

# Strukturelle und biophysikalische Untersuchungen der regulatorischen Domäne von humanem Nalp1

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
der Fakultät für Chemie an der Technischen Universität Dortmund

angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie,  
Abteilung Strukturelle Biologie

vorgelegt von  
Diplom-Biologe  
Gernot Hahne

2012

Gutachter:

Prof. Dr. Alfred Wittinghofer

Prof. Dr. Roland Winter

**Erklärung gemäß §5 Abs. 3 der Promotionsordnung der Universität Dortmund für die Fachbereiche Mathematik, Physik, Chemie (Stand vom 12 Februar 1985, geändert durch Satzung vom 24 Juni 1991)**

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund unter Anleitung und Betreuung von Herrn Prof. Dr. Alfred Wittinghofer und Frau Dr. Susanne Eschenburg durchgeführt.

Ich erkläre, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfen angefertigt habe. Diese Dissertation wurde zuvor noch an keiner anderen Fakultät zum Zwecke der Promotion oder einer anderen Prüfung eingereicht.

Dortmund,

---

Gernot Hahne

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	VII
Abbildungsverzeichnis .....	IX
Zusammenfassung .....	1
1 Einleitung .....	2
1.1 Das Immunsystem .....	2
1.2 Die Familie der Nod-ähnlichen Rezeptoren .....	4
1.3 Signalwege der Nod-ähnlichen Rezeptoren .....	8
1.4 Liganden der Nod-ähnlichen Rezeptoren .....	11
1.5 Synergien zwischen Nod-ähnlichen und Toll-ähnlichen Rezeptoren .....	17
1.6 Krankheiten, ausgelöst durch fehlerhafte Nod-ähnliche Rezeptoren .....	19
1.7 Leucin-reiche Wiederholungen .....	22
2 Material und Methoden .....	25
2.1 Materialien.....	25
2.1.1 Medien und Puffer .....	25
2.1.2 Enzyme .....	27
2.1.3 Vektoren .....	27
2.1.4 Oligonukleotide .....	28
2.1.5 <i>E. coli</i> Stämme.....	30
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	30
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese .....	31
2.2.3 DNA Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen .....	31
2.2.4 DNA Dephosphorylierung am 5'-Ende.....	32
2.2.5 Ligation linearer DNA Fragmente.....	32
2.2.6 Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA .....	33
2.2.7 Reinheitskontrolle und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	33
2.2.8 DNA Sequenzierung.....	33
2.3 Mikrobiologische Methoden .....	34
2.3.1 Anlegen eines <i>E. coli</i> Glycerolstocks .....	34
2.3.2 Erzeugung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien.....	34
2.3.3 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien .....	35
2.3.4 Heterologe Expression in <i>E. coli</i> Bakterien.....	35
2.4 Zellbiologische Methoden .....	36

---

2.4.1	Kultivierung von <i>D. discoideum</i> Zellen .....	36
2.4.2	Transformation und Selektion von <i>D. discoideum</i> Zellen .....	36
2.4.3	Cryokonservierung von <i>D. discoideum</i> Zellen .....	37
2.4.4	Kultivierung von <i>S. frugiperda</i> Zellen .....	37
2.4.5	Transfektion von <i>S. frugiperda</i> Zellen .....	38
2.5	Biochemische Methoden .....	38
2.5.1	Aufschluss von <i>E. coli</i> Zellen .....	38
2.5.2	Proteinaufreinigung aus <i>D. discoideum</i> Zellen im analytischen Maßstab .....	39
2.5.3	Proteinaufreinigung aus <i>S. frugiperda</i> Zellen im analytischen Maßstab .....	39
2.5.4	Affinitätschromatographie .....	40
2.5.5	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	40
2.5.6	TEV Protease Spaltung des Fusionsproteins .....	41
2.5.7	Ionenaustauschchromatographie .....	41
2.6	Biophysikalische Methoden .....	42
2.6.1	Ultrafiltration von Proteinen .....	42
2.6.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen .....	42
2.6.3	Größenausschlusschromatographie .....	42
2.6.4	Dynamische Lichtstreuung .....	43
2.6.5	Isothermale Titrationskalorimetrie .....	44
2.6.6	Fern-UV CD-Spektroskopie .....	44
2.6.7	Fluoreszenzspektroskopie .....	46
2.7	Röntgenkristallographische Methoden .....	48
2.7.1	Kristallisation .....	48
2.7.2	Einfrieren von Kristallen .....	49
2.7.3	Datensammlung .....	50
2.7.4	Datenauswertung .....	50
2.7.5	Lösung des Phasenproblems durch molekularen Ersatz .....	52
2.7.6	Erstellung und Verfeinerung des Strukturmodells .....	53
3	Ergebnisse .....	54
3.1	Heterologe Expression von Nod-ähnlichen Rezeptoren .....	54
3.1.1	Identifikation von löslich exprimierbaren Proteinfragmenten .....	54
3.1.2	Optimierung der Expressionsbedingungen für hNalp1(791-990) .....	56
3.1.3	Aufreinigung der LRR-Domäne von humanem Nalp1 .....	58
3.1.4	DLS Analyse der aufgereinigten hNalp1-LRR .....	60

---

3.2	Röntgenkristallographische Analyse der LRR-Domäne von hNalp1.....	60
3.2.1	Kristallisation von hNalp1-LRR.....	60
3.2.2	Datensammlung und Datenreduktion.....	62
3.2.3	Phasenlösung durch Molekularen Ersatz.....	63
3.2.4	Verfeinerung eines Strukturmodells für hNalp1-LRR.....	64
3.2.5	Kristallstruktur der LRR-Domäne von hNalp1.....	67
3.3	Biophysikalische Analyse einer Interaktion zwischen hNalp1-LRR und MDP.....	76
3.3.1	Ligandenbindungsstudie mit Isothermaler Titrationskalorimetrie.....	77
3.3.2	Ligandenbindungsstudie mit Fern-UV CD-Spektroskopie.....	79
3.3.3	Ligandenbindungsstudie mit Fluoreszenz- und Polarisationspektroskopie.....	83
4	Diskussion.....	91
	Literaturverzeichnis.....	100
	Anhang.....	114

## Abkürzungsverzeichnis

ASC	<i>Apoptosis associated speck like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BIR	<i>Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat</i>
bp	Basenpaar
CARD	<i>Caspase-activating and recruitment domain</i>
Caspase	<i>Cysteine dependent aspartate directed protease</i>
CIITA	<i>MHC class II transactivator</i>
C-Terminus	Carboxyterminus eines Polypeptides
Da	Dalton (Einheit der relativen Atommasse)
DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ERK	<i>Extracellular signal regulated protein kinase</i>
FBS	Fetales Rinderserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
FIIND	Proteinabschnitt unbekannter Funktion ( <i>function to find domain</i> )
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
g	mittlere Erdbeschleunigung ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ )
GSH	Glutathion ( $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycin)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
iE-DAP	$\gamma$ -D-glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure
IPAF	<i>Ice protease activating factor</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Wiederholung ( <i>leucine-rich repeat</i> )
M	molar
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDP	Muramyldipeptid (N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure

---

NACHT	alternative Bezeichnung für die Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne (NOD)
NAIP	<i>Baculoviral IAP repeat-containing protein</i>
Nalp	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein</i>
NF- $\kappa$ B	Kernfaktor kappa-B ( <i>nuclear factor kappa B</i> )
Ni-NTA	Nitrilotriessigsäure
NLR	Nod-ähnlicher Rezeptor ( <i>Nod-like receptor</i> , alternativ auch <i>nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat</i> )
NLRA	<i>NLR family, acid domain containing</i>
NLRB	<i>NLR family, BIR domain containing</i>
NLRC	<i>NLR family, CARD containing</i>
NLRP	<i>NLR family, PYD containing</i>
NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne ( <i>Nucleotide binding oligomerization domain</i> )
Nod	<i>Nucleotide binding oligomerization domain containing protein</i>
N-Terminus	Aminoterminus eines Polypeptides
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
pdb id	<i>protein data bank identification</i>
PEG	Polyethylenglycol
PGN	Peptidoglycan
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	Pathogen-erkennender Rezeptor ( <i>pathogen recognition receptor</i> )
PYD	<i>Pyrin domain</i>
RI	Ribonuklease-Inhibitor
RIPK2	<i>Receptor interacting proteine kinase 2</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
SDS	Natriumlaurylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
TCR	T-Zell Rezeptor ( <i>T-cell receptor</i> )
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor ( <i>Toll-like receptor</i> )
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrosefaktor alpha ( <i>tumor necrosis factor alpha</i> )
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen zu Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Die Pathogen-erkennenden Rezeptoren (PRR) des angeborenen Immunsystems.....	4
Abbildung 1.2: Signalwege der Nod-ähnlichen Rezeptoren (NLR).....	9
Abbildung 1.3: Modellvorstellung zur Nalp1 Aktivierung.....	10
Abbildung 1.4: Aufbau des Peptidoglycans.....	12
Abbildung 1.5: Agonisten verschiedener Nod-ähnlicher Rezeptoren und das angesteuerte Hauptzielprotein.....	15
Abbildung 1.6: Verschiedene Sekundärstrukturelemente innerhalb einer Leucin-reichen Wiederholung.....	24
Abbildung 2.1: Circular dichroismus (CD) und Elliptizität $\Theta$ .....	45
Abbildung 2.2: Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertes MDP.....	47
Abbildung 3.1: Expressionstest des Fragments GST-hNalp1(791-990).....	57
Abbildung 3.2: Aufreinigung von hNalp1-LRR.....	59
Abbildung 3.3: Dynamische Lichtstreuung der hNalp1-LRR.....	60
Abbildung 3.4: Initiale und optimierte Kristalle des Proteins hNalp1-LRR.....	61
Abbildung 3.5: Kristallpackung von hNalp1-LRR.....	63
Abbildung 3.6: Ramachandran-Diagramm.....	66
Abbildung 3.7: Kristallstruktur von hNalp1-LRR.....	67
Abbildung 3.8: Darstellung der hNalp1-LRR Struktur als elektrostatisches Oberflächenpotential.....	69
Abbildung 3.9: Grube auf der konkaven Seite.....	70
Abbildung 3.10: Vergleich zwischen LRR Typ A und Typ B von hNalp1.....	71
Abbildung 3.11: Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des $\beta$ -Faltblatts von hNalp1-LRR.....	71
Abbildung 3.12: Wasserstoffbrückenbindungen der Asparagin/Cystein-Leiter innerhalb von hNalp1-LRR.....	72
Abbildung 3.13: Überlagerung der sechs LRR von hNalp1.....	74
Abbildung 3.14: Überlagerung der $\alpha$ -Ketten von hNalp1-LRR und porcinem Ribonuklease-Inhibitor (pRI) ..	76
Abbildung 3.15: Die beiden Enantiomere des Muramyl-dipeptid (MDP).....	77
Abbildung 3.16: Isothermale Titrationskalorimetrie zum Interaktionsnachweis von hNalp1-LRR und MDP.....	78
Abbildung 3.17: Fern-UV CD-Spektrum von hNalp1-LRR.....	80
Abbildung 3.18: Analyse der Thermostabilität von hNalp1-LRR.....	82
Abbildung 3.19: Intrinsische und extrinsische Fluorophore für die Fluoreszenzspektroskopie.....	84
Abbildung 3.20: Fluoreszenzspektroskopie über intrinsische Fluorophore von hNalp1-LRR.....	85
Abbildung 3.21: Fluoreszenzspektroskopie über intrinsische Fluorophore bei steigender MDP Konzentration.....	86
Abbildung 3.22: Emissionsspektrum von MDP-FITC.....	87
Abbildung 3.23: Fluoreszenz von MDP-FITC in Abhängigkeit von hNalp1-LRR.....	88
Abbildung 3.24: Polarisationspektroskopie mit zweistufiger Titration von hNalp1-LRR zu MDP-FITC.....	89
Abbildung 3.25: Polarisationspektroskopie mit mehrstufiger Titration von hNalp1-LRR zu MDP-FITC.....	90
Abbildung 4.1: Sequenzvergleich des hNalp1(791-990) mit dem humanen Ribonuklease-Inhibitor (hRI).....	92
Abbildung 4.2: Sequenzabgleich von hNalp1 mit dem artifiziiellen „RI-like“ Protein.....	94
Abbildung 4.3: Überlagerung von hNalp1-LRR und VLR RBC36.....	97

## Zusammenfassung

Das 166 kD schwere Protein Nalp1 gehört zur Familie der Nod-ähnlichen Rezeptoren (NLR), die eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem spielen. Als intrazelluläre Rezeptoren erkennen sie Pathogene, die bereits in die Zelle eingedrungen sind. Nach der Aktivierung durch Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen setzen die Nod-ähnlichen Rezeptoren über einen bislang wenig erklärten Mechanismus Entzündungsreaktionen in Gang.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Kristallstruktur der LRR-Domäne von humanem Nalp1 bis zu einer Auflösung von 1.65 Å aufgeklärt werden. Diese Kristallstruktur liefert die erste dreidimensionale Beschreibung der regulatorischen Domäne eines Nod-ähnlichen Rezeptors. Die Struktur zeigt, dass die LRR-Domäne von Nalp1 aus sechs vollständigen Leucin-reichen Wiederholungen besteht, die aus insgesamt sieben  $\alpha$ -Helices und sieben  $\beta$ -Strängen geformt werden. Durch den geometrischen Vergleich mit LRR-Domänen anderer Proteine konnte die LRR-Domäne von Nalp1 der RI-ähnlichen Unterfamilie von LRR Proteinen zugeordnet werden.

Unter Verwendung unterschiedlicher biophysikalischer Methoden wurde untersucht, ob Muramyldipeptid (MDP) an die isolierte LRR-Domäne von humanem Nalp1 bindet. In der Literatur ist MDP als Pathogen-assoziierte molekulare Struktur beschrieben worden, die *in vitro* den Rezeptor aktiviert. Ligandenbindungsstudien über Isothermale Titrationskalorimetrie, Fern-UV CD Spektroskopie sowie Fluoreszenz- und Polarisationspektroskopie zeigten keine Interaktion zwischen MDP und der LRR-Domäne von humanem Nalp1.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann für den Aktivierungsmechanismus des humanen Nalp1 gefolgert werden, dass die LRR-Domäne des Rezeptors alleine nicht ausreichend ist für die Bindung des Liganden.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Der menschliche Organismus ist täglich dem Angriff unzähliger Pathogene ausgesetzt. Zur Abwehr dieser Pathogene hat sich in der Evolution ein Schutzmechanismus entwickelt, der als Immunsystem bezeichnet wird. Dieses Immunsystem wird in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilt<sup>1</sup>.

Das adaptive Immunsystem kommt ausschließlich bei Wirbeltieren vor und hat sich erst vor weniger als 500 Millionen Jahren entwickelt<sup>2</sup>. Es ist in der Lage, sehr spezifische Antigenstrukturen, sog. Epitope, zu erkennen. Die wichtigste Eigenschaft des adaptiven Immunsystems ist dabei seine Fähigkeit, *fremd* von *selbst* zu unterscheiden, um Angriffe gegen Moleküle und Zellen des eigenen Organismus zu vermeiden<sup>1</sup>. Die Erkennung geschieht durch Antikörper (Immunoglobuline) und T-Zell-Rezeptoren (TCR), die hoch spezifisch ein einzelnes Epitop binden<sup>1</sup>. Die dabei theoretisch mögliche Zahl der durch das adaptive Immunsystem erzeugten unterschiedlichen Immunoglobuline bzw. T-Zell-Rezeptoren beträgt über  $10^{12}$  und wird als präimmunes Antikörper Repertoire bezeichnet<sup>1</sup>.

Die Aktivierung des adaptiven Immunsystems beim Erstkontakt mit einem neuen Antigen braucht jedoch einige Zeit, weshalb teilweise einige Tage vergehen können, bis es zur vollen adaptiven Immunantwort kommt. Als erste Verteidigungslinie gegen einfallende Pathogene ist daher das angeborene Immunsystem essentiell für den Organismus, weil dieses schnell und ohne Zeitverzögerung auf Infektionen reagieren kann. Über ein solches angeborenes Immunsystem verfügen nicht nur Wirbeltiere sondern auch Wirbellose und sogar Pflanzen. Die grundlegenden Regulationsmechanismen sind dabei hoch konserviert<sup>1</sup>.

Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem stützt sich das angeborene Immunsystem nur auf eine verhältnismäßig geringe Zahl von unterschiedlichen Rezeptoren. Diese Rezeptoren richten sich dabei nicht gegen einen bestimmten Krankheitserreger, sondern erkennen Strukturen, die charakteristisch für bestimmte Gruppen von Pathogenen sind. Aus diesem Grund werden sie als Pathogen-erkennende Rezeptoren (*pathogen recognition receptors*, PRR) bezeichnet<sup>3</sup>. Bei den erkannten Pathogen-assoziierten Strukturen handelt es sich hauptsächlich um essentielle Bestandteile von Mikroorganismen oder Viren (z.B. Polysaccharide, Strukturproteine, bakterielle und virale Nukleinsäuren), die einem starken evolutionären Druck unterliegen und deshalb evolutionär hoch konserviert sind<sup>4</sup>. Daher verfügt das angeborene Immunsystem auch nicht über eine so große Zahl an unterschiedlichen Rezeptoren wie das adaptive System. Seine Rezeptoren sind darüber hinaus

nicht so variabel, denn schon kleine Variationen in diesen Rezeptoren können zu Fehlern in der angeborenen Immunantwort führen, mit schwerwiegenden negativen Konsequenzen für den gesamten Organismus. Außerdem handelt es sich bei den erkannten Strukturen um solche, die im eigenen Organismus nicht vorkommen, so dass auch das angeborene Immunsystem zwischen *fremd* und *selbst* unterscheiden kann.

Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems sind in vielen verschiedenen Typen von Körperzellen zu finden. In infizierten Zellen aktivieren diese Rezeptoren Signalwege, die zur Ausschüttung von Signalmolekülen führen. Dies hat die Aktivierung und Rekrutierung von Makrophagen und T-Lymphozyten zur Folge<sup>5</sup>, die dann die Bekämpfung der Mikroorganismen übernehmen. Dieses Zusammenwirken von angeborenem und adaptivem Immunsystem unterstützt eine schnelle Reaktion auf eine Infektion direkt am Infektionsherd.

Es gibt drei Hauptklassen von Pathogen-erkennenden Rezeptoren<sup>4</sup>. Sie unterscheiden sich vor allem in ihrer Lokalisierung in der Zelle (Abbildung 1.1). Die erste Gruppe bilden die sog. Toll-ähnlichen Rezeptoren (*Toll-like receptors*, TLR). Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Typ-I Transmembranproteine in der Zellmembran oder der Endosomenmembran. Die TLR verfügen über eine extrazelluläre (bzw. endosomale) Ligandenbindungsdomäne, eine  $\alpha$ -helikale Transmembrandomäne und eine cytosolische Effektor-domäne. Die Ligandenbindungsdomäne wird durch Leucin-reiche Wiederholungen (*leucine rich repeats*, LRR) gebildet. Bei der cytosolischen Effektor-domäne handelt es sich um eine Toll/Interleukin1 Rezeptor (TIR) Domäne<sup>6</sup>.

Die zweite Gruppe bilden die Retinolsäure-induzierbares-Gen1 (RIG-1) ähnlichen Rezeptoren (*retinoid acid-inducible gene-1 (RIG-1)-like receptors*, RLR). Im Gegensatz zu den TLR handelt es sich bei den RLR um cytosolische Proteine. Sie verfügen über zwei N-terminale Effektor-domänen und eine C-terminale RNA-Helicase Domäne und sind für die Detektion von viraler dsRNA im Cytosol verantwortlich<sup>7</sup>.

Die dritte Gruppe bilden die Nod-ähnlichen Rezeptoren (*Nod-like receptors*, NLR). Wie bei den RLR handelt es sich um cytosolische Proteine. Diese Rezeptoren werden hauptsächlich von Zellen des Immunsystems (z.B. Antigen präsentierende Zellen) exprimiert, sind aber auch in epithelialen und mesothelialen Zellen zu finden<sup>8</sup>.

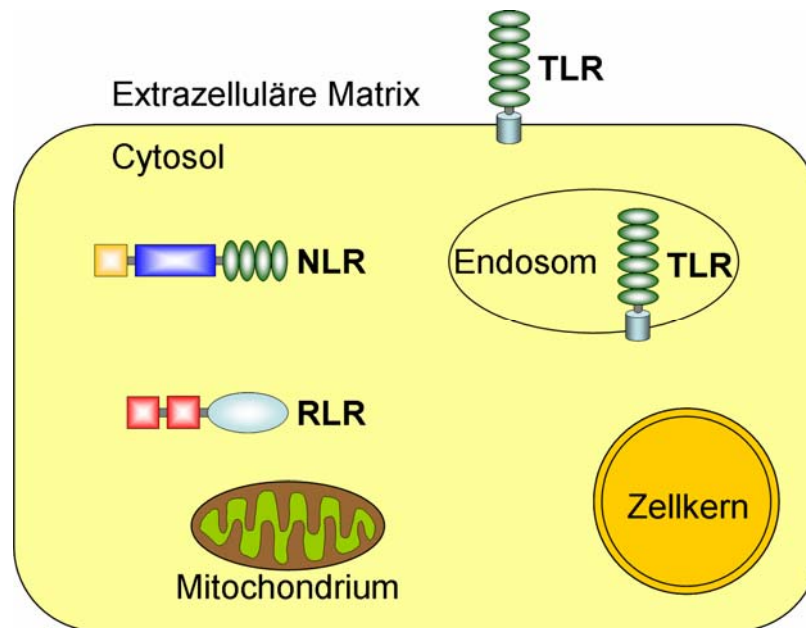


Abbildung 1.1: Die Pathogen-erkennenden Rezeptoren (PRR) des angeborenen Immunsystems.

Die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) sind Typ-I Transmembranrezeptoren in der Zell- bzw. Endosomenmembran. Ihre Ligandenbindungsdomäne (grün) ragt in die Extrazelluläre Matrix bzw. in das Innere der Endosomen. Die Retinolsäure-induzierbares-Gen1 (RIG-1) ähnlichen Rezeptoren (RLR) sind cytosolische Rezeptoren für die Detektion viraler dsRNA. Sie besitzen zwei N-terminale Effektor-domänen (rot) und eine Helicase-Domäne (hellblau). Die Nod-ähnlichen Rezeptoren (NLR) sind ebenfalls im Cytosol lokalisiert. Wie die TLR verfügen sie über eine C-terminale Ligandenbindungsdomäne (grün). Im zentralen Bereich der NLR befindet sich eine Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne (dunkelblau) und am C-Terminus eine Effektor-domäne (gelb).

## 1.2 Die Familie der Nod-ähnlichen Rezeptoren

Im menschlichen Organismus sind bislang 22 Proteine bekannt, die der Familie der Nod-ähnlichen Rezeptoren (NLR Familie) zugezählt werden. In der Maus sind sogar 33 NLR Gene bekannt<sup>9</sup>. Die Mitglieder der NLR Familie sind Multidomänenproteine mit einer charakteristischen, dreiteiligen Domänenarchitektur<sup>10</sup>. Am N-terminus befindet sich eine Effektor-domäne, mit deren Hilfe Protein-Protein Wechselwirkungen eingegangen werden können, um nachgeschaltete Signalkaskaden zu aktivieren. Im zentralen Bereich des Proteins befindet sich eine Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne (NOD), welche die charakteristischen Walker A und B Motive aufweist<sup>11</sup>. Diese NOD wird teilweise auch als NACHT Domäne bezeichnet, wobei sich dieser Name von den vier Proteinen NAIP, CIITA, HET-E und TP1 ableitet, in denen dieses Motiv als erstes gefunden wurde. Im C-terminalen Bereich verfügen die NLR über Leucin-reiche Wiederholungen (LRR), ähnlich denen der Toll-ähnlichen Rezeptoren. Zusätzlich zu diesen drei Hauptdomänen der NLR verfügen einzelne Mitglieder der Familie noch über weitere Domänen, die aber nicht charakteristisch für die gesamte Familie sind. So findet man bei CIITA (*MHC class II transactivator*)

zwischen der N-terminalen Effektor-domäne und der NOD eine Aktivierungsdomäne (AD). Im Fall des Nalp1 (*NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 1*) stellt die LRR-Domäne nicht das C-terminale Ende des Proteins dar, sondern es folgen noch zwei weitere Domänen, zuerst ein Abschnitt unbekannter Funktion (*function to find*, FIIND) und am C-Terminus dann eine CARD als zweite Effektor-domäne des Proteins<sup>12</sup>.













Bei der N-terminalen Effektor-domäne der NLR handelt es sich in den meisten Fällen um ein Mitglied aus der „*death domain*“ Familie. Dazu gehören die Domänen CARD (*Caspase-activating and recruitment domain*), PYD (*Pyrin domain*), DD (*Death domain*), und DED (*Death effector domain*)<sup>13-15</sup>. Die Bezeichnung „*death domain*“ leitet sich aus der Tatsache ab, dass diese Domänen ursprünglich in Proteinen gefunden wurden, welche an Prozessen der Apoptose und an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, wie z.B. die Caspasen (*cysteine-dependent aspartate-directed proteases*), die eine CARD enthalten<sup>13</sup>. Die einzige Ausnahme in der Gruppe der NLR Effektor-domänen bildet die BIR (*Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat*) Domäne, welche nicht zur „*death domain*“ Familie gehört. Über ihre Effektor-domäne aktivieren die einzelnen NLR unterschiedliche Signalkaskaden, wobei die jeweilige Effektor-domäne nur mit einer gleichartigen Domäne interagieren kann<sup>15</sup>.

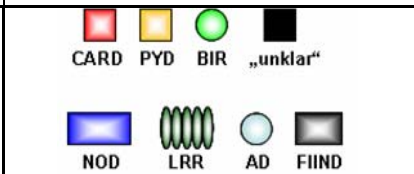
Da es im Laufe der Zeit zu einer unüberschaubaren und teilweise zweideutigen Benennung der einzelnen Nod-ähnlichen Rezeptoren gekommen ist, wurde zur Vereinheitlichung der Nomenklatur und zur besseren Überschaubarkeit eine Unterteilung der NLR in fünf Unterfamilien auf Basis ihrer Effektor-domäne vorgenommen<sup>16</sup>. Die fünf Unterfamilien heißen NLRA, NLRB, NLRC, NLRP und NLRX<sup>16</sup> (Tabelle 1.1). Die größte dieser Unterfamilien mit bislang 14 Mitgliedern ist die NLRP. In ihr sind die Nalp (*NACHT, LRR and PYD domains-containing protein*) Rezeptoren zusammengefasst, die alle eine PYD als Effektor-domäne besitzen<sup>12</sup>.

Die zweitgrößte Gruppe bildet die NLRC, welche die Nod Proteine (*Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein*) und IPAF (*Ice protease-activating factor*) beinhaltet, die eine CARD als Effektor-domäne aufweisen<sup>16</sup>.

Die Unterfamilien NLRA und NLRB bestehen jeweils nur aus einem einzigen Vertreter. CIITA (*MHC class II transactivator*) mit seiner N-terminalen CARD und der zusätzlichen Aktivierungsdomäne (AD) bildet die NLRA. NAIP (*Baculoviral IAP repeat-containing protein*) mit drei N-terminalen BIR Domänen bildet die NLRB Unterfamilie<sup>16</sup>.

Tabelle 1.1: Mitglieder der Nod-ähnlichen Rezeptoren und ihre Domänenarchitektur (nach Chen *et al.*, 2009)

NLR Familie	Name	Synonyme	Domänenarchitektur	Größe (AS)
NLRA	CIITA	NLRA, MHC2TA		1130
NLRB	NAIP	NLRB, BIRC1		1403
NLRC	Nod1	NLRC1, CARD4		953
	Nod2	NLRC2, CARD15		1040
	Nod3	NLRC3, CLR16.2		1065
	IPAF	NLRC4, CARD12, CLAN		1024
	Nod4	NLRC5, Nod27, CLR16.1		1866
NLRP	Nalp1	NLRP1, DEFCAP, NAC, CARD7		1473
	Nalp2	NLRP2, Pypaf2, NBS1, PAN1		1062
	Nalp3	NLRP3, Cryopyrin, CIAS1, Pypaf1		1036
	Nalp4	NLRP4, Pypaf4, PAN2		994
	Nalp5	NLRP5, Pypaf8, PAN11		1200
	Nalp6	NLRP6, Pypaf5, PAN3		892
	Nalp7	NLRP7, Pypaf3, Nod12		980
	Nalp8	NLRP8, PAN4, Nod16		1048
	Nalp9	NLRP9, Nod6		991
	Nalp10	NLRP10, Pynod, Nod8, PAN5		655
	Nalp11	NLRP11, Pypaf6, Nod17		1033
	Nalp12	NLRP12, Pypaf7, PAN6, RNO, Monarch-1		1061
	Nalp13	NLRP13, Nod14		1043
	Nalp14	NLRP14, Nod5		1093
NLRX	NLRX1	Nod5, Nod9, Nod26, CLR11.3		975



CARD PYD BIR „unklar“

NOD LRR AD FIIND

Eine Sonderstellung nimmt das NLRX1 (*NLR family member X 1*) ein. Bei diesem NLR Vertreter ist noch unklar, um was für eine Domäne es sich am N-Terminus handelt, da sich allein über die Sequenz keine Verwandtschaft mit bislang bekannten Strukturen erkennen lässt. Aus diesem Grund wird NLRX1 als alleiniger Vertreter der Unterfamilie NLRX geführt<sup>16</sup>. In Tabelle 1.1 sind alle bis heute bekannten Mitglieder der Familie der Nod-ähnlichen Rezeptoren zusammengefasst.

Die bei allen Nod-ähnlichen Rezeptoren vorkommende zentrale NOD ermöglicht eine Oligomerisierung, welche nach gängiger Meinung im Anschluss an die Aktivierung des Rezeptors stattfindet und für die Signalweiterleitung zwingend erforderlich ist<sup>17</sup>. Die C-terminale LRR-Domäne wird für Autoregulationsmechanismen und die Ligandenbindung verantwortlich gemacht, auch wenn die genauen Mechanismen hierfür noch weitestgehend unbekannt sind<sup>12</sup>.

Die einzelnen Mitglieder der NLR Familie weisen unterschiedliche, zell- und gewebsspezifische Expressionsmuster auf. So findet man z.B. für Nod1 ein hohes Expressionsniveau in Herz, Skelettmuskel, Milz und Pankreas, aber auch in Thymus, Gehirn, Lunge und Hoden ist es zu finden<sup>18</sup>. Dagegen ist Nod2 Monocyten-spezifisch<sup>19</sup>. Nalp3 kommt in nahezu allen Leukozyten vor, ansonsten hauptsächlich im nicht-keratinisierenden Epithel des Mundrachenraums, der Speiseröhre und des Gebärmutterhalses<sup>20</sup>. Nalp1 zeigt eine sehr weite Verbreitung innerhalb des Organismus, mit sehr hohen Mengen vor allem im Gehirn, speziell in den Pyramidenzellen der Großhirnrinde und den Oligodendrozyten, in Zellen des Immunsystems, wie den T-Lymphozyten und den Langerhans-Zellen, sowie in einer Vielzahl der inneren Organe, darunter Herz, Lunge, Leber, Milz und Nieren, den Skelettmuskeln und in allen Teilen des Verdauungstraktes<sup>18,20</sup>.

Aus diesen teilweise stark unterschiedlichen Expressionsmustern der einzelnen NLR lässt sich auf ihre spezifische Aufgabenverteilung bei der Immunantwort auf Pathogene schließen<sup>20</sup>. Diese Aufgabenverteilung wird außerdem deutlich, wenn man die verschiedenen Signalwege betrachtet, die von den einzelnen Nod-ähnlichen Rezeptoren aktiviert werden.



### 1.3 Signalwege der Nod-ähnlichen Rezeptoren

Die Hauptaufgabe der NLR ist die Aktivierung von Signalwegen, welche zur Produktion von Faktoren der Entzündungsreaktion führen, um so auf die Infektion des Wirts durch Pathogene zu reagieren. Dabei ist der Funktionsmechanismus der intrazellulären NLR ähnlich dem der membranständigen TLR, und teilweise werden sogar die gleichen Zielproteine angesteuert<sup>21</sup>. Nach erfolgreicher Detektion des Liganden aktivieren die verschiedenen NLR unterschiedliche Signalkaskaden, welche wiederum in unterschiedlichen Zielproteinen enden. Es wurden drei Hauptzielproteine der NLR Aktivität identifiziert, der Kernfaktor-kappa B (*nuclear factor-kappa B*, NF-κB), die Mitogen aktivierte Proteinkinase (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) und die Caspase-1 (*cysteine-dependent aspartate-directed protease 1*)<sup>9</sup> (Abbildung 1.2).

Die Zielproteine NF-κB und MAPK werden u.a. durch Signalkaskaden aktiviert, an deren Anfang die beiden NLR Nod1 und Nod2 stehen<sup>22-25</sup>. Die Aktivierung von Nod1 und Nod2 durch ihren jeweiligen Liganden führt zu ihrer Oligomerisierung. Über ihre CARD Effektorodomäne sind diese beiden NLR dann in der Lage eine CARD-CARD Interaktion mit der Serin-Threonin Kinase RIPK2 (*Receptor-interacting proteine kinase 2*) einzugehen<sup>17, 19, 23, 26-29</sup>. Diese Komplexbildung hat die essentielle Ubiquitylierung von RIPK2 am Lysin 209 (K209) zur Folge. Nur dieses ubiquitylierte RIPK2 kann weitere Proteine rekrutieren, wodurch es am Ende zur Aktivierung von MAPK und NF-κB kommt<sup>29-30</sup>. Das aktivierte NF-κB wird daraufhin aus dem Cytosol in den Zellkern transportiert, wo es die Transkription verschiedener Cytokine und Chemokine wie TNF-α (*tumor necrosis factor alpha*), Interleukin 6 (IL-6) und IL-8 einleitet. Die sekretierten Cytokine stimulieren und rekrutieren Immunzellen und tragen damit zur Immunantwort bei<sup>31-32</sup>. Die Aktivierung des MAPK Signalwegs resultiert in der Aktivierung der Kinasen ERK (*extracellular signal-regulated protein kinase*) und JNK (*c-Jun N-terminal kinase*)<sup>33</sup> (Abbildung 1.2).

Das dritte Hauptzielprotein, die Caspase-1, wird u.a. von Nalp1 und Nalp3 angesteuert. Die Caspase-1 wird allerdings nicht direkt durch einen der beiden NLR aktiviert, sondern in einem Multiproteinkomplex, der als Inflammasom bezeichnet wird<sup>34</sup> (Abbildung 1.2). Die Bezeichnung Inflammasom spiegelt dabei die Funktion des Komplexes bei Entzündungen (engl. *inflammation*) wider, das Suffix -som stammt vom griechischen Wort soma (= Körper) und definiert in der Biologie allgemein hochmolekulare Komplexe, z.B. das Ribosom. Außerdem wurde der Name in Anlehnung an das Apoptosom gewählt, um die strukturelle und funktionelle Verwandtschaft mit diesem Multiproteinkomplex zu unterstreichen.

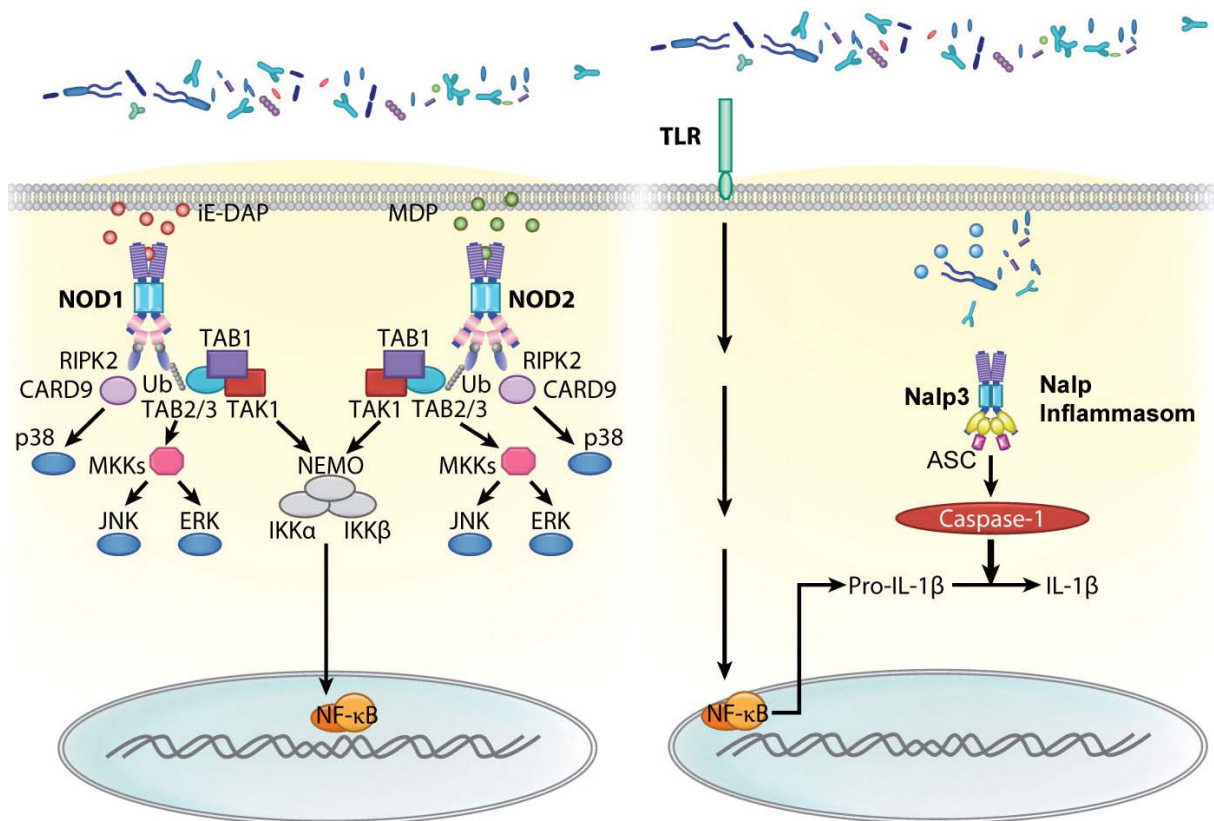


Abbildung 1.2: Signalwege der Nod-ähnlichen Rezeptoren (NLR).

Extrazelluläre Pathogen-assoziierte Strukturen (PAMPs) außerhalb der Zelle werden durch Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR) erkannt. Die Signalweiterleitung erfolgt über eine mehrstufige Kaskade und endet in der Aktivierung des NF-κB. Zur Aktivierung von Nod1 und Nod2 kommt es durch iE-DAP (D-γ-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure) und MDP (Muramyl-dipeptid), was die Rekrutierung des Adapterproteins RIPK2 zur Folge hat und unter Beteiligung weiterer Proteinkomplexe ebenfalls zur Aktivierung des NF-κB und der MKKs führt. Die Aktivierung der MKKs und des NF-κB resultiert in der Hochregulation der Transkription proinflammatorischer Gene (z.B. IL-1β). Verschiedene mikrobielle und endogene Moleküle sind in der Lage, die Formierung des Nalp Inflammasoms zu induzieren, wodurch es zur Aktivierung der Caspase-1 kommt. Die Caspase-1 spaltet das inaktive Pro-IL-1β in aktives IL-1β, welches dann von der Zelle sekretiert wird. Abkürzungen: TAB, TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 1; NEMO, NF-κB essential modulator; IKK, I-kappa-B kinase. (Chen *et al.*, 2009, modifiziert)

Im Nalp Inflammasom wird die Rezeptoraktivität über einen Adapter auf die Caspase-1 übertragen<sup>34-35</sup> (Abbildung 1.3). Das Inflammasom besteht dabei aus Nalp1 oder Nalp3, dem Adapterprotein ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) und der Procaspase-1 (katalytisch inaktives Zymogen der Caspase-1). Das ASC ist ein 195 Aminosäuren großes Protein, das aus einer N-terminalen PYD und einer C-terminalen CARD besteht, weshalb es alternativ auch PYCARD genannt wird<sup>36-37</sup>. Über seine PYD bindet das ASC an die PYD des Nalp1 oder Nalp3. Über seine CARD ist es in der Lage, an die CARD der Procaspase-1 zu binden und diese so in das Inflammasom zu rekrutieren<sup>35</sup>. Die Bedeutung sowohl von Nalp1 und Nalp3 als auch von ASC für die Aktivierung der Caspase-1 konnte dabei in verschiedenen Studien gezeigt werden<sup>38-42</sup>.

