähnlichen Verläufe der CD-Spektren vor und nach Durchführung der Schmelzkurve verdeutlichen, dass die CARD nach Erhitzen und wieder Abkühlen weiterhin  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturelemente enthält (Abb. 3-11). Die geringfügig verminderten Werte der Elliptizität nach Erhitzen der Probe, deuten auf eine Präzipitation des Proteins hin. Die hier untersuchte CARD ist somit thermostabil.

Bis jetzt untersuchte CARDS dagegen sind thermoinstabil und besitzen Schmelztemperaturen im Bereich zwischen 38 °C und 78 °C. Dazu gehören die CARD1 und CARD2 von Nod2, Nod1 CARD, APAF-1 CARD und Procaspase-9 CARD [103]. Die hier erzielten Ergebnisse sprechen somit dafür, dass die humane NLRC5 CARD nicht die klassische Struktur einer CARD-Domäne besitzt.

#### ***Untersuchung der NLRC5 CARD mittels NMR-Spektroskopie***

Die breite Dispersion der Signale in dem HSQC-Spektrum deutet darauf hin, dass die CARD in 0,01 % TFA, 0,5 mM TCEP eine Tertiärstruktur besitzt (Abb. 3-15). Bei unstrukturierten Proteinen dagegen überlappen die Signale miteinander und erscheinen in einem kleinen Bereich des Spektrums. Ein weiteres Indiz, das für eine strukturierte CARD spricht, sind die drei Signale von Tryptophanresten, welche im erwarteten Bereich des HSQC-Spektrums eines gefalteten Proteins liegen. Bei strukturierten Proteinen sind die hydrophoben Tryptophanseitenketten ins Proteininnere gerichtet, wodurch die Trp  $N\epsilon$ - $H\epsilon$ -Gruppe die charakteristischen Werte der chemischen Verschiebung aufweist. Bei unstrukturierten Proteinen sind sie dagegen dem wässrigen Milieu zugewandt.

Das zuerst und das nach 12 Tagen aufgenommene HSQC-Spektrum zeigten eine übereinstimmende Signalverteilung (Abb. 3-16). Dies deutet darauf hin, dass die CARD größtenteils ihre Tertiärstruktur beibehielt. In dem zuletzt aufgenommenen HSQC-Spektrum waren jedoch auch zusätzliche Signale geringer Intensität, z.B. ein viertes Signal im Bereich der NH-Gruppen von Tryptophanresten, zu sehen. Somit scheint zumindest ein Teil der CARD-Moleküle geringfügig die Tertiärstruktur verändert zu haben, möglicherweise aufgrund einer Dimerisierung der Moleküle. Die reduzierte Qualität und Intensität der Signale im zuletzt genannten HSQC-Spektrum sowie die im Anschluss gemessene Reduktion der Proteinkonzentration verdeutlichen, dass die Domäne präzipitierte, wobei die Tertiärstruktur zum Teil beibehalten wurde. Zumindest

behält die CARD trotz Bildung von Di- und Trimeren weiterhin die  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturelemente bei (Abb. 3-18).

#### ***Untersuchung der intermolekularen Disulfidbrücken zwischen den CARD-Molekülen***

In saurem Milieu wurden intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den CARD-Molekülen geschlossen (Abb. 3-12). Bereits nach 5 Tagen waren Dimere, nach 5 Wochen Tri-, Tetra- und Oligomere bzw. Aggregate auf dem SDS-Gel sichtbar. Die Bildung der Oligomere über intermolekulare Disulfidbrücken während der Aufnahme der NMR-Experimente konnte durch den Einsatz von 0,5 mM TCEP auch nicht verhindert werden (Abb. 3-17). Möglicherweise hätte eine höhere TCEP-Konzentration ihre Bildung während der Messzeit verhindert. So wurde für die Strukturaufklärung des ASC in pH 3,8 eine TCEP-Konzentration von 5 mM verwendet [83].

Nach Abschluss der NMR-Experimente wurde die NLRC5 CARD mit 5 mM TCEP nachträglich versetzt, was zu einer geringfügigen, jedoch nicht vollständigen, Reduktion der Disulfidbrücken führte (Abb. 3-17). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die intermolekularen Disulfidbrücken für das Lösungsmittel sowie das darin enthaltene Reduktionsmittel nicht zugänglich sind, weil sie sich im Inneren der Dimere bzw. Multimere befinden.

Der Einsatz eines anderen Reduktionsmittels stellt eine Option dar, um die Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken zu verhindern. So haben *Humke et al.* (2000) erfolgreich die Struktur von ICEBERG in pH 3,8 mit 20 mM DTT mittels NMR aufgeklärt [68]. TCEP gilt im Vergleich zu  $\beta$ ME und DTT als ein stabileres und effizienteres Reduktionsmittel [104]. Da es stark hydrophil ist, wird es nicht für die Reduktion von „maskierten“ Disulfidbrücken empfohlen [105].  $\beta$ ME und DTT sind dagegen auch in bestimmten organischen Lösungsmitteln lösbar und können möglicherweise besser Disulfidbrücken in einer hydrophoben Umgebung reduzieren. Allerdings tritt dabei die Problematik auf, dass  $\beta$ ME und DTT im Gegensatz zu TCEP im sauren pH-Bereich weniger effektiv sind [105]. Aus diesem Grund wird für die Strukturaufklärung im sauren Milieu generell TCEP verwendet.