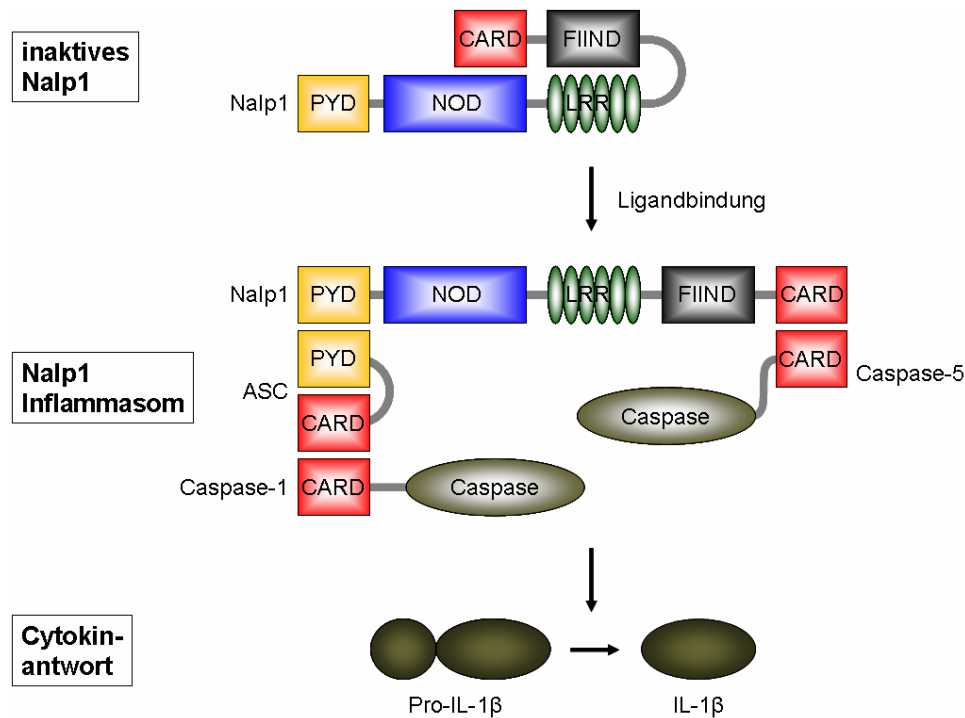


Abbildung 1.3: Modellvorstellung zur Nalp1 Aktivierung.

In der Zelle liegt das Nalp1 in inaktiver Form vor. Für die Inaktivität könnte ein autoinhibitorischer Mechanismus verantwortlich sein. Durch die Bindung des Liganden wird das Nalp1 aktiviert und es kommt zur Rekrutierung des Adapterproteins ASC über eine PYD-PYD Interaktion. Das ASC wiederum rekrutiert über seine CARD die Caspase-1, zusätzlich bindet das Nalp1 über seine C-terminal CARD die Caspase-5, womit das Nalp1 Inflammasom komplett ist. Durch die räumliche Nähe der Caspasen innerhalb dieses Multiproteinkomplexes kommt es zur katalytischen Aktivierung der Caspase-1, die dann in der Lage ist, das inaktive Cytokin Pro-IL-1 $\beta$  in seine aktive Form IL-1 $\beta$  zu spalten. (nach Tschopp *et al.*, 2003 und Uematsu & Akira, 2006)

Mit seiner C-terminalen CARD rekrutiert das Nalp1 zusätzlich noch die Caspase-5 in das Inflammasom, indem es eine direkte CARD-CARD Interaktion mit ihr eingeht (Abbildung 1.3). Der Zweck dieser Caspase-5 Rekrutierung, die bislang nur beim Nalp1 Inflammasom beobachtet wurde, ist nicht ganz klar. Experimentell konnte gezeigt werden, dass es auch ohne die Caspase-5 zu einer Aktivierung der Caspase-1 im Nalp1 Inflammasom kommt<sup>38</sup>.

Nicht abschließend geklärt ist die Frage, ob im Inflammasom das Nalp1 als Dimer oder Oligomer vorliegt. Das Nalp1 Inflammasom konnte von Faustin *et al.* aus aufgereinigten Komponenten rekonstituiert werden, und es war damit möglich Caspase-1 zu aktivieren. Elektronenmikroskopische Aufnahmen weisen dabei auf eine Ringstruktur aus fünf oder sieben Untereinheiten hin, ähnlich der Form des Apoptosoms<sup>38</sup>. Sicher zu sein scheint dagegen, dass durch die Ausbildung des Inflammasoms ein räumliches Umfeld geschaffen wird, durch das es zur autokatalytischen Aktivierung der Caspase-1 kommt<sup>17,43</sup>. Die aktivierte Caspase-1 ist in der Lage das Cytokin Pro-IL-1 $\beta$  in seine aktive Form IL-1 $\beta$  zu spalten<sup>44</sup>,

welches dann von der Zelle sekretiert wird und u.a. zur Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten beiträgt<sup>45</sup>.

Eine weitere Konsequenz der Caspase-1 Aktivierung ist die Auslösung der so genannten Pyroptose. Bei der Pyroptose handelt es sich um eine spezielle Form des programmierten Zelltods, unterschiedlich zu Apoptose und Nekrose. Bei diesem Prozess spielen neben der Caspase-1 die beiden Cytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 eine wichtige Rolle<sup>46</sup>. Im Verlauf der Pyroptose kommt es zur Bildung von Poren in der Plasmamembran, Zellyse und der Freisetzung von intrazellulären Signalstoffen, welche die Entzündungsreaktion verstärken<sup>47</sup>. Die Pyroptose tritt hauptsächlich bei Makrophagen auf, die mit intrazellulären Bakterien infiziert sind<sup>47-52</sup>.

#### 1.4 Liganden der Nod-ähnlichen Rezeptoren

Als Sensoren des Immunsystems sind die Pathogen-erkennenden Rezeptoren (PRR) dafür verantwortlich, das Eindringen von Mikroorganismen zu erkennen und das angeborene Immunsystem zu einer Abwehrreaktion zu aktivieren. Dabei kommt den NLR eine besondere Aufgabe zu. Da es sich bei ihnen um intrazelluläre Rezeptoren handelt, detektieren sie Pathogene, welche bereits in das Cytosol eingedrungen sind und die Zelle infiziert haben. Obwohl teilweise komplette Mikroorganismen in die Wirtszelle eindringen können, sind es hauptsächlich Abbauprodukte phagozytierter Bakterien oder von Bakterien sekretierte Stoffe, die ins Cytosol gelangen und die Zelle schädigen können. All diese Strukturen, die von PRR erkannt werden, bezeichnet man als Pathogen-assoziierte, molekulare Muster (*Pathogen-associated molecular pattern*, PAMP). Per Definition handelt es sich bei einem PAMP um eine molekulare Struktur, die essentiell für das Überleben der Mikroorganismen ist<sup>10</sup>. Daher stehen sie unter einem hohen Selektionsdruck und sind evolutionär hoch konserviert. Zu den PAMP gehören z.B. essentielle Bestandteile der bakteriellen Zellwand, wie Lipopolysaccharide und Peptidoglycane, aber auch virale Nukleinsäuren. Der hohe Konservierungsgrad der PAMP und ihre geringe evolutionäre Veränderung ist ein Grund dafür, dass das angeborene Immunsystem, im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem, mit verhältnismäßig wenig verschiedenen Rezeptoren auskommt und dennoch eine große Bandbreite von Pathogengruppen erkennen kann.

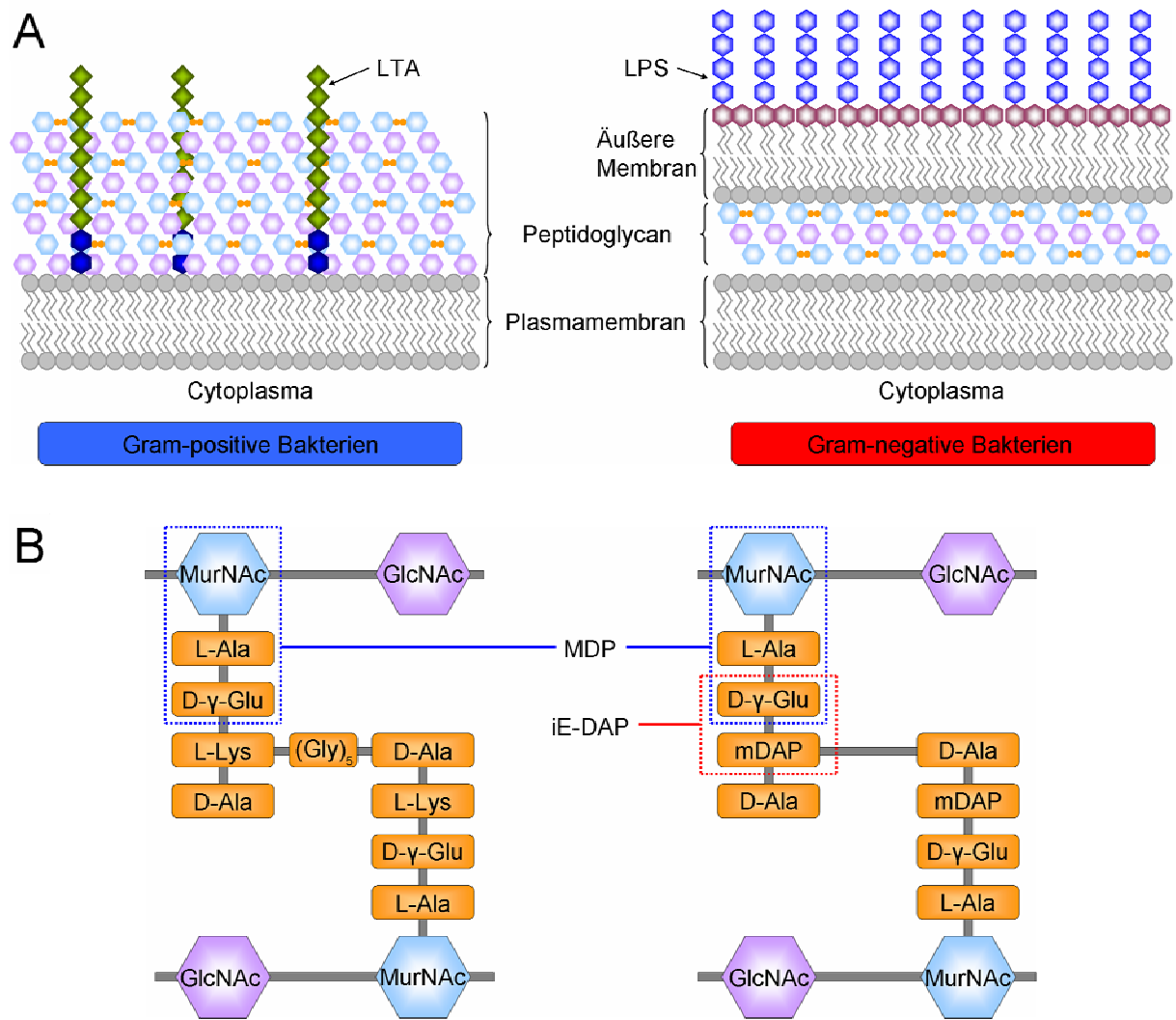


Abbildung 1.4: Aufbau des Peptidoglycans.

(A) Die schematische Darstellung zeigt vereinfacht den Aufbau der bakteriellen Zellhülle Gram-positiver (links) und Gram-negativer (rechts) Bakterien. Bei Gram-positiven Bakterien bilden lange, parallel verlaufende Ketten aus den alternierenden Zuckern N-Acetylglucosamin (GlcNAc, violette Sechsecke) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc, blaue Sechsecke) eine dicke Hülle auf der Plasmamembran, bei Gram-negativen Bakterien sind diese Zuckerketten deutlich kürzer und befinden sich im periplasmatischen Raum zwischen der Plasmamembran und der äußeren Membran. In beiden Fällen sind die einzelnen Zuckerketten über Peptidbrücken (orange Punkte) miteinander verbunden. Gezeigt sind außerdem weitere Bestandteile der bakteriellen Zellhülle, die beim Menschen als exogene Pyrogene wirken und von PRRs erkannt werden, wie die Lipoteichonsäure (LTA) der Gram-positiven Bakterien und die Lipopolysaccharide (LPS) der Gram-negativen Bakterien. (B) Die Peptidbrücken zwischen den Zuckerketten der Peptidoglycanschicht unterscheiden sich sowohl in der Zusammensetzung ihrer Aminosäuren als auch in der Form der Verknüpfung zwischen Gram-positiven (links) und Gram-negativen (rechts) Bakterien. Farblich markiert sind die zwei NLR aktivierenden Peptidoglycan-Fragmente MDP (Muramyl-dipeptid, blaue Box) und iE-DAP (D-γ-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure, rote Box). Abkürzungen: L-Ala, L-Alanin; D-Ala, D-Alanin; D-γ-Glu, D-γ-Glutaminsäure; L-Lys, L-Lysin; Gly, Glycin; mDAP, meso-Diaminopimelinsäure. (nach Silhavy *et al.*, 2010 und Vollmer *et al.*, 2008)

Die beiden NLR Nod1 und Nod2 werden durch Peptidoglycanfragmente aktiviert<sup>53</sup>. Das Peptidoglycan (PGN) ist ein Polymer aus Zuckern und Aminosäuren (Abbildung 1.4 A). Dabei sind die beiden Zucker N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure

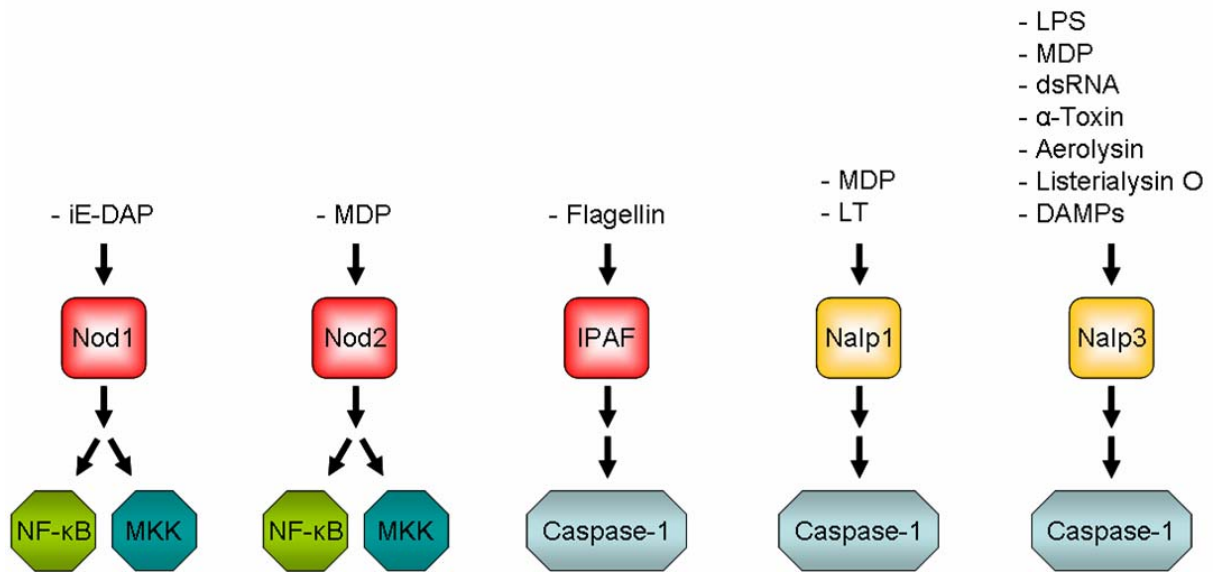
(MurNAc) alternierend über eine  $\beta(1-4)$ -glycosidische Bindung miteinander verbunden und formen so lange Ketten. Diese Zuckerketten sind über kurze Oligopeptide miteinander verbunden, die aus besonderen Aminosäuren aufgebaut sind und sich charakteristisch zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien unterscheiden<sup>54</sup> (Abbildung 1.4 B). Die Oligopeptide sind kovalent an die Lactylgruppen der N-Acetylmuraminsäuremoleküle gekoppelt und verbinden so die einzelnen Stränge zu einem engmaschigen Netzwerk, welches als Murein-Sacculus bezeichnet wird und dem Bakterium Stabilität und Festigkeit verleiht (deshalb teilweise auch als bakterielle Zellwand bezeichnet) (Abbildung 1.4 A)<sup>55</sup>.

Der Ligand von Nod1 ist  $\gamma$ -D-glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure (iE-DAP), ein PGN-Fragment (Abbildung 1.4 B)<sup>56-57</sup>. Die meso-Diaminopimelinsäure dieses Dipeptids kommt hauptsächlich bei Gram-negativen Bakterien vor, ist aber auch in den Gram-positiven Bakterien der Gattungen *Listeria monocytogenes* und *Bacillus* spp. zu finden<sup>56-57</sup>, letztere hat ein sehr hohes Nod1 stimulierendes Potenzial<sup>53</sup>. Untersuchungen von Hasegawa *et al.* haben gezeigt, dass Nod1 auch durch wasserlösliche Extrakte aus Lebensmitteln und Erde sowie durch Überstände von Bakterienkulturen stimuliert werden kann, ohne dass es zu physischem Kontakt mit lebenden Bakterien kommen muss<sup>53</sup>. So kann der Listeriolysin O (LLO) defiziente Stamm *Listeria hly* eine Nod1 (und Nod2) abhängige NF- $\kappa$ B Aktivierung einleiten, obwohl der Listeriolysin O Mangel dazu führt, dass es den Bakterien nicht mehr möglich ist, aus dem Phagosom ins Cytosol zu gelangen<sup>53</sup>. Dies deutet darauf hin, dass die als Nod1 Agonisten wirkenden Moleküle von den Bakterien sekretiert werden<sup>53</sup>. Bestätigt werden diese Erkenntnisse durch die Beobachtung, dass *Shigella* Mutanten mit erhöhter PGN Ausscheidung die Nod1 abhängige NF- $\kappa$ B Aktivierung *in vitro* hoch regulieren<sup>58</sup>. In weiteren *in vitro* Studien konnten mehrere pathogene Bakterien mit Nod1 abhängiger Aktivierung in Verbindung gebracht werden, dazu gehören *Listeria monocytogenes*<sup>27</sup>, *Shigella flexneri*<sup>22</sup>, *Campylobacter jejuni*<sup>59-60</sup>, enteroinvasive *Escherichia coli*<sup>61</sup>, *Chlamydomphila pneumonia*<sup>62</sup> und *Pseudomonas aeruginosa*<sup>63</sup>. Die Rolle von Nod1 bei *in vivo* Infektionen ist jedoch unklar. Ursprünglich wurde Nod1 für den Schutz bei Infektionen mit *Chlamydia trachomatis* *in vitro* verantwortlich gemacht, denn Nod1 defiziente murine embryonale Fibroblasten (MEF) weisen eine verringerte Produktion an Cytokinen nach einer Chlamydien Infektion auf. Allerdings haben Nod1 defiziente Mäuse keinen erhöhten Bakterienbefall oder klinische Symptome, was darauf hindeutet, dass Nod1 entweder nicht direkt involviert ist oder durch andere redundante Signalwege kompensiert wird<sup>64</sup>. Dem gegenüber konnte in Nod1 defizienten Mäusen eine erhöhte Anfälligkeit gegen *Helicobacter pylori* Infektionen festgestellt werden, verbunden mit einer verminderten  $\beta$ -Defensin-4 Produktion<sup>65-66</sup>.

Im Gegensatz zu Nod1, welches hauptsächlich als Sensor für Gram-negative Bakterien dient, wird Nod2 durch ein breiteres Spektrum an Bakterien aktiviert, dazu zählen die Gattungen *Streptococcus pneumoniae*<sup>67</sup>, *Listeria monocytogenes*<sup>68-69</sup>, *Mycobacterium tuberculosis*<sup>70</sup>, *Salmonella typhimurium*<sup>71</sup> und *Staphylococcus aureus*<sup>72</sup>. Der von Nod2 erkannte Agonist ist das PGN-Fragment Muramyl-dipeptid (MDP) (Abbildung 1.4 B)<sup>73-74</sup>. Ähnlich wie im Fall von Nod1 sind die meisten Untersuchungen bezüglich Nod2 aktivierender Pathogene in vitro durchgeführt worden, so dass die Beteiligung und Bedeutung von Nod2 bei Infektionen mit diesen Pathogenen in vivo noch weiteren Untersuchungen bedarf.

Durch ein breites Spektrum an Liganden wird Nalp3 aktiviert (Abbildung 1.5). Dieser NLR detektiert unter anderem LPS, MDP sowie bakterielle und virale Nukleinsäuren<sup>39-41, 75-76</sup>. So haben Kanneganti *et al.* eine Nalp3 abhängige Caspase-1 Aktivierung als Reaktion auf Sendai und Influenza Viren Infektion und doppelsträngige RNA gezeigt<sup>39</sup>. Außerdem reagiert Nalp3 auch auf bakterielle Toxine. So wurde gezeigt, dass es durch das  $\alpha$ -Toxin von *Staphylococcus aureus*, das Aerolysin von *Aeromonas hydrophila* und das Listeriolysin O von *Listeria monocytogenes* zur Bildung des Nalp3 Inflammasoms kommt, mit der Aktivierung von Caspase-1 und der Sekretion von IL-1 $\beta$  als Folge<sup>41, 77-78</sup>. Eine besondere Eigenschaft des Nalp3 ist seine Fähigkeit neben den Agonisten mikrobiellen Ursprungs auch endogene Signale zu erkennen. Nalp3 reagiert z.B. auf Veränderungen der intrazellulären Ionenkonzentration, speziell die von Kalium. Derartige Veränderungen können u.a. durch das marine Gift Maitotoxin-1 und das K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter Ionophor Nigericin ausgelöst werden<sup>41</sup>. Die intrazelluläre K<sup>+</sup> Abnahme hat einen wichtigen Einfluss auf die Nalp3 Signalweiterleitung<sup>79-80</sup> und führt zu einer Nalp3 induzierten Caspase-1 Aktivierung<sup>41</sup>. Dabei hat die K<sup>+</sup> Konzentration selbst keinen Einfluss auf die Caspase-1 Aktivität, und in Abwesenheit von PAMP Prästimulation wird die Caspase-1 nicht aktiviert<sup>79</sup>. Weitere endogene Signale, die eine Nalp3 Aktivierung auslösen können, sind außerdem Harnstoffkristalle<sup>81</sup> und reaktive Sauerstoffspezies, die als Reaktion auf Asbest und Siliziumdioxid gebildet werden<sup>82</sup>. Da es sich bei diesen endogenen Aktivatoren ebenfalls um Signale handelt, die mit zellulärem Stress oder einer Schädigung des Organismus in Zusammenhang gebracht werden, bezeichnet man diese Art von aktivierend wirkenden Molekülen als Gefahr-assoziierte, molekulare Muster (*Danger-associated molecular pattern*, DAMP)<sup>83-84</sup> (Abbildung 1.5).





**Abbildung 1.5:** Agonisten verschiedener Nod-ähnlicher Rezeptoren und das angesteuerte Hauptzielprotein. Die einzelnen NLRs erkennen charakteristische, pathogene Strukturen (Signale), die in das Cytosol gelangt sind, und aktivieren über spezifische Signalwege bestimmte Hauptzielproteine um eine Immunantwort auszulösen. Dabei gibt es teilweise Überschneidungen bei den erkannten Liganden, die so verschiedene Reaktionen auslösen. Abkürzungen: NF-κB, Kernfaktor-kappa B; MKK, MAP-Kinase Kinasen; iE-DAP, D-γ-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure; MDP, Muramyl-dipeptid; LT, Lethales Toxin; LPS, Lipopolysaccharid; dsRNA, doppelsträngige RNA; DAMPs, Gefahr-assoziierte molekulare Strukturen.

Trotz der vielen bekannten Aktivatoren für verschiedene Mitglieder der NLR Familie (Abbildung 1.5) ist die Art und Weise der Interaktion zwischen Ligand und NLR nicht klar. Genauer gesagt ist nicht bekannt, ob es zu einer direkten Wechselwirkung kommt, oder ob Adaptermoleküle an der Interaktion beteiligt sind. Die einzige Ausnahme hierzu bildet Nalp1. Faustin *et al.* waren in der Lage, das humane Nalp1 Inflammasom aus den aufgereinigten Einzelkomponenten Nalp1, ASC und Procaspase-1 zu rekonstruieren und haben dabei gezeigt, dass die Aktivierung durch Zugabe von MDP erfolgt<sup>38</sup> (Abbildung 1.5). Da in diesem zellfreien System keine weiteren Moleküle anwesend waren, ist davon auszugehen, dass es zumindest in diesem Fall zu einer direkten Interaktion zwischen dem Ligand MDP und dem Rezeptor Nalp1 kommt. Im murinen Nalp1b Gen konnten Mutationen identifiziert werden, welche die Anfälligkeit von Mäusen gegenüber dem Lethalen Toxin (LT) von *Bacillus anthracis* beeinflussen<sup>85</sup>. Das LT ist der Hauptvirulenzfaktor bei der Pathogenität von Milzbrand und ist für die Bildung von Poren in der Endosomenmembran in der Wirtszelle verantwortlich. Durch diese Poren kann dann der Lethale Faktor (LF) in die Wirtszelle eindringen. Der LF ist eine Protease, die spezifisch die N-terminalen Enden der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinasen (MAPK-Kinasen) abspaltet, was zu schwerwiegenden Veränderungen in den zellulären Signalwegen führt und letztendlich im Zelltod endet<sup>86</sup>. In



Mausmakrophagen verursacht LF eine schnelle Nekrose und in verschiedenen Mausstämmen wurde eine unterschiedlich hohe Anfälligkeit gegenüber LT-induzierter Makrophagennekrose beobachtet und mit fünf Polymorphismen im Gen von Nalp1b in Verbindung gebracht<sup>85</sup>. Nalp1b wurde in diesem Zusammenhang als primärer Vermittler für die Anfälligkeit von murinen Makrophagen gegen LT identifiziert. Die LT-induzierte Zellyse erfordert die Aktivierung von Caspase-1, was direkt oder indirekt über Nalp1b erfolgen könnte<sup>85</sup>.

Eine verbindende Eigenschaft der NLR ist ihre intrazelluläre Lokalisation. Mit Ausnahme von NLRX1 und CIITA sind alle bis heute bekannten NLR im Cytoplasma lokalisiert. Daraus ergibt sich die Frage, wie diese intrazellulären Rezeptoren exogene Strukturen erkennen und wie die Pathogene in das Cytoplasma gelangen. Bei den von den NLR erkannten Strukturen handelt es sich um a) Pathogene, die der extrazellulären Detektion durch TLR entgehen und direkt in die Zelle eindringen können, b) bakterielle Komponenten, die entweder durch Sekretionssysteme oder Poren formende Moleküle in die Zelle transportiert werden, oder c) mikrobielle Produkte, die durch Phagozytose oder Pinocytose von Immunzellen aufgenommen werden<sup>87</sup>.

Eine Bestätigung für den ersten Fall liefert Nod1, dessen Aktivierung von der intrazellulären Lokalisierung direkt invasiver Bakterien wie *Shigella flexneri*<sup>22, 58, 88</sup> und *Streptococcus pneumoniae*<sup>67</sup> abhängt. Zudem lösen nur lebende Bakterien der Gattung *Campylobacter jejuni* eine Nod1 abhängige NF- $\kappa$ B Aktivierung aus, nach Paraformaldehyd-Fixierung waren die Bakterien dazu nicht mehr in der Lage<sup>60</sup>.

Gram-negative Bakterien verfügen über eine große Zahl an Mechanismen, Proteine über die Zellhülle nach außen zu transportieren. Eine besondere Bedeutung kommt dabei den Typ III und Typ IV Sekretionssystemen zu. Mit diesen aus mehr als 20 Untereinheiten bestehenden Maschinerien sind pathogene Bakterien in der Lage, Effektorproteine in die eukaryotische Wirtszelle zu schleusen<sup>89</sup>. Über diesen Weg gelangen virulente Stoffe, z.B. PGN Fragmente, auch in nicht-phagozytierende Zellen wie Epithelzellen, wo sie dann eine Aktivierung der NLR auslösen<sup>90</sup>. Außerdem ermöglichen die bakteriellen Sekretionssysteme den Pathogenen Poren zu formen, um nach einer Phagozytose das Phagosom zu verlassen, sowie Produkte ins Cytosol zu transportieren<sup>25, 69, 91</sup>. Untersuchungen mit Bakterien mit mutiertem, funktionslosem Sekretionsapparat haben gezeigt, dass diese keine oder nur eine verringerte NLR abhängige Antwort auslösen<sup>66, 92</sup>. Alternativ zu den bakteriellen Sekretionssystemen der Gram-negativen Bakterien führen auch Poren formende bakterielle Toxine Gram-positiver Stämme zu einem Eindringen von virulenten Stoffen in die Wirtszelle

(z.B. das Lethale Toxin von *Bacillus anthracis* oder das Streptolysin O von *Streptococcus pyogenes*) (s.o.).

In einigen Fällen konnte eine NLR Aktivierung auch mit hitzeinaktivierten Bakterien erreicht werden. Da in diesen Fällen weder direkte Invasion noch ein aktives Sekretionssystem an der Aufnahme beteiligt sein kann, muss die Aufnahme der toten Bakterien durch Phagozytose der Wirtszelle erfolgen und so nachfolgend zur NLR Aktivierung führen<sup>69, 72</sup>. Der Eintritt von MDP in intestinale Epithelzellen erfolgt ebenfalls über einen Wirt-abhängigen Mechanismus und wird durch den Peptidtransporter hPepT1 in der Plasmamembran vermittelt<sup>93</sup>. Ein weiterer Wirt-vermittelter Mechanismus zur Aufnahme von virulenten Stoffen ins Cytosol ist der Weg über den P2X<sub>7</sub> Rezeptor in Verbindung mit dem Kanalprotein Pannexin-1 in der Plasmamembran. Hohe extrazelluläre Adenosintriphosphat (ATP) Konzentrationen stimulieren den P2X<sub>7</sub> Rezeptor, was zum Öffnen einer Pore im Kanalprotein Pannexin-1 führt<sup>94-95</sup>. Dabei können bakterielle Produkte ins Cytosol gelangen. Experimentell wurde beobachtet, dass es in eukaryotischen Zellen nach ATP Zugabe zu einer Aufnahme von LPS, PGN und Lipoteichonsäure sowie hitzeinaktivierten Bakterien kommt, was zu einer Nalp3 abhängigen Caspase-1 Aktivierung führt<sup>39-40, 42, 96</sup>. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass es auch zu Pannexin-1 vermittelter Aufnahme von MDP kommt, welche dann die Aktivierung von Nalp3 und Caspase-1, nicht aber von Nod2, zur Folge hat<sup>97</sup>.

## 1.5 Synergien zwischen Nod-ähnlichen und Toll-ähnlichen Rezeptoren

Die Nod-ähnlichen und Toll-ähnlichen Rezeptoren gehören beide zur Gruppe der Pathogen-erkennenden Rezeptoren. Betrachtet man die von ihnen detektierten Liganden und aktivierten Zielproteine, so scheint es eine hohe Redundanz zwischen diesen beiden Rezeptorfamilien zu geben. Ein Grund für die funktionelle Überschneidung liegt in der daraus resultierenden Potenzierung der Immunantwort auf eine Infektion. Dabei führt die unterschiedliche Lokalisierung der beiden Rezeptorfamilien zu einer Art natürlicher Arbeitsteilung. So lassen sich Synergien zwischen TLR und NLR bei der Reaktion auf PGN Fragmente beobachten<sup>68, 70, 98-99</sup>. Dennoch kommt es bei TLR und NLR vermittelter Signalweiterleitung auch zu individuellen Transkriptionsantworten, wie es z.B. für die Reaktion auf die Infektion mit Listerien gezeigt werden konnte<sup>100</sup>.

Eine sich gegenseitig ergänzende Wirkung von TLR und NLR lässt sich auch bei der Sekretion von IL-1 $\beta$  finden. Die Freisetzung von IL-1 $\beta$  erfolgt in zwei Stufen und beginnt mit einer NF- $\kappa$ B abhängigen Aktivierung der Transkription des IL-1 $\beta$  Gens, die durch TLR eingeleitet wird<sup>96</sup>. Im zweiten Schritt wird das produzierte Pro-IL-1 $\beta$  dann durch aktivierte Caspase-1 gespalten und aktiviert. Die Caspase-1 Aktivierung erfolgt NLR abhängig durch das Inflammasom<sup>96</sup> (s. Abbildungen 1.2 und 1.3). Durch diesen zweistufigen Prozess kann die Produktion und Freisetzung von IL-1 $\beta$  genauer reguliert werden, um pathologisch wirkende Überproduktionen dieses Cytokins zu verhindern. Auf diese Weise regulieren TLR und NLR unterschiedliche Aspekte desselben Prozesses.

Am Beispiel der IL-1 $\beta$  Sekretion als Antwort auf Pathogenbefall lassen sich auch Synergien zwischen Rezeptoren innerhalb der NLR Familie zeigen. So wird das PGN-Fragment MDP sowohl von Nod2 als auch von Nalp3 erkannt<sup>73-75</sup>, die Folgen sind jedoch unterschiedlich, wirken aber zusammen. So hat die Detektion des MDP durch Nod2 die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die damit verbundene Transkription von IL-1 $\beta$  zur Folge. Das durch MDP aktivierte Nalp3 löst die Inflammasombildung aus und damit die Aktivierung der Caspase-1, die wiederum das gebildete Pro-IL-1 $\beta$  in die reife Form IL-1 $\beta$  spaltet.

Ein weiteres Beispiel für kooperatives Wirken ist bei der Infektion mit Legionellen und Salmonellen zu finden. TLR5 und IPAF erkennen beide das von diesen Spezies produzierte Flagellin, aktivieren aber separate Signalwege, die im einen Fall die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und im anderen die der Caspase-1 nach sich zieht<sup>48, 92, 101-102</sup>.

Diese Beispiele zeigen, dass es sich bei der Erkennung des gleichen Liganden durch verschiedene Rezeptoren nicht um Redundanz handelt, sondern um Kooperation, um eine gezielte, abgestimmte und angemessene Immunantwort zu geben. Neben der Synergie stellen die Nod-ähnlichen Rezeptoren auch eine Sicherung dar, für den Fall, dass es zu einem Ausbleiben des TLR Signals kommt. Dies kann z.B. bei der wiederholten Exposition eines TLR mit LPS auftreten<sup>103</sup>. Gründe für dieses als TLR Toleranz bezeichnete Phänomen können u.a. sein die Unterdrückung exzessiver Cytokinproduktion, die zu Sepsis und multiplen Organversagen beim Wirt führen kann, sowie das Verhindern einer starken Immunantwort gegen kommensale Bakterien (z.B. bei Immunzellen des Darms), was zu pathologischen Entzündungen führen kann<sup>103</sup>. Bei TLR Toleranz spielen NLR eine wichtige Rolle. Die beiden Rezeptoren Nod1 und Nod2 sind in Mäusen und Makrophagen, die mit dem TLR Agonisten LPS vorbehandelt und so desensibilisiert wurden, weiterhin stimulierbar<sup>104</sup>. Dabei ist in Makrophagen die von ihnen ausgelöste Reaktion auf eine Infektion im Zustand der TLR Toleranz sogar erhöht, und bei einer systemischen Listerieninfektion in Mäusen, welche zuvor

mit LPS oder *Escherichia coli* stimuliert wurden, sind Nod1 und Nod2 maßgeblich an der Beseitigung der Infektion beteiligt<sup>104</sup>. Ähnliches geschieht in TLR desensibilisierten Makrophagen bei einer Infektion mit Salmonellen, wobei es zu IPAF vermittelter Produktion von IL-1 $\beta$  kommt<sup>101</sup>.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass NLR zum einen die TLR vermittelte Immunantwort potenzieren und vervollständigen können und zum anderen auch einen zusätzlichen Schutzmechanismus darstellen, für den Fall von Mehrfachinfektionen.

## 1.6 Krankheiten, ausgelöst durch fehlerhafte Nod-ähnliche Rezeptoren

Die einwandfreie Funktion der Pathogen-erkennenden Rezeptoren gewährleistet eine gezielte und effektive Immunreaktion des Wirtes gegen eingedrungene Pathogene. Fehlfunktionen in diesem Teil des angeborenen Immunsystems können zu einer mangelhaften Immunantwort und zu schwerwiegenden Beeinträchtigungen und sogar Schäden des Wirtes führen. Die Bedeutung der Nod-ähnlichen Rezeptoren wird dabei durch die Tatsache unterstrichen, dass mehrere Mutationen im Gen von Nod2 identifiziert und mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, wie der Colitis ulcerosa und dem Morbus Crohn in Verbindung gebracht werden konnten<sup>105-106</sup>. Die drei wichtigsten krankheitsassoziierten Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphism*, SNP) sind die Punktmutationen R702W und G908R sowie eine Rastermutation, bei der es durch die Insertion eines Cytosins an Nucleotidposition 3020 (3020insC) zum Austausch von Leucin zu Prolin und einem direkt nachfolgenden vorzeitigen Translationsabbruch kommt. Bei etwa 40 % aller Morbus Crohn Patienten in Nordamerika und Westeuropa konnte mindestens eine dieser drei Nod2 Varianten festgestellt werden. Zwar sind die tatsächlichen Ursachen für den Ausbruch von Morbus Crohn noch nicht geklärt und neben genetischen Ursachen werden auch Umwelteinflüsse dafür verantwortlich gemacht, aber Menschen, die für eine der drei genannten Mutationen homozygot sind, tragen ein 20-40 fach höheres Risiko zu erkranken. Liegt das mutierte Allele heterozygot vor, ist das Risiko lediglich 2-4 mal so hoch<sup>105-106</sup>. Bei in vitro Versuchen mit diesen Nod2 Varianten konnte gezeigt werden, dass ihre Fähigkeit, eine NF- $\kappa$ B Aktivierung nach Stimulation mit MDP auszulösen, deutlich verringert ist<sup>73, 107</sup>. Ein Grund hierfür könnte eine verminderte Bindekapazität für das MDP sein, denn die Mutationen liegen innerhalb oder benachbart der LRR-Domäne, die für die Ligandbindung verantwortlich gemacht wird<sup>108</sup>. Des Weiteren weisen Monocyten von Morbus Crohn Patienten mit der verkürzten Nod2 Variante

(3020insC) eine reduzierte Produktion von entzündungsassoziierten Cytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-10 auf<sup>109-110</sup>. Für den Zusammenhang zwischen diesen Funktionsverlustmutationen (*loss-of-function mutation*) von Nod2 und dem Krankheitsbild von Morbus Crohn, bei dem es zu einer chronischen Entzündungsreaktion im gesamten Bereich des Verdauungstraktes kommt, gibt es verschiedene Modelle, um diesen vermeintlichen Widerspruch zu erklären. Die ersten beiden Modelle folgern aus der verminderten Nod2 Funktionalität einen erhöhten Befall pathogener Bakterien im Darm, entweder aufgrund von verringerter Produktion von Defensinen (antimikrobiell wirkende Peptide) durch Paneth-Zellen der Darmmucosa<sup>68, 111-112</sup>, oder aufgrund von verminderter Beseitigung dieser Bakterien durch Makrophagen in der Darmwand, was zu einer erhöhten Aktivierung Nod2-unabhängiger PRR Signalwege führt<sup>73, 110</sup>. Eine andere Theorie ist, dass Nod2 als Immunrepressor gegen kommensale Bakterien des Darm wirkt und diese Funktion durch die mutierten Varianten nicht mehr ausgeführt werden kann, was zu einer erhöhten TLR Immunreaktion auf diese Kommensalen führt<sup>113-115</sup>. Die verschiedenen Modelle zum Zusammenhang von Nod2 und Morbus Crohn stellen keine sich gegenseitig ausschließenden Theorien dar, sondern spiegeln viel mehr die Komplexität der beteiligten Signalwege wider. Neben Morbus Crohn wird Nod2 außerdem auch noch mit dem Blau-Syndrom in Verbindung gebracht, einer sehr seltenen autosomal-dominanten Erbkrankheit, bei der es zu granulomatösem Hautausschlag, Arthritis und Iritis kommen kann<sup>116</sup>. Bei den mit dieser Krankheit in Verbindung gebrachten Nod2 Variationen handelt es sich um Funktionsgewinnmutationen (*gain-of-function mutation*) im Bereich der NOD<sup>117</sup>, die zu einer konstitutiv aktiven NF- $\kappa$ B Aktivität führen<sup>108, 118</sup>. Anhand dieser beiden mit Nod2 in Verbindung gebrachten Krankheiten wird deutlich, dass sowohl der Funktionsverlust eines Nod-ähnlichen Rezeptors als auch seine Überfunktion zu schweren Störungen im Gleichgewicht des Immunsystems führen kann.

Ein weiteres Beispiel für die Folgen von deregulierter NLR Aktivität stellen die Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrome (CAPS) dar. Dazu gehören das familiäre kälteinduzierte autoinflammatorische Syndrom (*familial cold autoinflammatory syndrome*, FCAS), auch als familiäre Kälteurtikaria (*familial cold urticaria*, FCU) bezeichnet<sup>119</sup>, das Muckle-Wells-Syndrom (MWS)<sup>120</sup> sowie das chronische infantile neurologisch kutane und artikulare Syndrom (*chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome*, CINCA)<sup>121</sup>, auch als neonatal beginnende entzündliche Systemerkrankung (*neonatal-onset multisystem inflammatory disease*, NOMID) bezeichnet<sup>122</sup>. Bei den CAPS handelt es sich um autosomal-dominante autoinflammatorische Syndrome. Im Gegensatz zu Autoimmun-

erkrankungen kommt es hierbei nicht zu einer Antigen-spezifischen T-Zellantwort oder einem erhöhten Selbst-Antikörper Titer, wohl aber zu Fehlfunktionen des angeborenen Immunsystems<sup>123</sup>. Das Krankheitsbild reicht dabei von wiederkehrendem Hautausschlag und periodisch auftretendem Fieber über Gelenk-, Muskel- und Kopfschmerzen bis hin zu fortschreitendem Seh- und Hörverlust und Proteinablagerungen in den Nieren. Bei den als CAPS zusammengefassten Krankheiten handelt es sich nicht, wie ursprünglich angenommen, um drei eigenständige Krankheiten, sondern um unterschiedlich stark ausgeprägte Phänotypen, die auf dieselbe Ursache zurückzuführen sind, wobei FCAS die mildeste Form und NOMID/CINCA die schwerste Form der CAPS darstellt<sup>124</sup>. Als gemeinsame Ursache gelten Mutationen im Gen von Nalp3 (urspr. als Cryopyrin bezeichnet), die bei Untersuchungen von CAPS Patienten gehäuft gefunden wurden<sup>125</sup>. Die meisten dieser Mutationen liegen im Bereich der NOD Domäne oder in der C-terminal benachbarten Region<sup>125</sup>. Bei diesen Mutationen handelt es sich um dominant-negative bzw. Überfunktionsmutationen, die zu einer Hochregulation der Caspase-1 Aktivierung und einer daraus resultierenden exzessiven IL-1 $\beta$  Produktion führen<sup>126-127</sup>. Eine erhöhte IL-1 $\beta$  Sekretion führt zu Fieber und Bluthochdruck sowie zur Produktion anderer proinflammatorischer Cytokine<sup>9</sup>. Therapieerfolge bei CAPS Patienten mit IL-1 Rezeptorantagonisten bestätigen die IL-1 $\beta$  Überproduktion als Ursache und damit indirekt auch die Beteiligung von Nalp3<sup>124</sup>.

Ein weiteres autoinflammatorisches Syndrom, bei dem einem NLR eine Beteiligung zugeschrieben wird, ist die Vitiligo (Leucopathia acquisita). Bei dieser chronischen Erkrankung kommt es zu einem langsam fortschreitenden Pigmentverlust der Haut durch Untergang der Melanozyten. Die Ursache hierfür ist unklar, aber es könnte sich um ein autoimmunes Phänomen handeln, da Vitiligo Patienten häufig auch andere Autoimmunerkrankungen aufweisen, wie autoimmune Schilddrüsenerkrankungen, rheumatische Arthritis, Diabetes mellitus Typ 1 und Lupus erythematoses<sup>128</sup>. In Patientenstudien in Nordamerika und Europa konnten Einzelnukleotidpolymorphismen im Gen für Nalp1 mit einer Prädisposition für Vitiligo in Verbindung gebracht werden<sup>129</sup>, obgleich der mechanistische Beitrag von Nalp1 zu dem Pigmentverlust daraus nicht geschlussfolgert werden kann.

Die aufgeführten Beispiele von NLR assoziierten Krankheiten zeigen, wie wichtig weiterführende Forschung im Bereich der Nod-ähnlichen Rezeptoren ist, denn je genauer man die Mechanismen kennt, umso gezielter können Therapien entwickelt werden.

## 1.7 Leucin-reiche Wiederholungen

Alle Nod-ähnlichen Rezeptoren (mit Ausnahme von Nalp 10) besitzen Leucin-reiche Wiederholungen (*leucine-rich repeat*, LRR) (Tabelle 1.1). LRR sind ein Strukturmotiv, das in einer Vielzahl von Proteinen auftaucht, von Viren über Bakterien bis hin zu Eukaryoten. Dabei handelt es sich um die unterschiedlichsten Klassen von Proteinen, sowohl extra- als auch intrazelluläre, membrangebundene wie cytosolische, beteiligt an den unterschiedlichsten Aufgaben, wie der Assemblierung der extrazellulären Matrix<sup>130</sup>, der Zelladhäsion und Signaltransduktion<sup>131-133</sup>, neuronaler Entwicklung<sup>134-135</sup>, RNA Prozessierung<sup>136-137</sup>, Adhäsion und Invasion von Bakterien in Wirtszellen<sup>138-139</sup>, der Erkennung und Abwehr von Pathogenen in tierischen und pflanzlichen Zellen<sup>140-142</sup> und der Immunantwort<sup>6, 143-146</sup>.

Eine einzelne LRR ist 20-30 Aminosäuren lang und beinhaltet in überdurchschnittlichem Maße die hydrophobe Aminosäure Leucin. Das Motiv, in der diese Aminosäure auftritt, ist dabei über alle Proteinklassen hoch konserviert und bildet die elf Reste umfassende, charakteristische LRR Konsensussequenz LxxLxLxxNxL<sup>147-148</sup>. Abhängig von Länge und Zusammensetzung des variablen Teils werden die LRR in Unterfamilien aufgeteilt<sup>148</sup> (Tabelle 1.2). Eine LRR-Domäne formt eine gekrümmte, spulenartig gewundene Struktur, in der jede Leucin-reiche Wiederholung eine Umdrehung der Spule formt. Durch die bogenartige Krümmung lassen sich eine innere konkave und eine äußere konvexe Seite beschreiben. Die konkave Seite ist strukturell hoch konserviert und bildet ein  $\beta$ -Faltblatt aus, wobei jede Wiederholung einen  $\beta$ -Strang dazu beiträgt (Abbildung 1.6). Dieses Strukturelement ist allen LRR-Domänen zu Eigen. Die konvexe Seite variiert in den einzelnen Unterfamilien und kann unterschiedliche Sekundärstrukturelemente aufweisen, wie  $\alpha$ -Helices,  $3_{10}$  Helices, Polyprolin II Helices, aber auch kurze  $\beta$ -Stränge (Abbildung 1.6). Dabei ist ein Zusammenhang zwischen der Gesamtlänge der Leucin-reichen Wiederholung und dem sekundären Strukturelement ihrer konvexen Seite zu beobachten. Kurze Wiederholungen weisen hauptsächlich Polyprolin II Helices auf, mit zunehmender Länge ist eine Tendenz über  $3_{10}$  Helices und  $\beta$ -Stränge hin zu  $\alpha$ -Helices erkennbar<sup>149</sup> (Abbildung 1.6). Die  $\beta$ -Stränge der konkaven Seite und die Sekundärstrukturelemente der konvexen Seite sind über Schleifen miteinander verbunden. Dabei verbindet die sog. aufsteigende Schleife das C-terminale Ende des  $\beta$ -Stranges mit dem N-Terminus des konvexen Strukturelements und die sog. absteigende Schleife das C-terminale Ende dieses Strukturelements mit dem N-Terminus des  $\beta$ -Stranges der nachfolgenden Leucin-reichen Wiederholung (Abbildung 1.6). Durch zusätzliche Reste innerhalb der aufsteigenden oder absteigenden Schleife können teilweise größere Schlaufen entstehen<sup>149</sup>. Die erste veröffentlichte Kristallstruktur eines Proteins mit Leucin-reichen

Wiederholungen war die des porcinen Ribonuklease-Inhibitors (pRI)<sup>150</sup>. Diese Struktur stellt ein Paradebeispiel für die Architektur einer LRR-Domäne dar und ist daher auch namengebend für eine ganze LRR-Unterfamilie<sup>148</sup> (Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2: Unterfamilien der Leucin-reichen Wiederholungen (nach A. V. Kajava, 1998).

LRR-Unterfamilie	Länge (AS)	Bereich (AS)	Konsensussequenz <sup>a</sup>	Herkunft	Ort
Typisch <sup>b</sup>	24	20-27	<u>LxxLxLxxN</u> xLxxLp <sup>+</sup> xxxF <sup>-</sup> xxLxx	Tiere, Pilze	extrazellulär
RI-ähnlich <sup>c</sup>	28-29	28-29	<u>LxxLxLxx</u> <sup>N</sup> / <sub>C</sub> xLxxxg <sup>+</sup> oxLxxoLxxxxx	Tiere	intrazellulär
CC <sup>d</sup>	26	25-27	<u>LxxLxLxxC</u> xxITDxxoxxL <sup>-</sup> <sub>g</sub> xx <sup>+</sup> / <sub>L</sub> xx	Tiere, Pilze, Pflanzen	intrazellulär
PS <sup>e</sup>	24	23-25	<u>LxxLxLxxN</u> xL <sup>+</sup> / <sub>s</sub> GxIPxxLGxLxx	Pflanzen, primitive Eukaryoten	extrazellulär
SD22-ähnlich <sup>f</sup>	22	21-23	<u>LxxLxLxxN</u> <sup>r</sup> / <sub>k</sub> I <sup>r</sup> / <sub>k</sub> I <sup>r</sup> / <sub>k</sub> IE <sup>+</sup> / <sub>G</sub> LExLxx	Tiere, Pilze	intrazellulär
Bakteriell <sup>g</sup>	20	20-22	<u>LxxLxV</u> xxN <sup>+</sup> xLxxLP <sup>D</sup> / <sub>E</sub> LPxx	Gram-negative Bakterien	extrazellulär

- a) fettgedruckte und normale Großbuchstaben bezeichnen über 70 % und über 40 % Häufigkeit der angegebenen Aminosäure an einer bestimmten Position, mit den übrigen Resten zu denselben Bestandteilen. Kleinbuchstaben bezeichnen über 30 % Häufigkeit. Ein o markiert einen nicht polaren Rest, ein x einen beliebigen Rest. Stellen von Insertionen bzw. Deletionen sind mit + bzw. – über der jeweiligen Position angegeben. Die dicke durchgezogene Linie hebt den konstanten Teil aller Konsensussequenzen hervor, während die dünne gestrichelte Linie die charakteristische Region jeder einzelnen LRR-Unterfamilie unterstreicht.
- b) Zahlenmäßig größte LRR-Unterfamilie
- c) Ribonuklease-Inhibitor ähnliche LRR Proteine (z.B. RNA1 aus *Mus musculus*)
- d) Cystein enthaltende LRR Proteine (z.B. Skp2 aus *Homo sapiens*; RSP2 aus *Arabidopsis thaliana*; L6 aus *Linum usitatissimum*; GRR1 aus *Saccharomyces cerevisiae*)
- e) Pflanzen spezifische LRR Proteine (z.B. Cf-2.1 aus *Solanum pimpinellifolium*; Polygalacturanase Inhibitor aus *Phaseolus vulgaris*)
- f) SDS22<sup>+</sup> ähnliche LRR Proteine (z.B. SDS22<sup>+</sup> aus *Saccharomyces cerevisiae*)
- g) Bakterielle LRR Proteine (z.B. YopM aus *Yersinia pestis*; Ipa4 und Ipa7 aus *Shigella flexneri*)



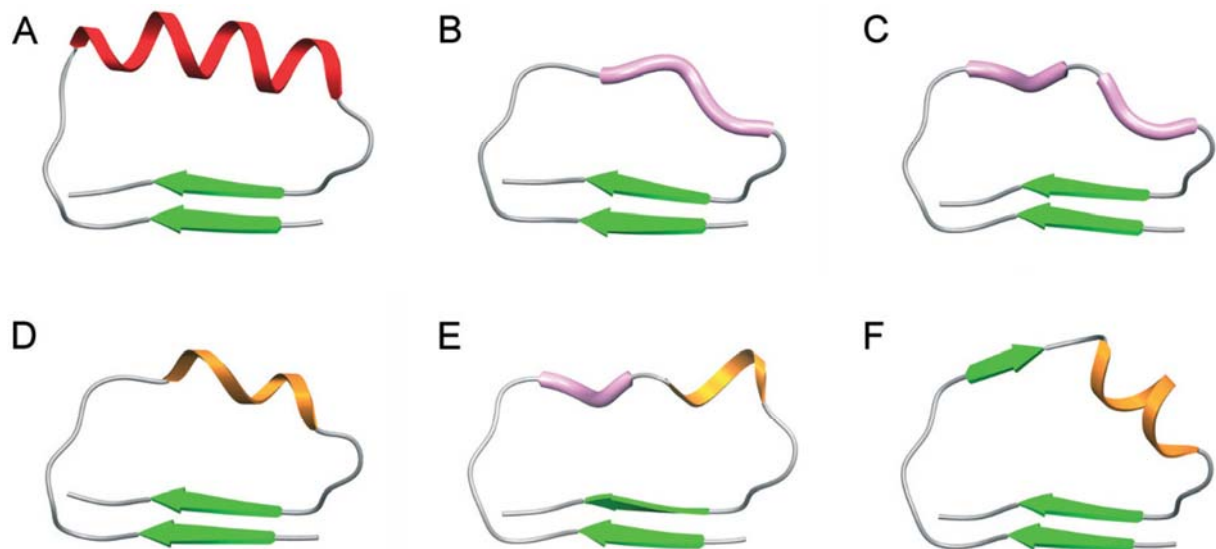


Abbildung 1.6: Verschiedene Sekundärstrukturelemente innerhalb einer Leucin-reichen Wiederholung. Jedes der Bilder zeigt die konservierten  $\beta$ -Stränge der konkaven Seite von zwei aufeinander folgenden LRR mit dem dazwischen liegenden LRR-Unterfamilien spezifischen Sekundärstrukturelement der konvexen Seite. (A) 28 Reste umfassende LRR des RI mit kontinuierlicher  $\alpha$ -Helix auf der konvexen Seite. (B) 20 Reste umfassende LRR des YopM mit einer Polyprolin II Konformation. (C) 22 Reste umfassende LRR des DCN mit zwei Polyprolin II Segmenten. (D) 22 Reste umfassende LRR des INLH mit einer  $3_{10}$ -Helix. (E) 23 Reste umfassende LRR des DCN mit einem Polyprolin II Segment, gefolgt von einer einzelnen Windung einer  $3_{10}$ -Helix. (F) 24 Reste umfassende LRR des TLR3 mit einem kurzen  $\beta$ -Strang, gefolgt von einer  $3_{10}$ -Helix auf der konvexen Seite. In allen Bildern repräsentieren grüne Pfeile  $\beta$ -Stränge, rote Bänder  $\alpha$ -Helices, orange Bänder  $3_{10}$ -Helices und rosa Röhren Polyprolin II Helices. (Bella *et al.*, 2008, modifiziert)

Die bogenartige Krümmung ist eines der charakteristischsten geometrischen Eigenschaften einer LRR-Domäne. Da diese Grundform allen LRR Strukturen zu Eigen ist, wurden von Enkhbayar *et al.* verschiedene geometrische Parameter definiert, um einzelne LRR Strukturen miteinander vergleichen zu können<sup>151</sup>. Zu diesen Parametern gehören der Krümmungsradius  $R$ , der Gesamtrotationwinkel um die Mittelachse  $\varphi$  und der durchschnittliche Winkel pro Wiederholung  $\langle\varphi\rangle$ , der Drallwinkel  $\tau$  zwischen benachbarten Wiederholungen, sowie der Neigungswinkel  $\theta$  zwischen der Richtung des  $\beta$ -Faltblattes und der Achse des best passenden Kreises<sup>151</sup>. Der Vergleich dieser Parameter zwischen unterschiedlichen LRR Strukturen zeigt, dass das auffälligste Merkmal, die Gesamtkrümmung, abhängig ist von der Art des sekundären Strukturelements der konvexen Seite. Strukturen mit  $\alpha$ -Helices weisen einen kleineren Krümmungsradius  $R$  und einen größeren Winkel pro Wiederholung  $\langle\varphi\rangle$  auf als Strukturen mit  $3_{10}$  oder Polyprolin II Helices, was auf die größere räumliche Ausdehnung der  $\alpha$ -Helices gegenüber den anderen sekundären Strukturelementen zurückzuführen ist<sup>151-152</sup>.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Medien und Puffer

##### Luria Bertani (LB)-Medium

Bacto Trypton	10 g/l
Bacto Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
pH 7,0 mit NaOH	
autoklaviert	

##### Terrific-Broth (TB)-Medium

Bacto Trypton	12 g/l
Bacto Hefeextrakt	24 g/l
Glycerol (v/v)	0,4 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,31 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,54 g/l
autoklaviert	

##### LB-Agar

1,5 % Agar in LB-Medium

##### HL5c Medium

Protease Pepton	5 g/l
Casein Pepton	2,5 g/l
Bacto Trypton	2,5 g/l
Bacto Hefeextrakt	5 g/l
D-Glukose	10 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0,3 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4 g/l
pH 6,6 mit NaOH	
autoklaviert	

##### TC-100 Medium

TC-100	21,9 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	0,35 g/l
FBS (v/v)	10 %
Pluronic F-68 (v/v)	1 %

##### Bonner's Lösung

NaCl	10 mM
KCl	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,5 mM

##### EP-Puffer

Kaliumphosphat, pH 6,1	10 mM
Sucrose	50 mM

##### Lyse-Puffer

Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
EDTA	2 mM
EGTA	0,2 mM
Benzamidin	5 mM
DTE	2 mM

##### Extraktionspuffer

Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
EDTA	2 mM
EGTA	0,2 mM
NaCl	300 mM
MgCl <sub>2</sub>	12 mM
ATP	10 mM

##### TSS-Puffer

LB-Medium ohne NaOH	
PEG 8000 (w/v)	10 %
DMSO (w/v)	5 %
MgCl <sub>2</sub>	50 mM
steril filtriert	

##### Phosphate buffered saline (PBS)-Puffer

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	80 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM
NaCl	100 mM

50x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer

Tris	2 M
Essigsäure (99%)	1 M
EDTA	50 mM

5x DNA-Probenpuffer

1x TAE-Puffer	
Glycerin (v/v)	50 %
SDS (w/v)	0,2 %
Bromphenolblau	0,05 %
Xylencyanol	0,05 %

SDS-Gelpuffer

Tris	3 M
SDS (w/v)	0,3 %
pH 8,45 mit HCl	

5x Protein-Probenpuffer

Tris-HCl (pH 6,8)	100 mM
Glycerol	20 %
SDS (w/v)	4 %
$\beta$ -Mercaptoethanol	2 %
Bromphenolblau	0,2 %

10x Anodenpuffer

Tris	2 M
pH 8,9 mit HCl	

10x Kathodenpuffer

Tris	1 M
Tricin	1 M
SDS (w/v)	1 %
pH 8,25 mit HCl	

Coomassie Färbelösung

H <sub>2</sub> O	50 %
Ethanol	40 %
Essigsäure (99%)	10 %
Coomassie Brillinat Blue G250	0,5 g/l
Coomassie Brilliant Blue R250	0,5 g/l

Protein-Puffer A

MES-NaOH (pH 6,5)	50 mM
NaCl	500 mM

Protein-Puffer B

MES-NaOH (pH 6,5)	50 mM
NaCl	100 mM

HEPES-Puffer

HEPES-NaOH (pH 7,5)	50 mM
NaCl	100 mM

CD-Puffer

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 mM
pH 7,7 mit NaOH	

### 2.1.2 Enzyme

Enzym	Hersteller
Pfu-DNA Polymerase	New England Biolabs
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4-DNA Ligase	New England Biolabs
Alkalische Phosphatase aus Shrimps	Roche
His6-TEV-Protease	MPI Dortmund

Die Enzyme wurden mit dem zugehörigen Puffer des jeweiligen Herstellers verwendet.

### 2.1.3 Vektoren

pProEX-HT a/b/c (Invitrogen)

- Expressionsvektor für die heterologe Expression in *E. coli*
- Transkription steht unter Kontrolle eines lac Repressor regulierten Trc Promoters
- codiert N-terminalen Hexahistidin (His<sub>6</sub>)-Fusionsanteil
- codiert TEV Protease Erkennungssequenz zwischen His<sub>6</sub>-Fusionsanteil und Protein

pProEX-H10T a/b/c (Invitrogen, modifiziert)

- modifizierter pProEX-HT: Decahistidin (His<sub>10</sub>)- anstelle des His<sub>6</sub>-Fusionsanteils

pGEX-4T-1-TEV (GE Healthcare, modifiziert)

- Expressionsvektor für die heterologe Expression in *E. coli*
- Transkription steht unter Kontrolle eines lac Repressor regulierten tac Promoters
- codiert N-terminalen 26 kDa Glutathion-S-Transferase (GST, EC 2.5.1.18) Fusionsanteil aus *Schistosoma japonicum*
- codiert TEV Protease Erkennungssequenz zwischen GST-Fusionsanteil und Protein

pFastBac-HT a/b/c (Invitrogen)

- Transfervektor für das Bac-to-Bac Baculovirus Expressionssystem (Invitrogen)
- Zwei Transposonelemente flankieren Expressionskassette
- Transkription in Insektenzellen unter der Kontrolle des Polyhedrin (PH) Promoters
- codiert N-terminalen Hexahistidin (His<sub>6</sub>)-Fusionsanteil
- codiert TEV Protease Erkennungssequenz zwischen His<sub>6</sub>-Fusionsanteil und Protein

pFastBac-H10T a/b/c (Invitrogen, modifiziert)

- modifizierter pFastBac-HT: Decahistidin (His<sub>10</sub>)- anstelle des His<sub>6</sub>-Fusionsanteils

pDIC2-TEV-P (Th. Reubold)

- Expressionsvektor für die heterologe Expression in *Dictyostelium discoideum*
- Transkription steht unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Actin15 Promoters
- codiert N-terminalen Heptahistidin (His<sub>7</sub>)-Myosin II Motordomäne-Fusionsanteil
- codiert C-terminalen GST-Fusionsanteil
- codiert TEV Protease Erkennungssequenz zwischen His<sub>7</sub>-Myosin II Motordomäne-Fusionsanteil und Protein
- codiert Prescision Protease Erkennungssequenz zwischen GST-Fusionsanteil und Protein

**2.1.4 Oligonukleotide**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG synthetisiert.

Tabelle 2.1: Oligonukleotide.

Name	Sequenz
Nalp1 1s Sall	CGCGTCGACATGGCTGGCGGAGCCTGGGGC
Nalp1 1s EcoRI	GCGGAATTCATGGCTGGCGGAGCCTGGGGCCGCCTG
Nalp1 1s NotI	ATAAGAATGCGGCCGCAATGGCTGGCGGAGCCTGGGGCCGCCTG
Nalp1 301s BclI	GGATGATCACCTGATTATGTGGAGGAGAATCGAGGA
Nalp1 320s BamHI	CGGGATCCCCAGGCCTGGATACCCAAGAACC
Nalp1 741s BclI	GGATGATCAATGGGCATGTGTGTAGAAACAGACATG
Nalp1 791s BclI	GGATGATCACCAGTCACAGATGCCTATTGGCAGATT
Nalp1 807s BamHI	CGCGGATCCACCAGAAACCTGAAGGAGCTGGACCTA
Nalp1 818s BamHI	CGCGGATCCAACCTCGCTGAGCCACTCTGCAGTGAAG
Nalp1 807s SacI	ACGCGAGCTCACCAGAAACCTGAAGGAGCTGGACCTA
Nalp1 818s SacI	ACGCGAGCTCAACTCGCTGAGCCACTCTGCAGTGAAG
Nalp1 989s BamHI	CGCGGATCCCCAAGTGTGATGACCCCTACTGAGGGCC
Nalp1-1 1082s BamHI	CGCGGATCCCCACGGGGCCTGTGGCTACTGAGGTAG
Nalp1-1 1230s BamHI	CGCGGATCCCCCGTCACCTCTGTGGTGTGCTTTACC
Nalp1-1 1372s EcoRI	CGCGAATTCCTCTGGATGCCCCGCAGTTGCTG
Nalp1 92as Sall	ACGCGTCGACTCAGTGGCCTGCCCTTCTGGGCTTGGGC
Nalp1 791as Sall	ACGCGTCGACTCATGGGACCCACCTGAACAGGACTACC
Nalp1 932as XhoI	CCGCTCGAGTCAGTTCTGCTGCAGGTCTAGCTCCTTCAG
Nalp1 948as XhoI	CCGCTCGAGTCAATGCCTGAGCCCCCACAGAGCAGTCG
Nalp1 932as NheI	CTAGCTAGCTCAGTTCTGCTGCAGGTCTAGCTCCTTCAG
Nalp1 948as NheI	CTAGCTAGCTCAATGCCTGAGCCCCCACAGAGCAGTCG
Nalp1 990as Sall	ACGCGTCGACTCAACTTGGTTTCCGTCTGCTGAAGATGAG
Nalp1-5 1375as NheI	CTAGCTAGCGTATCTCCTGGCGTCTCTGTTGCACCTG
Nalp1-1 1377as Sall	ACGCGTCGACTCACTGCGGGGCATCCAGAGGTGAAGGTACGG
Nalp1-1 1473as Sall	CGCGTCGACTCAGCTGCTGAGTGGCAGGAGTCCCTTTTTGCTGCC
NALP1 404bp s	GGGTTTTGAGACAGCTGC

NALP1_899bp_s	GGCCTGATTATGTGGAGG
NALP1_1402bp_s	CCTTCTTTGGAGCAGGCAC
NALP1_1899bp_s	GTCCTATGTCTTGGAGG
NALP1_2405bp_s	CCGTCCTCAAGGTCACCAG
NALP1_2903bp_s	GGCAGGAACTGAGGGCCC
NALP1_3399bp_s	CCAGTTCCTGGGTGAGATC
Nalp2_1s_EcoRI	CCGGAATTCATGGTGTCTTCGGCGCAGATGGGCTTC
NALP2_1062as_Sall	CGCGTCGACTCAGATCATGAAGTCATGAGAAGAAGG
NALP2_349bp_s	CCTCTAGACGTGGACGAAATG
NALP2_807bp_s	GCAGGATGACATTCCACAC
NALP2_1245bp_s	GGAGGACCCGGTCCCCACC
NALP2_1697bp_s	CCAAGGAGTTGGAGGCCAC
NALP2_2154bp_s	CCTGTGTGAACAAATAGCC
Nalp3_1s_BamHI	CGCGGATCCATGAAGATGGCAAGCACCCGCTGCAAG
Nalp3_100s_BamHI	CGCGGATCCCGTGTTCGAATCCCACTGTGATATGC
Nalp3_160s_BamHI	CGCGGATCCGAGAGTGTGAGCCTCAACAAACGC
Nalp3_697s_BamHI	CGCGGATCCGAAGGCCGACACCTTGATATGGTGCAG
Nalp3_718s_BamHI	CGCGGATCCCATGGATTGGTGAACAGCCACCTCACTTCC
Nalp3_724s_BamHI	CGCGGATCCACCTCACTTCCAGTTTTTGCCGGGGC
Nalp3_740s_BamHI	CGCGGATCCAGCCAGAGTCTAACTGAATTGGACC
Nalp3_777s_BamHI	CGCGGATCCTTGGGGCGCTGTGGCTTGTGACAC
Nalp3_894s_BamHI	CGCGGATCCTCTGGCCTTACGTCAGTCTGT
Nalp3_93as_Sall	ACGCGTCGACTCACTTCGGCTCATCTCTTTTGGCTTTCTC
Nalp3_717as_Sall	ACGCGTCGACTCAAGAACAGGCAGCATGAGAGGAGC
Nalp3_995as_Sall	ACGCGTCGACCTGTTTCAGCACTTCACAGAACATC
Nalp3_1007as_Sall	ACGCGTCGACTCATTCAAGACAACCCAGGTTCTGCAGG
Nalp3_1036as_Sall	ACGCGTCGACTACCAAGAAGGCTCAAAGACGACGGT
NALP3_429bp_s	CGTGAGAAGCAGATTCCAGTGC
NALP3_879bp_s	CCCTCCAGAATCCTCTTCCTC
NALP3_1321bp_s	GCGGTGTACGTCTTCTTCCTTTCC
NALP3_1861bp_s	CTGCAGATCCAGCCCAGCCAGC
NALP3_2343bp_s	CCTCTCGCATGAGTGCTGCTTCG
Nod1_638s_BamHI	CGCGGATCCGTTTCAGGTGCGAAAGCTTCAACCAGG
Nod1_953as_Sall	CGCGTCGACTCAGAAACAGATAATCCGCTTCTC
NOD1_397bp_s	CTGCGACACCATCTGGGC
NOD1_902bp_s	GTCCTGCCCCTGGGAGC
NOD1_1398bp_s	GGCCCACCGGGGCATGG
NOD1_1901bp_s	GCCTGCCCCGCGTTCAGG
NOD1_2551bp_s	GGCATCTCCACAGAAGGAGGAAAGAGC
Nod2_748s_BamHI	CGCGGATCCGAGATGCAGGAGGAGCGGCTGGCTCG
Nod2_1040as_Sall	CGCGTCGACTCAAAGCAAGAGTCTGGTGTCCCTGC
NOD2_399bp_s	CCTGCAGAGTCACCGGCC
Nod2_874bp_s	GCGGACACTGTGCTGGTGG
NOD2_900bp_s	GGCGGGCAGTGGCAAGAGC
NOD2_1401bp_s	CCGCCTCATCCGCCTGCTC
NOD2_1898bp_s	GCAGGCCAGGCAACTCAC
NOD2_2407bp_s	GGTGACATTGGCGTGGAGC

### 2.1.5 *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) phoA supE44 $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1 deoR	Invitrogen
DH10Bac	F <sup>-</sup> mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 endA1 araD139 $\Delta$ (ara,leu)7697 galU galK $\lambda$ - rpsL nupG/bMON14272/pMON7124	Invitrogen
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3)	Novagen
Rosetta2(DE3)	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam <sup>R</sup> )	Novagen

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur gezielten Vervielfältigung von spezifischen DNA-Abschnitten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) verwendet<sup>153</sup>. Die dabei eingesetzten Oligonukleotide (Primer) waren so entworfen, dass deren Nukleotidsequenz komplementär zu den beiden Randbereichen der zu vervielfältigenden Matrizen-DNA war. Zu Beginn der PCR wurde die Matrizen-DNA durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Im nächsten Schritt wurde die Temperatur abgesenkt um eine Hybridisierung der beiden Primer an die komplementären Abschnitte der Matrizen-DNA zu ermöglichen. Die Hybridisierungstemperatur ist dabei abhängig von der Nukleotidsequenz der Primer. Als Richtwert kann eine Temperatur von 5-10°C unterhalb der Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) der Primer angesetzt werden. Die Schmelztemperatur kann nach der 2 + 4 Regel von Thein und Wallace mit folgender Formel näherungsweise bestimmt werden<sup>154</sup>:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 2 (nA + nT) + 4 (nG + nC)$$

Nach der Hybridisierung der Primer an die DNA-Matrize folgte die Synthese des neuen DNA-Strangs am 3'OH-Ende des Primers durch eine thermostabile DNA Polymerase bei 72°C<sup>155</sup>. In dieser Arbeit wurde die *Pfu* DNA Polymerase (Roche) aus *Pyrococcus furiosus* eingesetzt, deren Synthesegeschwindigkeit ca. 500 bp pro Minute beträgt. Dieser Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Synthese wurde 30-mal wiederholt, um am Ende eine hohe Kopienzahl des gewünschten DNA-Abschnitts aus geringsten Mengen Matrizen-DNA zu gewinnen. Die PCR wurde in einem Thermocycler T3000 (Biometra) durchgeführt.

Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes:

Matrizen-DNA (20-200 ng)	1,0 µl
Primer 1 (100 pmol/µl)	1,0 µl
Primer 2 (100 pmol/µl)	1,0 µl
dNTPs (10 mM)	1,0 µl
10x <i>Pfu</i> -Polymerase Puffer	5,0 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase (2 U/µl)	1,0 µl
ddH <sub>2</sub> O	40,0 µl

Temperatur/Zeit Verlauf einer PCR:

Denaturierung	95°C, 15 sec	
Denaturierung	95°C, 30 sec	} 30 Zyklen
Hybridisierung	65°C, 30 sec	
Synthese	72°C, 30 sec pro 500 bp	
Synthese	72°C, 10 min	
Kühlung	4°C, ∞	

### 2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde sowohl für die analytische als auch für die präparative Aufreinigung linearer DNA verwendet. Für das Gel wurde 1% Agarose (w/v) in 1x TAE Puffer gelöst. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1x TAE. Die DNA Fragmente wurden mit DNA-Probenpuffer aufgetragen und bei 10 V pro Zentimeter Elektrodenabstand 60-90 min entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Ein mitlaufender DNA-Standard (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) diente als Größenvergleich.

Um die DNA unter UV Licht sichtbar zu machen, wurde das Gel im Anschluss mit Ethidiumbromid eingefärbt und die DNA-Banden ausgeschnitten<sup>156-160</sup>. Zur Extraktion der DNA aus dem Agarosegel wurde das QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet.

### 2.2.3 DNA Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Die Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen dient zur Erzeugung definierter Enden eines DNA Fragments bzw. zur Auftrennung von Plasmiden, um beide in einer nachfolgenden Ligation zu verbinden.



Der Reaktionsansatz für eine Restriktion (Gesamtvolumen 20  $\mu\text{l}$ ) enthielt 4 – 8  $\mu\text{g}$  DNA, 10 – 20 U Restriktionsendonuklease (New England Biolabs) sowie 2  $\mu\text{l}$  des zugehörigen 10x Restriktionsendonukleasepuffers (New England Biolabs) und wurde für mehrere Stunden (teilweise ü.N.) bei Reaktionstemperatur nach Herstellerangabe inkubiert. Um die richtige Orientierung des Inserts in den Vektor bei der nachfolgenden Ligation zu garantieren, wurden sowohl Insert als auch Vektor mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten.

Die geschnittene DNA wurde mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

#### **2.2.4 DNA Dephosphorylierung am 5'-Ende**

Um die Religation eines mit Restriktionsendonukleasen linearisierten Plasmidvektors bei einer Ligation mit einem DNA-Fragment zu verhindern, wurden die 5'-Enden der Plasmid-DNA dephosphoryliert. Die dazu verwendete alkalische Phosphatase spaltet die 5'-Phosphatgruppe ab, was eine Religation der beiden Vektorenden unmöglich macht.

Ein Dephosphorylierungsansatz bestand aus 45  $\mu\text{l}$  geschnittener und aufgereinigter Plasmid-DNA, 1  $\mu\text{l}$  alkalische Phosphatase (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, Roche) und 5  $\mu\text{l}$  10x Phosphatase-Reaktionspuffer (Roche). Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und die Phosphatase danach hitzeinaktiviert (65°C, 20 min).

#### **2.2.5 Ligation linearer DNA Fragmente**

Um einen DNA Abschnitt in den Polylinker (*multiple cloning site*, MCS) eines Expressionsvektors zu integrieren, wurden das DNA Fragmente (Insert) und das linearisierte Plasmid miteinander ligiert. Dazu wurden Insert und Plasmid im Verhältnis 4:1 bis 6:1 gemischt. Zur Katalyse der Reaktion wurde 1  $\mu\text{l}$  T4 DNA Ligase (New England Biolabs) und 2  $\mu\text{l}$  10x T4 DNA Ligase Puffer (New England Biolabs) zugesetzt. Die Reaktion inkubierte für mehrere Stunden (oder ü.N.) bei RT.

### 2.2.6 Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA

Die Isolierung und Aufreinigung von Plasmid DNA aus Bakterien erfolgte unter Verwendung des QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) bzw. des QIAGEN® oder QIAfilter™ Plasmid Midi Kit (Qiagen) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.2.7 Reinheitskontrolle und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Reinheitskontrolle und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen wurde mit dem Spectrophotometer NanoDrop1000 (Thermo Scientific) und der zugehörigen Software nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wird die Absorption der Lösung bei den Wellenlängen 230, 260, 280 und 340 nm gegen Wasser als Referenz gemessen. Aus der Absorption bei 260 nm lässt sich die Nukleinsäurekonzentration in der Probe berechnen, wobei eine Absorption von 1 einer DNA Konzentration von 50 ng/μl entspricht. Die Absorption bei 280 nm wird durch Verunreinigungen mit Proteinen, Phenolen und anderen Substanzen, die bei oder in der Nähe von 280 nm absorbieren, verursacht. Die Absorption bei 230 nm spiegelt ebenfalls Verunreinigungen in der Probe wider. Als Basiswert dient die Absorption bei 340 nm, dieser Wert wird von allen anderen Messwerten abgezogen. Aus den Quotienten 260/280 und 260/230 lässt sich die Reinheit der Nukleinsäurelösung bestimmen, für reine DNA liegt der Quotient 260/280 über 1,8 und der Quotient 260/230 im Bereich von 1,8 – 2,2.

### 2.2.8 DNA Sequenzierung

Alle angefertigten Expressionskonstrukte wurden vor ihrer Verwendung auf die Richtigkeit ihrer Sequenz hin analysiert. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.*<sup>161</sup>.

Für die PCR zur Sequenzierung wurde der Big Dye Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems) verwendet, in dem die DNA Polymerase mit dem zugehörigen Puffer sowie dNTPs und ddNTPs enthalten sind. Hinzu kamen außerdem die Matrizen-DNA und der entsprechende Primer. Die PCR wurde in einem Thermocycler T3000 (Biometra) durchgeführt.

Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes:

Matrizen-DNA (300-500 ng)	1 $\mu$ l
Primer (5 pmol/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Big Dye Terminator Mix	3 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	14 $\mu$ l

Temperatur/Zeit Verlauf einer PCR zur Sequenzierung:

Denaturierung	96°C, 30 sec	
Denaturierung	96°C, 30 sec	} 25 Zyklen
Hybridisierung	50°C, 15 sec	
Synthese	60°C, 4 min	
Kühlung	4°C, $\infty$	

Nach der PCR folgte eine Ethanol-fällung der DNA. Die Sequenzanalyse wurde anschließend über Kapillarelektrophorese und Fluoreszenzanalyse in einem ABI PRISM 3700 Sequenzierer (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben durchgeführt.

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Anlegen eines *E. coli* Glycerolstocks

Zur langfristigen Lagerung von *E. coli* Zellen wurden diese während der frühen exponentiellen Phase ihres Wachstums ( $OD_{600} = 0,3-0,5$ ) aus einer Flüssigkultur entnommen, im Verhältnis 1:1 mit sterilem 80%igem Glycerol gemischt und in 2 ml Cryogefäßen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und gelagert.

### 2.3.2 Erzeugung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden nach der von Chung *et al.* beschriebenen Methode erzeugt<sup>162</sup>. Dazu wurden 5 ml LB-Medium mit *E. coli* Zellen eines Glycerolstocks angeimpft und ü.N. bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 160 rpm kultiviert. Enthielt der verwendete *E. coli* Stamm eine intrinsische Resistenz (z.B. Chloramphenicol bei Rosetta2(DE3)) wurde das LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum als Selektionsmarker versetzt. Aus dieser Kultur wurden 100 ml LB-Medium auf eine optische Zelldicht von  $OD_{600} = 0,05$  angeimpft und bei  $37^{\circ}\text{C}$  und

160 rpm bis zum Erreichen der frühen exponentiellen Phase ( $OD_{600} = 0,3-0,5$ ) angezogen. Im Anschluss folgte eine 20 minütige Inkubation auf Eis, bevor die Zellen bei  $6500 \times g$  für 5 min bei  $4^\circ C$  zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde in 10 ml steril filtriertem, eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 2 ml sterilem Glycerol wurden die Bakterien in 50  $\mu l$  Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ C$  gelagert. Vor der Verwendung wurde jede Charge auf ungewollte Resistenzen durch Kontamination getestet.

### 2.3.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und mit 1-10  $\mu l$  Plasmid-DNA gemischt. Nach einer Inkubation auf Eis für 30-60 min folgte ein Hitzeschock bei  $42^\circ C$  für 60 sec und eine rasche Abkühlung auf Eis für 2 min. Zur Regeneration der Zellen und Ausbildung der Plasmid-vermittelten Resistenz wurde dem Transformationsansatz neun Volumen steriles LB-Medium zugefügt und dieser bei  $37^\circ C$  und 160 rpm für 30-60 min inkubiert. Danach wurden die *E. coli* Zellen auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum als Selektionsmarker ausplattiert und bei  $37^\circ C$  ü.N. kultiviert.

### 2.3.4 Heterologe Expression in *E. coli* Bakterien

Die Expression von organismusfremden Genen in einem Organismus wird als heterologe Expression bezeichnet. Zur Herstellung von humanen Proteinen in *E. coli* Zellen wurden diese mit Plasmiden transformiert, welche die Exonsequenz (oder Teile davon) eines humanen Proteins unter der Kontrolle eines lac Repressor regulierten tac Promotors enthielten. Auf diese Weise wird der Beginn der Transkription kontrollierbar. Sie kann durch Zugabe von IPTG induziert werden. In dieser Arbeit wurden *E. coli* Zellen der Stämme BL21(DE3) oder Rosetta2(DE3) verwendet.

Für eine Anzucht im analytischen Maßstab (Expressionstest) wurden 100 ml TB-Medium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben auf eine optische Zelldichte von  $OD_{600} = 0,05$  angeimpft. Das als Selektionsmarker eingesetzte Antibiotikum richtete sich nach dem verwendeten Vektor und dem Zellstamm. Die Konzentrationen der eingesetzten Antibiotika betragen für Ampicillin  $100-150 \mu g \cdot ml^{-1}$  und für Chloramphenicol  $34 \mu g \cdot ml^{-1}$ . Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer optischen Zelldichte von  $OD_{600} = 0,4-0,6$  in einem Schüttelinkubator bei 160 rpm kultiviert. Um möglichst optimale Bedingungen für die heterologe Expression und die Produktion des rekombinanten Proteins zu finden, wurden für

jedes Konstrukt verschiedene Temperaturen (25-37°C) für die Anzucht der Zellen getestet, sowie Temperatur (20-37°C), Dauer (5h-ü.N.) und IPTG Menge (0,1-1,0 mM) für die Proteinproduktion variiert.