Des Weiteren erschien die Proteinbande der CARD nach Durchführung der NMR-Experimente unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf dem SDS-Gel in Form einer Doppelbande (Abb. 3-17). Möglicherweise wurden während der 12-tägigen Messzeit

nicht nur inter- sondern auch intramolekulare Disulfidbrücken geschlossen, die durch den  $\beta$ ME-haltigen Lämmli-Puffer, jedoch nicht durch TCEP, reduziert wurden. Isomere, die sich aufgrund von intramolekularen Disulfidbrücken unterscheiden, können in einem SDS-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen unterschiedliche Migrationen aufweisen.

Auf einigen SDS-Gelen waren beim Vergleich der Proteinbande der CARD unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen Unterschiede in der Migration des Proteins sichtbar. Dies könnte ebenfalls auf das Vorliegen von intramolekularen Disulfidbrücken hinweisen (Abb. 3-12 links, Abb. 3-13).

Entsprechend dem Aktivierungsmodell der NLRs bleibt die CARD in der geschlossenen Form des NLRC5 verborgen, in der offenen Form bindet sie an die CARD-Domänen anderer Proteine. Die NLRC5 CARD sollte somit im Gegensatz zu den hier vorliegenden Bedingungen nie vollständig von einem Lösungsmittel umgeben sein. Wie bereits erwähnt, deutet die Präzipitation der CARD bei pH-Werten unterhalb und oberhalb des isoelektrischen Punkts auf mögliche hydrophobe Interaktionen zwischen den Molekülen hin. Auch die Thermostabilität der CARD deutet auf das Vorliegen von starken Wechselwirkungen, die nicht nur intra- sondern auch intermolekular vorliegen könnten. Möglicherweise di-, bzw. multimerisieren die CARD-Moleküle über hydrophobe Interaktionen miteinander. Sobald eine Interaktion vorliegt, bildet sich in diesem Bereich eine Disulfidbrücke zwischen den beiden CARD-Molekülen aus. Da diese in einer hydrophoben Umgebung liegt, ist sie von dem Lösungsmittel ausgeschlossen und kann durch das hydrophile TCEP nicht reduziert werden. Bei diesem Vorgang könnte ein Cysteinrest, das sich auf der Oberfläche des Proteins befindet, die intermolekularen Disulfidbrücken ausbilden. Eine andere Möglichkeit ist, dass sich die Tertiärstruktur der CARD im Laufe der Zeit so verändert, dass die im Inneren des Proteins liegende Cysteine zugänglicher werden.

Um die Stabilität der CARD zu erhöhen und damit auch die Bildung der Disulfidbrücken zu verhindern, müssten die hydrophoben Interaktionen zwischen den Molekülen unterbunden werden. Dies könnte z.B. durch die Zugabe von chaotropen Ionen erreicht werden.

*Srimathi et al.* (2008) beobachteten eine pH-Wert abhängige Dimerisierung der CARD von Nod1, wobei die Homodimere auf einer intermolekularen Disulfidbrücke beruhen [78]. So lag die Domäne bei pH 5 (ohne Reduktionsmittel) hauptsächlich als Dimer und bei pH 8 (ohne Reduktionsmittel) dagegen als Monomer vor. Die Autoren vermuten, dass die Dimerisierung der CARD eines NOD-like-Rezeptors über intermolekulare Disulfidbrücken einen einzigartigen Regulationsmechanismus darstellt. Die physiologische Bedeutung der Nod1 CARD-Dimere konnte jedoch bis jetzt nicht bestätigt werden [78].

*Jang et al.* (2013) kristallisierten die CARD von CARD11 in Form eines Homodimers, welches durch intermolekulare Disulfidbrücken verbunden war [66]. Allerdings wurde während der Kristallisation bei pH 8 kein Reduktionsmittel zugegeben. In Lösung lag die CARD ebenfalls als Dimer vor, wurde jedoch durch die Zugabe von 5 mM DTT in die monomere Form überführt. Die Bildung von Disulfidbrücken bei pH 8 ohne die Verwendung eines Reduktionsmittels kann erwartet werden. Die Autoren stellten jedoch bezüglich der reversiblen Bildung der CARD-Dimere eine interessante Hypothese auf. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) aktivieren die Bildung des CARD11-Signalosoms, an dem die CARD von CARD11 beteiligt ist. Die Autoren schlagen vor, dass ROS den oligomeren Zustand des CARD11-Signalosoms durch die Bildung von Disulfidbrücken zwischen den CARD-Domänen reguliert. Sie stützen ihre Hypothese auf die Untersuchungen des NLRP3-Inflammasoms, welches durch ROS aktiviert wird. Dabei soll ROS den oligomeren Zustand der NLRP3 PYD-Domäne, die der CARD-Domäne verwandt ist, kontrollieren und so die Bildung des Inflammasoms regulieren.

Auch NLRC5 erfüllt eine Funktion in der Bildung eines Inflammasoms [41]. Die Di- bzw. Multimerisierung der CARD von NLRC5 über intermolekulare Disulfidbrücken könnte ebenfalls bei diesem Vorgang eine physiologische Rolle spielen.

#### **Struktur der murinen NLRC5 CARD** (*Gutte et al.*, 2014) [106]

*Gutte et al.* (2014) veröffentlichten im Mai dieses Jahres die mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärte Struktur der murinen NLRC5 CARD und zeigten, dass die Domäne einzigartige strukturelle Elemente enthält [106]. Sie wurde als ein Fusionsprotein mit der *Glutathione-S-transferase* (GST) löslich in *E. coli* exprimiert (GST-mCARD). Die Autoren synthetisierten auch die humane CARD, die aus den ersten 103 Aminosäuren bestand, ebenfalls löslich als Fusionsprotein mit der GST

(GST-hCARD). Die humane CARD wurde von den Autoren jedoch weder gereinigt noch strukturell untersucht. Dies wurde damit begründet, dass das Fusionsprotein GST-hCARD gegenüber GST-mCARD eine geringere Löslichkeit zeigte [106].

In der vorliegenden Arbeit aggregierte die Thioredoxin-CARD zu Einschlusskörpern. Somit scheint GST gegenüber dem Thioredoxin geeigneter für die lösliche Produktion der humanen CARD zu sein. Eventuell hatten die 11 zusätzlichen Aminosäuren am C-Terminus einen positiven Einfluss auf die lösliche Expression der GST-hCARD gegenüber der hier untersuchten Thioredoxin-CARD. Von diesen 11 Aminosäuren waren vier geladen und drei polar.

*Gutte et al.*, (2014) stand für die NMR-Experimente eine 600  $\mu$ M Proteinlösung der murinen CARD zur Verfügung [106], was etwa 13-mal mehr Protein darstellt als die in dieser Arbeit verwendete Menge an humaner CARD. Die murine CARD wurde in MES-Puffer (pH 6,2), 2 mM TCEP gereinigt und untersucht [106]. Möglicherweise wäre dieser Puffer ebenfalls geeigneter für die Reinigung der humanen CARD gewesen. Der MES-Puffer zählt zu den sog. „biologischen Puffern“, die unter anderem eine geringe Wechselwirkung mit Proteinen aufweisen sollen.

Wie auch in dieser Arbeit für die humane CARD beschrieben, beobachteten *Gutte et al.* (2014), dass die murine CARD in leicht saurem Milieu oligomerisierte, was erst durch die Zugabe von 2 mM TCEP unterbunden werden konnte [106]. Darüber hinaus schlussfolgerten die Autoren, dass die murine CARD über einen hydrophoben Bereich auf ihrer Oberfläche dimerisiert. Möglicherweise besitzt die humane CARD ebenfalls diesen hydrophoben Bereich auf ihrer Oberfläche, wodurch nicht nur die bereits erwähnte Dimerisierung der humanen CARD, sondern auch die Elution der Domäne bei der hohen Acetonitril-Konzentration von 85 % während der RP-HPLC erklärt werden könnte.

Des Weiteren wurde für die murine CARD die typische Schmelzkurve eines thermoinstabilen Proteins mit einer Schmelztemperatur von 66 °C bestimmt [106]. Anhand dieser Ergebnisse erscheint es unwahrscheinlich, dass die in dieser Arbeit untersuchte humane CARD tatsächlich thermostabil ist. Vielmehr unterstützt es die Vermutung, dass die humane CARD aufgrund von hydrophoben Interaktionen zwischen den CARD-Molekülen während des Erhitzens stabilisiert wurde.

Die Aufklärung der Strukturen von humanen PRRs bereitet generell Schwierigkeiten, da die Rezeptoren nicht einfach zu reinigen sind [107]. Statt den humanen PRRs wurden oftmals PRRs bzw. Domänen anderer Spezies strukturell aufgeklärt. So überprüften *Yoon et al.*, (2012) die heterologe Synthese der Ektodomäne des TLR5 aus Mensch, Maus, Frosch, Forelle und Zebrafisch [108]. Dabei konnte ausschließlich das Protein des Zebrafischs in löslicher Form synthetisiert werden. Weitere Beispiele sind die Strukturen des *full-length* RIG-I der Ente [80] und der murinen CARD von CARD11, die gegenüber den humanen Proteinen höhere Löslichkeiten besitzen [66].

### ***Identifizierung von Interaktionspartnern der NLRC5 CARD***

NLRC5 transaktiviert die MHC Klasse I-Gene und beeinflusst den RIG-I-like- und den NF- $\kappa$ B-Signalweg sowie die Ausbildung eines Inflammasoms. In den hier durchgeführten Experimenten wurden jedoch keine Interaktionen zwischen der rekombinanten humanen CARD und den Transkriptionsfaktoren des *enhanceosome*, den Mitgliedern der oben genannten Signalwege oder den Komponenten des Inflammasoms nachgewiesen.

*Gutte et al.*, (2014) modelten an die hydrophobe Oberfläche der murinen NLRC5 CARD ein zweites Monomer, was in der Bildung einer neuen negativ geladenen Bindungsoberfläche resultierte, die aus den beiden Monomeren zusammengesetzt wird [106]. Somit kann möglicherweise erst das CARD-Dimer seine Interaktionspartner binden. Darüber hinaus konnten *Gutte et al.*, (2014) die bereits beschriebene Interaktion zwischen NLRC5 und RIG-I nicht nachweisen [42], wobei sie in einem NMR *shift assay* die direkte Interaktion zwischen der murinen monomeren NLRC5 CARD und den murinen RIG CARDS untersuchten [106].

Möglicherweise wurden in der vorliegenden Arbeit keine Interaktionen mit mutmaßlichen Interaktionspartnern identifiziert, da die humane CARD an der Sepharose nicht als entsprechendes Dimer vorlag und somit auch nicht die neue Bindungsoberfläche enthielt. Andere Erklärungen sind, dass der rekombinanten CARD noch unbekannt posttranslationale Modifikationen fehlten oder dass die Bedingungen während der Durchführung der Experimente nicht optimal waren um die mutmaßlichen Interaktion nachweisen zu können. So könnte z.B. eine zu geringe Anzahl an Zellen in den Experimenten eingesetzt worden sein.