Zur Anzucht im präparativen Maßstab wurden 2,5 l TB-Medium mit  $150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Ampicillin als Selektionsmarker in einem 5 l Erlenmeyerkolben auf eine optische Zelldichte von  $\text{OD}_{600} = 0,05$  angeimpft. Die Zellen wurden bei 30°C in einem Schüttelinkubator bei 160 rpm bis zu einer optischen Zelldichte von  $\text{OD}_{600} = 1,0$  angezogen. Zum Start der heterologen Expression wurde dem Medium 0,1 mM IPTG zugesetzt und die Temperatur auf 20°C reduziert. Um eine hohe Proteinausbeute zu erzielen, wurden die Zellen ü.N. bei 20°C und 160 rpm schüttelnd kultiviert, bevor sie geerntet wurden. Zur Zellernte wurden die Zellen zentrifugiert (4000\*g, 10 min, 4°C). Das Zellpellet wurde in 100 ml kaltem Puffer (50 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl) resuspendiert und erneut zentrifugiert (4000\*g, 10 min, 4°C). Das Zellpellet wurde bei -80°C eingefroren und so bis zum Aufschluss gelagert.

## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Kultivierung von *D. discoideum* Zellen

*Dictyostelium discoideum* ist ein im Boden lebender einzelliger Organismus aus der Klasse der Schleimpilze. Dieser Einzeller kann sowohl adhärent in Zellkulturplatten als auch in Schüttelkultur (180 rpm) kultiviert werden. Zur Kultivierung wurde HL5c Medium verwendet, dem zum Schutz vor Bakterienkontamination 10 U/ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde. Sobald die adhärent wachsenden Zellen auf der Platte konfluent waren, wurden sie mit HL5c Medium zum größten Teil abgespült und die verbleibenden Zellen mit frischem Medium weiter kultiviert. In Flüssigkultur können die Zellen bis zu einer Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml kultiviert werden, bevor die Kultur geteilt werden muss. Dabei sollten die Zellen nicht unter eine Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml verdünnt werden.

### 2.4.2 Transformation und Selektion von *D. discoideum* Zellen

Die *D. discoideum* Zellen wurden mit der Methode der Elektroporation transformiert. Dazu wurden die Zellen zweimal in eiskaltem EP-Puffer gewaschen und anschließend in einer Zelldichte von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml in eiskaltem EP-Puffer resuspendiert. Für einen

Transformationsansatz wurden 20 µg Plasmid-DNA in eine vorgekühlte 1.5 ml EP-Küvette (Schichtdicke 0,4 cm, BioRad) vorgelegt und mit 800 µl der Zellsuspension gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurden die Zellen in einem Gene-Pulser (BioRad) bei 1,2 kV, 3 µFD und 600 Ω bei einer Zeitkonstanten von 0,5-0,7 ms elektroporiert. Nach der Elektroporation wurde der Ansatz in der EP-Küvette für 5 min auf Eis gekühlt, bevor die Zellen auf sechs Zellkulturplatten (Ø = 10 cm) mit jeweils 10 ml HL5c Medium verteilt wurden. Nach 24 h wurde das Medium durch frisches ersetzt, dem zur Selektion der erfolgreich transformierten Zellen der Selektionsmarker G418 in drei verschiedenen Konzentrationen (10, 15 und 20 µg/ml) zugesetzt wurde. Ab diesem Zeitpunkt wurde das G418-haltige Medium alle zwei Tage gewechselt, bis aus den Einzelklonen Kolonien wuchsen. Die Kolonien wurden einzeln mit einer Pipette von der Platte in die Vertiefung einer 24-Loch Zellkulturplatte überführt. Jede dieser Vertiefungen war mit 0.5 ml G418-haltigem Medium befüllt. Waren die Zellen in der Vertiefung konfluent, wurden sie auf Zellkulturplatten (Ø = 10 cm) mit 10 ml G418-haltigem Medium umgesetzt und weiter kultiviert, um ihre heterologe Expression in einer analytischen Proteinaufreinigung zu untersuchen.

#### **2.4.3 Cryokonservierung von *D. discoideum* Zellen**

Zur Cryokonservierung von *D. discoideum* Zellen wurden die Zellen mit einer Dichte von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml in frischem HL5c Medium (+ 10 % DMSO, steril) resuspendiert. Danach wurden die Zellen in 1 ml Aliquots in 2 ml Cryogefäßen mit einer speziellen Isopropanol befüllten Einfrierbox (5100 Cryo 1°C Freezing Container "Mr. Frosty", Nalgene) bei -80°C eingefroren. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese bei 37°C aufgetaut und auf einer Zellkulturplatte (Ø = 10 cm) mit 10 ml HL5c Medium ausplattiert.

#### **2.4.4 Kultivierung von *S. frugiperda* Zellen**

Bei den verwendeten Sf-21 Zellen (IPLB-SF-21-AE) handelt es sich um Ovarienzellen der Nachtfalterart *Spodoptera frugiperda*<sup>163</sup>. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät und entweder adhärent in 10 cm Zellkulturschalen mit 10 ml Nährmedium oder als Suspensionskultur bei 120 rpm in Fernbachkolben unter sterilen Bedingungen bei 27°C kultiviert. Als Nährmedium wurde steril filtriertes TC-100 Medium (Invitrogen) mit 10 % fötalem Rinderserum (Gibco) und 1 % Pluronic F-68 (Invitrogen)

eingesetzt. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen passagiert. Dabei wurden sie im Verhältnis 1:3 bis 1:4 geteilt und mit frischem Medium neu ausgesät.

#### **2.4.5 Transfektion von *S. frugiperda* Zellen**

Zur heterologen Expression in Sf-21 Zellen wurde das Bac-to-Bac Baculovirus Expressionssystem (Invitrogen) verwendet. Dabei wird mit Hilfe von *E. coli* DH10Bac Zellen das Zielgen aus dem Donorvektor in die Bacmid DNA transponiert. Als Donorvektoren dienten Plasmide der pFastBac-HT Serie (Invitrogen). Die rekombinante Bacmid DNA wurde anschließend isoliert und über Liposomen-vermittelte Transfektion unter Verwendung von Cellfectin (Invitrogen) in die Insektenzellen eingebracht. Dazu wurden 5 µl Bacmid DNA und 6 µl Cellfectin in 200 µl serumfreiem TC-100 Medium gemischt und für 30 min bei RT inkubiert, bevor weitere 800 µl serumfreies TC-100 Medium zugegeben wurden. Mit dieser Lipid-DNA Suspension wurden  $1 \times 10^6$  adhärenente Zellen in der Vertiefung einer 6-Loch Zellkulturplatte transfiziert. Die Zellen wurden für 5 h bei 27°C mit dem Transfektionsansatz inkubiert, bevor das Medium gewechselt und auf normales Nährmedium umgestellt wurde.

## **2.5 Biochemische Methoden**

### **2.5.1 Aufschluss von *E. coli* Zellen**

Die aus der heterologen Expression stammenden *E. coli* Zellpellets wurden bei RT aufgetaut und in kaltem Puffer resuspendiert. Die Wahl der Pufferbedingungen war dabei abhängig vom jeweiligen Protein. Für den Aufschluss des hNalp1(791-990) wurde der Protein-Puffer A verwendet. Zur Unterstützung des nachfolgenden mechanischen Zellaufschlusses durch Ultraschall mit dem Sonifier Cell Disruptor (Branson Sonic Power Co.) wurde der Suspension zusätzlich 1 % NP40 Detergenz zugesetzt. Als Protease-Inhibitor wurde außerdem 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) zugegeben. Das Aufschlussvolumen betrug pro Pellet einer 100 ml Kultur 5 ml (Zellaufschluss im analytischen Maßstab), pro Pellet einer 2,5 l Kultur 100 ml (Zellaufschluss im präparativen Maßstab). Nach dem mechanischen Zellaufschluss wurde das Gesamtlysat bei 30000-90000\*g für 30-60 min bei 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile abzutrennen. Die Überstände der Zellaufschlüsse im analytischen Maßstab wurden zur Überprüfung der heterologen

Expression mit SDS-PAGE untersucht, die Überstände der Zellaufschlüsse im präparativen Maßstab wurden für die Proteinaufreinigung über Affinitätschromatographie verwendet.

### 2.5.2 Proteinaufreinigung aus *D. discoideum* Zellen im analytischen Maßstab

Die *D. discoideum* Zellen einer konfluenten Zellkulturplatte ( $\varnothing = 10$  cm) wurden auf der Platte einmal mit 5 ml Bonner's Lösung gewaschen und dann mit 1 ml Bonner's Lösung von der Platte abgespült und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 1000\*g für 5 min bei RT wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 600  $\mu$ l Lyse-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 600  $\mu$ l Lyse-Puffer mit 1% Triton X-100 und 12  $\mu$ l 100x Protease-Inhibitoren-Mix (s.u.) wurden die Zellen für 30 min auf Eis lysiert. Danach wurde das Lysat bei 12000\*g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 60  $\mu$ l Extraktionspuffer mit 10 mM ATP mit Hilfe eines Mikropistills homogenisiert. Die Suspension wurde ein weiteres Mal bei 12000\*g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels SDS-PAGE auf das Vorhandensein des rekombinanten Proteins hin analysiert.

#### 100x Protease-Inhibitoren-Mix Vorratslösung

N $\alpha$ -p-Tosyl-L-Argininmethylester (TAME)	10 mg/ml
N $\alpha$ -p-Tosyl-L-phenylalaninchloromethylketon (TPCK)	8 mg/ml
Pepstatin A	0,2 mg/ml
Leupeptin	0,5 mg/ml
in Ethanol (100 %, p.a.) lösen und bei -20°C lagern	

### 2.5.3 Proteinaufreinigung aus *S. frugiperda* Zellen im analytischen Maßstab

Die Sf-21 Zellen einer Zellkulturplatte ( $\varnothing = 10$  cm) wurden mit dem Medium von der Platte abgenommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation bei 800\*g wurden die Zellen pelletiert. Der virushaltige Überstand wurde für die Infektion neuer Zellen bei 4°C aufbewahrt, das Zellpellet wurde in 2 ml PBS resuspendiert und in einem 2 ml Reaktionsgefäß erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl) resuspendiert. Durch Ultraschall mit dem Sonifier Cell Disruptor (Branson Sonic Power Co.) wurden die Zellen aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei 12000\*g für 20 min bei 4°C wurden die unlöslichen Bestandteile des Lysats von den löslichen getrennt. Eine Mini Spin Säule (Qiagen) wurde mit 300  $\mu$ l Ni-NTA



Superflow (Qiagen) beladen und vier Mal mit jeweils 500 µl Wasch-Puffer (50 mM HEPES (ph 7,5), 300 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) durch Zentrifugation bei 400\*g für 15 s bei RT equilibriert. Der Durchlauf wurde dabei jedes Mal verworfen. Der Überstand des Zellysats wurde auf die equilibrierten Säulen pipettiert. Durch Zentrifugation bei 400\*g für 15 s bei RT wurde das Lysat insgesamt drei Mal über die Ni-NTA Matrix geleitet. Danach wurde die Säule auf die gleiche Weise zehn Mal mit jeweils 500 µl Wasch-Puffer gespült. Zur Elution des gebundenen Proteins wurde dem Wasch-Puffer 300 mM Imidazol zugesetzt und das Protein mit zwei Mal 100 µl dieses Puffers von der Säule gewaschen.

Von allen Zwischenschritten wurden Proben genommen, 1:1 mit 5x Protein-Probenpuffer gemischt und mit Hilfe der SDS-PAGE auf das Vorhandensein des rekombinanten Proteins hin analysiert.

#### **2.5.4 Affinitätschromatographie**

Um das rekombinant hergestellte hNalp1-LRR aus dem Zellysats zu isolieren, enthielt es einen durch den verwendeten Plasmidvektor codierten Fusionsanteil, um die Bindung an eine stationäre Phase über einen spezifischen Liganden zu ermöglichen. Bei dem verwendeten Fusionsanteil handelte es sich um das Enzym Glutathion-S-Transferase. Als stationäre Phase diente eine Glutathion-gekoppelte Sepharose®-Matrix (GE Healthcare)<sup>164</sup>, die in Säulenform eingesetzt und über eine Peristaltikpumpe (Pharmacia LKB Pump P-1, Pharmacia) betrieben wurde. Für die Aufreinigung wurde die Säule mit fünf Säulenvolumen Protein-Puffer A equilibriert, bevor der nach dem Zellaufschluss erhaltene Zentrifugationsüberstand (2.5.1) mit einer Geschwindigkeit von 1 – 5 ml·min<sup>-1</sup> über die Säulenmatrix geleitet wurde. Anschließend wurde die Matrix mit mindestens zehn Säulenvolumen Protein-Puffer A gespült, um alle nicht bindenden Bestandteile zu entfernen. Danach folgte der Wechsel auf den Protein-Puffer B durch Waschen mit drei Säulenvolumen. Zur Elution von hNalp1-LRR von der Säulenmatrix wurde dem Protein-Puffer B 30 mM reduziertes Glutathion zugesetzt. Eluiert wurde in Fraktionen von 2 – 4 ml, wobei die proteinhaltigen Fraktionen am Ende vereinigt wurden.

#### **2.5.5 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde das Verfahren der Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger & von Jagow verwendet<sup>165</sup>. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und zusammen mit einem Proteinstandard (Precision

Plus Protein Standard Unstained, Bio-Rad) in die einzelnen Geltaschen pipettiert. Für die Gelelektrophorese wurde das Mini Protean II System (Bio-Rad) verwendet, wobei je nach Trennbedarf Trenngele mit einem Acrylamidanteil zwischen 8 – 14 % eingesetzt wurden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 50 – 60 mA, bis das Farbband des Ladepuffers das gesamte Gel durchlaufen hatte. Nach Beendigung des Laufs wurde das Polyacrylamidgel in einer heißen Coomassie-Färbelösung für 15 min eingefärbt. Zum Entfärben des Gels wurde destilliertes Wasser benutzt.

### 2.5.6 TEV Protease Spaltung des Fusionsproteins

Das Fusionsprotein GST-hNalp1(791-990) enthielt zwischen dem GST-Fusionsanteil und dem hNalp1(791-990) eine Erkennungssequenz für das Nuclear Inclusion a (NIa) Protein des Tobacco Etch Virus (TEV). Dadurch war es möglich, den Fusionsanteil durch Zugabe der 27 kDa schweren katalytischen Domäne des NIa Proteins (auch als TEV Protease bezeichnet) abzuspalten. Für diese Reaktion wurden 50 µg TEV Protease auf 1 mg Fusionsprotein eingesetzt. Die Hydrolyse erfolgte bei 4°C ü.N.

### 2.5.7 Ionenaustauschchromatographie

Um das abgespaltene GST vom hNalp1-LRR abzutrennen, wurde die Ionenaustauschchromatographie eingesetzt. Die im Puffer B vorliegenden Proteine wurden dazu auf eine 1 ml HiTrap SP Säule (GE Healthcare) aufgetragen, die über eine ÄKTA-Prime FPLC (*fast protein liquid chromatography*) (GE Healthcare) betrieben wurde. Nach dem Beladen wurde die Säule mit Puffer B gespült, bis im Durchfluss kein Protein mehr detektiert werden konnte. Zur Elution wurde ein kontinuierlicher NaCl-Gradient (0,1-1,0 M NaCl über 10-20 Säulenvolumen) verwendet und das Eluat in Fraktionen von 0,5 ml gesammelt. Um im gleichen Schritt auch die TEV-Protease abzutrennen, wurde direkt hinter die 1 ml SP-Säule eine 1 ml HisTrap Säule (GE Healthcare) geschaltet, welche die mit einem His<sub>6</sub>-Fusionsanteil versehene TEV-Protease zurückhielt, aber vom hNalp1-LRR ungehindert passiert werden konnte.

## 2.6 Biophysikalische Methoden

### 2.6.1 Ultrafiltration von Proteinen

Um die Proteinkonzentration von hNalp1-LRR zu erhöhen, wurde das Puffervolumen durch Ultrafiltration eingeengt. Dazu wurden Amicon Ultra Centrifugal Filter Units (Millipore) mit einer Porengrößen von 10 kDa verwendet. Durch Zentrifugation bei 1500\*g bei 4°C in Intervallen von 5-20 min konnte die Proteinkonzentration bis auf 15 mg·ml<sup>-1</sup> erhöht werden.

### 2.6.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Proteinkonzentration in Lösung wurde durch zwei verschiedene Methoden bestimmt. Zum einen kam die Methode von Bradford zum Einsatz<sup>166-167</sup>. Zur Messung wurde 1 ml Bradford-Reagenz (Bio-Rad) mit 1-20 µl Proteinlösung in einer Kunststoffküvette (Sarstedt) gemischt und die Absorption bei der Wellenlänge  $\lambda = 595$  nm in einem Photometer (Eppendorf) gemessen. Zur Bestimmung der Konzentration diente eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA).

Als zweite Methode wurde die UV-Absorption der Proteinlösungen bei 280 nm in einem Spectrophotometer NanoDrop1000 (Thermo Scientific) gemessen. Bei dieser von Gill und von Hippel entwickelten Methode wird der Extinktionskoeffizient des Proteins aus seiner Aminosäuresequenz bestimmt<sup>168-169</sup>. Anschließend kann mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes die Konzentration des Proteins in der Lösung berechnet werden.

Lambert-Beer-Gesetz:  $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$  mit E: Extinktion  
 $\varepsilon$  : Extinktionskoeffizient  
c : Konzentration  
d : Schichtdicke

### 2.6.3 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie wurde aus zwei Gründen eingesetzt. Zum einen sollte eine zusätzliche Reinigung von hNalp1-LRR durch Abtrennung von fremden Proteinen oder ungeschnittenem Fusionsprotein erreicht werden. Zum anderen diente sie dazu, hNalp1-LRR in einen Puffer definierter Zusammensetzung zu überführen.

Für die Größenausschlusschromatographie wurden Matrices und Säulen der Firma GE Healthcare verwendet, die über unterschiedliche Trennleistungen und Kapazitäten verfügten und über eine Äkta Prime FPLC (GE Healthcare) betrieben wurden.

Verwendete Säulen und Matrices:      HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 prep grade  
HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 prep grade  
HiLoad™ 26/60 Superdex™ 75 prep grade  
HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade

#### 2.6.4 Dynamische Lichtstreuung

Bei der dynamischen Lichtstreuung (DLS) wird mit einem Laser polarisiertes, monochromatisches Licht durch eine Probe geleitet und dann die Zeit-abhängige Fluktuation der Streulichtintensität mit Hilfe eines Photonenzählers gemessen. Über eine Autokorrelationsfunktion errechnet sich daraus der Diffusionskoeffizient der gelösten Teilchen, mit dem dann über die Stokes-Einstein Gleichung der hydrodynamische Radius ( $R_h$ ) bestimmt werden kann.

Stokes-Einstein Gleichung:  $R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$       mit       $k_B$ : Boltzmann-Konstante  
T: Temperatur in Kelvin  
 $\eta$  : Viskosität des Lösungsmittels  
D: Diffusionskoeffizient

Durch die DLS lassen sich außerdem Aussagen über Polydispersität und Aggregation von Molekülen in Lösung ableiten, wichtige Kriterien für die Kristallisation von Proteinen<sup>170</sup>. Um das Protein hNalp1-LRR auf Aggregation und den Grad der Polydispersität hin zu untersuchen, wurden 20  $\mu\text{l}$  Proteinlösung mit einer Proteinkonzentration von 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  in einer speziellen Quarzglaszuvette (Wyatt Technologies) in einem DLS Gerät DynaPro (Wyatt Technologies) bei 4°C untersucht. Dabei wurden jeweils zehn Akquisitionen zu einer Messung zusammengefasst. Insgesamt wurden fünf Messungen gemacht. Für die Auswertung der Daten wurde die zugehörige Software DYNAMICS 6.7.7.9 (Wyatt Technologies) verwendet.

### 2.6.5 Isothermale Titrationskalorimetrie

Mit der Isothermalen Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry*, ITC) lassen sich chemische und biochemische Reaktionen, wie z.B. die Bildung eines Komplexes, auf Basis ihrer Thermodynamik quantitativ charakterisieren. Bei dieser Methode wird die Enthalpieänderung ( $\Delta H$ ) des Systems direkt gemessen, woraus sich dann die Entropieänderung und die Wärmekapazität ableiten lassen<sup>171</sup>. Aus Enthalpie- und Entropieänderung wiederum lassen sich Rückschlüsse auf die molekularen Grundlagen der Interaktion ziehen<sup>172</sup>. Aus den erhaltenen kalorimetrischen Titrationsdaten lassen sich zudem Aussagen über die stöchiometrische Zusammensetzung des Komplexes treffen<sup>173</sup>.

In dieser Arbeit wurde die ITC eingesetzt, um eine mögliche Interaktion zwischen hNalp1-LRR und MDP zu charakterisieren. Die ITC Messungen wurden mit den Geräten VP-ITC bzw. ITC<sub>200</sub> (MicroCal) unter Verwendung der zugehörigen Software (MicroCal) durchgeführt. Das verwendete MDP wurde von der Firma Invivogen bezogen.

In die Probenzelle wurde einer der beiden Bindungspartner vorgelegt. Über die Spritze des Injektionsaufsatzes wurde dann kontrolliert der zweite Bindungspartner des Komplexes in die Probenzelle titriert. Kommt es zu einer Komplexbildung, wird entweder Wärme an die Umgebung freigesetzt (exotherme Reaktion), oder es wird ihr Wärme entzogen (endotherme Reaktion). Auf diese Änderung der Temperatur reagiert das Gerät automatisch durch Anpassung der Heizleistung an der Probenzelle, um dessen Temperatur mit der der Referenzzelle konstant zu halten. Für die Messung wurde die Referenzzelle mit destilliertem Wasser gefüllt.

In der Auswertung mit dem Programm Origin7 (OriginLab Corporation) kann aus der gemessenen Heizleistung die freigesetzte oder aufgenommene Wärmemenge berechnet werden und gegen das steigende Verhältnis der beiden Bindungspartner aufgetragen werden. Aus diesen Daten lassen sich dann Aussagen über die Bindungskonstante  $K$  des Komplexes, die Bildungsenthalpie  $\Delta H$ , die Änderung der Entropie  $\Delta S$  und die stöchiometrische Zusammensetzung des Komplexes machen.

### 2.6.6 Fern-UV CD-Spektroskopie

Linear polarisiertes Licht kann als Zusammensetzung zweier gegenläufiger zirkular polarisierter elektromagnetischer Wellen gleicher Amplitude und Phase angesehen werden. Trifft linear polarisiertes Licht auf ein Molekül, das unterschiedliche Extinktionskoeffizienten

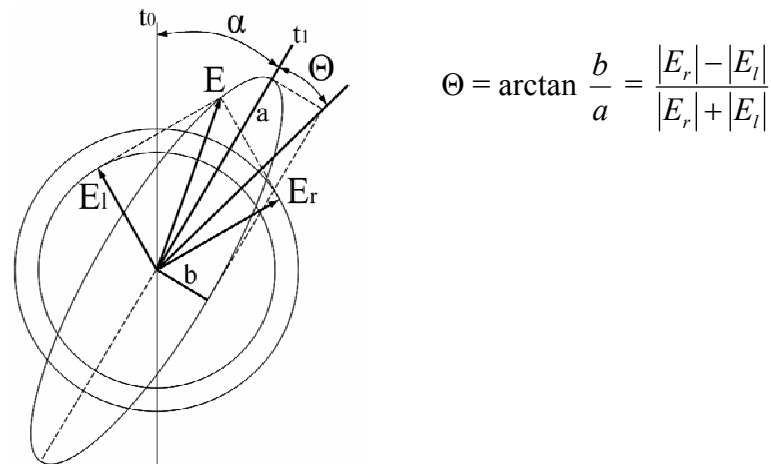


Abbildung 2.1: Circular dichroismus (CD) und Elliptizität  $\Theta$ .

Addition der elektrischen Feldvektoren  $E_l$  und  $E_r$  nach dem Durchgang durch ein optisch aktives Medium ( $c_l < c_r$ ). Der Unterschied in der Absorption von links- und rechts-polarisiertem Licht wird als Circular dichroismus bezeichnet.

für rechts- und links-polarisiertes Licht besitzt, werden beide Komponenten unterschiedlich stark absorbiert. Moleküle mit dieser Eigenschaft bezeichnet man als optisch aktiv (chiral). Den Unterschied in der Absorption von rechts- und links-polarisiertem Licht nennt man Circular dichroismus (CD). Als Ergebnis erhält man elliptisch polarisiertes Licht. Die Elliptizität  $\Theta$  ist dabei definiert als Arkustangens des Verhältnisses von kleiner zu großer Halbachse der Polarisationsellipse (Abbildung 2.1).

Proteine sind optisch aktive (chirale) Moleküle. Ihre Sekundärstrukturelemente weisen spezifische Absorptionsmuster auf und tragen so charakteristische Anteile zu einem CD-Spektrum bei. Auf diese Weise lassen sich aus dem CD-Spektrum eines Proteins und dem Vergleich mit Spektren von Proteinen bekannter Struktur Aussagen über die Anteile seiner Sekundärstrukturelemente treffen<sup>174</sup>.

In dieser Arbeit wurden CD-Spektren von hNalp1-LRR alleine und in Gegenwart von MDP aufgenommen und Untersuchungen zur Thermostabilität durchgeführt. Dazu wurde hNalp1-LRR in CD-Puffer auf eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  verdünnt. Bei Ansätzen mit MDP betrug die MDP Konzentration 50  $\mu\text{M}$ . Bei der Aufnahme der CD-Spektren wurde zwischen schnellem Scan (vor, während und nach einer Thermostabilitätsmessung) und langsamem Scan unterschieden (Tabelle 2.2). Zur Auswertung wurde die gemessene Elliptizität  $\Theta$  gegen die Wellenlänge  $\lambda$  aufgetragen. Bei der Untersuchung der Thermostabilität wurde die Probe von 10°C auf 65°C mit einer Geschwindigkeit von 10°C/min aufgeheizt bzw. wieder abgekühlt. Dabei wurde im Abstand von 0,5°C bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 222 \text{ nm}$  die Elliptizität  $\Theta$  der Probe gemessen. Vor dem Aufheizen bei

10°C, nach dem Aufheizen bei 65°C und nach dem Abkühlen bei 10°C wurde jeweils ein CD-Spektrum der Probe in Form eines schnellen Scan aufgenommen (Tabelle 2.2). Alle Messungen wurden in einem J-815 CD Spektrometer (Jasco) durchgeführt. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Messungen mit MDP (50 µM) in CD-Puffer und mit CD-Puffer alleine durchgeführt.

Tabelle 2.2: Parameter der als schneller und langsamer Scan aufgenommenen CD-Spektren.

Parameter	schneller Scan	langsamer Scan
Temperatur	10°C oder 65°C	10°C
Sensitivität	100 mdeg	100 mdeg
Start	250 nm	260 nm
Ende	190 nm	170 nm
Schrittweite	1 nm	0,5 nm
Scan Modus	Step	Step
Resonanz	0,5 s	1 s
Bandweite	1 nm	1 nm
Spaltweite	1 nm	1 nm
Akkumulierung	5	15

## 2.6.7 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie wurde eingesetzt um eine mögliche Bindung des MDP an hNalp1-LRR nachzuweisen. Dabei wurden sowohl intrinsische als auch extrinsische Fluorophore genutzt (Tabelle 2.3). Als intrinsische Fluorophore dienten die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Als extrinsischer Fluorophor wurde das Fluoresceinisothiocyanat (FITC) verwendet, welches über ein 6-Aminohexansäure Zwischenstück an die C6-Position der Muramylsäure des Muramyl-dipeptid (MDP) gekoppelt war (Abbildung 2.2). Durch die 6-Aminohexansäure zwischen Molekül und Fluorophor sollten sterische Hinderungen bei einer Wechselwirkung mit der hNalp1-LRR ausgeschlossen werden. Sowohl das FITC markierte MDP als auch das unmarkierte MDP wurden von der Firma Invivogen bezogen.

Tabelle 2.3: Charakteristika der verwendeten Fluorophore.

Fluorophor	Absorptions- maximum $\lambda_A^{\max}$ [nm]	Absorptions- koeffizient $\epsilon(\lambda_A^{\max})$ [l · mol <sup>-1</sup> · cm <sup>-1</sup> ]	Emissions- maximum $\lambda_F^{\max}$ [nm]	Fluoreszenz- lebenszeit $\tau_F$ [ns]
Tryptophan	280	5600	348	1-8
Tyrosin	274	1400	303	1-8
Phenylalanin	257	200	282	1-8
FITC	495	73000	512	4

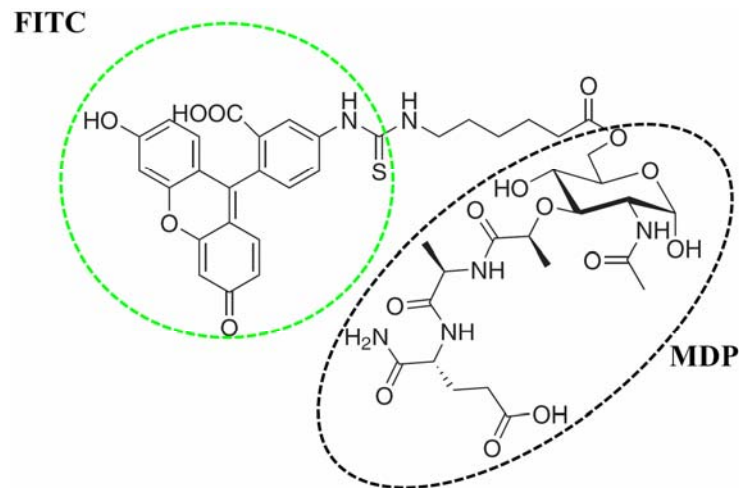


Abbildung 2.2: Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertes MDP. Das Fluorophor FITC ist über ein 6-Aminohexansäure Zwischenstück an die C6-Position der Muramylsäure des MDP gekoppelt (Invivogen).

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen hNalp1-LRR und MDP wurde eine Gleichgewichtstitration durchgeführt. Im Idealfall lässt sich über dieses Verfahren die Dissoziationsgleichgewichtskonstante ( $K_D$ ) des Komplexes bestimmen. Hierzu wird der Fluorophor tragende Bindungspartner in einer bestimmten Konzentration vorgelegt und der Interaktionspartner in steigender Konzentration hinzu titriert. Kommt es bei einer Bindung zu einer Änderung der chemischen Umgebung des Fluorophors, hat dies einen Anstieg oder Abfall der Fluoreszenzintensität zur Folge. Diese Änderung der Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Bindung. Die Titration wird solange fortgesetzt, bis das Fluoreszenzsignal sich nicht mehr ändert, was dem Erreichen der Sättigung der Bindung entspricht. Kommt es bei der Messung zu keiner Fluoreszenzänderung, kann dies zwei Ursachen haben. Zum einen kann keine Bindung vorliegen, zum anderen kann es trotz Bindung zu keiner Änderung der chemischen Umgebung des Fluorophors kommen.

Mit dem FITC-MDP wurden außerdem Fluoreszenzpolarisationsmessungen durchgeführt. Bei dieser speziellen Form der Fluoreszenzspektroskopie erfolgt die Anregung des Fluorophors mit linear polarisiertem Licht, weshalb auch das bei der nachfolgenden Emission emittierte Licht polarisiert ist. Die Intensität der von dem Fluorophor erzeugten Fluoreszenzpolarisation wird gemessen. Das Polarisationssignal ist abhängig von der Viskosität des Lösungsmittels, der Fluoreszenzlebenszeit und dem Maß der Rotationsdiffusion (Diffusionskoeffizient) des fluoreszierenden Moleküls. Bei konstanter Lösungsmittelviskosität erzeugen kleine Moleküle aufgrund ihres höheren Freiheitsgrades und ihrer schnelleren Eigenrotation ein kleineres Polarisationssignal als große Moleküle. Dies



bedeutet für die Interaktion von hNalp1-LRR und FITC-MDP, dass bei einer Bindung der beiden Moleküle das FITC-MDP in seiner Rotationsfreiheit eingeschränkt würde und deshalb ein stärkeres Polarisationsignal als im freien, ungebundenen Zustand erzeugen würde.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenz- und Polarisationsmessungen wurden in einem Spektralfluorimeter FluoroMax (HORIBA Scientific) bei 20°C in entgastem und steril filtriertem Puffer durchgeführt. Für die Polarisationsmessungen wurde das Anregungslicht mit Hilfe eines Polarisators linear polarisiert, bevor es auf die Probe traf. Das fluoreszierende Molekül wurde vorgelegt und der Bindungspartner hinzu titriert. Zwischen den einzelnen Titrationsschritten wurde bis zur Stabilisierung des Fluoreszenzsignals gewartet (Erreichen des Gleichgewichts). Die Anregungswellenlänge beim Einsatz der intrinsischen Fluorophore (aromatische Aminosäuren) war 280 nm und die Emission wurde über einen Wellenlängenbereich von 300 – 440 nm gemessen. Die Anregung des FITC erfolgte bei einer Wellenlänge von 495 nm (laut Hersteller Invivogen). Die Intensität der Fluoreszenz (-polarisation) wurde bei einer Wellenlänge von 512 nm gemessen, wobei bei der Polarisationsmessung die vier Fluoreszenzintensitäten  $I_{VV}$ ,  $I_{VH}$ ,  $I_{HV}$  und  $I_{HH}$  jeweils über 2 Sekunden integriert wurden. Als Kontrolle diente in allen Fällen ein Ansatz, zu dem statt Bindungspartner nur reiner Puffer titriert wurde, um die Stabilität des Signals und evtl. Verdünnungseffekte beobachten und in der Auswertung berücksichtigen zu können.

## 2.7 Röntgenkristallographische Methoden

### 2.7.1 Kristallisation

Das Protein hNalp1-LRR wurde mit dem Verfahren der Dampfdiffusion aus einer konzentrierten Proteinlösung in einen übersättigten Zustand überführt, um es so zum Kristallisieren zu bringen. Dazu wurde sowohl die Methode des sitzenden als auch die des hängenden Tropfens verwendet<sup>175</sup>.

Bei der Methode des sitzenden Tropfens wurde in die große Vertiefung jeder Einheit einer 96-Einheiten Platte (3553 oder 3551, Corning) 50 µl Reservoirlösung aus einem kommerziell erhältlichen Pufferlösungssatz (Qiagen) verteilt. In die kleinen Vertiefungen jeder Einheit wurden 100 nl konzentrierte Proteinlösung (5, 10 oder 15 mg·ml<sup>-1</sup>) vorgelegt und mit 100 nl Reservoirlösung der jeweiligen Einheit gemischt. Die Lösungen wurden mit einem Pipettierroboter (Mosquito, TTP Labtech) bei Raumtemperatur auf der Platte abgesetzt.

Anschließend wurden die Platten mit einer durchsichtigen Folie luftdicht versiegelt und in einem Rock Imager 1000 (Formulatrix) bei 20 oder 4°C inkubiert, wobei eine automatische, regelmäßige, optische Erfassung jedes Tropfens mit dem Programm Rock Maker 2.0 (Formulatrix) stattfand.

Bei der Methode des hängenden Tropfens wurden 700 µl Reservoirlösung in die Vertiefung einer 24-Loch VDX-Platte (Hampton) vorgelegt. Danach wurden 1,5 µl konzentrierte Proteinlösung mit 1,5 µl der Reservoirlösung auf einem Deckglas (Durchmesser 21 mm) gemischt und dieses dann umgedreht (hängender Tropfen) auf die Vertiefung gelegt. Zuvor war der Rand der Vertiefung mit Siliconpaste (Baysoline mittelviskos, Bayer) bestrichen worden, um einen luftdichten Verschluss zu gewährleisten. Die Ansätze wurden bei 20°C oder 4°C inkubiert und täglich auf Kristallwachstum hin überprüft.

### 2.7.2 Einfrieren von Kristallen

Beim Einfrieren von Kristallen aus biologischen Makromolekülen muss die Entstehung von kristallinem Eis im Kristallwasser und der umgebenden Lösung verhindert werden, weil dieses den Kristall beschädigt. Aus diesem Grund werden Proteinkristalle in einer Kryolösung eingefroren, die ein Frostschutzmittel (z.B. Glycerol, Ethylenglycol, Xylitol) enthält, um ein glasartiges Gefrieren von Kristallwasser und Lösung zu erreichen<sup>176</sup>.

Im Fall der hNalp1-LRR bestand die Kryolösung aus der Reservoirlösung mit 30 % Glycerol. Zum Einfrieren wurde ein einzelner Kristall mit Hilfe einer kleinen Nylon-Schleufe (*Mounted CryoLoop*, Hampton) aus dem Tropfen in 10 µl Kryolösung überführt. Nach einer Minute Inkubation wurde der Kristall erneut in die Nylon-Schleufe aufgenommen, mit ihr in einem speziellen Aufbewahrungscontainer (*CrystalCap Magnetic*, Hampton) in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Stickstoffbehälter bis zur Messung aufbewahrt.

Die ausreichenden Frostschutzeigenschaften der Kryolösung wurden durch Beugungstests unter kryogenen Bedingungen im Stickstoffstrom bei 100 K an einem Drehanodenröntgengenerator mit einer FR591 Cu-K $\alpha$ -Anode ( $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ ) (Bruker AXS Nonius) in Verbindung mit einem MAR345 *Image Plate Detector System* (Marresearch GmbH) überprüft.

### 2.7.3 Datensammlung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Beugungsdaten wurden mit gefrorenen Kristallen unter kryogenen Bedingungen in einem kontinuierlichen Stickstoffstrom bei 100 K aufgenommen. Die tiefe Temperatur verringert das Entstehen von Strahlenschäden im Kristall während der Messung<sup>177</sup>. Gemessen wurde an der Swiss Light Source (beamline X06SA, Villingen, Schweiz) mit einem Mar225 Detektor und monochromatischer Synchrotronstrahlung bei einer Wellenlänge von 1.000 Å im Drehkristallverfahren<sup>178</sup>.

### 2.7.4 Datenauswertung

Die atomare Zusammensetzung der Moleküle in der Einheitszelle des Kristalls bestimmt die gebeugte Intensität eines Reflexes auf der Beugungsaufnahme. Dabei ist die Intensität  $I(hkl)$  eines Reflexes mit den Miller-Indizes  $hkl$  proportional zum Quadrat der Amplitude des komplexen Strukturfaktors  $F(hkl)$ <sup>179</sup>. Jedem Reflex müssen zuerst die korrekten Miller-Indizes entsprechend der beugenden Netzebenenschar zugeordnet werden, bevor aus den gemessenen Beugungsmustern die Strukturfaktoramplituden  $F(hkl)$  bestimmt werden können. Dabei ergeben sich die korrekten Miller-Indizes und die Lage eines Reflexes auf der Detektorebene aus den genauen geometrischen Parametern des Beugungsexperimentes. Zu diesen Parametern zählen die Wellenlänge des einfallenden Röntgenstrahls, der Abstand zwischen Kristall und Detektorebene, die Größe des Drehbereichs während der Beugungsaufnahme, sowie die Kantenvektoren der Einheitszelle und die Orientierung des Kristalls relativ zum Detektor und zum einfallenden Strahl, die aus den Beugungsaufnahmen bestimmt werden. An jedem Beugungsort wird eine Integrationsmaske angelegt, die Reflexform und lokale Untergrundstreuung berücksichtigt, um die Intensitäten der einzelnen Reflexe bestimmen zu können. Die Intensitätswerte aller zum Reflex gezählten Pixel werden summiert und dem entsprechenden Zahletripel  $hkl$  als integrierte Intensität zugeordnet. Diese integrierten Intensitäten werden um Absorptions- und Polarisierungseffekte und um den Lorentz-Faktor korrigiert<sup>179</sup>. Anschließend werden sie zusammen mit den zugehörigen Miller-Indizes und der Standardabweichung der integrierten Intensitäten vom lokalen Untergrund in eine Datei geschrieben. Die Reflexintensitäten müssen auf ein gemeinsames Intensitätsniveau skaliert werden, bevor die Rohdaten zur Berechnung der Strukturfaktoramplituden weiter verwendet werden können. Dazu werden die in jedem Datensatz vorhandenen, symmetrie-äquivalenten Reflexe genutzt. Theoretisch sollten die Intensitäten dieser Reflexe gleich sein. Aber Schwankungen in den Strahlbedingungen,

veränderte Kristallorientierung, unterschiedlich starke Absorptionseffekte unter verschiedenen Beugungswinkeln usw. führen in der Praxis zu Abweichungen zwischen den Intensitäten symmetrie-äquivalenter Reflexe. Diese Abweichungen werden zur Berechnung des  $R_{\text{sym}}$ -Werts verwendet, der als Maß für die Güte der gemessenen Beugungsdaten genommen werden kann:

$$R_{\text{sym}} = \frac{\sum \sum | \langle I(hkl)_i \rangle - I(hkl)_i |}{\sum \sum I(hkl)_i}$$

(Es wird über alle symmetrie-äquivalenten Reflexe hkl und die Anzahl i (von 1 bis N) der äquivalenten Intensitätsmessungen summiert.  $I(hkl)_i$  ist die Intensität der i-ten Messung zu einem Reflex,  $\langle I(hkl)_i \rangle$  ist der Mittelwert der N äquivalenten Messungen)

Der  $R_{\text{sym}}$  hat eine implizite Abhängigkeit von der Multiplizität der Reflexe hkl. Ein alternatives Maß zur Bewertung der Datenqualität ist deshalb der angepasste  $R_{\text{sym}}$ , der als  $R_{\text{meas}}$  bezeichnet wird<sup>180</sup>. Beim  $R_{\text{meas}}$  wird die Unabhängigkeit von der Multiplizität durch Anpassen jedes Reflexbeitrages durch den Faktor  $\sqrt{n_h/(n_h - 1)}$  (wobei  $n_h$  die Multiplizität ist) erreicht.

$$R_{\text{meas}} = \frac{\sum \sqrt{\frac{n_h}{n_h - 1}} \sum | \langle I(hkl)_i \rangle - I(hkl)_i |}{\sum \sum I(hkl)_i}$$

Auf diese Weise sind die Beiträge der einzelnen Reflexe hkl entsprechend ihrer Multiplizität angemessen gewichtet. Die Größenordnung der skalierten Differenzterme  $\sqrt{n_h/(n_h - 1)} | \langle I(hkl)_i \rangle - I(hkl)_i |$  korreliert nicht mit der Multiplizität eines Reflexes, und  $R_{\text{meas}}$  Werte für Datensätze mit geringer Redundanz sind genauso hoch wie die für Datensätze mit hoher Redundanz<sup>180</sup>.