*Neerincx et al.* (2014) zeigten kürzlich, dass die CARD von NLRC5 eine transkriptionelle Aktivität aufweist [109]. Dabei vermittelte die CARD nicht nur die Aktivierung von MHC-Genen, sondern sie fungierte sogar auch als eine Transaktivierungsdomäne bei der Aktivierung eines Testgens. Daraus könnte geschlussfolgert werden, dass die CARD an allgemeine/basale Transkriptionsfaktoren bindet. In der hier durchgeführten Interaktionsstudie wurden jedoch Transkriptionsfaktoren identifiziert, die nicht bei allgemeinen sondern bei spezifischen Prozessen wirken (Tab. 3-2), wodurch eine Interaktion mit der NLRC5 CARD als unwahrscheinlich erscheint. Der Faktor HMGB1 bindet zwar unspezifisch an die DNA, hat jedoch auch die Funktion eines DAMPs. Es wird von sterbenden Zellen freigesetzt [93], was die Wahrscheinlichkeit einer spezifischen Interaktion mit der CARD herabsetzt. Der Faktor NAP1L1 hat eine Funktion in der Umformung des Chromatins [95] und könnte somit einen potentiellen Interaktionspartner der CARD darstellen.

Das in einem der SDS-Gele identifizierte CACYBP spielt eine Rolle bei der Ubiquitinierung (Tab. 3-2). Allerdings ist die Funktion des CACYBP auf einen spezifischen Signalweg beschränkt [90]. *Cui et al.* (2010) beschreiben, dass NLRC5 ubiquitiniert wird [42], was die mehrfach beobachtete Doppelbande des NLRC5 in SDS-Gelen erklären könnte [35, 42, 43]. Da eine Ubiquitinierung der CARD2 von RIG-I bereits nachgewiesen wurde [79], könne im Falle von NLRC5 ebenfalls die CARD ubiquitiniert werden. Das Ubiquitin wurde allerdings nicht in demselben SDS-Gel, in welchem das CACYBP detektiert wurde, identifiziert. Dagegen wurde in einem hier nicht gezeigten SDS-Gel Polyubiquitin-C detektiert, welches jedoch entsprechend dem *score*, nach welchem die Auswertung der massenspektroskopischen Analyse erfolgte, als eine Verunreinigung eingestuft wurde (nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde die Caspase14 in einem der SDS-Gele detektiert (Tab. 3-2). Das Protein wird jedoch, im Gegensatz zu den ubiquitär vorkommenden Mitgliedern der Caspase-Familie, in Epidermiszellen exprimiert und ist in den meisten anderen Geweben abwesend. Darüber hinaus enthält die Caspase14 keine CARD-Domäne [91]. Damit könnte es sich bei diesem potentiellen Interaktionspartner um eine Kontamination handeln, die aus der Epidermis des Experimentators stammt.

Eine Aussage darüber, ob es sich bei den in den SDS-Gelen detektierten Proteinen um spezifische Interaktionen handelt, kann an dieser Stelle nicht gemacht werden. Dazu müssten im nächsten Schritt die Kontrollspuren der SDS-Gele nach Vorliegen der identifizierten potentiellen Interaktionspartner mittels Massenspektrometrie untersucht

werden. Bestätigt die Analyse der Kontrollen eine spezifische Interaktion mit der CARD von NLRC5, könnte die Proteininteraktion in weiteren Experimenten weiter untersucht werden. Dies könnte z.B. durch Co-Expression der Proteine und anschließende Analyse der Interaktion erfolgen. Eine andere Möglichkeit stellen NMR *shift assay* Experimente dar, mittels welcher eine direkte Interaktion zweier Bindungspartner nachgewiesen werden kann.

Die strukturelle Untersuchung von NLRs ist aufgrund der geringen Löslichkeit der Proteine und ihrer Tendenz zur Aggregation generell problematisch und gilt als eine Herausforderung. Dennoch gelang es in dieser Arbeit die humane CARD von NLRC5, trotz einer geringen Ausbeute, zu reinigen und NMR-Experimente durchzuführen. Diese zeigen, dass die gereinigte humane CARD eine Tertiärstruktur besitzt. Die hier erzielten Ergebnisse stellen somit eine Grundlage für die Aufklärung der Struktur der humanen NLRC5 CARD dar.

**5 LITERATURVERZEICHNIS**

1. Murphy, K., et al., *Janeway's Immunobiology*. Taylor & Francis Ltd., 2011. 8th edition p. 888.
2. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
3. Inohara, N. and G. Nunez, *The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens*. Oncogene, 2001. **20**(44): p. 6473-81.
4. Ting, J.P., et al., *The NLR gene family: a standard nomenclature*. Immunity, 2008. **28**(3): p. 285-7.
5. Zhong, Y., A. Kinio, and M. Saleh, *Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases*. Frontiers in immunology, 2013. **4**: p. 333.
6. Albrecht, M., et al., *Structural localization of disease-associated sequence variations in the NACHT and LRR domains of PYPAF1 and NOD2*. FEBS letters, 2003. **554**(3): p. 520-8.
7. Albrecht, M. and F.L. Takken, *Update on the domain architectures of NLRs and R proteins*. Biochemical and biophysical research communications, 2006. **339**(2): p. 459-62.
8. Koonin, E.V. and L. Aravind, *The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation*. Trends in biochemical sciences, 2000. **25**(5): p. 223-4.
9. Kobe, B. and J. Deisenhofer, *Proteins with leucine-rich repeats*. Curr Opin Struct Biol, 1995. **5**(3): p. 409-16.
10. Leipe, D.D., E.V. Koonin, and L. Aravind, *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, 2004. **343**(1): p. 1-28.
11. Danot, O., et al., *Wheel of Life, Wheel of Death: A Mechanistic Insight into Signaling by STAND Proteins*. Structure, 2009. **17**(2): p. 172-82.
12. Lu, C., et al., *Nucleotide binding to CARD12 and its role in CARD12-mediated caspase-1 activation*. Biochemical and biophysical research communications, 2005. **331**(4): p. 1114-9.
13. Duncan, J.A., et al., *Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(19): p. 8041-6.
14. Ye, Z., et al., *ATP binding by monarch-1/NLRP12 is critical for its inhibitory function*. Molecular and cellular biology, 2008. **28**(5): p. 1841-50.
15. Askari, N., et al., *Expression, purification, and characterization of recombinant NOD1 (NLRC1): A NLR family member*. Journal of biotechnology, 2012. **157**(1): p. 75-81.