Bei allen Beugungsdaten von hNalp1-LRR wurde zur Bestimmung der Reflexintensitäten das Programm XDS<sup>181</sup> eingesetzt. Die Skalierung der Intensitäten wurde mit dem Programm XSCALE<sup>181</sup> durchgeführt. Zur Berechnung der Strukturaktoren aus den skalierten Intensitäten wurde das Programm XDSCONV<sup>181</sup> verwendet.

### 2.7.5 Lösung des Phasenproblems durch molekularen Ersatz

Mit einer Fourier-Transformation über die Strukturfaktoren  $\mathbf{F}(hkl)$  aus allen symmetrisch unabhängigen Reflexen lässt sich die Elektronendichteverteilung  $\rho(xyz)$  um die Atome in der Einheitszelle des Kristalls berechnen:

$$\begin{aligned}\rho(xyz) &= 1/V \sum \sum \sum \mathbf{F}(hkl) \cdot \exp(-2\pi i(hx+ky+lz)) \\ &= 1/V \sum \sum \sum F(hkl) \cdot \exp(i\alpha(hkl)) \cdot \exp(-2\pi i(hx+ky+lz))\end{aligned}$$

(Das Volumen  $V$  der Elementarzelle wird über  $h$ ,  $k$  und  $l$  von  $-\infty$  bis  $+\infty$  summiert. Im zweiten Schritt der Gleichung ist der komplexe Strukturfaktor  $\mathbf{F}(hkl)$  aufgelöst in das Produkt aus seiner Amplitude  $F(hkl)$  und dem zugehörigen Phasenterm  $\exp(i\alpha(hkl))$ .)

Im Gegensatz zu den Strukturfaktoramplituden  $F(hkl)$ , die sich aus den gemessenen Beugungsmustern bestimmen lassen (Kap. 2.7.4), ergeben sich die Phasenwinkel nicht direkt aus der Messung. Da diese Phasenwinkel aber zur Berechnung der Elektronendichteverteilung zwingend erforderlich sind, ergibt sich daraus das sog. Phasenproblem. In dieser Arbeit wurde das Phasenproblem durch die Methode des molekularen Ersatzes gelöst<sup>182</sup>. Der molekulare Ersatz kann dann angewandt werden, wenn bei der zu lösenden Struktur keine großen Unterschiede gegenüber einer bereits bekannten Struktur erwartet werden. Im Fall des hNalp1(791-990) wurde auf der Grundlage von Sequenzhomologien und Strukturvorhersagen eine hohe strukturelle Übereinstimmung mit der Struktur des humanen Ribonuklease-Inhibitors (hRI) angenommen. Aus diesem Grund wurde mit dem Programm MODELLER<sup>183</sup> und der Struktur des hRI (pdb id: 1z7x) ein Ausgangsmodell erstellt. Dieses Ausgangsmodell wurde mit dem Programm Phaser<sup>184</sup> aus dem CCP4 Programm Paket<sup>185</sup> in die Einheitszelle eingepasst. Mit Hilfe dieses eingepassten Modells wurden erste Phasenwinkel berechnet, die dann zusammen mit den gemessenen Strukturfaktoramplituden in die Fourier-Transformation eingingen. Um dabei abschätzen zu können, wie viele Moleküle sich in einer asymmetrischen Einheit befinden, wurde aus den Zellparametern der Einheitszelle der Matthews-Koeffizient  $V_M$  ermittelt<sup>186</sup>. Dazu dividiert man das Volumen ( $V$ ) der Einheitszelle durch die Anzahl an asymmetrischen Einheiten ( $n$ ) multipliziert mit der Masse ( $M$ ) des Moleküls in Dalton:

$$V_M = \frac{V}{n \cdot M}$$

Der Matthews-Koeffizient liegt für Proteinkristalle im Bereich von 1,6 - 3,5 Å<sup>3</sup>·Da<sup>-1</sup>. Bei nur einem angenommenen Molekül hNalp1-LRR (1 x 22763 Da) pro asymmetrischer Einheit ergibt sich für V<sub>M</sub> ein Wert von 2,97 Å<sup>3</sup>·Da<sup>-1</sup>, bei einem Solvensgehalt von 58,5 %. Geht man von zwei Molekülen (2 x 22763 Da) pro asymmetrischer Einheit aus, ergibt sich ein V<sub>M</sub>-Wert von 1,48 Å<sup>3</sup>·Da<sup>-1</sup>, bei einem Solvensgehalt von nur 17 %.

### 2.7.6 Erstellung und Verfeinerung des Strukturmodells

Aus den gemessenen Strukturfaktoramplituden und den durch molekularen Ersatz erhaltenen Phasenwinkeln konnte eine erste Elektronendichtekarte berechnet werden. Mit dieser Elektronendichtekarte war es möglich, ein erstes Strukturmodell von hNalp1-LRR anzufertigen. Dieses Strukturmodell wurde dann in einem rechnergestützten Verfahren mit den Programmen Refmac 5<sup>187</sup> und Coot<sup>188</sup> verfeinert.

Hierbei wurden, unter Berücksichtigung der Stereochemie, die thermischen und räumlichen Parameter aller Atome so verändert, dass sich die aus dem aktuellen Modell berechneten Strukturfaktoramplituden  $F_{\text{calc}}(hkl)$  den gemessenen Strukturfaktoramplituden  $F_{\text{obs}}(hkl)$  immer weiter annähern. Diese Optimierung wurde in Zyklen aus automatischer Verfeinerung und manueller Korrektur solange fortgesetzt, bis die bestmögliche Übereinstimmung zwischen den beiden Strukturfaktoramplituden  $F_{\text{calc}}(hkl)$  und  $F_{\text{obs}}(hkl)$  erreicht worden war. Als Maß für die Güte dieser Verfeinerung diente die Abweichung dieser Werte voneinander, die als kristallographischer R-Wert  $R_{\text{cryst}}$  bezeichnet wird:

$$R_{\text{cryst}} = \frac{\sum |F_{\text{obs}}(hkl) - F_{\text{calc}}(hkl)|}{\sum F_{\text{obs}}(hkl)} \times 100$$

(Summiert wird über alle symmetrie-unabhängigen Reflexe hkl.)

Eine noch realistischere Abschätzung des Modellfehlers erhält man, wenn man den R-Wert aus einer statistisch ausgewiesenen Teilmenge (2 – 5 %) von symmetrie-unabhängigen Reflexen berechnet, die nicht zur Verfeinerung der Struktur verwendet werden. Dieser Wert wird als freier R-Wert  $R_{\text{free}}$  bezeichnet<sup>189</sup>.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Heterologe Expression von Nod-ähnlichen Rezeptoren

#### 3.1.1 Identifikation von löslich exprimierbaren Proteinfragmenten

Zur heterologen Expression von humanen Nod-ähnlichen Rezeptoren (NLR) wurden drei verschiedene Expressionssysteme eingesetzt. *Escherichia coli* Bakterien als prokaryotischer Organismus, der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* und Sf21 Ovarienzellen des Nachtfalters *Spodoptera frugiperda* als eukaryotische Expressionssysteme. In allen drei Expressionssystemen wurde versucht, verschiedene humane NLR vollständiger Länge heterolog zu exprimieren. Aber mit keinem der verwendeten Organismen war es möglich, einen vollständigen humanen Nod-ähnlichen Rezeptor zu exprimieren. Darüber hinaus wurde eine große Zahl an Konstrukten entworfen, welche nur für einzelne Abschnitte eines NLR kodierten (Tabelle 3.1). Als Anhaltspunkt für die Wahl der Fragmentgrenzen der verschiedenen Konstrukte dienten dabei sowohl prognostizierte Domänengrenzen verschiedener Datenbanken (smart, pfam, dompred) als auch nicht-automatisierte Sequenzvergleiche innerhalb der Mitglieder der Nod-ähnlichen Rezeptoren und mit homologen Proteinen anderer Spezies.

Die NLR Fragmente wurden auf DNA Ebene mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Kap. 2.2.1) erzeugt. Als DNA Matrizen dienten Plasmidvektoren, welche die codierenden Sequenzen der humanen Gene Nalp1.1 (NCBI ACCESSION NM\_033004), Nalp1.5 (NCBI ACCESSION NM\_001033053), Nalp2 (NCBI ACCESSION NM\_017852), Nalp3 (NCBI ACCESSION NM\_004895), Nod1 (NCBI ACCESSION NM\_006092) und Nod2 (NCBI ACCESSION NM\_022162) enthielten. Diese Matrizen-Plasmide wurden kommerziell erworben. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden aufgereinigt, restringiert und mit dem gewünschten Zielvektor ligiert (Kap. 2.2.2 – 2.2.5). Für die Expression in Bakterien wurden Vektoren der Serie pProEX-HT (Invitrogen) und der pGEX-4T-1-TEV (GE Healthcare, modifiziert) verwendet. Bei der Expression in Sf21 Zellen wurden Vektoren der Serie pFastBac-HT (Invitrogen) eingesetzt. In *D. discoideum* Zellen wurde der pDIC2-TEV-P (Th. Reubold) genutzt. Die erstellten Expressionskonstrukte wurden vor ihrer Verwendung durch DNA-Sequenzierung auf die Richtigkeit der Sequenz des eingefügten Inserts hin überprüft (Kap. 2.2.8). Durch Transformation bzw. Transfektion wurden die Expressionskonstrukte dann in die Zellen der verschiedenen Expressionssysteme gebracht (Kap. 2.3.3, 2.4.2 und 2.4.5). Alle in Tabelle 3.1 aufgeführten Konstrukte wurden im kleinen Maßstab daraufhin getestet, ob das Zielprotein im entsprechenden Expressionssystem löslich

exprimiert werden kann. Der Ablauf eines solchen Expressionstests ist in Kap. 2.3.4 beschrieben. Die Ergebnisse dieser Expressionstests sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Expressionskonstrukte.

Expressionskonstrukt	Fusionsprotein <sup>1)</sup>	Domänen	E <sup>2)</sup>	L <sup>3)</sup>
pProEX-HTa Nalp1 (1-791)	His6-Nalp1 (1-791)	PYD-NOD	+	u
pProEX-HTa Nalp1 (1-990)	His6-Nalp1 (1-990)	PYD-NOD-LRR	+	u
pProEX-HTb Nalp1 (320-791)	His6-Nalp1 (320-791)	NOD	+	u
pProEX-HTb Nalp1 (320-990)	His6-Nalp1 (320-990)	NOD-LRR	+	u
pProEX-H10Tb Nalp1 (791-990)	His10-Nalp1 (791-990)	LRR	++	l
pProEX-H10Tb Nalp1.1 (791-1377)	His10-Nalp1.1 (791-1377)	LRR-FIIND	+	u
pProEX-H10Tb Nalp1.1 (791-1473)	His10-Nalp1.1 (791-1473)	LRR-FIIND-CARD	+	u
pProEX-H10Tb Nalp1.1 (989-1377)	His10-Nalp1.1 (989-1377)	FIIND	+	u
pProEX-H10Tb Nalp1.1 (989-1473)	His10-Nalp1.1 (989-1473)	FIIND-CARD	+	u
pProEX-H10Tb Nalp1.1 (1082-1377)	His10-Nalp1.1 (1082-1377)	FIIND	+	u
pProEX-H10Tb Nalp1.1 (1082-1473)	His10-Nalp1.1 (1082-1473)	FIIND-CARD	+	u
pProEX-H10Tb Nalp1.1 (1230-1377)	His10-Nalp1.1 (1230-1377)	FIIND	+	u
pProEX-H10Tb Nalp1.1 (1230-1473)	His10-Nalp1.1 (1230-1473)	FIIND-CARD	+	u
pGEX-4T-1-TEV Nalp1 (1-92)	GST-Nalp1 (1-92)	PYD	++	l
pGEX-4T-1-TEV Nalp1 (741-990)	GST-Nalp1 (741-990)	LRR	++	u
pGEX-4T-1-TEV Nalp1 (791-990)	GST-Nalp1 (791-990)	LRR	++	l
pGEX-4T-1-TEV Nalp1 (807-948)	GST-Nalp1 (807-948)	LRR	+	u
pGEX-4T-1-TEV Nalp1 (818-932)	GST-Nalp1 (818-932)	LRR	+	u
pGEX-4T-1-TEV Nalp1 (818-948)	GST-Nalp1 (818-948)	LRR	+	u
pGEX-4T-1-TEV Nalp1.1 (1-1473)	GST-Nalp1.1 (1-1473)	PYD-NOD-LRR-FIIND-CARD	-	-
pFastBac-HTa Nalp1.5 (1-1375)	His6-Nalp1.5 (1-1375)	PYD-NOD-LRR-FIIND	-	-
pFastBac-H10Tb Nalp1 (807-948)	His10-Nalp1 (807-948)	LRR	-	-
pFastBac-H10Tb Nalp1 (818-932)	His10-Nalp1 (818-932)	LRR	-	-
pFastBac-H10Tb Nalp1 (818-948)	His10-Nalp1 (818-948)	LRR	-	-
pDIC2-TEV-P Nalp1.5 (1-1375)	His8Myo-Nalp1.5(1-1375)-GST	PYD-NOD-LRR-FIIND	-	-
pDIC2-TEV-P Nalp1 (807-948)	His8Myo-Nalp1 (807-948)	LRR	+	l
pDIC2-TEV-P Nalp1 (818-932)	His8Myo-Nalp1 (818-932)	LRR	+	l
pProEX-HTa Nalp2 (1-1062)	His6-Nalp2 (1-1062)	PYD-NOD-LRR	-	-
pFastBac-HTa Nalp2 (1-1062)	His6-Nalp2 (1-1062)	PYD-NOD-LRR	-	-
pProEX-HTb Nalp3 (1-1036)	His6-Nalp3 (1-1036)	PYD-NOD-LRR	-	-
pProEX-H10Tb Nalp3 (160-1036)	His10-Nalp3 (160-1036)	NOD-LRR	-	-
pProEX-HTb Nalp3 (718-995)	His6-Nalp3 (718-995)	LRR	+	u
pProEX-HTb Nalp3 (718-1036)	His6-Nalp3 (718-1036)	LRR	+	u
pProEX-HTb Nalp3 (724-1007)	His6-Nalp3 (724-1007)	LRR	+	u
pProEX-H10Tb Nalp3 (777-1036)	His10-Nalp3 (777-1036)	LRR	+	u
pProEX-H10Tb Nalp3 (894-1036)	His10-Nalp3 (894-1036)	LRR	+	u
pGEX-4T-1-TEV Nalp3 (1-1036)	GST-Nalp3 (1-1036)	PYD-NOD-LRR	-	-
pGEX-4T-1-TEV Nalp3 (1-93)	GST-Nalp3 (1-93)	PYD	+	l
pGEX-4T-1-TEV Nalp3 (1-717)	GST-Nalp3 (1-717)	PYD-NOD	-	-
pGEX-4T-1-TEV Nalp3 (100-717)	GST-Nalp3 (100-717)	NOD	-	-
pGEX-4T-1-TEV Nalp3 (100-1036)	GST-Nalp3 (100-1036)	NOD-LRR	-	-
pGEX-4T-1-TEV Nalp3 (697-1036)	GST-Nalp3 (697-1036)	LRR	-	-
pGEX-4T-1-TEV Nalp3 (718-995)	GST-Nalp3 (718-995)	LRR	-	-
pGEX-4T-1-TEV Nalp3 (718-1036)	GST-Nalp3 (718-1036)	LRR	-	-
pGEX-4T-1-TEV Nalp3 (740-995)	GST-Nalp3 (740-995)	LRR	+	u
pGEX-4T-1-TEV Nalp3 (740-1036)	GST-Nalp3 (740-1036)	LRR	+	u
pGEX-4T-1-TEV Nalp3 (894-1036)	GST-Nalp3 (894-1036)	LRR	+	u



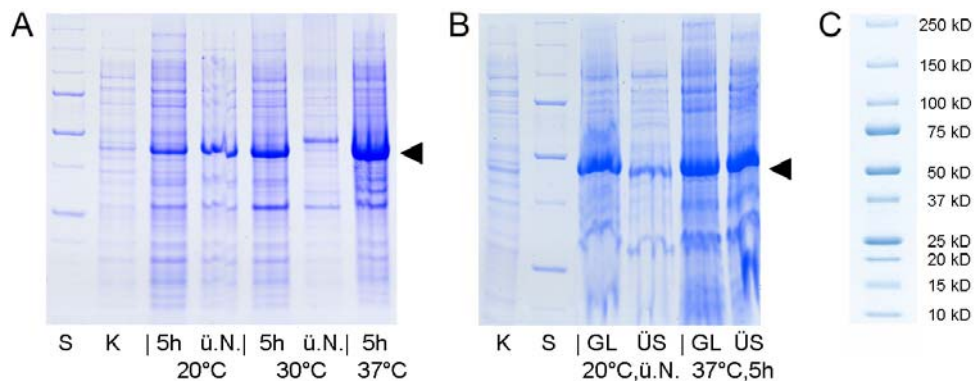
pFastBac-HTb Nalp3 (718-1036)	His6-Nalp3 (718-1036)	LRR	-	-
pProEX-H10Tb Nod1 (638-953)	His10-Nod1 (638-953)	LRR	++	u
pFastBac-H10Tb Nod1 (638-953)	His6-Nod1 (638-953)	LRR	-	-
pProEX-H10Tb Nod2 (748-1040)	His10-Nod2 (748-1040)	LRR	++	u
pFastBac-H10Tb Nod2 (748-1040)	His6-Nod2 (748-1040)	LRR	-	-
1) angegeben ist Art und Position des Fusionsanteils am rekombinanten Protein, wobei His6 bzw. His10 für sechs bzw. zehn Histidine, GST für Glutathion-S-Transferase und Myosin für die Myosin-II-Motordomäne steht. 2) Expressionsniveau (E) des Konstruktes gemessen an der Stärke der Bande des Fusionsproteins im Coomassie gefärbten SDS-PAA Gel, wobei „++“ starke Expression, „+“ geringe Expression und „-“ keine erkennbare Expression bedeutet. 3) Löslichkeit (L) des Fusionsproteins, wobei l für (teilweise) löslich und u für unlöslich steht.				

Trotz der vielen unterschiedlichen Konstrukte, des Einsatzes von drei verschiedenen Expressionssystemen und der Variation von Anzucht- und Aufschlussbedingungen bei den durchgeführten Expressionstests konnten am Ende lediglich die Fusionsproteine GST-Nalp1(1-92), GST-Nalp3(1-93) und Nalp1(791-990) sowohl als GST als auch als His Fusionsprotein in löslicher Form heterolog exprimiert werden. Bei den ersten beiden Konstrukten handelt es sich um die Pysin Domäne (PYD) des jeweiligen Rezeptors, die vom Nalp1 bereits strukturell bekannt ist<sup>190</sup>. In dem Abschnitt der Aminosäuren 791-990 des Proteins hNalp1 befindet sich die Domäne der Leucin-reichen Wiederholungen (*leucine rich repeat*, LRR). Diese Domäne wird für die Bindung des Liganden an das hNalp1 Protein verantwortlich gemacht<sup>191</sup>.

### 3.1.2 Optimierung der Expressionsbedingungen für hNalp1(791-990)

Zellen des *E. coli* Stamms BL21(DE3) wurden mit dem Vektor pGEX-4T-1-TEV Nalp1 (791-990) transformiert (Kap. 2.3.3). Mit den transformierten Bakterien der über Nacht Kultur wurden 500 ml TB-Medium (mit  $150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Ampicillin als Selektionsmarker) auf eine optische Zelldichte von  $\text{OD}_{600} = 0,05$  angeimpft und auf fünf 250 ml Erlenmeyerkolben verteilt. Die Bakterien wurden in einem Schüttelinkubator bei 160 rpm und einer Temperatur von  $30^\circ\text{C}$  bis zu einer optischen Zelldichte von  $\text{OD}_{600} = 0,4 - 0,6$  kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurde dann die Transkription des GST-hNalp1(791-990) durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Um möglichst optimale Bedingungen für die heterologe Expression und die Produktion des rekombinanten Proteins zu finden, wurden die fünf Kulturen im Weiteren unterschiedlich behandelt. Zwei Kulturen wurden bei  $30^\circ\text{C}$  belassen, zwei auf  $20^\circ\text{C}$  abgekühlt und eine auf  $37^\circ\text{C}$  aufgeheizt. Nach fünf

Stunden bei der jeweiligen Temperatur wurden je eine Kultur aus 20°C und 30°C sowie die 37°C Kultur zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden bei -80°C eingefroren. Die restlichen zwei Kulturen verblieben bei 20°C bzw. 30°C über Nacht im Schüttelinkubator und wurden erst am nächsten Morgen zentrifugiert. Diese Bakterienpellets wurden ebenfalls bei -80°C eingefroren. Um den Erfolg des Expressionstests zu überprüfen und die einzelnen Bedingungen miteinander vergleichen zu können, folgte der Aufschluss der *E. coli* Zellen im analytischen Maßstab. Die gefrorenen Bakterienpellets wurden bei RT aufgetaut und in 5 ml kaltem Protein-Puffer A resuspendiert. Der Zellausschluss erfolgte mechanisch durch Ultraschall unter Zugabe von 1 % NP40 Detergenz und 1 mM PMSF (Kap. 2.5.1). Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt. Zur Auswertung des Expressionstests wurden Proben der Gesamtzelllysate und der Zentrifugationsüberstände mit denaturierender SDS-PAGE untersucht (Abbildung 3.1). Die Analyse ergab für alle fünf getesteten Bedingungen, dass das Fusionsprotein GST-hNalp1(791-990) in großen Mengen und vor allem in löslicher Form von den Bakterien produziert wurde. Die größte Ausbeute an löslichem Protein hNalp1(791-990) wurde unter folgender Bedingung erzielt: Kultivierung der Bakterien bei 30°C, Induktion der Expression mit 0,1 mM IPTG bei einer optischen Zelldichte  $OD_{600} = 0,5$  und Proteinsynthese bei 20°C über Nacht.



**Abbildung 3.1:** Expressionstest des Fragments GST-hNalp1(791-990).

Die Proben des analytischen Zellaufschlusses vom Expressionstest mit dem Konstrukt GST-hNalp1(791-990) in Coomassie gefärbten 10 %igen PAA-Gele nach denaturierender SDS-PAGE. Die heterologe Expression im 100 ml Maßstab wurde in *E. coli* Zellen des Stamms BL21(DE3) bei unterschiedlichen Temperaturen und über verschiedene Zeiträume durchgeführt. (A) Es wurden jeweils die Gesamtzelllysate der aufgeführten Testbedingungen aufgetragen, um zu überprüfen, ob das Fusionsprotein GST-hNalp1(791-990) überhaupt exprimiert wurde. (B) Die Bakterienpellets der Testbedingungen 20°C, ü.N. sowie 37°C, 5h wurden aufgeschlossen und Proben vom Gesamtlysate (GL) und vom löslichen Überstand (ÜS) nach Zentrifugation wurden mit SDS-PAGE analysiert. Zur Auswertung wurde auf beiden Gelen zusätzlich die Probe einer Negativkontrolle (K) aufgetragen. Ein Proteinstandard (S) dient als Größenvergleich (Precision Plus Protein Standards (Bio Rad)). Die Position der erwarteten Proteinbande des GST-hNalp1(791-990) ist mit einer schwarzen Pfeilspitze markiert. (C) Banden des Precision Plus Protein Standards (Bio Rad) in einem 4-20 % Tris-HCl Criterion™ Gel. Dieser Größenstandard enthält drei intensivere Referenzbanden zur besseren Orientierung bei 25 kD, 50 kD und 75 kD.

### 3.1.3 Aufreinigung der LRR-Domäne von humanem Nalp1

Um das Protein hNalp1(791-990) (im Folgenden hNalp1-LRR genannt) im präparativen Maßstab zu gewinnen, wurden 2,5 l TB-Medium (mit  $150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Ampicillin) mit transformierten *E. coli* Zellen auf eine optische Zelldichte von  $\text{OD}_{600} = 0,05$  angeimpft. Die Zellen wurden bei  $30^\circ\text{C}$  bis zu einer optischen Zelldichte von  $\text{OD}_{600} > 1,0$  angezogen. An diesem Punkt wurde  $0,1 \text{ mM}$  IPTG zugesetzt und die Temperatur auf  $20^\circ\text{C}$  reduziert. Bei dieser Temperatur wurden die Zellen über Nacht kultiviert, bevor sie durch Zentrifugation geerntet wurden (Kap. 2.3.4). Die Zellen einer 2,5 l Bakterienkultur wurden in 100 ml Protein-Puffer A aufgeschlossen, dem  $1 \text{ mM}$  PMSF und  $1 \%$  NP40 Detergenz zugesetzt wurden (Kap. 2.5.1). Als Puffer wurde 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) bei pH 6,5 gewählt, weil der isoelektrische Punkt des Proteinabschnitts hNalp1(791-990) bei 8,51 liegt. Die affinitätschromatographische Aufreinigung (Kap. 2.5.3) des Fusionsproteins GST-hNalp1-LRR erfolgte über eine GSH-Säule (GE Healthcare), die zuvor mit Protein-Puffer A equilibriert worden war. Nach dem Auftragen wurde die GSH-Säule mit zehn Säulenvolumen Protein-Puffer A gespült. Anschließend wurde auf Protein-Puffer B umgestellt und die Säule mit weiteren drei Säulenvolumen gewaschen. Zur Elution wurde Protein-Puffer B mit  $30 \text{ mM}$  reduziertem Glutathion verwendet (Abbildung 3.2 A). Um den GST Fusionsanteil vom isolierten GST-hNalp1-LRR abzuspalten, wurde dem Eluat der GSH-Säule  $50 \mu\text{g}$  TEV Protease pro  $1 \text{ mg}$  Fusionsprotein zugegeben und der Ansatz über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert (Kap. 2.5.6). Zur Trennung von hNalp1-LRR und GST wurde eine Ionenaustauschchromatographie (Kap. 2.5.7) durchgeführt, wobei über einen NaCl Gradienten von  $0,1 - 1,0 \text{ M}$  eluiert wurde (Abbildung 3.2 B). Um gleichzeitig auch die mit einem His<sub>6</sub> Fusionsanteil versehene TEV Protease abzutrennen, wurde direkt hinter die Ionenaustauscher-Säule (1 ml HiTrap SP, GE Healthcare) eine Ni-NTA Säule (1 ml HisTrap, GE Healthcare) geschaltet, durch welche das Eluat des Ionenaustauschers floss, bevor es in Fraktionen gesammelt wurde (Abbildung 3.2 B). Die hNalp1-LRR enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt. Um das Protein nach der Ionenaustauschchromatographie zurück in den Protein-Puffer B zu überführen, wurde eine Größenausschlusschromatographie (Kap. 2.6.3) mit diesem Puffer durchgeführt (Abbildung 3.2 C). Durch eine abschließende Reinigung über eine GSH-Säule (1 ml GSTrap, GE Healthcare) wurden Reste von ungeschnittenem Fusionsprotein zurückgehalten und ein Reinheitsgrad von ca.  $98 \%$  erreicht (Abbildung 3.2 D). Der Durchfluss mit hochreinem hNalp1-LRR wurde gesammelt, über Ultrafiltration konzentriert (Kap. 2.6.1) und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die gesamte Aufreinigung verlief über mehrere

Tage, wobei das Protein stets gekühlt wurde. Die Ausbeute an Zielprotein betrug ca. 4 mg pro 2,5 l Bakterienkultur. Von allen Schritten und Fraktionen wurden Proben entnommen und mit Hilfe von denaturierender SDS-PAGE (Kap. 2.5.5) analysiert, um Verlauf und Fortschritt der Reinigung zu prüfen und zu protokollieren. Die in Abbildung 3.2 gezeigten Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamid Gele dokumentieren die erfolgreiche Isolierung und Aufreinigung von hNalp1-LRR.

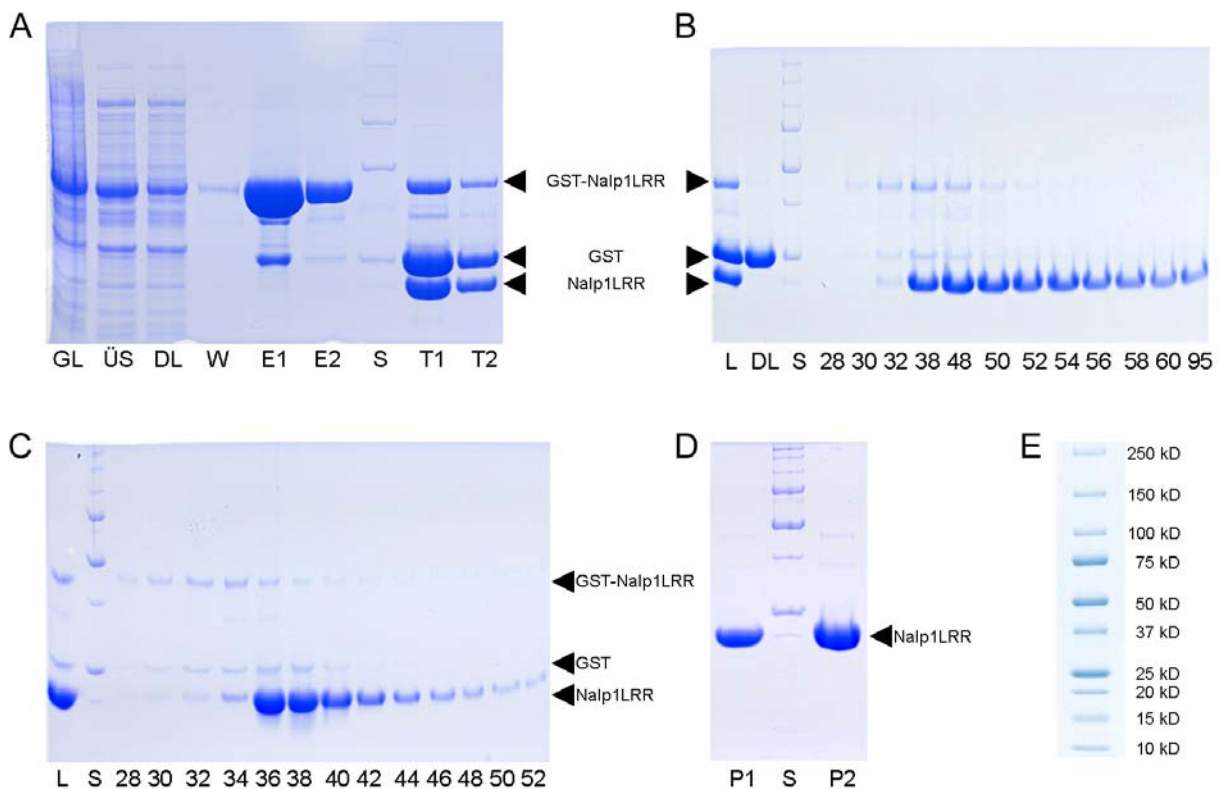


Abbildung 3.2: Aufreinigung von hNalp1-LRR.

Dargestellt ist der Verlauf von Isolierung und Aufreinigung des heterolog exprimierten Proteinfragments hNalp1-LRR anhand repräsentativer 10 %iger PAA-Gele aus denaturierender SDS-PAGE nach Coomassiefärbung. (A) Affinitätschromatographische Aufreinigung über 5 ml GSH-Säule. Bezeichnung der einzelnen Spuren: GL, Gesamtlysate der Bakterienkultur; ÜS, löslicher Überstand des Gesamtlysats; DL, Durchlauf durch die GSH-Säule; W, Waschfraktion; E1, Eluat 1 (erstes Säulenvolumen); E2, Eluat 2 (restliches Elutionsvolumen); S, Precision Plus Protein Standards (Bio Rad); T1, Eluat 1 nach Proteolyse mit TEV Protease ü.N.; T2, Eluat 2 nach Proteolyse mit TEV Protease ü.N.. (B) Ionenaustauschchromatographie über 1 ml HiTrap SP Säule mit nachgeschalteter 1 ml HiTrap Ni-NTA Säule. Elution durch NaCl-Gradient von 0,1-1,0 M. Bezeichnung der einzelnen Spuren: L, Ladevolumen; DL, Durchlauf; S, Precision Plus Protein Standards (Bio Rad); 28-95, Nummer der Fraktion der Ionenaustauschchromatographie. (C) Größenausschlusschromatographie (HiLoad 16/60, Superdex 75). Bezeichnung der einzelnen Spuren: L, Ladevolumen; S, Precision Plus Protein Standards (Bio Rad); 28-52, Nummer der Fraktion der Größenausschlusschromatographie. (D) Abschließende affinitätschromatographische Aufreinigung über 1 ml GSH-Säule. Bezeichnung der einzelnen Spuren: P1, Durchfluss mit final aufgereinigtem Protein hNalp1-LRR; S, Precision Plus Protein Standards (Bio Rad); P2, Durchfluss nach Ultrafiltration. (E) Banden des Precision Plus Protein Standards (Bio Rad) in einem 4-20 % Tris-HCl Criterion™ Gel. Dieser Größenstandard enthält drei intensivere Referenzbanden zur besseren Orientierung bei 25 kD, 50 kD und 75 kD.

### 3.1.4 DLS Analyse der aufgereinigten hNalp1-LRR

Die aufgereinigte hNalp1-LRR wurde vor dem Einsatz zur Kristallisation mit dem Verfahren der Dynamischen Lichtstreuung (Kap. 2.6.4) auf Polydispersität hin untersucht. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass das isolierte Protein keine Aggregate bildet, welche die Kristallisation negativ beeinflussen könnten. Die Messungen wurden bei 4°C durchgeführt. Für 99,9 % der gesamten Proteinmasse betrug die gemessene Polydispersität lediglich 10,4 % (Abbildung 3.3).

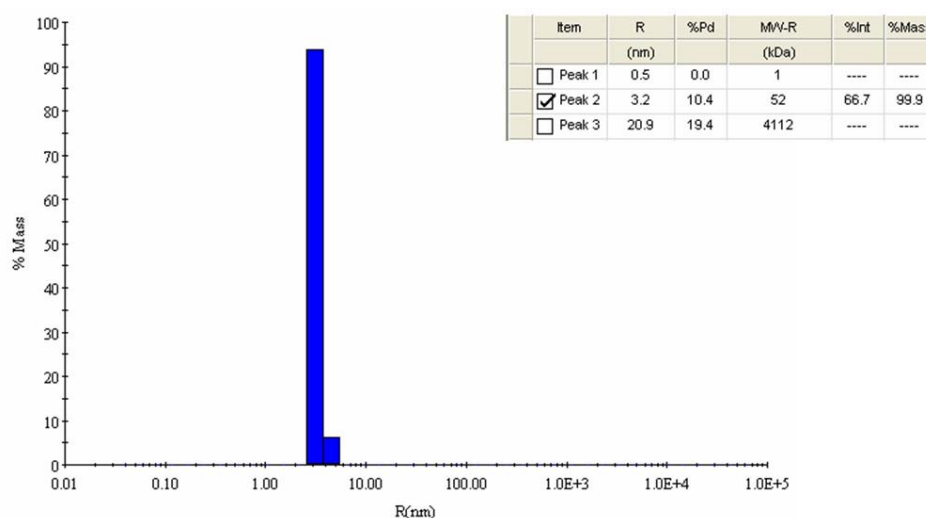


Abbildung 3.3: Dynamische Lichtstreuung der hNalp1-LRR.

Die Auswertung der DLS Messung ergab eine nahezu homogene Proteinspezies. Der ermittelte hydrodynamische Radius der Hauptpopulation (99,9 % der gesamten Proteinmasse) betrug 3,2 nm, bei einer Polydispersität von 10,4 %. Es gab keine Anzeichen für eine Aggregatbildung.

## 3.2 Röntgenkristallographische Analyse der LRR-Domäne von hNalp1

### 3.2.1 Kristallisation von hNalp1-LRR

Das Protein hNalp1-LRR wurde für die Suche nach Kristallisationsbedingungen in drei Konzentrationen (15, 10 und 5 mg·ml<sup>-1</sup>) eingesetzt. Die Suche wurde in 96-Einheiten Platten im Verfahren des sitzenden Tropfens bei 4°C durchgeführt. Die Tropfen wurden dabei vollautomatisch durch einen Pipettierroboter abgesetzt (Kap. 2.7.1). Als Reservoiurlösungen wurden die Puffersätze *JCSG+ Suite* und *Classics Lite Suite* (Qiagen) verwendet. Unter mehreren Bedingungen des *JCSG+ Suite* Puffersatzes zeigten sich bereits nach 6 Stunden die ersten Kristalle, jedoch waren sie klein und verwachsen. Die Kristalle der Bedingung 74 des

Puffersatzes *JCSG+ Suite* (0,1 M HEPES (pH 7,5), 0,02 M  $\text{MgCl}_2$ , 22 % (w/v) Polyacrylsäure (PAA) 5100) machten den kompaktesten Eindruck (Abbildung 3.4 A). Im Verfahren des hängenden Tropfens (Kap. 2.7.1) in 24-Loch Platten wurde versucht, diese zu reproduzieren. Parallel dazu wurde durch Variation der Puffersubstanz, des pH-Wertes und der PAA Konzentration versucht, die Kristallisationsbedingung so zu optimieren, dass größere Einzelkristalle entstehen (Abbildung 3.4 B-D). Diese Reproduktions- und Optimierungsansätze wurden sowohl bei 4°C als auch bei 20°C durchgeführt. Das beste Resultat wurde bei 20°C mit einer Reservoirolösung folgender Zusammensetzung erzielt: 0,1 M Tris (pH 8,0), 0,02 M  $\text{MgCl}_2$ , 25 % (w/v) PAA 5100. Der 3  $\mu\text{l}$  große Tropfen bestand zur Hälfte aus dieser Reservoirolösung und zur anderen Hälfte aus 10  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  Nalp1-LRR in Protein-Puffer B. Die unter dieser Bedingung gewachsenen Proteinkristalle hatten alle eine sechseckige, zylindrische Form, mit spitz zulaufenden Enden, wobei die größten Einzelkristalle eine maximale Länge von ca. 400  $\mu\text{m}$  erreichten (Abbildung 3.4 B-D). Das Kristallwachstum verlief dabei über mehrere Tage.

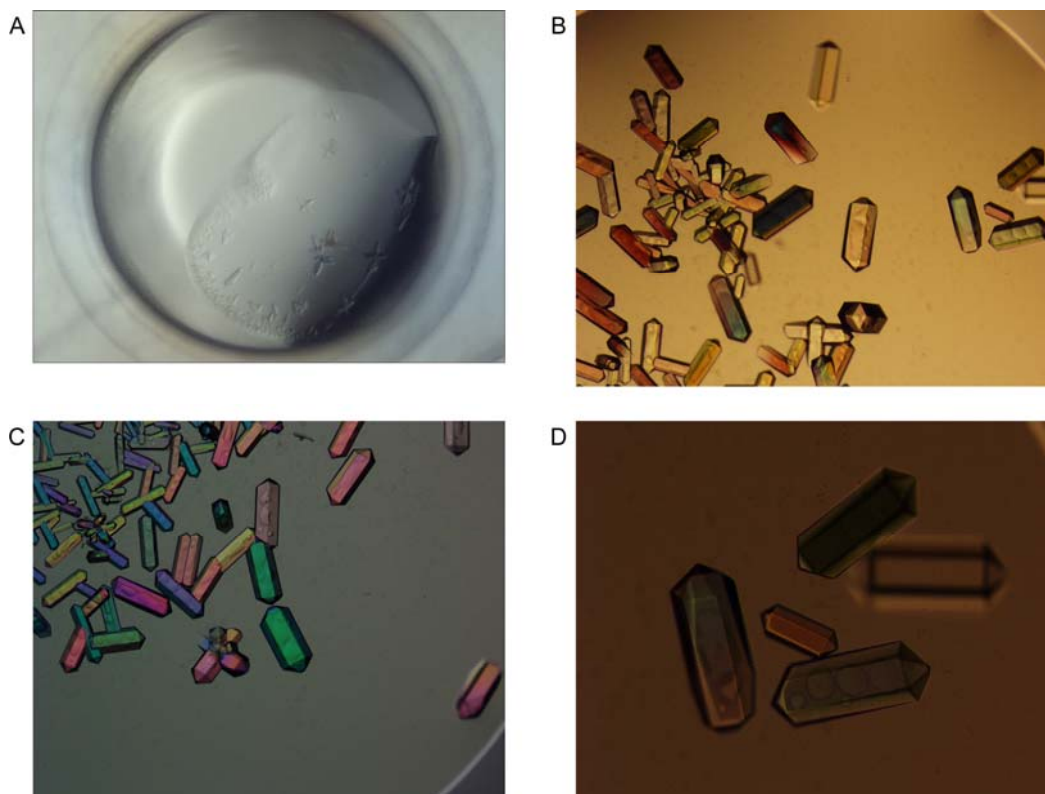


Abbildung 3.4: Initiale und optimierte Kristalle des Proteins hNalp1-LRR.