16. Mo, J., et al., *Pathogen sensing by nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2) is mediated by direct binding to muramyl dipeptide and ATP*. The Journal of biological chemistry, 2012. **287**(27): p. 23057-67.
17. Faustin, B., et al., *Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation*. Molecular cell, 2007. **25**(5): p. 713-24.
18. Harton, J.A., et al., *GTP binding by class II transactivator: role in nuclear import*. Science, 1999. **285**(5432): p. 1402-5.
19. Proell, M., et al., *The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences*. PloS one, 2008. **3**(4): p. e2119.
20. Meissner, T.B., et al., *NLR family member NLRC5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(31): p. 13794-9.
21. Zurek, B., et al., *Mutational analysis of human NOD1 and NOD2 NACHT domains reveals different modes of activation*. Innate immunity, 2012. **18**(1): p. 100-11.
22. Ferrand, J. and R.L. Ferrero, *Recognition of Extracellular Bacteria by NLRs and Its Role in the Development of Adaptive Immunity*. Frontiers in immunology, 2013. **4**: p. 344.
23. Mason, D.R., P.L. Beck, and D.A. Muruve, *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors and inflammasomes in the pathogenesis of non-microbial inflammation and diseases*. Journal of innate immunity, 2012. **4**(1): p. 16-30.
24. Chamaillard, M., et al., *An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid*. Nature immunology, 2003. **4**(7): p. 702-7.
25. Girardin, S.E., et al., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(11): p. 8869-72.
26. Tanabe, T., et al., *Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition*. The EMBO journal, 2004. **23**(7): p. 1587-97.
27. Girardin, S.E., et al., *Identification of the critical residues involved in peptidoglycan detection by Nod1*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(46): p. 38648-56.
28. Laroui, H., et al., *L-Ala-gamma-D-Glu-meso-diaminopimelic acid (DAP) interacts directly with leucine-rich region domain of nucleotide-binding oligomerization domain 1, increasing phosphorylation activity of receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 and its interaction with nucleotide-binding oligomerization domain 1*. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**(35): p. 31003-13.
29. Grimes, C.L., et al., *The innate immune protein Nod2 binds directly to MDP, a bacterial cell wall fragment*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(33): p. 13535-7.
30. Hong, M., S.I. Yoon, and I.A. Wilson, *Structure and functional characterization of the RNA-binding element of the NLRX1 innate immune modulator*. Immunity, 2012. **36**(3): p. 337-47.

31. Lupfer, C. and T.D. Kanneganti, *Unsolved Mysteries in NLR Biology*. *Frontiers in immunology*, 2013. **4**: p. 285.
32. Kufer, T.A., *Signal transduction pathways used by NLR-type innate immune receptors*. *Molecular bioSystems*, 2008. **4**(5): p. 380-6.
33. Kufer, T.A. and P.J. Sansonetti, *NLR functions beyond pathogen recognition*. *Nature immunology*, 2011. **12**(2): p. 121-8.
34. Meissner, T.B., A. Li, and K.S. Kobayashi, *NLRC5: a newly discovered MHC class I transactivator (CIITA)*. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 2012. **14**(6): p. 477-84.
35. Neerinx, A., et al., *A role for the human nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing family member NLRC5 in antiviral responses*. *The Journal of biological chemistry*, 2010. **285**(34): p. 26223-32.
36. Benko, S., et al., *NLRC5 limits the activation of inflammatory pathways*. *Journal of immunology*, 2010. **185**(3): p. 1681-91.
37. Nickerson, K., et al., *Dendritic cell-specific MHC class II transactivator contains a caspase recruitment domain that confers potent transactivation activity*. *The Journal of biological chemistry*, 2001. **276**(22): p. 19089-93.
38. Neerinx, A., et al., *NLRC5 controls basal MHC class I gene expression in an MHC enhanceosome-dependent manner*. *Journal of immunology*, 2012. **188**(10): p. 4940-50.
39. Bewry, N.N., et al., *GTP-dependent recruitment of CIITA to the class II major histocompatibility complex promoter*. *The Journal of biological chemistry*, 2007. **282**(36): p. 26178-84.
40. Linhoff, M.W., et al., *Two distinct domains within CIITA mediate self-association: involvement of the GTP-binding and leucine-rich repeat domains*. *Molecular and cellular biology*, 2001. **21**(9): p. 3001-11.
41. Davis, B.K., et al., *Cutting edge: NLRC5-dependent activation of the inflammasome*. *Journal of immunology*, 2011. **186**(3): p. 1333-7.
42. Cui, J., et al., *NLRC5 negatively regulates the NF-kappaB and type I interferon signaling pathways*. *Cell*, 2010. **141**(3): p. 483-96.
43. Kuenzel, S., et al., *The nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor NLRC5 is involved in IFN-dependent antiviral immune responses*. *Journal of immunology*, 2010. **184**(4): p. 1990-2000.
44. Staehli, F., et al., *NLRC5 deficiency selectively impairs MHC class I-dependent lymphocyte killing by cytotoxic T cells*. *Journal of immunology*, 2012. **188**(8): p. 3820-8.
45. Robbins, G.R., et al., *Regulation of class I major histocompatibility complex (MHC) by nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing (NLR) proteins*. *The Journal of biological chemistry*, 2012. **287**(29): p. 24294-303.
46. Steimle, V., et al., *Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome)*. *Cell*, 1993. **75**(1): p. 135-46.