(A) Initiale Kristalle von hNalp1-LRR nach 6 Stunden Inkubation bei 4°C unter der Bedingung *JCSG+ Suite, Condition 74*, mit einer Proteinkonzentration von 15  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . (B-D) Kristalle aus Ansätzen zur Optimierung der initialen Kristallisationsbedingung. Neben verwachsenen Kristallen sind bereits erste Einzelkristalle zu sehen (B und C). Alle Kristalle weisen eine sechseckige, zylindrische Form, mit spitz zulaufenden Enden auf. Die besten Resultate konnten mit der Reservoirolösung: 0,1 M Tris (pH 8,0), 0,02 M  $\text{MgCl}_2$ , 25 % (w/v) PAA 5100 bei 20°C erzielt werden (D). Die größten Einzelkristalle hatten dabei eine Länge von bis zu 400  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.2 Datensammlung und Datenreduktion

Die für die Strukturlösung der hNalp1-LRR verwendeten Beugungsdaten wurden unter kryogenen Bedingungen im Drehkristallverfahren am Synchrotron-Messstand X06SA des *Swiss Light Source* (SLS) aufgenommen (Kap. 2.7.3). Von einem Kristall wurden zwei Beugungsdatensätze aufgenommen. Um Beugungsdaten aus den Bereichen hoher Auflösung zu erhalten, wurde für den ersten Datensatz ein Abstand von Kristall zu Detektoroberfläche von 140 mm gewählt. In Schritten von  $0,5^\circ$  wurden insgesamt 300 Aufnahmen mit einer Belichtungszeit von jeweils 1 s gemacht. Mit dem zweiten Datensatz sollten Beugungsdaten aus den Bereichen niedriger Auflösung gesammelt werden. Hierzu wurde der Abstand zwischen Kristall und Detektoroberfläche auf 280 mm vergrößert. Es wurden 120 Aufnahmen mit einem Drehbereich von jeweils  $1^\circ$  und einer Belichtungszeit von 1 s gemacht. Die beiden Beugungsdatensätze wurden einzeln mit dem Programm XDS ausgewertet und anschließend mit dem Programm XSCALE zu einem Datensatz zusammengefasst (Kap. 2.7.4). Dieser Datensatz enthielt 99,8 % aller möglichen nicht-redundanten Reflexe im Auflösungsbereich von 15 - 1,65 Å (Tabelle 3.2). Durch die Auswertung der Beugungsaufnahmen konnte die Kristallpackung in die hexagonal primitive Raumgruppe 178 (P6<sub>1</sub>22) eingeordnet werden. Die Zellparameter der Einheitszelle sind in Tabelle 3.3 angegeben.

Tabelle 3.2: Statistik des zusammengefassten Datensatzes von hNalp1-LRR.

Auflösung [Å]	Anzahl der Reflexe			Vollständigkeit [%]	I/σ	R <sub>meas</sub> [%]
	beobachtet	unabhängig	möglich			
15	396	42	69	60,9	46,52	3,5
10	2107	119	138	86,2	78,22	3,2
8	3697	169	174	97,1	91,57	2,9
6	12268	456	456	100,0	106,02	3,5
5	15712	555	555	100,0	110,95	3,3
4	35841	1231	1232	99,9	113,43	3,1
3	103582	3362	3362	100,0	108,06	3,4
2,5	72982	4131	4133	100,0	81,47	3,1
2,0	164965	9234	9242	99,9	54,66	5,0
1,9	55855	3119	3122	99,9	30,70	10,3
1,8	68718	3846	3848	99,9	20,37	16,8
1,7	85403	4778	4779	100,0	13,87	26,3
1,65	50624	2843	2844	100,0	9,71	38,7
Gesamt	672150	33885	33954	99,8	51,61	3,9

Tabelle 3.3: Parameter der Einheitszelle.

Kantenlänge [Å]			Winkel [°]		
a	b	c	α	β	γ
84,69	84,69	130,47	90,00	90,00	120,00



### 3.2.3 Phasenlösung durch Molekularen Ersatz

Die Einheitszelle der hexagonal-primitiven Raumgruppe 178, die den Kristallen von hNalp1-LRR zugeordnet werden konnte, enthält 12 asymmetrische Einheiten. Über den Matthews-Koeffizient<sup>186</sup> wurde abgeschätzt, dass jede dieser asymmetrischen Einheiten nur ein Molekül hNalp1-LRR enthält (Kap. 2.7.5). Deshalb wurden bei der Phasenlösung durch Molekularen Ersatz (Kap. 2.7.5) mit dem Programm Phaser aus dem CCP4 Programmpaket die Grundeinstellungen so gewählt, dass bei der Rotations- und Translationssuche nach einem

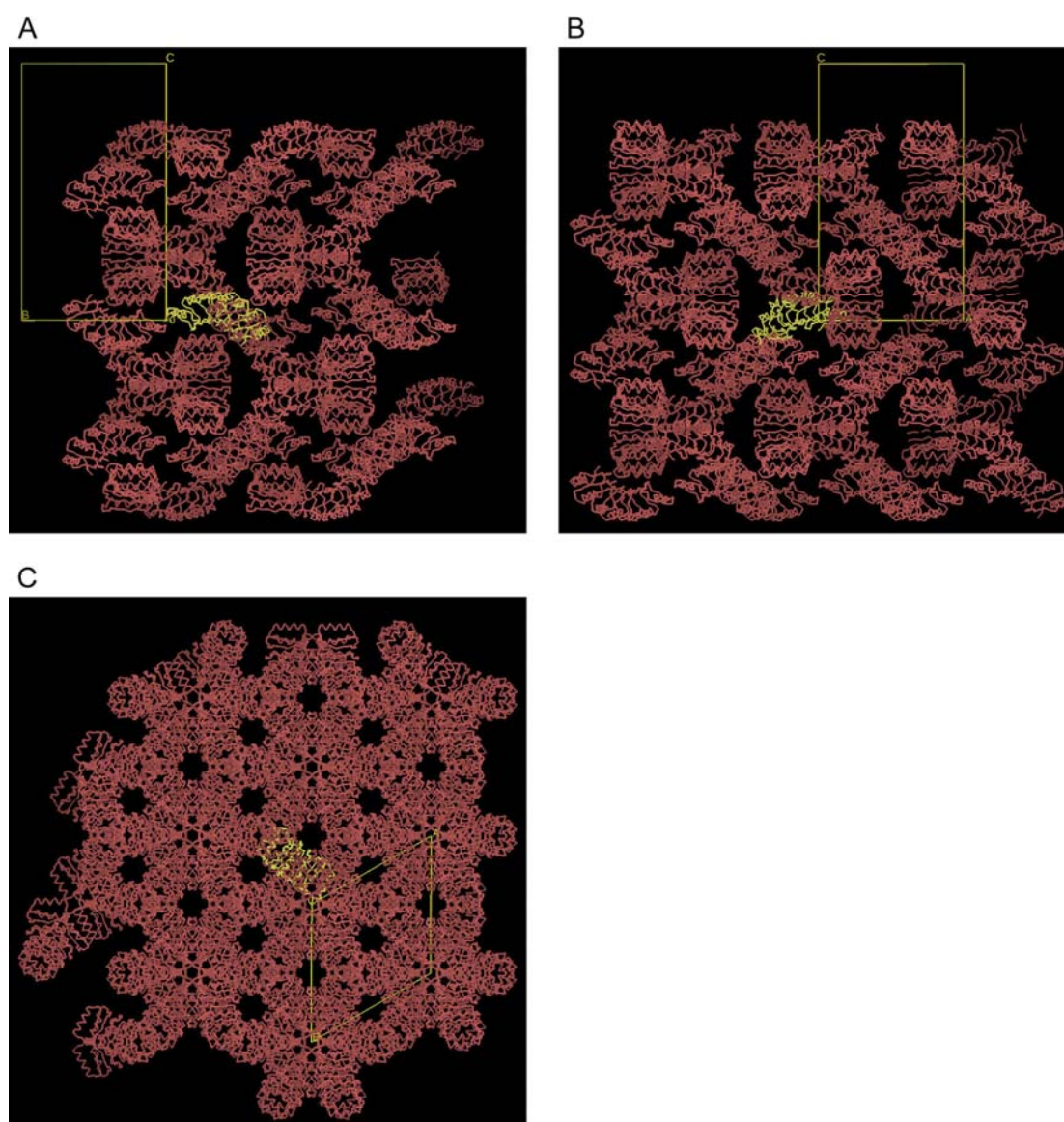


Abbildung 3.5: Kristallpackung von hNalp1-LRR.

Der Kristall von hNalp1-LRR hat die hexagonal primitive Raumgruppe 178 ( $P6_122$ ) mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit. (A) Blickrichtung entlang der A-Achse der Einheitszelle (gelbes Rechteck). Zu sehen sind das eine Molekül der asymmetrischen Einheit (gelb) und seine Symmetrieverwandten (rot). (B) Wie A, aber Blickrichtung entlang der B-Achse der Einheitszelle. (C) Wie A, aber Blickrichtung entlang der C-Achse der Einheitszelle. Die hexagonale Geometrie mit den ringförmig angeordneten Molekülen und den zentralen Solvenskanälen ist gut zu erkennen.



Molekül in der asymmetrischen Einheit gesucht werden sollte. Das Suchmodell ist mit dem Programm MODELLER erstellt worden (Kap. 2.7.5). Es basierte nach Homologieanalysen auf der Struktur des humanen Ribonuklease-Inhibitors (pdb id: 1z7x), wies aber die Sequenz des kristallisierten hNalp1-LRR auf. Das Programm Phaser lieferte eine eindeutige, kollisionsfreie Lösung für ein Molekül pro asymmetrische Einheit gemäß der hexagonalen Packung in Raumgruppe 178 (P6<sub>1</sub>22) (Abbildung 3.5).

### 3.2.4 Verfeinerung eines Strukturmodells für hNalp1-LRR

Die gemessenen Strukturfaktoramplituden und die durch molekularen Ersatz erhaltenen Phasenwinkel wurden genutzt, um eine erste Elektronendichtekarte zu berechnen (Kap. 2.7.6). Das Homologie-Modell von hNalp1-LRR, das im Molekularen Ersatz in die Einheitszelle des Kristalls positioniert worden war (Kap. 3.2.3), diente als Ausgangsmodell für die Kristallstruktur von hNalp1-LRR. Das Strukturmodell wurde in mehreren Zyklen mit dem Programm Refmac5 mit der Methode des sog. *least square restrained refinement* verfeinert (Kap. 2.7.6). Nach jedem Zyklus wurde das Modell mit Hilfe des Programms Coot kontrolliert und manuell an die aktuell berechneten Elektronendichtekarten angepasst (Kap. 2.7.6). Durch diesen Prozess erhielt man immer genauere Phasenwinkel und dadurch wiederum immer bessere Elektronendichtekarten. Das Modell konnte so immer weiter verfeinert werden. Als Maß für die erfolgreiche Strukturverfeinerung dienten sowohl der kristallographische als auch der freie R-Wert (Kap. 2.7.6), die auf Werte von 14,8 % bzw. 18,0 % reduziert werden konnten (Tabelle 3.4). Am Ende dieses Prozesses stand eine Validierung der verfeinerten Struktur mit den Programmen SFcheck und PROcheck aus dem CCP4 Programmpaket. Hierbei werden u.a. verschiedene stereochemische Parameter des Modells mit denen bekannter Strukturen verglichen und auf Abweichungen hin überprüft (Anhang). Das finale Strukturmodell der hNalp1-LRR besteht aus insgesamt 1890 Atomen (ohne H-Atome) (Tabelle 3.4), die sich auf 198 Aminosäuren, 217 Wassermoleküle und ein Glycerolmolekül verteilen. Das Glycerolmolekül stammt aus dem Puffer, der als Frostschutz der Kristalle eingesetzt worden war (Kap. 2.7.2). Der mittlere Temperaturfaktor (B-Faktor) des Modells beträgt 26 Å<sup>2</sup> (Tabelle 3.4). Der B-Faktor ist proportional zum Quadrat der mittleren Auslenkung des Atoms aus seiner Ruhelage. Je kleiner der B-Faktor eines Atoms, umso klarer die Elektronendichte, die seine Position definiert.

Tabelle 3.4: Statistik der Strukturverfeinerung.

Parameter	Wert
Auflösung	29,8 – 1,65 Å
Verwendete Reflexe	32189
R <sub>krist</sub>	14,8 %
R <sub>free</sub>	18,0 %
Anzahl der Atome im Modell	1890
Anzahl der Aminosäuren	198
Anzahl der Wassermoleküle	217
Mittlere quadrat. Abweichung der Bindungslängen	0,0288 Å
Mittlere quadrat. Abweichung der Bindungswinkel	2,223°
Mittlerer Temperaturfaktor	26 Å <sup>2</sup>

Das zur Kristallisation eingesetzte Protein bestand aus insgesamt 206 Aminosäuren. Die ersten sechs Aminosäuren des N-Terminus (GAMGGS) sind artifiziell und resultieren aus der Expression als GST-Fusionsprotein. Bei den darauf folgenden 200 Aminosäuren handelt es sich um die Sequenz von Prolin 791 (P791) bis Serin 990 (S990) des hNalp1. Die 198 Aminosäuren im Modell entsprechen den Aminosäuren 792-989 des hNalp1 Proteins. Die Aminosäuren des artifiziellen Linkers (GAMGGS) sowie P791 und das C-terminale S990 konnten auf Grund fehlender interpretierbarer Elektronendichte nicht in das Modell eingefügt werden. Die hohe Auflösung von 1,65 Å ermöglichte bei 19 der 198 Aminosäuren im Modell die Definition von zwei Seitenkettenkonformationen (V792, T793, D794, A795, Y796, Q798, S802, N809, S819, S823, S827, R888, D909, Q912, S916, S919, D935, R940, R955), für R986 waren sogar drei unterschiedliche Konformationen darstellbar.

Im Diagramm nach Ramachandran<sup>192</sup> sind die dihedralen Torsionswinkel des Proteinrückgrats dargestellt (Abbildung 3.6). Es zeigt, dass nach Abschluss der Verfeinerung fast 98 % aller Aminosäuren bevorzugte  $\Psi/\Phi$ -Winkelkombination einnehmen und die übrigen Aminosäuren erlaubte Torsionswinkel aufweisen.

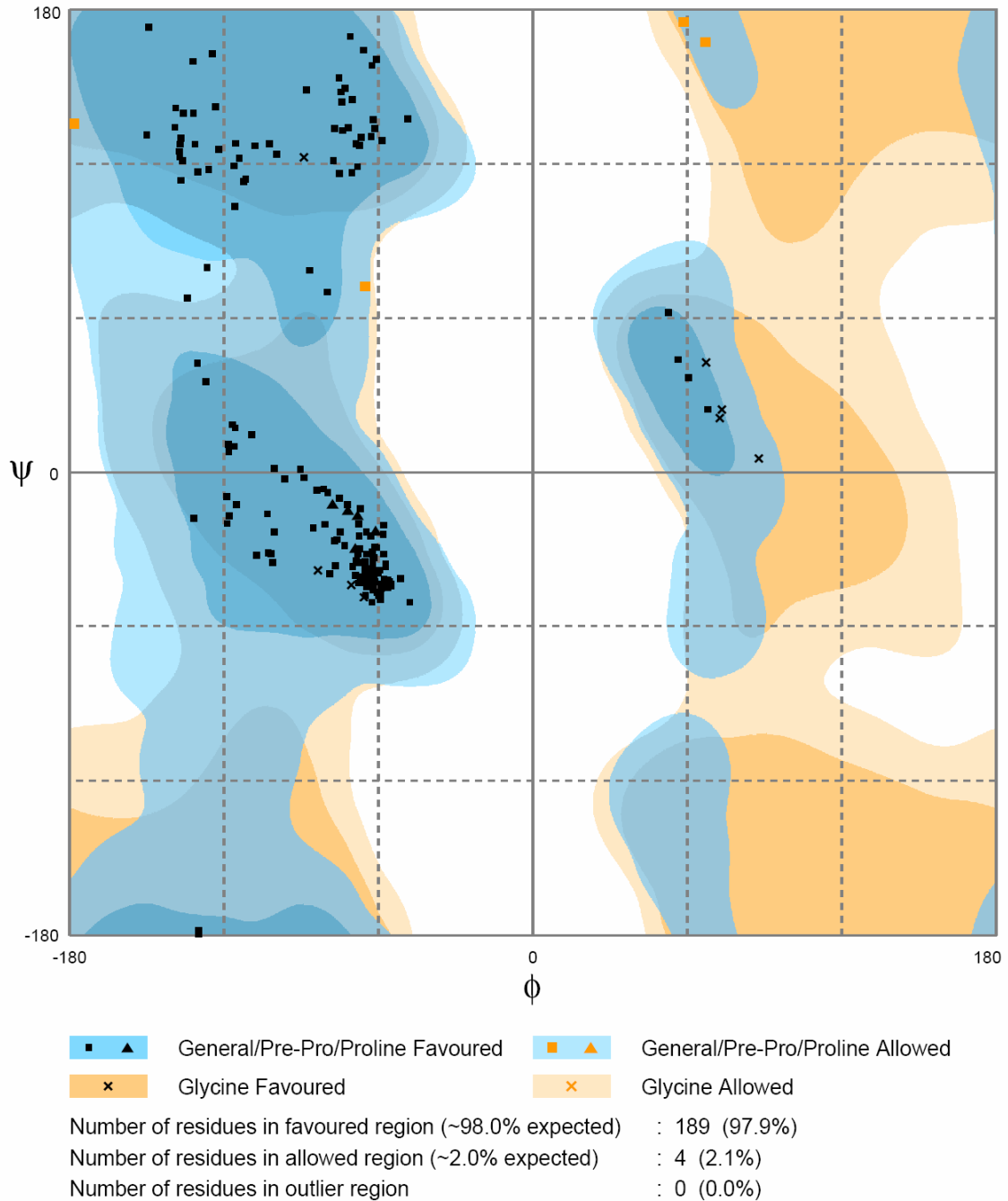


Abbildung 3.6: Ramachandran-Diagramm.

Das Diagramm dient der Beurteilung der stereochemischen Parameter des erstellten Proteinmodells. Jede Aminosäure erhält dazu nach ihrer  $\Psi/\Phi$ -Kombination des Proteinrückgrates eine Position im Koordinatensystem. Im Diagramm sind favorisierte Kombinationen (dunkel blau für alle Aminosäuren außer Glycin, dunkel orange für Glycin), erlaubte Kombinationen (hell blau für alle Aminosäuren außer Glycin, hell orange für Glycin) und verbotene Kombinationen (weiß) gekennzeichnet. Proline sind durch Dreiecke, Glycine durch Kreuze und alle übrigen Aminosäuren durch Quadrate dargestellt. Die Auswertung zeigt, dass 97,9 % aller Aminosäuren des Modells favorisierte Kombinationen aufweisen und die übrigen immer noch im erlaubten Bereich liegen. Das Diagramm wurde mit dem Programm RAMPAGE (S.C. Lovell *et al.*, 2003) erstellt.

### 3.2.5 Kristallstruktur der LRR-Domäne von hNalp1

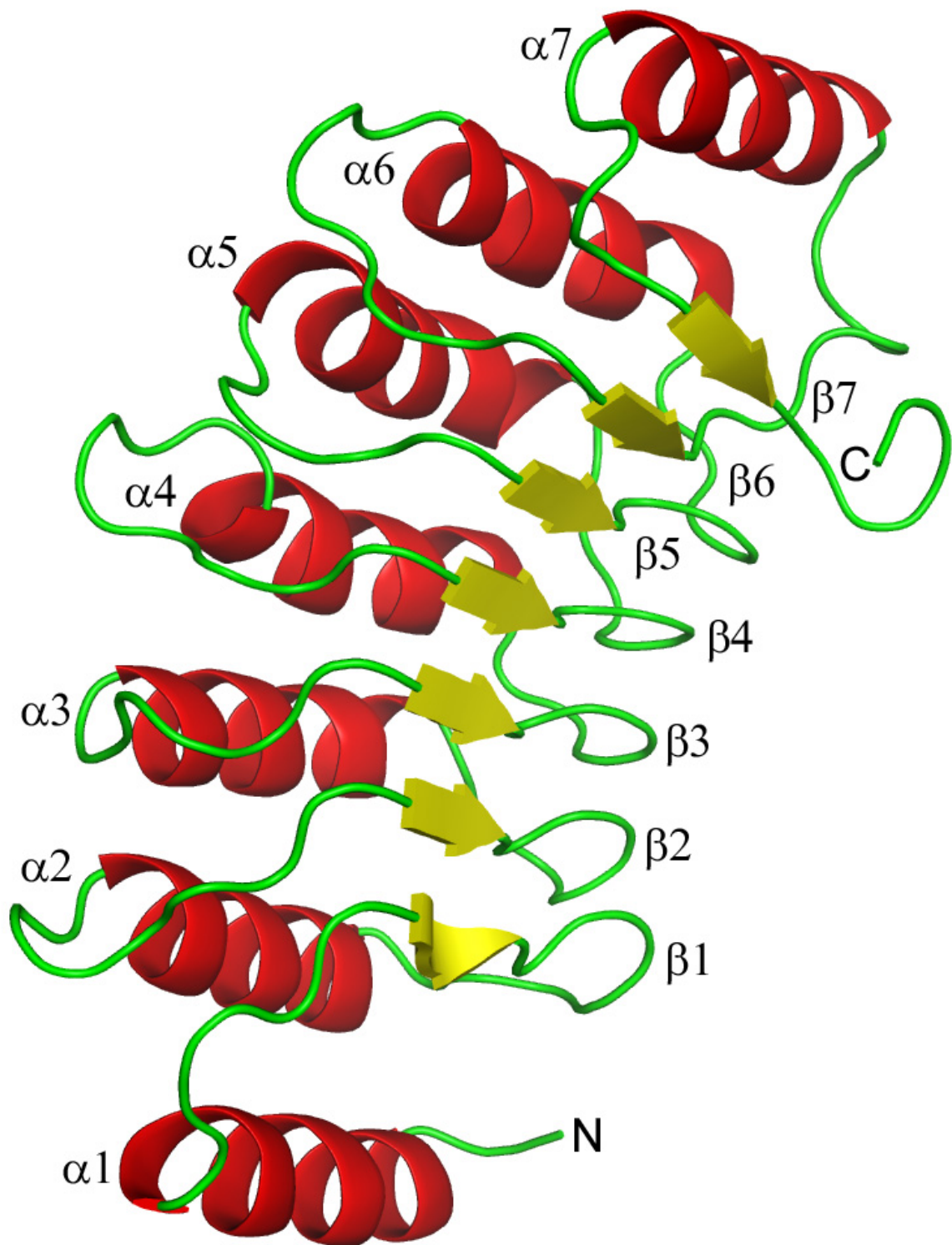


Abbildung 3.7: Kristallstruktur von hNalp1-LRR.

Das Protein hat eine bogenartig gekrümmte Form. Auf der konkaven Seite des Bogens bilden sieben  $\beta$ -Stränge (gelb,  $\beta 1 - \beta 7$ ) ein paralleles  $\beta$ -Faltblatt aus. Die konvexe Seite des Bogens wird von sieben  $\alpha$ -Helices (rot,  $\alpha 1 - \alpha 7$ ) geformt. Die  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Stränge alternieren und sind über kurze Schleifen (grün) miteinander verbunden. Auf diese Weise entsteht die spiralartige Architektur des Proteins. Die Abbildung wurde mit den Programmen PyMOL (DeLano Scientific LLC) und Photoshop (Adobe) erstellt.

Die Kristallstruktur von hNalp1-LRR zeigt ein Monomer, welches aus sieben  $\alpha$ -Helices und sieben  $\beta$ -Strängen besteht (Abbildung 3.7). Die Gesamtmaße der Struktur betragen ca. 58 x 33 x 31 Å. Die  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Stränge alternieren und sind über kurze Schleifen miteinander verbunden. Dabei sind die  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Stränge nahezu parallel zueinander und parallel zu einer gemeinsamen Symmetrieachse angeordnet. Um diese Symmetrieachse ist das Protein bogenartig gekrümmt. In diesem Bogen bilden die  $\alpha$ -Helices die konvexe Seite und die  $\beta$ -Stränge die konkave Seite, wodurch auf dieser Seite ein paralleles  $\beta$ -Faltblatt entsteht (Abbildung 3.7).

Die LRR-Domäne des humanen Nalp1 hat eine kompakte Struktur mit einer Vielzahl von geladenen Aminosäuren an der Oberfläche (Abbildung 3.8), jedoch zeigt das elektrostatische Oberflächenpotential keine ausgedehnten Cluster positiver oder negativer Ladung (Abbildung 3.8). Allerdings lassen sich strukturelle Auffälligkeiten auf der Proteinoberfläche beobachten. Auf der konkaven Seite des Proteins formen die Aminosäuren des fünften  $\beta$ -Strangs (AS 926-928) eine tiefe Grube (Abbildung 3.8 A). Diese Grube ist von den geladenen Seitenketten der Aminosäuren Q900, E926, D928 und R955 umgeben, die eine Art Trichter formen (Abbildung 3.8 A und 3.9). Für Arginin (R955) konnten zwei Seitenkettenkonformationen bestimmt werden. Die übrigen Aminosäureseitenketten, die den Trichter um die Grube herum formen, waren während des Verfeinerungsprozesses durch klar definierte Elektronendichten eindeutig zu positionieren. Abgeschirmt wird die Grube durch ein weiteres Arginin (R986), das vom C-Terminus über die konkave Fläche ragt (Abbildung 3.8 A). Für dieses Arginin (R986) konnten bei der Strukturverfeinerung drei Konformationen der Seitenkette bestimmt werden.

In der Oberflächendarstellung des Proteins kann man beim Blick auf die Frontseite der ersten Leucin-reichen Wiederholung sehr deutlich den hydrophoben Kern des Proteins sehen (Abbildung 3.8 A). Dieser wird hauptsächlich durch die konservierten Leucine ausgefüllt. Die konvexe Seite der Kristallstruktur zeigt in weiten Bereichen eine sehr unebene Oberfläche (Abbildung 3.8 C). Eine solch markante Grube wie auf der konkaven Seite findet sich hier jedoch nicht.

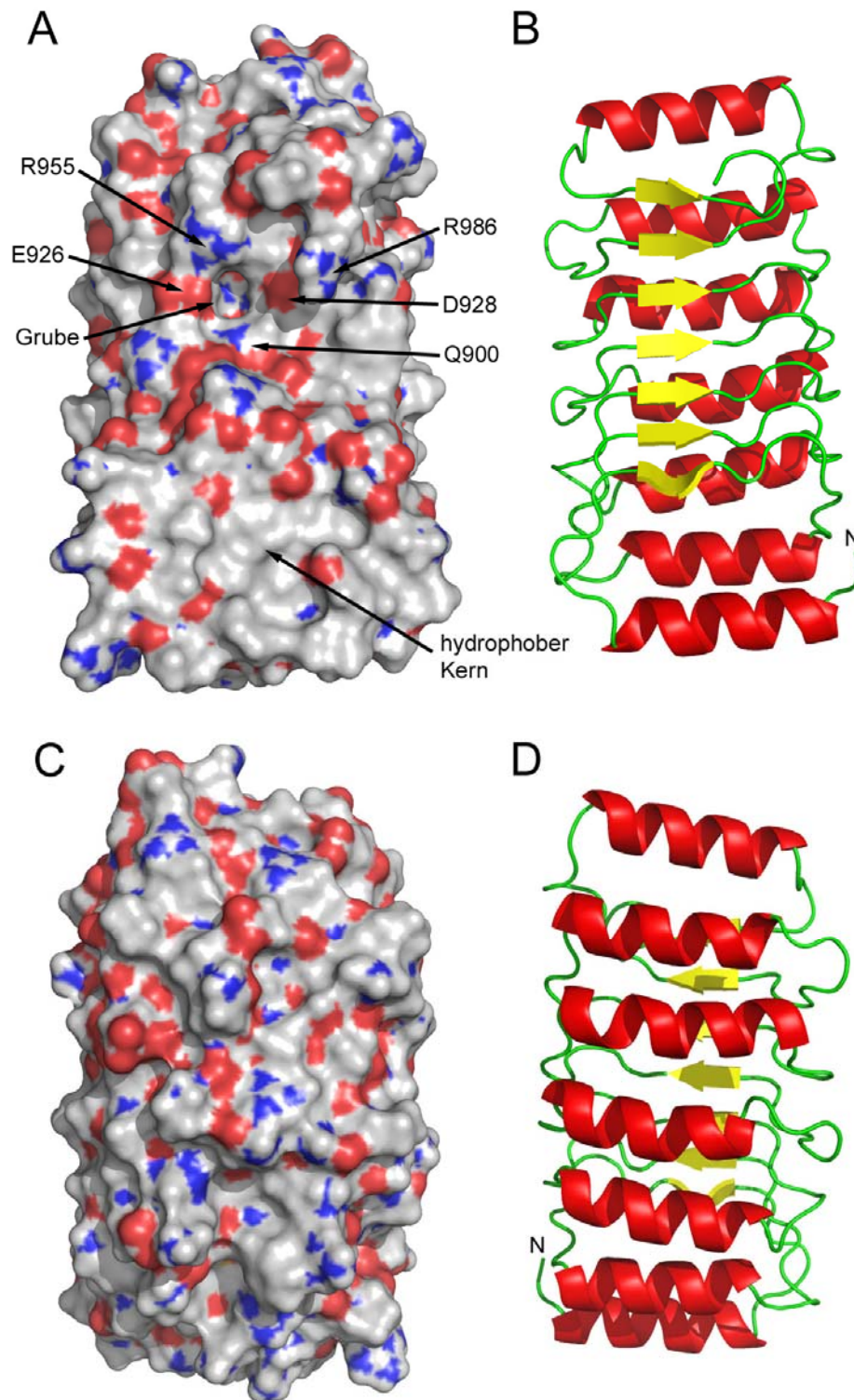


Abbildung 3.8: Darstellung der hNalp1-LRR Struktur als elektrostatisches Oberflächenpotential. (A) Blick auf die konkave Seite des Proteins (rot, negativ geladen; blau, positiv geladen; grau, ungeladen). Die Grube, die vom fünften  $\beta$ -Strang gebildet wird, ist deutlich zu sehen. Die Grube ist umgeben von positiv und negativ geladenen Resten (Q900, E926, D928, R955). Vom C-Terminus aus ragt das R986 über die konkave Fläche in Richtung der Grube. Im unteren Bereich der Struktur blickt man direkt auf das Innere der ersten LRR mit dem hydrophoben Kern. (B) Blickrichtung wie A mit Darstellung der Sekundärstrukturelemente, der N-Terminus ist gekennzeichnet. (C) Blick auf die konvexe Seite des Proteins (rot, negativ geladen; blau, positiv geladen; grau, ungeladen). Eine solch markante Grube wie auf der konkaven Seite ist nicht zu erkennen. (D) Blickrichtung wie C mit Darstellung der Sekundärstrukturelemente, der N-Terminus ist gekennzeichnet. Die Abbildung wurde mit den Programmen PyMOL (DeLano Scientific LLC) und Photoshop (Adobe) erstellt.



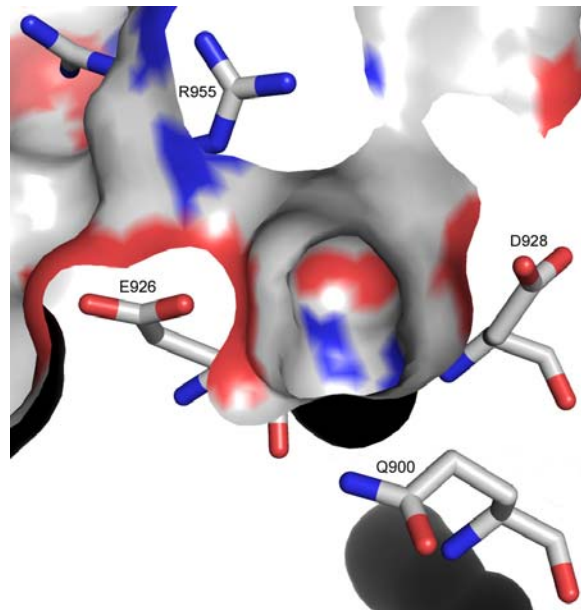


Abbildung 3.9: Grube auf der konkaven Seite.

Die vier Aminosäuren Q900, E926, D928 und R955 sind in Strichdarstellung gezeigt. Sie bilden eine Art Trichter um die Grube. Für das Arginin (R955) konnten im Verlauf der Strukturverfeinerung zwei Konformationen der Seitenkette bestimmt werden. Die Abbildung wurde mit den Programmen PyMOL (DeLano Scientific LLC) und Photoshop (Adobe) erstellt.

Die LRR-Domäne des hNalp1 wird alternierend aus Leucin-reichen Wiederholungen des Typ A und Typ B gebildet, wobei sie mit einer LRR des Typ B beginnt. Eine LRR des Typ A besteht aus 28 Aminosäuren mit einem konservierten Cystein an Position 9, eine LRR des Typ B besteht aus 29 Aminosäuren mit einem konservierten Asparagin an Position 9<sup>150</sup> (Abbildung 3.10 A und B). In beiden LRR Typen haben die Helices der konvexen Seite eine Länge von 11-13 Aminosäuren. Die charakteristischen  $\beta$ -Stränge der konkaven Seite sind sehr kurz und umfassen nur die drei Aminosäuren der Positionen 3-5 der Konsensussequenz (Abbildung 3.10 A und B), definiert mit dem Programm DSSP<sup>193</sup>. Jeder dieser  $\beta$ -Stränge formt dabei jeweils drei Wasserstoffbrückenbindungen mit dem benachbarten  $\beta$ -Strang innerhalb des  $\beta$ -Faltblatts (Abbildung 3.11).

Innerhalb einer LRR übernehmen die konservierten Leucine eine wichtige strukturelle Funktion. Ihre Seitenketten zeigen ins Innere und bilden so den hydrophoben Kern des Proteins (Abbildung 3.10 A und B).

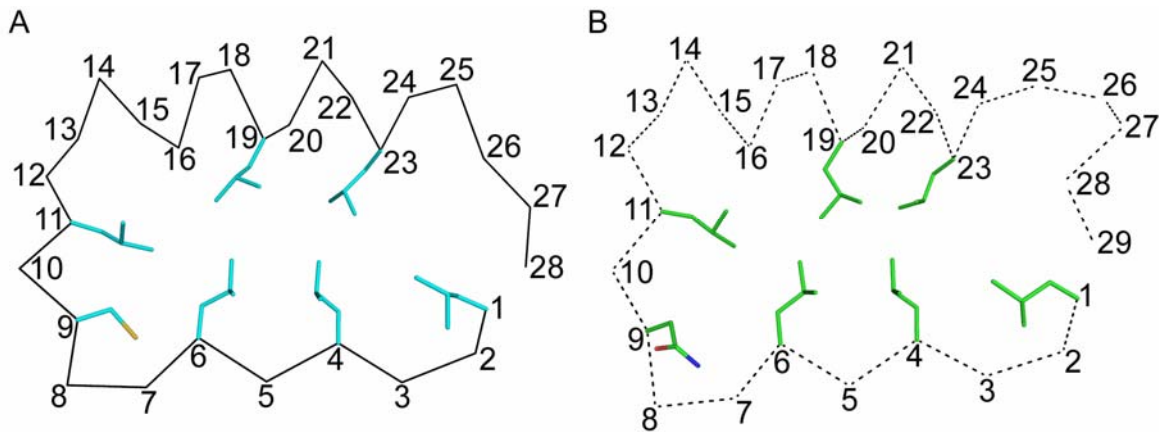


Abbildung 3.10: Vergleich zwischen LRR Typ A und Typ B von hNalp1.

(A) Erste Typ A LRR von hNalp1-LRR. Gezeigt ist die Hauptkette des Proteinrückgrates (durchgezogene, schwarze Linie) mit Nummerierung der  $C\alpha$ -Atome. Zusätzlich sind die Seitenketten der hoch konservierten Aminosäuren der Konsensussequenz eingezeichnet (türkis). Die Leucine (Pos. 1; 4; 6; 11; 19; 23) formen den hydrophoben Kern des Proteins. Das konservierte Cystein (Pos. 9) übernimmt ebenfalls strukturelle Aufgaben. (B) Erste Typ B LRR von hNalp1-LRR. Die Hauptkette des Proteinrückgrates (gestrichelte, schwarze Linie) mit Nummerierung der  $C\alpha$ -Atome ist dargestellt. Wie bei der Typ A LRR bilden die konservierten Aminosäureseitenketten (grün) das hydrophobe Proteininnere. An Pos. 9 befindet sich ein Asparagin anstelle des Cysteins. Die Abbildung wurde mit den Programmen PyMOL (DeLano Scientific LLC) und Photoshop (Adobe) erstellt.

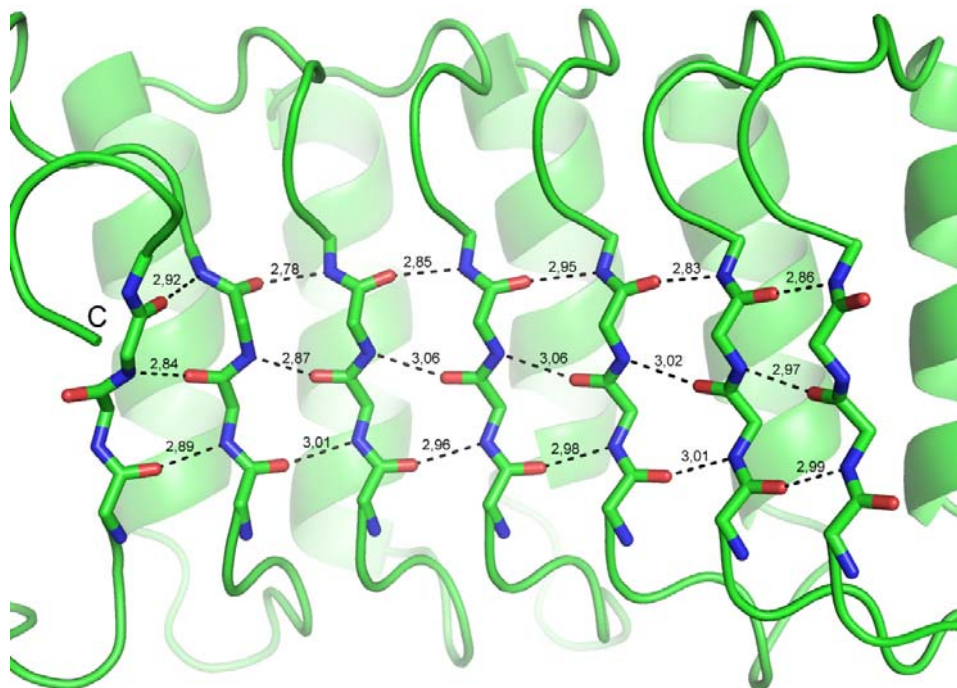
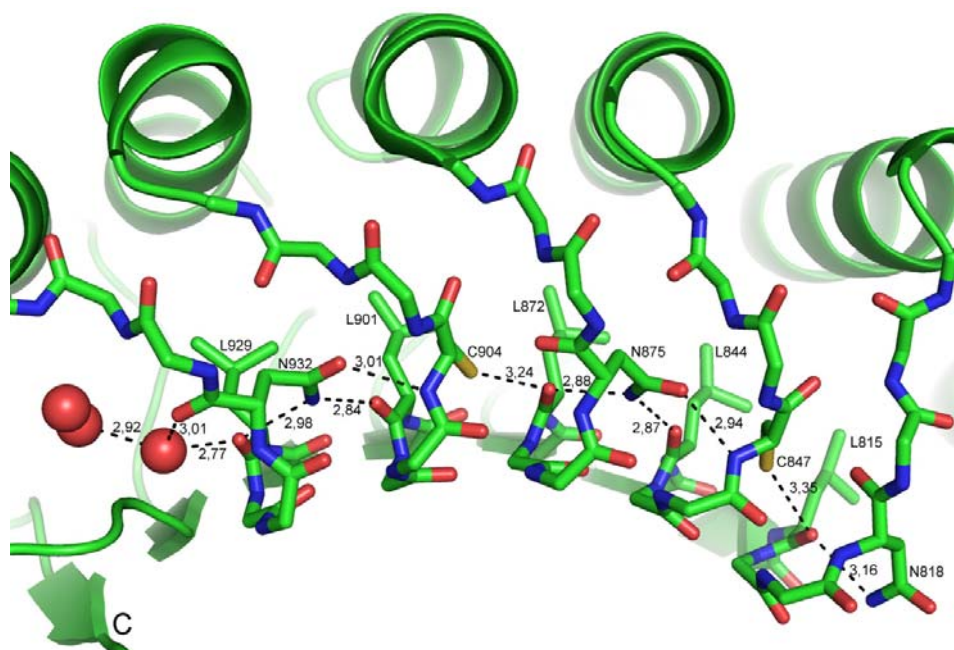


Abbildung 3.11: Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des  $\beta$ -Faltblatts von hNalp1-LRR.

Die Proteinhauptkette ist schematisch in grün dargestellt. Auf der konkaven Seite sind die Hauptkettenatome der am  $\beta$ -Faltblatt beteiligten Aminosäuren als Balkendarstellung hervorgehoben. Dabei sind C-Atome grün, N-Atome blau und O-Atome rot dargestellt. Die Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte Linien) sind unter Angabe der Abstände (in Å) eingezeichnet. Die Abbildung wurde mit den Programmen PyMOL (DeLano Scientific LLC) und Photoshop (Adobe) erstellt.



Neben den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den  $\beta$ -Strängen benachbarter LRR auf der konkaven Seite gibt es noch weitere Elemente, die diese bogenartig gekrümmte Struktur des Proteins stabilisieren. Dazu gehören die Wasserstoffbrücken, welche die Aminosäureseitenketten der konservierten Cysteine und Asparagine (Konsensusposition 9) mit dem Proteinrückgrat bilden (Abbildung 3.12). Die Cysteine bilden dabei eine H-Brücke zwischen ihrem S-Atom und dem O-Atom eines Leucin aus der vorangegangenen LRR (Konsensusposition 6) und eine zweite H-Brücke zwischen ihrem N-Atom und dem Seitenketten O-Atom des Asparagins aus der nachfolgenden LRR (Abbildung 3.12). Die Asparagine bilden neben dieser H-Brücke mit dem Cystein noch jeweils zwei weitere H-Brücken. Die eine zwischen ihrem Seitenketten N-Atom und dem O-Atom eines Leucins (Konsensusposition 6) derselben LRR und die andere zwischen ihrem Seitenketten N-Atom und dem O-Atom eines Leucins (Konsensusposition 6) der vorangegangenen LRR (Abbildung 3.12).



**Abbildung 3.12:** Wasserstoffbrückenbindungen der Asparagin/Cystein-Leiter innerhalb von hNalp1-LRR. Die Proteinhauptkette ist schematisch in grün dargestellt. In den aufsteigenden Schleifen sind die Hauptkette sowie die Aminosäuren, die an den Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind, als Balkendarstellung hervorgehoben. Dabei sind C-Atome grün, N-Atome blau, O-Atome rot und S-Atome gelb dargestellt. Die Nummern der Aminosäuren sind angegeben. Die Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte Linien) sind unter Angabe der Abstände (in Å) eingezeichnet. Zwischen der letzten und der vorletzten LRR übernehmen drei Wassermoleküle (rote Kugeln) die stabilisierende Aufgabe des in der letzten LRR fehlenden Cysteins. Die Abbildung wurde mit den Programmen PyMOL (DeLano Scientific LLC) und Photoshop (Adobe) erstellt.

Diese Wasserstoffbrücken ziehen sich vom N-terminalen bis zum C-terminalen Ende der LRR-Domäne über die gesamte Seite der aufsteigenden Schleifen und sind bei vielen LRR Proteinen zu finden. In Abhängigkeit der vorliegenden Aminosäuren werden sie als Asparagin-, Cystein- oder, wie in diesem Fall, als Asparagin/Cystein-Leiter bezeichnet. Das fehlende Cystein in der sechsten LRR des hNalp1 wird funktionell durch drei Wassermoleküle ersetzt (Abbildung 3.12). Durch einen veränderten Verlauf der aufsteigenden Schleife in der sechsten LRR entsteht der Platz für diese drei Wassermoleküle in der Struktur (Abbildung 3.12 und 3.13). Durch Überlagerung der sechs LRR des hNalp1 werden strukturelle Unterschiede zwischen den einzelnen Wiederholungen deutlich sichtbar (Abbildung 3.13 A). Zwischen den ersten fünf LRR des hNalp1 sind die strukturellen Unterschiede relativ gering. Die markanteste Abweichung ist ein veränderter Hauptkettenverlauf zwischen den beiden LRR Typen A und B. In den Typ B LRR entsteht dabei am C-terminalen Ende der Helix der konvexen Seite eine Ausbuchtung (Abbildung 3.10 und 3.13 A). Diese Ausbuchtung wird durch ein konserviertes Prolin geformt, welches sich an Konsensusposition 26 der Typ B Wiederholungen befindet. Der so veränderte Verlauf der Hauptkette macht die zusätzliche Aminosäure in den Typ B Wiederholungen nötig, um den Ringschluss zur nachfolgenden LRR zu ermöglichen.

Die größten Abweichungen im Vergleich zeigt die sechste LRR des hNalp1 (Abbildung 3.13 A). Der Systematik folgend würde man an dieser Stelle eine LRR des Typs A erwarten. Aber an Position 9 der Konsensussequenz findet sich statt eines Cysteins ein Threonin (T961), außerdem wird das konservierte Leucin der Konsensusposition 23 durch ein Leucin (L974) an Konsensusposition 22 ersetzt. Neben diesen Sequenzanomalien weist die sechste Leucin-reiche Wiederholung auch eine erhebliche strukturelle Abweichung im Vergleich zu den übrigen fünf LRR der Struktur auf (Abbildung 3.13 A und B). Die Hauptkette nimmt im Bereich der aufsteigenden Schleife einen völlig anderen Verlauf als in den übrigen LRR (Abbildung 3.13 B).

Aus der Überlagerung der ersten fünf LRR ergibt sich für die Abweichung der  $\text{C}\alpha$ -Atome zwischen den Typ A Wiederholungen und zwischen den Typ B Wiederholungen in beiden Fällen ein quadratisches Mittel von  $0,7 \text{ \AA}$  und selbst beim Vergleich der beiden Typ A LRR mit der ersten Typ B LRR beträgt das quadratische Mittel der Abweichung zwischen den  $\text{C}\alpha$ -Atomen nur  $0,9 \text{ \AA}$  (Tabelle 3.5). Diese hohe strukturelle Konservierung ermöglicht es, äquivalente Positionen innerhalb der einzelnen LRR zu bestimmen und darüber geometrische Analysen von Abständen und Winkeln zwischen den einzelnen Leucin-reichen Wiederholungen und ihren sekundären Strukturelementen durchzuführen. So lässt sich aus

den Abständen der drei äquivalenten  $C\alpha$ -Atome benachbarter  $\beta$ -Stränge (Konsensuspositionen 3-5) der mittlere Abstand zwischen zwei benachbarten  $\beta$ -Strängen ermitteln, welcher  $4,8 \pm 0,1 \text{ \AA}$  beträgt. Aus elf äquivalenten  $C\alpha$ -Atomen benachbarter Helices (Konsensuspositionen 13-23) lässt sich in gleicher Weise der durchschnittliche Abstand zwischen zwei benachbarten Helices von  $9,2 \pm 1,1 \text{ \AA}$  berechnen. Dieser Unterschied in den mittleren Abständen benachbarter  $\beta$ -Stränge und  $\alpha$ -Helices ist verantwortlich für die bogenartige Krümmung der gesamten Domäne (Abbildung 3.7). Der Gesamtradius dieses Bogens umfasst  $99,6^\circ$ , was einen durchschnittlichen Winkel von  $19,9 \pm 9,5^\circ$  zwischen zwei benachbarten LRR bedeutet. Diese geometrischen Daten der einzelnen Sekundärstrukturelemente sowie deren Abstände und Winkel zueinander und zwischen benachbarten LRR stimmen gut mit den Werten des porcinen Ribonuklease-Inhibitors (pRI) überein<sup>150</sup> (Tabelle 3.5).

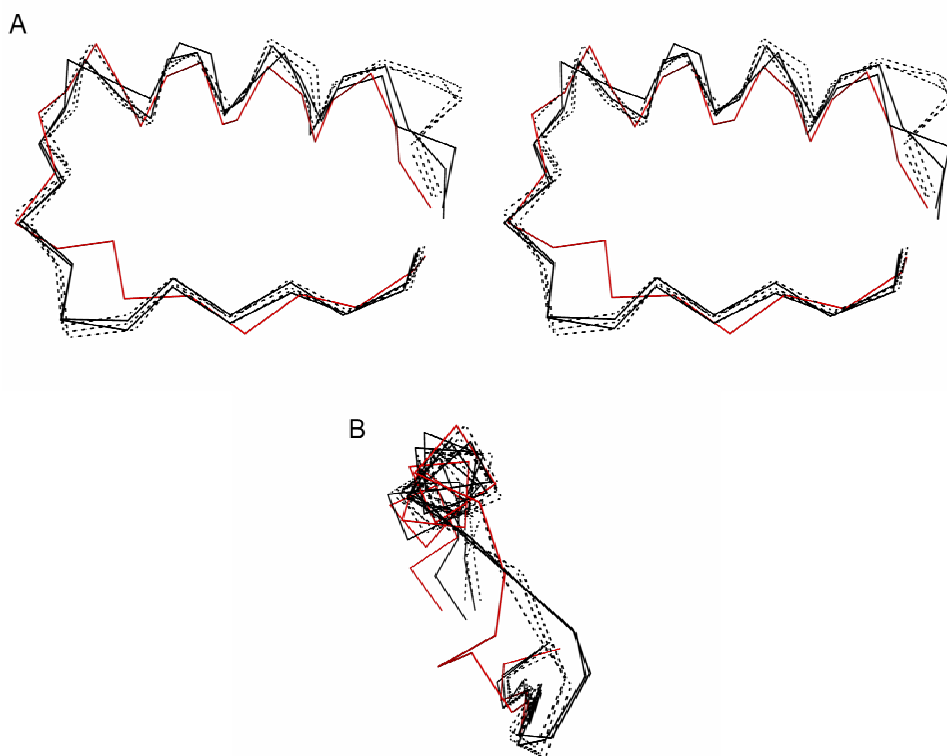


Abbildung 3.13: Überlagerung der sechs LRR von hNalp1.

(A) Überlagerung der  $C\alpha$ -Atome aller sechs LRR in Stereodarstellung. Die 29 Aminosäuren der ersten Typ B LRR wurden als Basis für die Ausrichtung aller Typ B (gestrichelte, schwarze Linien) und Typ A (durchgezogene, schwarze Linien) LRR verwendet. Die ersten fünf LRR des hNalp1(791-990) zeigen eine große strukturelle Übereinstimmung. Lediglich durch das konservierte Prolin (Pos. 26) in den Typ B LRR weisen diese eine Ausbuchtung am C-terminalen Ende der Helix der konvexen Seite auf. Eine starke Abweichung von der strukturellen Einheitlichkeit zeigt die sechste LRR (durchgezogene, rote Linie). Mit 28 Aminosäuren hat sie die Länge einer Typ A LRR, ihr fehlt jedoch das konservierte Cystein an Pos. 9. Genau in diesem Bereich bestehen auch die größten strukturellen Unterschiede. Zu Beginn der aufsteigenden Schleife nimmt die Hauptkette einen deutlich anderen Verlauf als die übrigen LRR. (B) Blickrichtung aus A um  $90^\circ$  gedreht mit Blick auf die aufsteigende Schleife. Der abweichende Hauptkettenverlauf der sechsten LRR lässt sich sehr gut erkennen. Die Abbildung wurde mit den Programmen PyMOL (DeLano Scientific LLC) und Photoshop (Adobe) erstellt.

Tabelle 3.5: Vergleich einzelner geometrischer Parameter von pRI und hNalp1-LRR.

Parameter	pRI	hNalp1-LRR
Länge der $\beta$ -Stränge *	3 AS	3 AS
Länge der Helices *	11-13 AS	11-13 AS
Länge der Schleifen	4-9 AS	4-8 AS
Abstand zwischen benachbarten $\beta$ -Strängen	$4,8 \pm 0,1 \text{ \AA}$	$4,8 \pm 0,1 \text{ \AA}$
Abstand zwischen benachbarten Helices	$9,3 \pm 1,1 \text{ \AA}$	$9,2 \pm 1,1 \text{ \AA}$
H-Brücken zwischen benachbarten $\beta$ -Strängen	3	3
Winkel zwischen benachbarten Helices	$12,7 \pm 5,3^\circ$	$19,9 \pm 9,5^\circ$
Mittlere quadrat. Abweichung zwischen Typ A LRR	$0,9 \text{ \AA}$	$0,7 \text{ \AA}$
Mittlere quadrat. Abweichung zwischen Typ B LRR	$1,0 \text{ \AA}$	$0,7 \text{ \AA}$
Mittlere quadrat. Abweichung zwischen Typ A und Typ B LRR	$1,7 \text{ \AA}$	$0,9 \text{ \AA}$
*) Bestimmt mit dem Programm DSSP		

Die gute geometrische Übereinstimmung zwischen der LRR-Domäne von hNalp1 und dem porcinen Ribonuklease-Inhibitor wird noch deutlicher, wenn man sich eine Überlagerung der  $\alpha$ -Ketten von hNalp1-LRR und pRI (pdb id: 2bnh) anschaut (Abbildung 3.14). Bei diesem Vergleich überlagern die beiden Strukturen jeweils vom C-Terminus an. Dabei ist gut zu erkennen, dass die strukturelle Übereinstimmung bei den C-terminalen LRR am größten ist. Hier sind die sekundären Strukturelemente von konkaver und konvexer Seite in der Überlagerung teilweise deckungsgleich (Abbildung 3.14 A und B). Mit zunehmendem Verlauf Richtung N-Terminus kommt es vor allem auf der konvexen Seite bei den Helices zu Abweichungen (Abbildung 3.14 B). Dies ist mit dem größeren Winkel zwischen benachbarten Helices beim hNalp1-LRR im Vergleich zum pRI zu erklären (Tabelle 3.5), wodurch das Protein einen anderen Krümmungswinkel erhält. Die aufsteigenden und absteigenden Schleifen der beiden Strukturen verlaufen über weite Bereiche parallel zueinander (Abbildung 3.14 A).

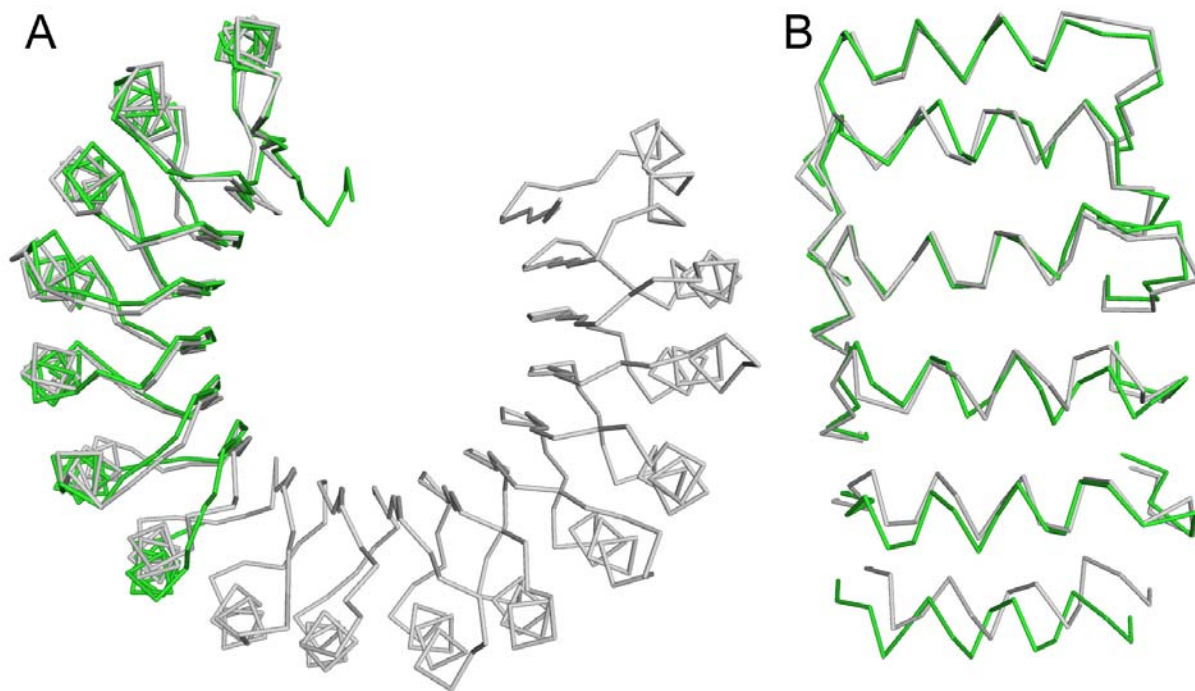


Abbildung 3.14: Überlagerung der C $\alpha$ -Ketten von hNalp1-LRR und porcinem Ribonuklease-Inhibitor (pRI). (A) Blickrichtung auf die Seite der absteigenden Schleifen (grün, hNalp1-LRR; grau, pRI). Die Strukturen überlagern beginnend von ihrem jeweiligen C-Terminus an. In diesem Bereich ist die strukturelle Übereinstimmung der Sekundärstrukturelemente am höchsten und nimmt Richtung N-Terminus ab. (B) wie A, Blickrichtung um 90° rotiert auf die Helices der konvexe Seite. Im oberen (C-terminalen) Bereich der Strukturen ist die hohe Übereinstimmung zwischen den Helices gut zu erkennen. In Richtung N-Terminus werden die Verschiebungen größer. Die Abbildung wurde mit den Programmen PyMOL (DeLano Scientific LLC) und Photoshop (Adobe) erstellt.

### 3.3 Biophysikalische Analyse einer Interaktion zwischen hNalp1-LRR und MDP

Faustin *et al.* haben 2007 experimentell die aktivierende Eigenschaft des N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (Muramyllopeptid, MDP-LD) auf hNalp1 in einem zellfreien System indirekt durch Nachweis der Caspase-1 Aktivierung gezeigt<sup>38</sup>. Dabei wurde eine Enantiomerenspezifität festgestellt, wonach MDP-LD aktivierend wirkte, das Enantiomer MDP-DD hingegen nicht (Abbildung 3.15). Das lässt auf eine sehr spezifische Interaktion schließen. In vielen LRR enthaltenden Rezeptoren stellt die LRR-Domäne die Liganden bindende Domäne dar<sup>194-199</sup>. Auf dieser Grundlage und den Ergebnissen von Faustin *et al.* wurde gefolgert, dass dies auch beim hNalp1 der Fall sein könnte und MDP-LD als Ligand an die LRR-Domäne von hNalp1 bindet. Da bei allen nachfolgend beschriebenen Versuchen nur das aktivierend wirkende MDP-LD Enantiomer zum Einsatz kam, wird dieses der Einfachheit halber im Folgenden mit MDP bezeichnet.

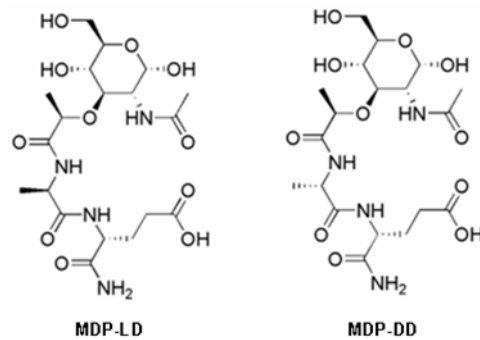


Abbildung 3.15: Die beiden Enantiomere des Muramyl dipeptid (MDP).

Links das Nalp1 aktivierende N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (MDP-LD), rechts das N-Acetylmuramyl-D-alanyl-D-isoglutamin (MDP-DD), welches nicht aktivierend wirkt. (Invivogen, modifiziert)

### 3.3.1 Ligandenbindungsstudie mit Isothermaler Titrationskalorimetrie

Die Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) stellt ein klassisches Verfahren zur quantitativen Untersuchung und thermodynamischen Beschreibung von chemischen Reaktionen dar. Im Fall einer Komplexbildung zweier Moleküle lässt sich aus der direkten Messung der Enthalpieänderung ( $\Delta H$ ) die Bindungskonstante  $K$  berechnen (Kap. 2.6.5). Mit dieser Methode sollte eine mögliche Interaktion zwischen hNalp1-LRR und MDP charakterisiert werden (Abbildung 3.16).

Für die Aufreinigung des Proteins hNalp1-LRR ist ein MES Puffersystem bei pH 6,5 verwendet worden, weil sich das Protein in diesem Puffer als sehr stabil erwies. Am Ende der Aufreinigung befand sich das Protein hNalp1-LRR in Protein-Puffer B (Kap. 2.1.1), der ebenfalls über MES bei pH 6,5 gepuffert war. Das von Faustin *et al.* verwendete Puffersystem war HEPES (pH 7,5). Um negative Auswirkungen des geringeren pH-Wertes auf eine Interaktion zwischen hNalp1-LRR und MDP auszuschließen, wurde für die ITC sowohl Protein-Puffer B als auch HEPES-Puffer verwendet. Zusätzlich wurden auch Salz-freie Varianten dieser Puffer getestet, die jedoch zur Präzipitation des Proteins führten. Bei den Messungen wurde, wenn möglich, ein zehnfacher molarer Überschuss in der Spritze gegenüber der Zelle eingesetzt. Dabei wurde sowohl hNalp1-LRR in der Messzelle vorgelegt und das MDP titriert, als auch umgekehrt. Außerdem wurden Messungen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt (Abbildung 3.16).

In den Messungen, bei denen hNalp1-LRR in die Messzelle vorgelegt und MDP aus der Spritze titriert wurde, sind die einzelnen Injektionsspitzen kaum vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden (Abbildung 3.16 A).

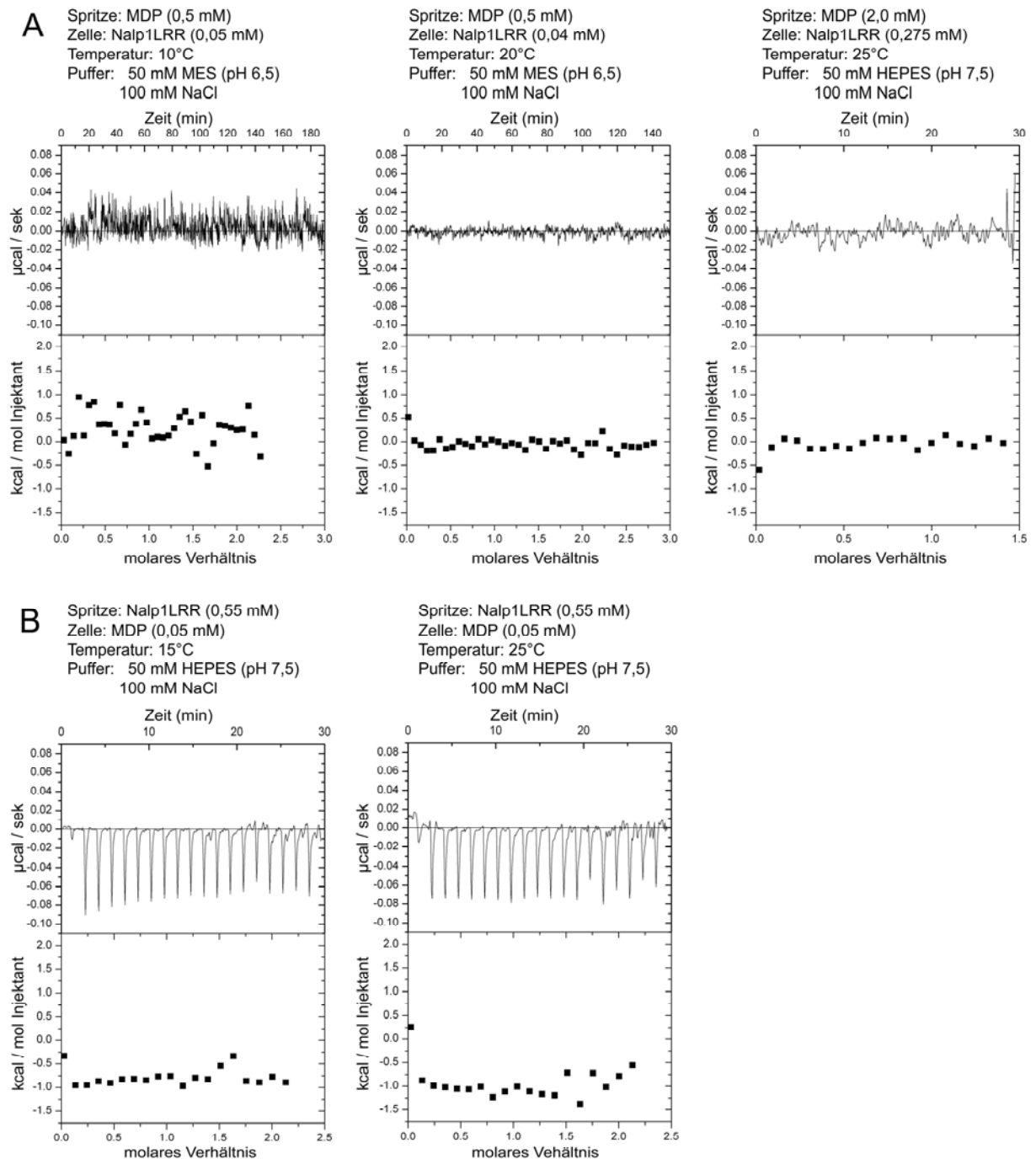


Abbildung 3.16: Isothermale Titrationskalorimetrie zum Interaktionsnachweis von hNalp1-LRR und MDP.

(A) Zu Beginn der Messung wurde hNalp1-LRR in die Messzelle und MDP in die Spritze in den angegebenen Konzentrationen vorgelegt. Die jeweiligen Temperatur- und Pufferbedingungen sind ebenfalls angegeben. Durch einzelne Injektionen in regelmäßigen Abständen wurde das MDP in die Zelle titriert. Im oberen Teil jedes Diagramms ist dabei die Heizleistung an der Messzelle dargestellt, die bei den Injektionen vom Gerät aufgebracht wird, um die Temperatur in der Zelle konstant zu halten, wobei einzelne Injektionsspitzen nicht zu erkennen sind. Der untere Diagrammteil zeigt die Auswertung, die jedoch in diesen Fällen nicht möglich war. (B) Hier wurde MDP in die Messzelle und hNalp1-LRR in die Spritze in den angegebenen Konzentrationen vorgelegt. Temperatur und Pufferbedingungen sind ebenfalls aufgeführt. Die Spitzen der einzelnen Injektionen sind deutlich zu erkennen, nehmen jedoch in ihrer Größe nicht ab, was auf keine Sättigung bei einer möglichen Komplexbildung schließen lässt. Dies zeigt auch die Auswertung im unteren Teil.

Besonders gut zu sehen ist dies bei den Messungen, die bei einer Temperatur von 10°C, d.h. unterhalb der Raumtemperatur (20°C) durchgeführt wurden (Abbildung 3.16 A). Aus technischen Gründen konnte nur die Messzelle konstant gekühlt werden. Die Spritze konnte lediglich mit vorgekühlter Lösung befüllt, aber nicht während der Messung weiter temperiert werden, so dass es hier zu einer kontinuierlichen Erwärmung der Spritzenlösung über die Zeit kommt. Dies allein führt schon unweigerlich zu einer Enthalpieänderung in der Zelle bei jeder Injektion und damit zur Verstärkung des Hintergrundrauschens. Um diesen Effekt etwas zu mildern, wurden neben Messungen unterhalb der Raumtemperatur auch Messungen bei 20°C und darüber durchgeführt. Um die Temperaturstabilität des Proteins während der Messung zu gewährleisten, wurde auf Messungen bei Temperaturen über 25°C verzichtet. Die Tatsache, dass in den MDP Titrationsexperimenten einzelne Injektionsspitzen nicht zu differenzieren sind, macht eine Auswertung dieser Messungen unmöglich (Abbildung 3.16 A).

In den Versuchen, in denen MDP in der Messzelle vorgelegt und hNalp1-LRR titriert wurde, sind die einzelnen Injektionsspitzen deutlich sichtbar (Abbildung 3.16 B). Die Ausschläge nach unten bedeuten dabei eine Verringerung der Heizleistung des Gerätes, als Reaktion auf eine Temperaturzunahme nach jeder einzelnen Injektion. Dies kann durch eine exotherme Reaktion innerhalb der Zelle hervorgerufen werden, wie sie bei der Komplexbildung von Molekülen stattfinden kann. Die Auswertung zeigt jedoch, dass es zu keiner Abnahme der freigesetzten Wärmemenge pro Injektion über die Zeit kommt. Mittels ITC konnte daher keine Bindung von MDP an hNalp1-LRR nachgewiesen werden.

### 3.3.2 Ligandenbindungsstudie mit Fern-UV CD-Spektroskopie

Wenn es zu einer Interaktion zwischen Nalp1-LRR und MDP käme und diese Wechselwirkung einen Einfluss auf die Sekundärstrukturelemente oder die Thermostabilität der LRR-Domäne hätte, wäre dies mit Hilfe der Fern-UV CD-Spektroskopie zu detektieren (Kap. 2.6.6). Um mit diesem Verfahren eine mögliche Wechselwirkung zwischen den beiden potenziellen Bindungspartnern zeigen zu können, wurden die Elliptizität (Grad der unterschiedlichen Absorption von rechts- und links-polarisiertem Licht, Kap. 2.6.6) und die Thermostabilität von hNalp1-LRR alleine und hNalp1-LRR mit MDP miteinander verglichen. Die Messungen wurden in CD-Puffer (Kap. 2.1.1) durchgeführt. Zu Beginn war es deshalb nötig zu überprüfen, ob das Protein unter den Bedingungen des CD-Puffers seine Sekundärstruktur und damit seine Stabilität beibehält. Hierzu wurden CD-Spektren von



hNalp1-LRR im Fern-UV Bereich ( $\lambda = 170\text{-}260\text{ nm}$ ) bei einer Temperatur von  $10^\circ\text{C}$  aufgenommen. Die dabei ermittelte Elliptizität  $\Theta$  wurde gegen die Wellenlänge  $\lambda$  aufgetragen (Abbildung 3.17). Zur Validierung der Daten wurden 15 Messungen gemittelt. Das Ergebnis war ein Spektrum mit einem globalen Maximum bei ca. 195 nm und einem globalen Minimum bei ca. 220 nm. Die gemessenen Daten wurden mit der K2D2 Methode auf dem zugehörigen Web-Server<sup>200</sup> analysiert, um die Sekundärstrukturanteile des Proteins zu bestimmen. Diese Auswertung ergab einen  $\alpha$ -Helix Anteil von 87,5 % und einen  $\beta$ -Strang Anteil von 0,5 %. Aus der Kristallstruktur ergaben sich dagegen 43 %  $\alpha$ -Helix Anteil und 10 %  $\beta$ -Strang Anteil. Trotz der Unterschiede zwischen berechneten und beobachteten Sekundärstrukturanteilen ließ der hohe berechnete  $\alpha$ -Helix Anteil aus den CD Daten aber den Schluss zu, dass das Protein auch in dem verwendeten CD-Puffer über definierte Sekundärstrukturen verfügt und es nicht zu einer Puffer-bedingten Denaturierung des Proteins kommt. In allen weiteren Messungen wurde daher dieser CD-Puffer verwendet.

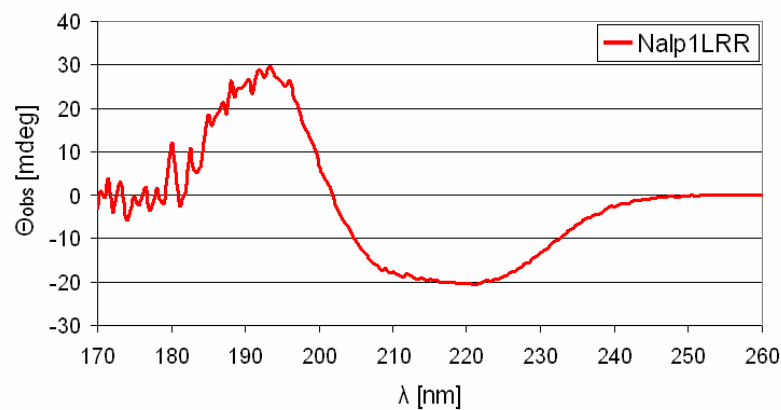


Abbildung 3.17: Fern-UV CD-Spektrum von hNalp1-LRR.

Gemessen wurde im Fern-UV Spektralbereich von  $\lambda = 170\text{-}260\text{ nm}$  um die Stabilität des Proteins im verwendeten CD-Puffer zu testen. Die pufferkorrigierte beobachtete Elliptizität  $\Theta_{\text{obs}}$  von hNalp1-LRR ist gegen die Wellenlänge  $\lambda$  aufgetragen. Das Spektrum zeigt ein globales Maximum bei 195 nm und ein globales Minimum bei 220 nm. Der ausgeprägte Kurvenverlauf deutet auf das Vorhandensein von Sekundärstrukturelementen im Protein hin, woraus sich auf ein stabiles Protein unter den verwendeten Bedingungen schließen lässt.

Von Ansätzen mit hNalp1-LRR alleine und mit MDP wurden CD-Spektren ( $\lambda = 190\text{-}250\text{ nm}$ ) aufgenommen (Abbildung 3.18). Einflüsse des MDP auf die Sekundärstruktur von hNalp1-LRR würden sich dabei durch einen veränderten Kurvenverlauf im Spektrum widerspiegeln. Gemessen wurde mit einer Proteinkonzentration von  $5\ \mu\text{M}$ . Das MDP wurde in einem zehnfachen molaren Überschuss eingesetzt. Es wurden sowohl Messungen direkt nach der Zugabe des MDP durchgeführt als auch Proben gemessen, die nach der MDP Zugabe erst eine Stunde auf Eis inkubiert wurden. Messungen des Puffers alleine und mit MDP dienten als Kontrollen und zur Bestimmung der optischen Aktivität des MDP und wurden bei der Auswertung zur Normalisierung der Messdaten verwendet. Die Auswertung dieser Spektren ergab eine hohe Übereinstimmung im Kurvenverlauf zwischen allen Proben, sowohl mit als auch ohne MDP (Abbildung 3.18 A). Das bedeutet, dass MDP keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur von hNalp1-LRR hat.

Zur Bestimmung der Thermostabilität wurden die einzelnen Proben von  $10^\circ\text{C}$  auf  $65^\circ\text{C}$  erhitzt und danach wieder auf  $10^\circ\text{C}$  heruntergekühlt. Die Rampengeschwindigkeit beim Aufheizen bzw. Abkühlen betrug jeweils  $10^\circ\text{C}$  pro Minute. Im Abstand von  $0,5^\circ\text{C}$  wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 222\text{ nm}$  die Elliptizität  $\Theta$  der Probe gemessen und gegen die Temperatur  $T$  aufgetragen (Abbildung 3.18 B und D). Zu Beginn der Messung sowie am Ende jeder Temperaturrampe wurden von jeder Probe komplette CD-Spektren ( $\lambda = 190\text{-}250\text{ nm}$ ) aufgenommen, um die Veränderungen in der Elliptizität durch Aufheizung und Abkühlung, d.h. Denaturierung und mögliche Rückfaltung genauer zu dokumentieren. Zur Validierung wurden hierbei jeweils 5 Spektren gemittelt. Während des Aufheizens blieb die beobachtete Elliptizität  $\Theta_{\text{obs}}$  der hNalp1-LRR bis zu einer Temperatur von ca.  $55^\circ\text{C}$  relativ konstant im negativen Bereich, bevor sie dann mit fortschreitender Erhöhung der Temperatur auf  $65^\circ\text{C}$  schnell weniger negative Werte einnahm (Abbildung 3.18 B). Dieser Effekt war bei allen Proben, mit und ohne MDP, zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass das MDP die Temperaturstabilität von hNalp1-LRR nicht beeinflusst. Im Fall einer Wechselwirkung von hNalp1-LRR und MDP hätte man eine Stabilisierung oder Destabilisierung des Proteins im Bereich der Interaktionsfläche und damit einen veränderten Schmelzpunkt erwarten können. Die Tatsache, dass dies nicht zu beobachten ist, spricht gegen eine Interaktion der beiden Moleküle MDP und hNalp1-LRR.

Die CD-Spektren, die im Anschluss an das Aufheizen bei einer Temperatur von  $65^\circ\text{C}$  von den Proben gemacht wurden, zeigen in allen Fällen nahezu keine Elliptizität mehr (Abbildung 3.18 C), was auf den vollständigen Verlust der Sekundärstrukturen hindeutet. Ob dieser durch das Aufheizen hervorgerufene Verlust der Sekundärstruktur reversibel ist, wurde

durch die anschließende Rückfaltstudie überprüft. Dazu wurden die auf 65°C aufgeheizten Proben wieder auf 10°C abgekühlt. Es war jedoch nicht möglich, die ursprüngliche Elliptizität des Proteins wieder zu erreichen (Abbildung 3.18 D), das heißt eine Rückfaltung hat nicht stattgefunden.

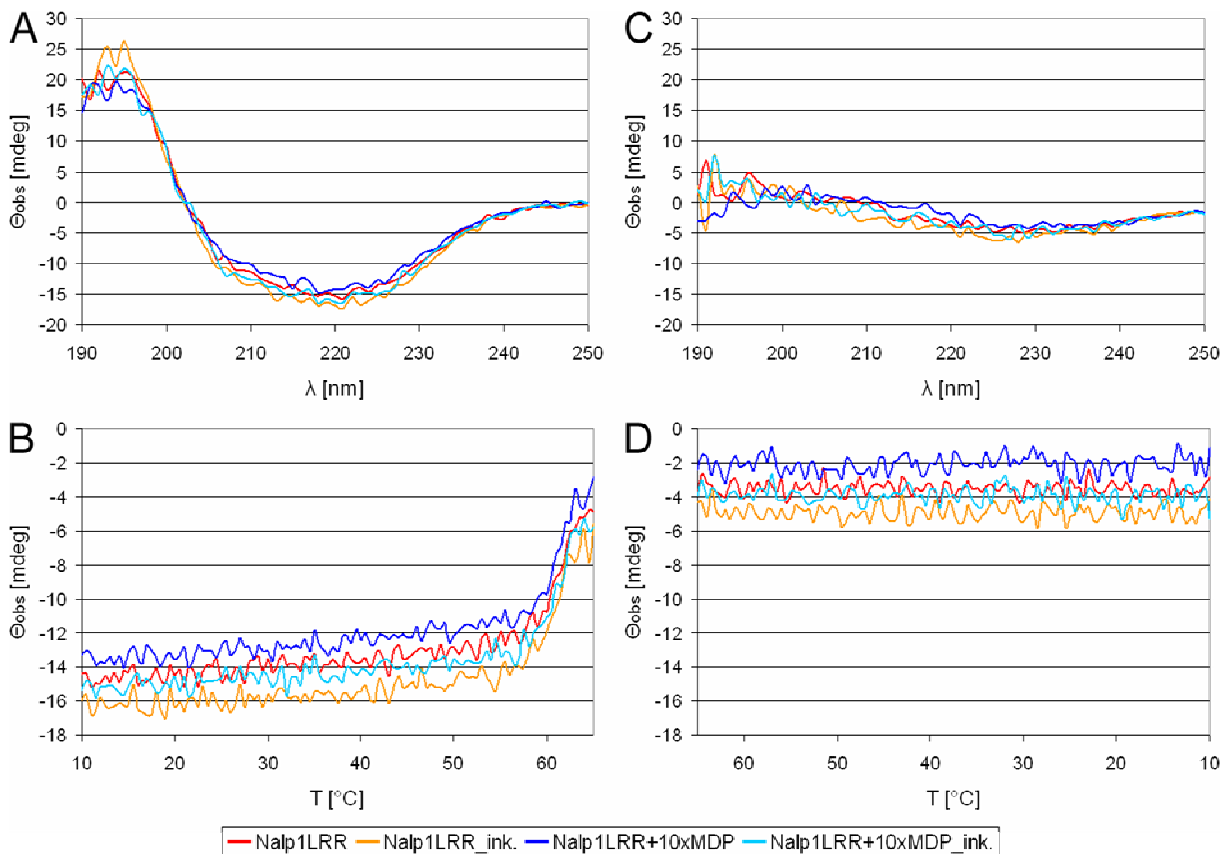


Abbildung 3.18: Analyse der Thermostabilität von hNalp1-LRR.

(A) CD-Spektren, aufgenommen bei 10°C vor Beginn der Thermostabilitätsanalyse. Die Ansätze enthielten hNalp1-LRR alleine oder zusätzlich einen 10-fachen molaren Überschuss MDP. Die Hälfte der Proben wurde vor der Messung eine Stunde auf Eis inkubiert (ink.). Die pufferkorrigierte beobachtete Elliptizität  $\Theta_{\text{obs}}$  ist gegen die Wellenlänge  $\lambda$  aufgetragen. Alle Spektren zeigen einen ähnlichen Verlauf, mit einem globalen Maximum bei 195 nm und einem globalen Minimum bei 220 nm. (B) Bei der Thermostabilitätsanalyse wurden die Proben von 10°C auf 65°C aufgeheizt, wobei die Temperatursteigerung 10°C pro Minute betrug. Die beobachtete Elliptizität  $\Theta_{\text{obs}}$  wurde gegen die Temperatur  $T$  aufgetragen. Bis 55°C bleiben die Werte recht konstant im negativen Bereich, ab 55°C bewegen sich die Kurven dann jedoch schnell in Richtung weniger negativer Werte. (C) CD-Spektren, die bei 65°C nach der Thermostabilitätsanalyse aufgenommen wurden. Darstellung wie in A. Die beobachtete Elliptizität  $\Theta_{\text{obs}}$  hat im Vergleich zu A deutlich abgenommen. (D) Rückfaltstudie, bei der die Proben um 10°C pro Minute von 65°C auf 10°C abgekühlt wurden. Darstellung wie in B. Die Ausgangswerte der beobachteten Elliptizität  $\Theta_{\text{obs}}$  von B werden jedoch nicht wieder erreicht.