47. Kobayashi, K.S. and P.J. van den Elsen, *NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses*. Nature reviews. Immunology, 2012. **12**(12): p. 813-20.
48. Biswas, A., et al., *Cutting edge: impaired MHC class I expression in mice deficient for Nlr5/class I transactivator*. Journal of immunology, 2012. **189**(2): p. 516-20.
49. Yao, Y. and Y. Qian, *Expression regulation and function of NLRC5*. Protein & cell, 2013. **4**(3): p. 168-75.
50. Tong, Y., et al., *Enhanced TLR-induced NF-kappaB signaling and type I interferon responses in NLRC5 deficient mice*. Cell research, 2012. **22**(5): p. 822-35.
51. Meissner, T.B., et al., *NLRC5 cooperates with the RFX transcription factor complex to induce MHC class I gene expression*. Journal of immunology, 2012. **188**(10): p. 4951-8.
52. Neerinx, A., et al., *NLRC5, at the Heart of Antigen Presentation*. Frontiers in immunology, 2013. **4**: p. 397.
53. Kumar, H., et al., *NLRC5 deficiency does not influence cytokine induction by virus and bacteria infections*. Journal of immunology, 2011. **186**(2): p. 994-1000.
54. Park, H.H., et al., *The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation*. Annual review of immunology, 2007. **25**: p. 561-86.
55. Hofmann, K., P. Bucher, and J. Tschopp, *The CARD domain: a new apoptotic signalling motif*. Trends in biochemical sciences, 1997. **22**(5): p. 155-6.
56. Shi, Y., *Caspase activation: revisiting the induced proximity model*. Cell, 2004. **117**(7): p. 855-8.
57. Franchi, L., R. Munoz-Planillo, and G. Nunez, *Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes*. Nature immunology, 2012. **13**(4): p. 325-32.
58. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
59. Ogura, Y., et al., *Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4812-8.
60. Girardin, S.E., et al., *CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive Shigella flexneri*. EMBO Rep, 2001. **2**(8): p. 736-42.
61. Inohara, N., et al., *An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways*. J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 27823-31.
62. Le, H.T. and J.A. Harton, *Pyrin- and CARD-only Proteins as Regulators of NLR Functions*. Frontiers in immunology, 2013. **4**: p. 275.
63. Lamkanfi, M., et al., *INCA, a novel human caspase recruitment domain protein that inhibits interleukin-1beta generation*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 51729-38.

64. Lee, S.H., C. Stehlik, and J.C. Reed, *Cop, a caspase recruitment domain-containing protein and inhibitor of caspase-1 activation processing*. J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 34495-500.
65. Druilhe, A., et al., *Regulation of IL-1beta generation by Pseudo-ICE and ICEBERG, two dominant negative caspase recruitment domain proteins*. Cell Death Differ, 2001. **8**(6): p. 649-57.
66. Jang, T.H., J.H. Park, and H.H. Park, *Novel disulfide bond-mediated dimerization of the CARD domain was revealed by the crystal structure of CARMA1 CARD*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79778.
67. Zhou, P., et al., *Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(20): p. 11265-70.
68. Humke, E.W., et al., *ICEBERG: a novel inhibitor of interleukin-1beta generation*. Cell, 2000. **103**(1): p. 99-111.
69. Jin, T., et al., *Structure of the NLRP1 caspase recruitment domain suggests potential mechanisms for its association with procaspase-1*. Proteins, 2013. **81**(7): p. 1266-70.
70. Kersse, K., et al., *The death-fold superfamily of homotypic interaction motifs*. Trends in biochemical sciences, 2011. **36**(10): p. 541-52.
71. Qin, H., et al., *Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 549-57.
72. Vaughn, D.E., et al., *Crystal structure of Apaf-1 caspase recruitment domain: an alpha-helical Greek key fold for apoptotic signaling*. Journal of molecular biology, 1999. **293**(3): p. 439-47.
73. Riedl, S.J., et al., *Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 926-33.
74. Yan, N., et al., *Structure of the CED-4-CED-9 complex provides insights into programmed cell death in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2005. **437**(7060): p. 831-7.
75. Shiozaki, E.N., J. Chai, and Y. Shi, *Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4197-202.
76. Coussens, N.P., et al., *Crystal structure of the Nod1 caspase activation and recruitment domain*. Biochemical and biophysical research communications, 2007. **353**(1): p. 1-5.
77. Manon, F., et al., *Solution structure of NOD1 CARD and mutational analysis of its interaction with the CARD of downstream kinase RICK*. Journal of molecular biology, 2007. **365**(1): p. 160-74.
78. Srimathi, T., et al., *Monomer/dimer transition of the caspase-recruitment domain of human Nod1*. Biochemistry, 2008. **47**(5): p. 1319-25.
79. Ferrage, F., et al., *Structure and dynamics of the second CARD of human RIG-I provide mechanistic insights into regulation of RIG-I activation*. Structure, 2012. **20**(12): p. 2048-61.

80. Kowalinski, E., et al., *Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA*. Cell, 2011. **147**(2): p. 423-35.
81. Potter, J.A., R.E. Randall, and G.L. Taylor, *Crystal structure of human IPS-1/MAVS/VISA/Cardif caspase activation recruitment domain*. BMC structural biology, 2008. **8**: p. 11.
82. Chou, J.J., et al., *Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment*. Cell, 1998. **94**(2): p. 171-80.
83. de Alba, E., *Structure and interdomain dynamics of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC)*. The Journal of biological chemistry, 2009. **284**(47): p. 32932-41.
84. Jin, T., et al., *The structure of the CARD8 caspase-recruitment domain suggests its association with the FIIND domain and procaspases through adjacent surfaces*. Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications, 2013. **69**(Pt 5): p. 482-7.
85. Herman, M.D., et al., *Structures of BIR domains from human NAIP and cIAP2*. Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications, 2009. **65**(Pt 11): p. 1091-6.
86. Martinon, F. and J. Tschopp, *NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens*. Trends in immunology, 2005. **26**(8): p. 447-54.
87. Tsumoto, K., et al., *Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification*. Biotechnology progress, 2004. **20**(5): p. 1301-8.
88. Katz, J.J., *Anhydrous trifluoroacetic acid as a solvent for proteins*. Nature, 1954. **174**(4428): p. 509.
89. Wüthrich, K., *NMR of proteins and nucleic acids*. 1986.
90. Matsuzawa, S.I. and J.C. Reed, *Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses*. Mol Cell, 2001. **7**(5): p. 915-26.
91. Denecker, G., et al., *Caspase-14 reveals its secrets*. J Cell Biol, 2008. **180**(3): p. 451-8.
92. Baudino, T.A., et al., *Isolation and characterization of a novel coactivator protein, NCoA-62, involved in vitamin D-mediated transcription*. J Biol Chem, 1998. **273**(26): p. 16434-41.
93. Campana, L., L. Bosurgi, and P. Rovere-Querini, *HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(5): p. 518-23.
94. Deng, Z., et al., *Yin Yang 1: a multifaceted protein beyond a transcription factor*. Transcription, 2010. **1**(2): p. 81-4.
95. Okuwaki, M., K. Kato, and K. Nagata, *Functional characterization of human nucleosome assembly protein 1-like proteins as histone chaperones*. Genes Cells, 2010. **15**(1): p. 13-27.
96. Stoll, V.S., et al., *A thioredoxin fusion protein of VanH, a D-lactate dehydrogenase from Enterococcus faecium: cloning, expression, purification,*

- kinetic analysis, and crystallization*. Protein science : a publication of the Protein Society, 1998. **7**(5): p. 1147-55.
97. Hillar, A., G. Otulakowski, and O.B. H, *Purification and characterization of a recombinant rat prohaptooglobin expressed in baculovirus-infected Sf9 insect cells*. Protein expression and purification, 2007. **55**(2): p. 246-56.
98. Light, A. and H. Janska, *Enterokinase (enteropeptidase): comparative aspects*. Trends Biochem Sci, 1989. **14**(3): p. 110-2.
99. Eibl, C., et al., *Structural and functional analysis of the NLRP4 pyrin domain*. Biochemistry, 2012. **51**(37): p. 7330-41.
100. Shahravan, S.H., et al., *Enhancing the specificity of the enterokinase cleavage reaction to promote efficient cleavage of a fusion tag*. Protein expression and purification, 2008. **59**(2): p. 314-9.
101. Choi, S.I., et al., *Recombinant enterokinase light chain with affinity tag: expression from Saccharomyces cerevisiae and its utilities in fusion protein technology*. Biotechnology and bioengineering, 2001. **75**(6): p. 718-24.
102. Jang, T.H. and H.H. Park, *Generalized semi-refolding methods for purification of the functional death domain superfamily*. Journal of biotechnology, 2011. **151**(4): p. 335-42.
103. Fridh, V. and K. Rittinger, *The tandem CARDs of NOD2: intramolecular interactions and recognition of RIP2*. PloS one, 2012. **7**(3): p. e34375.
104. Getz, E.B., et al., *A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry*. Anal Biochem, 1999. **273**(1): p. 73-80.
105. uptima, i., *Tris(2-carboxyethyl)phosphine HCl (TCEP), Produktbeschreibung*.
106. Gutte, P.G., et al., *Unusual structural features revealed by the solution NMR structure of the NLRC5 caspase recruitment domain*. Biochemistry, 2014. **53**(19): p. 3106-17.
107. Bryant, C.E. and T.P. Monie, *Mice, men and the relatives: cross-species studies underpin innate immunity*. Open biology, 2012. **2**(4): p. 120015.
108. Yoon, S.I., et al., *Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling*. Science, 2012. **335**(6070): p. 859-64.
109. Neerincx, A., et al., *The N-terminal domain of NLRC5 confers transcriptional activity for MHC class I and II gene expression*. J Immunol, 2014. **193**(6): p. 3090-100.

## **Danksagung**

Bei Herrn Prof. Dr. Stefan Rose-John bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in das Biochemisch Institut der CAU Kiel.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Joachim Grötzinger danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und die fortwährende Unterstützung während meiner Promotion. Für seine stetige Bereitschaft zu konstruktiven Diskussionen, das Vertrauen in meine experimentelle Durchführung der Arbeiten, die kontinuierliche Finanzierung sowie das schnelle Korrekturlesen der Arbeit möchte ich mich bei Ihm bedanken.

Herrn Prof. Dr. Frank Sönnichsen danke ich für die zeitintensiven Aufnahmen der NMR-Spektren.

Dr. Liam Cassidy, Dr. Barbara Gregorius sowie Jana Schlenk aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Andreas Tholey danke ich für die massenspektrometrischen Analysen.

Für die Übernahme der Zweitbegutachtung meiner Arbeit bedanke ich mich bei Prof. Dr. Axel Scheidig.

Ein großer Dank gilt Dr. habil. Sascha Jung, der mich während der Promotion betreute, indem er intensiv meine Daten diskutierte und mich auf kritische Punkte bei der Durchführung von Experimenten hinwies. Für seine Zeit, die ausführliche Einweisung in die Methoden, die hilfreichen Vorschläge zu weiteren Vorgehensweise, die Kommentare zu meinen Präsentationen sowie die geduldige Einführung in die NMR-Spektroskopie bedanke ich mich.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Nina Hedeman, Tim Kerkow, Dr. Christoph Garbers, Dr. Janina Wolf und Dr. habil. Sascha Jung. Sie haben sich sehr viel Zeit genommen und mich mit ihren kritischen Anmerkungen äußerst unterstützt.

Alle Mitglieder der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Grötzinger haben mich stets sehr hilfsbereit bei theoretischen und praktischen Fragen im Labor unterstützt. Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen ehemaligen Kollegen/innen für die gute Atmosphäre und die schöne Zeit, die ich am Biochemischen Institut hatte, bedanken: Tim Kerkow, Dr. Björn Spudy, Britta Hansen, Jessica Schneider, Dr. Stefan Düsterhöft, Dr. Jana Kieper, Mirja Oldefest, Dr. Inken Lorenzen, Michelle Horn, Dr. Ahmad Trad und Nina Hedeman.

## 6 ANHANG

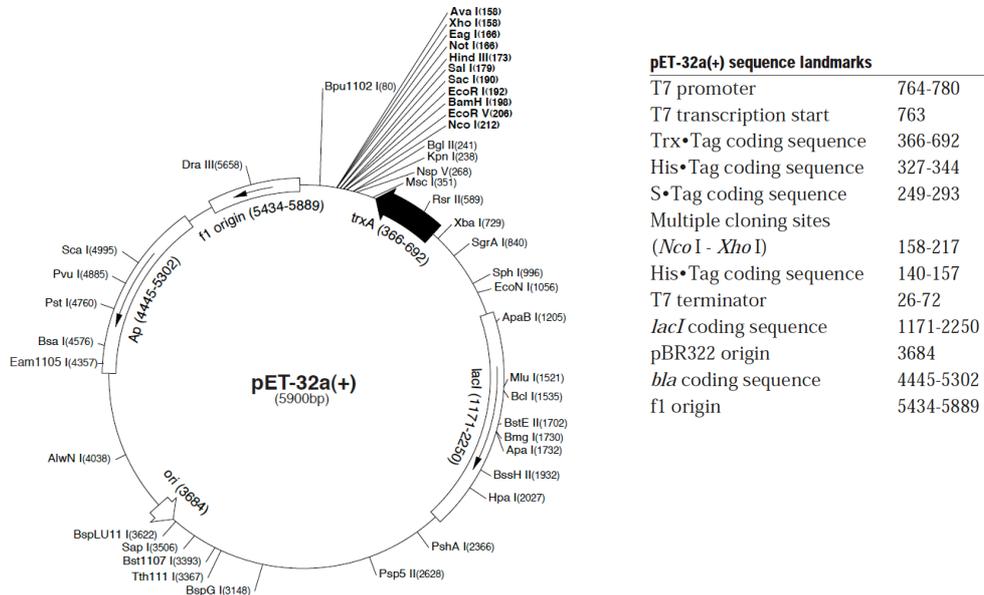


Abb. 6-1: Vektorkarte von pET-32a(+)

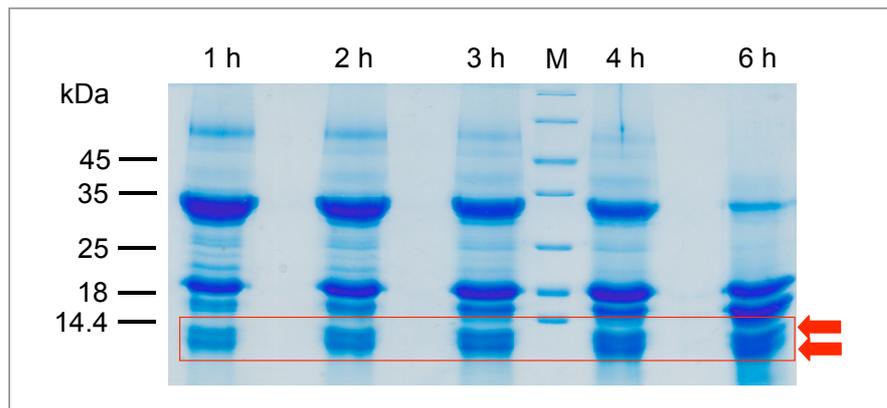


Abb. 6-2: SDS-PAGE zur Überprüfung der proteolytischen Spaltung der Thioredoxin-CARD

Die Thioredoxin-CARD wurde mit 0,2 U Enterokinase pro 1 mg Thioredoxin-CARD bei 25 °C für 1-6 Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze zentrifugiert und die Überstände mittels SDS-PAGE analysiert (Coomassie-Färbung). M = Marker.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit – abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meinen Doktorvater – selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Die vorliegende Arbeit wurde bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt, sie wurde nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Anna Zaslowski

Hamburg,