### 3.3.3 Ligandenbindungsstudie mit Fluoreszenz- und Polarisationspektroskopie

Da mit der CD-Spektroskopie kein Einfluss von MDP auf hNalp1-LRR beobachtet werden konnte, wurde für den Nachweis einer möglichen Komplexbildung zwischen diesen beiden Molekülen auf die Methode der Fluoreszenzspektroskopie (Kap. 2.6.7) gewechselt. Dabei wurden zwei Strategien parallel verfolgt. Zum einen sollte die intrinsische Fluoreszenz des Proteins genutzt werden, um eine Komplexbildung nachweisen zu können. Dazu sollten die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin als intrinsische Fluorophore dienen. Kommt es bei einer Komplexbildung mit MDP zu einer Veränderung in ihrer Umgebung, würden sich ihre fluorophoren Eigenschaften verändern, was man an einer Veränderung im Fluoreszenzspektrum erkennen könnte (Kap. 2.6.7). Insgesamt verfügt hNalp1-LRR über sechs aromatische Aminosäuren, darunter jedoch nur ein Tryptophan und ein Tyrosin. Sie befinden sich hauptsächlich in den terminalen Bereichen bzw. auf der konvexen Seite des Proteins (Abbildung 3.19). Falls eine Bindung des MDP an das Protein entfernt von diesen Aminosäuren stattfindet und ihre Umgebung dabei nicht verändert wird, besteht die Möglichkeit, dass sich ihre Fluoreszenzeigenschaften nicht ändern. Diese Möglichkeit muss bei einer vermuteten Bindung auf der konkaven Seite der LRR durchaus in Betracht gezogen werden. Um dies auszuschließen, bedarf es eines Fluorophors, welcher unabhängig von Ort und Art der Interaktion ist. An diesem Punkt setzt die zweite Strategie an. Diese gewünschten Eigenschaften bietet ein kovalent an das MDP gekoppelter Fluorophor, da dieser sich im Fall einer Interaktion in relativer Nähe der beiden Bindungspartner befände. Allerdings birgt solch ein kovalent an das MDP gebundener Fluorophor neben diesem Vorteil auch das Risiko, die gewünschte Interaktion mit dem Protein sterisch zu inhibieren, abhängig von seiner Größe und Position am MDP Molekül. Als Konsequenz hieraus ergibt sich, dass der Fluorophor so gewählt und positioniert sein muss, dass er weder durch seine Größe noch durch seine Lage eine mögliche Bindung verhindert. Ein Fluorophor-markiertes MDP bietet außerdem die Chance, neben der standardmäßigen Verwendung von nicht polarisiertem Licht auch linear polarisiertes Licht einzusetzen, um die sog. Fluoreszenzpolarisation zu messen (Kap. 2.6.7). Bei einer Bindung des Fluorophor-markierten MDP an hNalp1-LRR würde sich der Diffusionskoeffizient des Fluorophor-markierten MDP ändern, weil es in seiner Rotationsfreiheit eingeschränkt würde. Das von ihm erzeugte Polarisationsignal wäre stärker als das des freien, ungebundenen Fluorophor-markierten MDP (Kap. 2.6.7). Dieses Phänomen ist unabhängig vom Abstand des Fluorophors zur möglichen Bindungsstelle und stellt deshalb eine gute weitere Option dar, um eine mögliche Komplexbildung nachzuweisen.

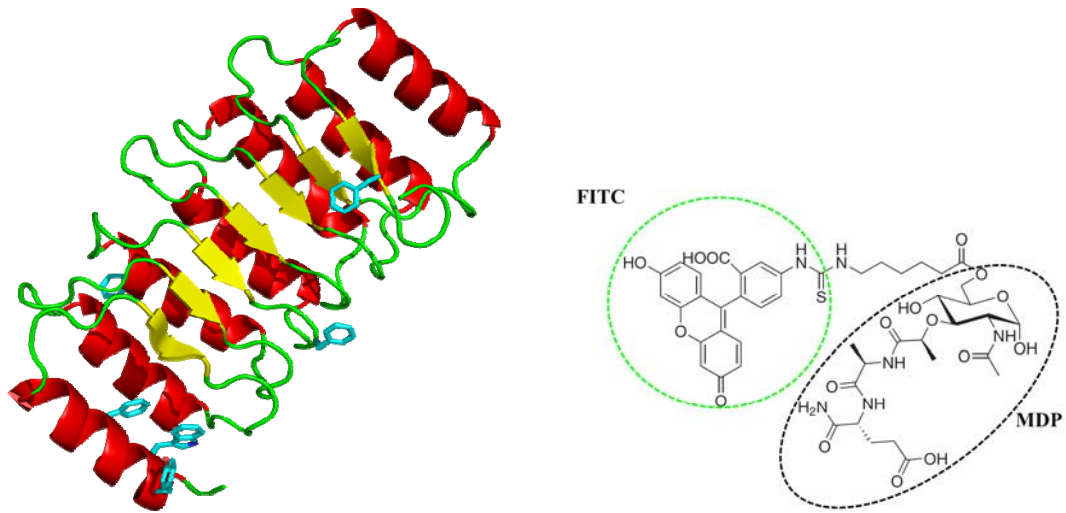
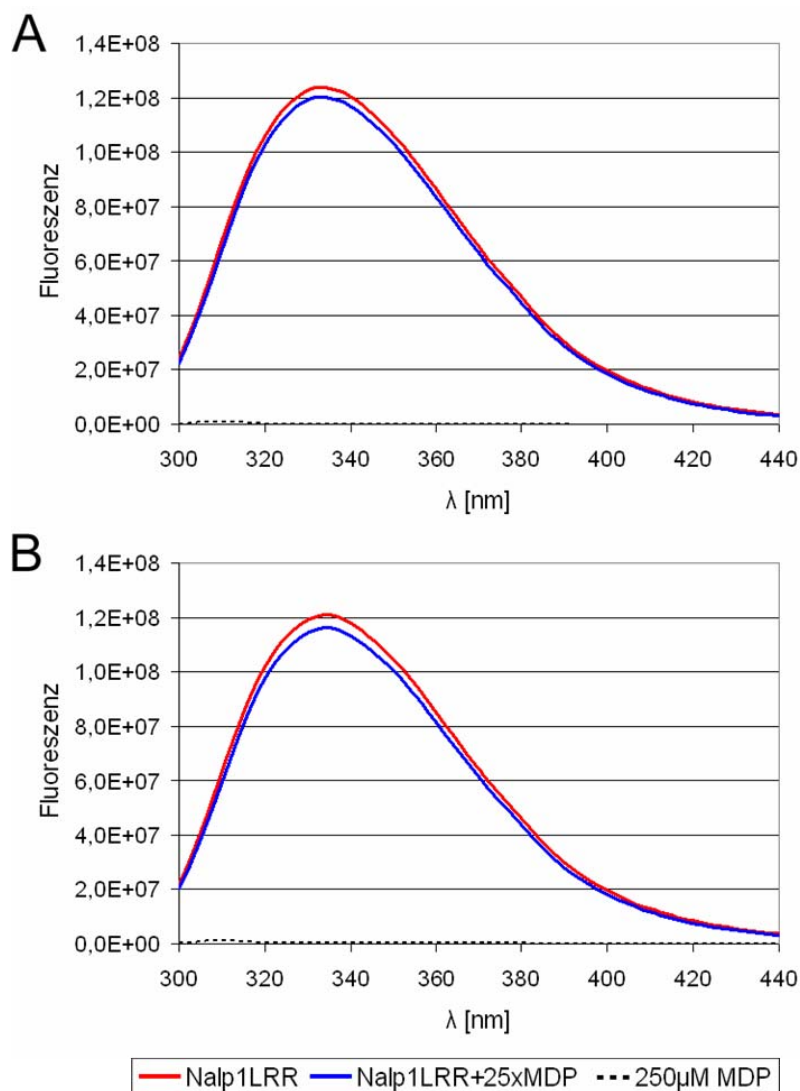


Abbildung 3.19: Intrinsische und extrinsische Fluorophore für die Fluoreszenzspektroskopie. Links: In der Struktur von hNalp1-LRR sind die Seitenketten der als intrinsische Fluorophore agierenden aromatischen Aminosäuren hervorgehoben (blau). Rechts: Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertes MDP. Das FITC ist über ein 6-Aminohexansäure Zwischenstück an die C6-Position der Muramylsäure des MDP gekoppelt und dient so als extrinsischer Fluorophor (Invivogen).

Das MDP war in zwei Fluorophor-gekoppelten Varianten kommerziell erhältlich (Invivogen). Als Fluorophore standen dabei das Fluorescein in Form von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und das Rhodamin B zur Auswahl. Weil das Fluorescein im Gegensatz zum Rhodamin B eine höhere Fluoreszenzlebenszeit besitzt (Fluorescein: 4,1 ns ↔ Rhodamin B: 1,7 ns)<sup>201</sup> fiel die Wahl auf das MDP-FITC. Bei diesem MDP Derivat ist das Fluoresceinisothiocyanat (FITC) kovalent über ein 6-Aminohexansäure Zwischenstück an die C6 Position der Muramylsäure des MDP gekoppelt (Abbildung 3.19).

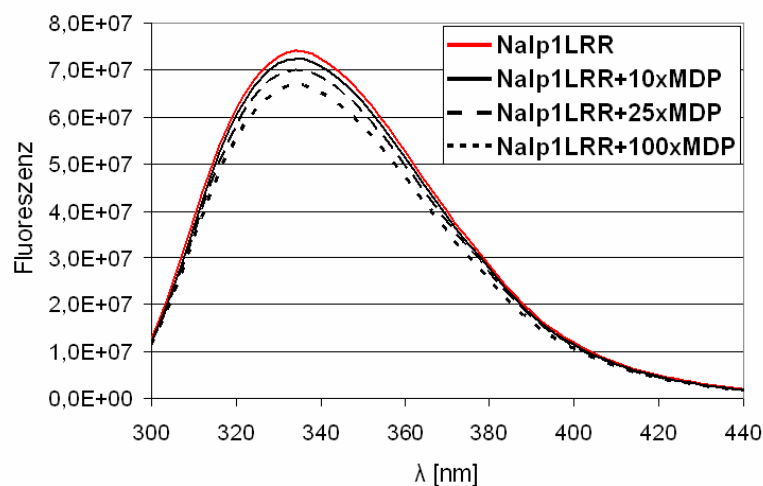
Für die Fluoreszenzspektroskopie mit den aromatischen Aminosäuren als intrinsische Fluorophore wurden 10  $\mu\text{M}$  hNalp1-LRR eingesetzt. Analog zur Isothermalen Titrationskalorimetrie wurden die Messungen sowohl in Protein-Puffer B als auch in HEPES-Puffer durchgeführt (Kap. 3.6.1). Die Exzitation erfolgte bei  $\lambda = 280$  nm, weil sich bei dieser Wellenlänge das Anregungsmaximum von Tryptophan befindet (Tabelle 2.1). Die Emission wurde über den Wellenlängenbereich  $\lambda = 300\text{-}440$  nm detektiert. Das Emissionsmaximum von hNalp1-LRR befand sich bei 334 nm (Abbildung 3.20). Um eine mögliche Komplexbildung zu induzieren, wurde hNalp1-LRR mit einem 25 fachen molaren Überschuss MDP inkubiert, bevor die Fluoreszenz detektiert wurde. Unter beiden Pufferbedingungen ist nach Zugabe von MDP eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten, wobei es nicht zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums kommt (Abbildung 3.20). Diese Abnahme in der Fluoreszenzintensität betrug im Bereich des Emissionsmaximums in HEPES-Puffer 4 %



**Abbildung 3.20:** Fluoreszenzspektroskopie über intrinsische Fluorophore von hNalp1-LRR. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach Excitation  $\lambda = 280$  nm über den Wellenlängenbereich  $\lambda = 300-440$  nm. Gemessen wurde Nalp1-LRR ( $10 \mu\text{M}$ ), Nalp1-LRR ( $10 \mu\text{M}$ ) + 25 facher molarer Überschuss MDP (25xMDP) und  $250 \mu\text{M}$  MDP alleine. (A) Fluoreszenzmessung in Protein-Puffer B. Die gemessene Fluoreszenz ist gegen die Wellenlänge  $\lambda$  aufgetragen, wobei die Werte für Nalp1-LRR + 25xMDP mit den Werten der Messung  $250 \mu\text{M}$  MDP normalisiert wurden. Die dargestellten Kurven stellen gemittelte Werte aus jeweils drei Messungen dar. (B) Wie A, aber in HEPES-Puffer. Unter beiden Pufferbedingungen kommt es nach MDP Zugabe zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität, die jedoch nicht signifikant ist (Student t-Test;  $p < 0,01$ ).

und in Protein-Puffer B 3 %. Bei einem Signifikanzniveau  $\alpha$  von 1 % in einem Student t-Test für ungepaarte Zweistichproben erwiesen sich diese Veränderungen jedoch als nicht signifikant. Zur Kontrolle und Normalisierung wurden unter beiden Pufferbedingungen auch Spektren von MDP alleine aufgenommen. Sollte die geringe, aber messbare Veränderung in der Fluoreszenzintensität der aromatischen Aminosäuren von hNalp1-LRR dennoch durch MDP verursacht worden sein, d.h. durch eine direkte Wechselwirkung zwischen MDP und Protein, müsste die zu beobachtende Fluoreszenzabnahme konzentrationsabhängig sein. Um

dies näher zu untersuchen, wurde eine Messreihe durchgeführt, bei der 5  $\mu\text{M}$  hNalp1-LRR mit unterschiedlichen MDP Konzentrationen (10, 25 und 100 facher molarer Überschuss) inkubiert und anschließend fluoreszenzspektroskopisch untersucht wurden. Diese Messreihe wurde ausschließlich in HEPES-Puffer durchgeführt. Die Messungen ergaben, dass die Fluoreszenzintensität mit zunehmender MDP Konzentration sinkt (Abbildung 3.21). Mit einem 100 fachen molaren Überschuss MDP konnte eine etwa 10 % geringere Fluoreszenzintensität am Emissionsmaximum  $\lambda = 334 \text{ nm}$  beobachtet werden. In einem Student t-Test für ungepaarte Zweistichproben (Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,01$ ) stellte sich dies als eine signifikante Reduktion heraus. Mit einem 10 bzw. 25 fachen molaren Überschuss MDP zeigte sich zwar ebenfalls eine Abschwächung der Fluoreszenz von 2,5 - 5,5 %. Legt man das gleiche Signifikanzniveau zu Grunde, handelt es sich hierbei jedoch nicht um signifikante Verringerungen (Abbildung 3.21). Ob die signifikante Reduktion der Fluoreszenz bei einem 100 fachen molaren Überschuss MDP tatsächlich auf eine direkte Interaktion zwischen MDP und hNalp1-LRR zurückzuführen ist, sollte durch den Einsatz des Fluorophor-markierten MDP-FITC aufgeklärt werden. Bei einer direkten Wechselwirkung müsste damit ebenfalls eine konzentrationsabhängige Änderung der Fluoreszenz zu beobachten sein. Vor der eigentlichen Analyse dieser möglichen Wechselwirkung wurde ein Wellenlängenprofil des MDP-FITC erstellt, um das Emissionsmaximum dieses Moleküls zu bestimmen (Abbildung 3.22). Hierzu wurde die Fluoreszenzemission von 0,5  $\mu\text{M}$  MDP-FITC in



**Abbildung 3.21:** Fluoreszenzspektroskopie über intrinsische Fluorophore bei steigender MDP Konzentration. Gemessen wurden jeweils 5  $\mu\text{M}$  hNalp1-LRR alleine und mit 10 fachem, 25 fachem oder 100 fachem molaren MDP Überschuss. Die Exzitation erfolgte bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$ . Die gemessene Fluoreszenz ist gegen die Wellenlänge  $\lambda$  aufgetragen. Pro Bedingung wurden jeweils fünf einzelne Messungen gemittelt. Ein ungepaarter Zweistichproben Student t-Test ergab für hNalp1-LRR+100xMDP eine statistisch signifikante Reduktion der Fluoreszenz beim Emissionsmaximum  $\lambda = 334 \text{ nm}$  ( $p < 0,01$ ).

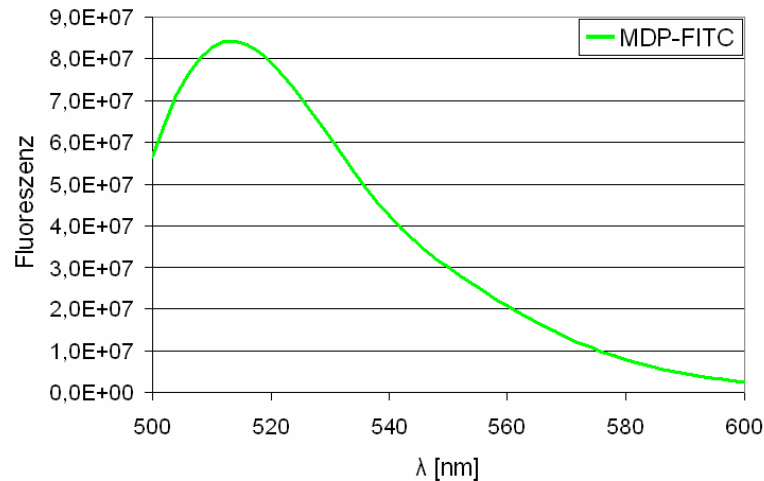


Abbildung 3.22: Emissionsspektrum von MDP-FITC.

Zur Bestimmung des Emissionsmaximums wurden 0,5  $\mu\text{M}$  MDP-FITC in HEPES-Puffer vorgelegt. Es erfolgte die Exzitation bei  $\lambda = 495$  nm, die Emission wurde über den Wellenlängenbereich  $\lambda = 500\text{-}600$  nm aufgenommen. Die gemessene Fluoreszenz ist gegen die Wellenlänge  $\lambda$  aufgetragen. Das Emissionsmaximum des MDP-FITC liegt bei  $\lambda = 512$  nm.

HEPES-Puffer bei Exzitation  $\lambda = 495$  nm (Herstellerangabe Invivogen) über den Wellenlängenbereich  $\lambda = 500\text{-}600$  nm gemessen. Das Emissionsmaximum des MDP-FITC lag bei  $\lambda = 512$  nm (Abbildung 3.22). In allen nachfolgenden Fluoreszenzmessungen mit MDP-FITC wurde die Emission deshalb bei dieser Wellenlänge detektiert.

Um eine proteinkonzentrationsabhängige Änderung der MDP-FITC Fluoreszenz festzustellen, wurde die Fluoreszenzintensität von 0,5  $\mu\text{M}$  MDP-FITC vor und nach Inkubation mit einem 10 bzw. 100 fachen molaren Überschuss hNalp1-LRR gemessen. Nach der Zugabe von hNalp1-LRR nimmt die Fluoreszenzintensität am Emissionsmaximum ( $\lambda = 512$  nm) zwar ab (Abbildung 3.23), allerdings ist diese Abnahme nicht konzentrationsabhängig und tritt außerdem auch bei der Kontrolle auf, zu der anstelle von Protein nur ein gleiches Volumen an Puffer zugegeben wurde.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der beobachteten Abnahme der Fluoreszenzintensität nur um einen reinen Verdünnungseffekt handelt oder doch eine Wechselwirkung zwischen den beiden Molekülen stattfindet, wurde eine spektroskopische Messung mit polarisiertem Licht durchgeführt. In Fall einer Bindung des MDP-FITC an hNalp1-LRR sollte das Polarisationsignal des MDP-FITC zunehmen, da seine Rotationsfreiheit deutlich eingeschränkt wäre (Kap. 2.6.7). Dieser Effekt wäre konzentrationsabhängig, wodurch sich die Bindung charakterisieren ließe. Für diese Polarisationsmessung wurde das MDP-FITC mit linear polarisiertem Licht der Wellenlänge  $\lambda = 495$  nm angeregt. Die Änderung des



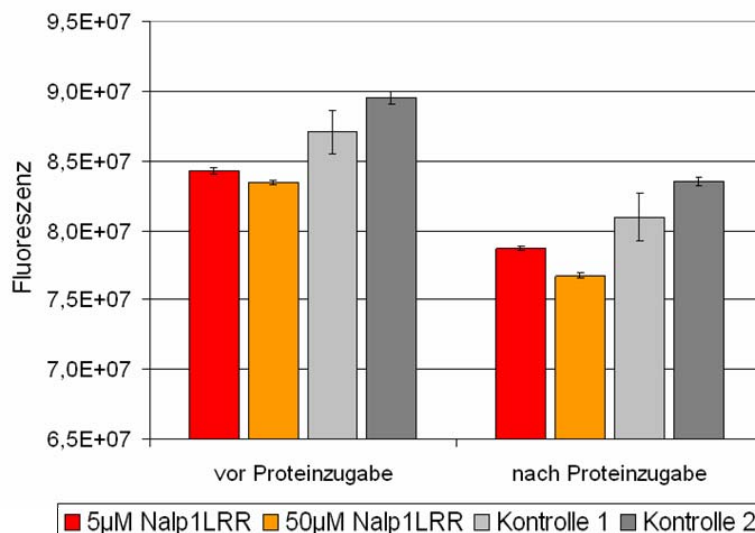


Abbildung 3.23: Fluoreszenz von MDP-FITC in Abhängigkeit von hNalp1-LRR.

Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität von 0,5 µM MDP-FITC in HEPES-Puffer am Emissionsmaximum  $\lambda = 512$  nm des MDP-FITC nach Exzitation bei  $\lambda = 495$  nm vor und nach Zugabe verschiedener Mengen hNalp1-LRR. Bei den Kontrollen wurde anstelle des Proteins ein gleiches Volumen Puffer zugegeben. In allen Fällen ist eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu sehen, die sich sowohl bei den Proteinproben als auch bei den Kontrollen in der gleichen Größenordnung bewegt.

Polarisationssignals wurde am Emissionsmaximum des MDP-FITC bei der Wellenlänge  $\lambda = 512$  nm detektiert.

In einem ersten Versuch wurden 0,5 µM MDP-FITC vorgelegt und die Polarisation gemessen. Es folgte eine zweistufige Titration von hNalp1-LRR. Im ersten Schritt wurden 5 µM Protein hinzu titriert, im zweiten Schritt wurde die Proteinkonzentration auf 50 µM erhöht. Zwischendurch wurde jeweils bis zum Erreichen des Gleichgewichts gewartet und das Polarisationssignal gemessen. Das Resultat war ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Polarisation (Abbildung 3.24). Um den Einfluss der titrationsbedingten Volumenerhöhung während der Messung (knapp 10 %) und die daraus resultierende Verdünnung des vorgelegten MDP-FITC auf dessen Polarisationsintensität hin überprüfen zu können, wurde in einer Kontrolle die gleiche Volumenerhöhung durch Zugabe von reinem Puffer erzeugt. Dabei zeigte sich jedoch keine Veränderung in der Polarisation des MDP-FITC, so dass hier Verdünnungseffekte ausgeschlossen werden konnten.

Nach diesen ersten Polarisationsmessungen und einem sichtbaren Einfluss der Proteinkonzentration auf das Polarisationssignal wurde im nächsten Schritt eine mehrstufige Titration durchgeführt. Dabei sollte bei steigender Proteinkonzentration eine Sättigung im Kurvenverlauf des Polarisationssignals erreicht werden, was einer Sättigung der Bindung

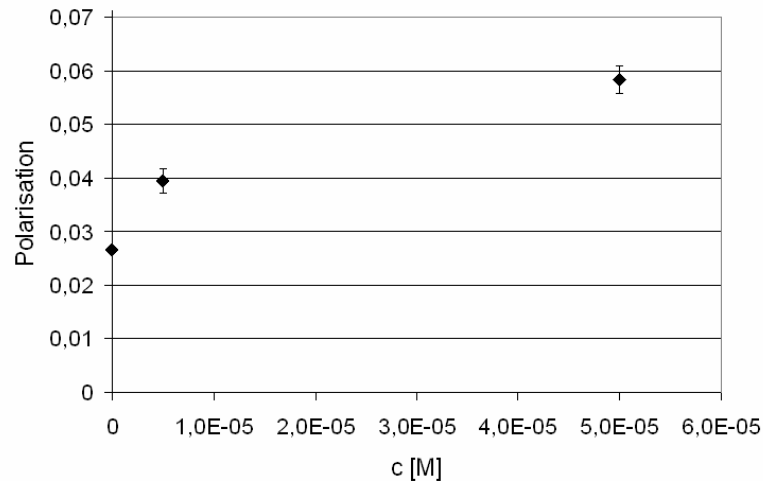


Abbildung 3.24: Polarisationspektroskopie mit zweistufiger Titration von hNalp1-LRR zu MDP-FITC.

Es wurden  $0,5 \mu\text{M}$  MDP-FITC vorgelegt. Mit linear polarisiertem Licht wurde nach Exzitation mit  $\lambda = 495 \text{ nm}$  die Intensität der Fluoreszenzpolarisation am Emissionsmaximum  $\lambda = 512 \text{ nm}$  über einen Zeitraum von 10 min gemessen und gemittelt. Im ersten Titrationsschritt erfolgte die Zugabe von  $5 \mu\text{M}$  hNalp1-LRR, die Polarisation wurde danach über einen Zeitraum von 20 min gemessen und gemittelt. Im zweiten Titrationsschritt wurde die Konzentration von hNalp1-LRR auf  $50 \mu\text{M}$  erhöht und die Polarisation für weitere 20 min gemessen und gemittelt. Die gemessene Polarisation ist gegen die Proteinkonzentration  $c$  aufgetragen. Mit zunehmender Proteinkonzentration kommt es zu einem Anstieg der vom MDP-FITC erzeugten Polarisation.

entspräche. Hierzu wurden erneut  $0,5 \mu\text{M}$  MDP-FITC vorgelegt und die Polarisation gemessen. Im Folgenden wurde die Proteinkonzentration alle 5 min (nach Erreichen des Gleichgewichts) um  $5 \mu\text{M}$  erhöht, wobei kontinuierlich die Polarisation gemessen wurde. Diese Titration wurde über zwanzig Schritte bis zu einer Proteinkonzentration von  $100 \mu\text{M}$  fortgesetzt. Die Polarisation stieg dabei linear zur Proteinkonzentration an (Abbildung 3.25). Da sich bis zur Proteinkonzentration von  $100 \mu\text{M}$  noch keine Sättigung der Polarisationskurve abzeichnete, wurde die Proteinkonzentration um weitere  $50 \mu\text{M}$  erhöht, was einen weiteren linearen Anstieg der Polarisation zur Folge hatte (Abbildung 3.25). Eine weitere Erhöhung der hNalp1-LRR Konzentration im Verlauf der Messung war aus technischen Gründen nicht möglich. Trotz des 300 fachen molaren Überschusses hNalp1-LRR gegenüber MDP-FITC deutete sich keine Sättigung in der Polarisationskurve an.

Ob der zu beobachtende Anstieg der MDP-FITC Polarisation in Abhängigkeit von der titrierten hNalp1-LRR Konzentration ein Hinweis für eine spezifische Bindung zwischen den beiden Molekülen hNalp1-LRR und MDP-FITC ist, oder ob es sich nur um eine unspezifische Wechselwirkung handelt, die den Polarisationsanstieg verursacht, sollte durch zwei Kontroll-experimente überprüft werden. In diesen Kontrollen wurden die Proteine 14-3-3zeta und Glutathion-S-Transferase (GST) eingesetzt. Für beide Proteine ist keine spezifische Bindung an MDP beschrieben, deshalb ist bei ihrer Zugabe keine Erhöhung der MDP-FITC

Polarisation zu erwarten. In der ersten Kontrolle wurde die Polarisation von  $0,5 \mu\text{M}$  MDP-FITC vor und nach Zugabe von  $50 \mu\text{M}$  14-3-3zeta Protein gemessen. Die Zugabe des Proteins führte wie erwartet zu keinem signifikanten Anstieg der Polarisation (Abbildung 3.25). In der zweiten Kontrolle wurden  $50 \mu\text{M}$  GST zu  $0,5 \mu\text{M}$  MDP-FITC zugegeben. Das Ergebnis war ein starker Anstieg der Polarisation (Abbildung 3.25). Dieser Anstieg der Polarisation kann nur auf eine unspezifische Wechselwirkung zwischen GST und MDP-FITC zurückgeführt werden. Für den Anstieg der MDP-FITC Polarisation während der Titration von hNalp1-LRR könnte daher ebenfalls eine unspezifische Wechselwirkung zwischen hNalp1-LRR und MDP-FITC verantwortlich sein. Eine spezifische Bindung kann daher so nicht nachgewiesen werden.

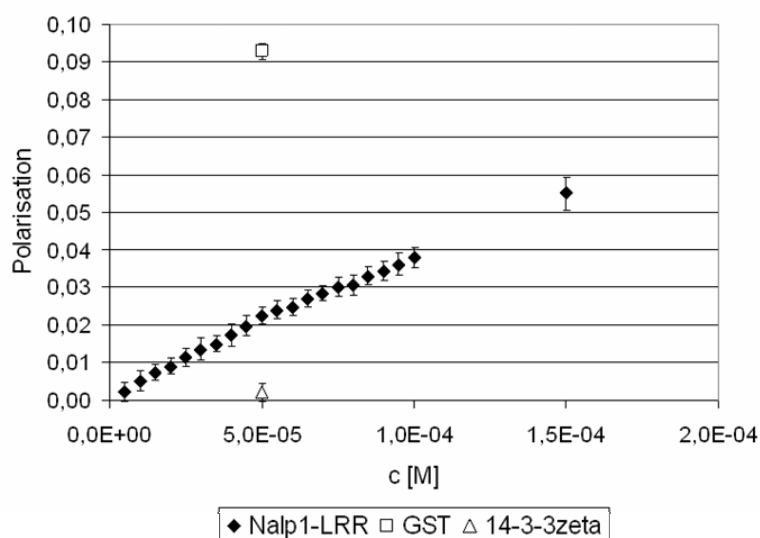


Abbildung 3.25: Polarisationsspektroskopie mit mehrstufiger Titration von hNalp1-LRR zu MDP-FITC.

Es wurden  $0,5 \mu\text{M}$  MDP-FITC vorgelegt. Mit linear polarisiertem Licht wurde nach Exzitation mit  $\lambda = 495 \text{ nm}$  die Intensität der Fluoreszenzpolarisation am Emissionsmaximum  $\lambda = 512 \text{ nm}$  über einen Zeitraum von 10 min gemessen und gemittelt. In der folgenden Titration erfolgte die Zugabe von jeweils  $5 \mu\text{M}$  hNalp1-LRR alle 5 min bis zu einer Proteinkonzentration von  $100 \mu\text{M}$ , bevor sie durch die letzte Injektion final auf  $150 \mu\text{M}$  erhöht wurde. In den Zeiträumen zwischen den einzelnen Injektionen wurde jeweils die Polarisation gemessen. Mit der linear steigenden Proteinkonzentration ist auch ein linearer Anstieg der Polarisation zu beobachten. Eine Sättigung der Kurve ist nicht erkennbar. Die Endkonzentration von  $150 \mu\text{M}$  hNalp1-LRR stellte aus technischen Gründen die maximal mögliche Proteinkonzentration dar und entspricht einem 300 fachen molaren Überschuss von hNalp1-LRR gegenüber MDP-FITC. Ob dem proteinabhängigen Anstieg der Polarisation unspezifische Wechselwirkungen zwischen MDP-FITC und Protein zugrunde liegen können, wurde durch Kontrollen mit den beiden Proteinen GST und 14-3-3zeta überprüft, über die keine Interaktion mit MDP bekannt ist. Die Zugabe von  $50 \mu\text{M}$  14-3-3zeta zu  $0,5 \mu\text{M}$  MDP-FITC führte dabei zu keiner, die Zugabe von  $50 \mu\text{M}$  GST zu  $0,5 \mu\text{M}$  MDP-FITC dagegen zu einer deutlichen Erhöhung der Polarisation.

## 4 Diskussion

Bislang gibt es nur wenig Information über die dreidimensionale Struktur von Proteinen der NLR Familie. Nur von Pyrin-Domänen (PYD) und Caspase-Aktivierungs-Domänen (CARD) einzelner NLR konnten Kristall- oder NMR-Strukturen gelöst werden<sup>190, 202-207</sup> (daneben sind weitere nicht publizierte Struktur von PYD und CARD verschiedener NLR Proteine in der *Protein Data Bank* (PDB) hinterlegt: pdb id: 2do9; pdb id: 3pjh; pdb id: 2dbd; pdb id: 3kat). Diese wenigen Strukturdaten der NLR spiegeln insbesondere wider, dass andere Proteinbereiche von NLR Proteinen als PYD oder CARD nur schwer heterolog zu exprimieren sind. Dies bestätigt sich auch in Experimenten dieser Arbeit. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine große Zahl an Expressionskonstrukten angefertigt (Tabelle 3.1). Diese codierten entweder für einen kompletten NLR oder einzelne funktionelle Abschnitte. Die Expressionskonstrukte wurden zum Teil in drei verschiedenen Expressionssystemen (*E. coli*, *D. discoideum* und SF21 Zellen) getestet. Löslich exprimieren ließen sich jedoch nur die strukturell bereits bekannte PYD von hNalp1 und hNalp3, sowie die LRR-Domäne von hNalp1.

Mit verschiedenen LRR Konstrukten, die sich durch Variation der Konstruktgrenzen in Länge und enthaltenem Sequenzabschnitt unterschieden, wurde der größtmögliche lösliche Proteinabschnitt im Bereich der LRR-Domäne von hNalp1 bestimmt. Der Sequenzabschnitt AS 791-990 (hNalp1-LRR) stellte sich als der größte noch lösliche Proteinabschnitt im Bereich der LRR-Domäne heraus (Tabelle 3.1). Konstrukte, deren Größe über diese Grenzen hinausging, waren nicht löslich. Das Protein hNalp1-LRR konnte in hoher Reinheit aufgereinigt werden (Abbildung 3.2 D). Die mit Hilfe der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) gemessene geringe Polydispersität von nur ca. 10 % (Abbildung 3.3) zeigt dabei außerdem, dass es sich um eine Proteinpopulation mit hoher Homogenität und ohne Aggregate handelt. Diese Ergebnisse belegen die hohe Qualität des aufgereinigten Proteins.

hNalp1 konnte erfolgreich kristallisiert werden und die Struktur konnte aus den gemessenen hoch auflösenden Beugungsdaten mit Hilfe des molekularen Ersatzes gelöst werden (Abbildung 3.7). Mit der Röntgenkristallstruktur von hNalp1-LRR ist es erstmalig gelungen, die Leucin-reichen Wiederholungen eines NLR strukturell aufzuklären. Die LRR-Domäne ist von besonderem Interesse, da über sie, ähnlich wie bei den verwandten TLR der Fall, die Ligandbindung stattfinden soll<sup>198, 208-209</sup>.

Mit dem Aufbau als bogenartig gekrümmte rechtshändige Helix mit einem parallelen  $\beta$ -Faltblatt aus kurzen  $\beta$ -Strängen (3 AS) auf der konkaven Seite zeigt die Struktur von hNalp1-LRR die allgemeinen Merkmale von Leucin-reichen Wiederholungen. Wie bereits in

Kap. 1.7 beschrieben, kommen in Proteinen unterschiedliche Arten von Leucin-reichen Wiederholungen vor, die in verschiedene Unterfamilien eingeordnet werden (Tabelle 1.2). Durch geometrische Analysen der Struktur und durch Vergleiche der Sequenz mit anderen LRR enthaltenden Proteinen ist es möglich, die vorliegende LRR Struktur von hNalp1 und damit das gesamte Protein einer dieser LRR-Unterfamilien zuzuordnen. Beim Vergleich der Aminosäuresequenz des hNalp1 mit denen anderer LRR Proteine wurde die größte Übereinstimmung mit dem humanen Ribonuklease-Inhibitor (hRI) erzielt. Das Programm Vector NTI 6 (InforMax) berechnete beim Vergleich der Aminosäuresequenz 791-990 des hNalp1 (NCBI ACCESSION NP\_127497) mit der des hRI (NCBI ACCESSION NP\_002930) eine Identität von 40 %, der Grad der Homologie lag sogar bei 50 % (Abbildung 4.1). Neben dieser Sequenzhomologie zeigen auch strukturelle Merkmale der Leucin-reichen Wiederholungen von hNalp1-LRR seine Verwandtschaft mit dem Ribonuklease-Inhibitor und anderen LRR Proteinen aus der RI-ähnlichen Unterfamilie. hNalp1-LRR besteht ebenso wie der Ribonuklease-Inhibitor aus den beiden LRR Typen A und B, die im Wechsel die Struktur bilden. In ihrer Art und Ausdehnung zeigen die Sekundärstrukturelemente der konkaven und konvexen Seite von hNalp1-LRR dabei die Charakteristika von LRR der RI-ähnlichen Unterfamilie (Tabelle 3.5). Besonders deutlich wird die strukturelle Verwandtschaft zwischen

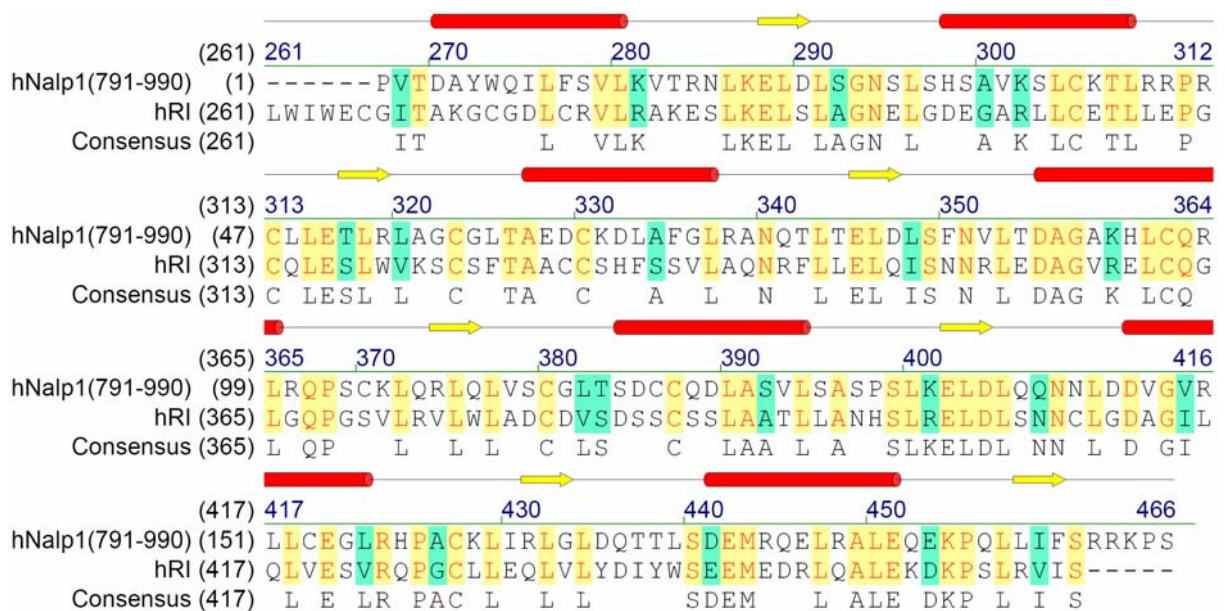


Abbildung 4.1: Sequenzvergleich des hNalp1(791-990) mit dem humanen Ribonuklease-Inhibitor (hRI).

Der Abgleich der beiden Aminosäuresequenzen mit dem Programm Vector NTI 6 (InforMax) ergab eine Sequenzidentität von 40 % und eine Homologie von 50 %. Identische Aminosäuren sind gelb unterlegt, homologe Aminosäuren grün. Die Zahlen hinter den Proteinnamen geben die AS Position der Sequenz an. Die Zahlen über dem Sequenzverlauf die Position des gemeinsamen Consensus. Über dem Sequenzverlauf sind schematisch die Sekundärstrukturelemente dargestellt ( $\alpha$ -Helices: rote Röhren,  $\beta$ -Stränge: gelbe Pfeile).

hNalp1-LRR und Ribonuklease-Inhibitor im Vergleich einzelner geometrischer Parameter (Tabelle 3.5) und der direkten Überlagerung der beiden Strukturen (Abbildung 3.14). Auf Basis dieser Analyse kann das hNalp1 eindeutig der RI-ähnlichen Unterfamilie von LRR Proteinen zugeordnet werden.

Betrachtet man die LRR Konsensussequenz, beginnt jede Leucin-reiche Wiederholung mit den hoch konservierten hydrophoben Aminosäuren, die u.a. den  $\beta$ -Strang der konkaven Seite bilden (Tabelle 1.2). Die weniger stark konservierten Reste formen das sekundäre Strukturelement der konvexen Seite und die beiden verbindenden Schleifen. Im Fall der RI-ähnlichen LRR Unterfamilie lautet die Motivfolge  $\beta$ -Strang–Schleife– $\alpha$ -Helix–Schleife. Ausgehend von dieser Definition bilden die sieben  $\beta$ -Stränge und die sieben  $\alpha$ -Helices von hNalp1-LRR sechs vollständige Leucin-reiche Wiederholungen, bestehend aus  $\beta_1+\alpha_2$ ,  $\beta_2+\alpha_3$ ,  $\beta_3+\alpha_4$ ,  $\beta_4+\alpha_5$ ,  $\beta_5+\alpha_6$  und  $\beta_6+\alpha_7$  (Abbildung 3.7). Hinzu kommt jeweils ein zusätzliches sekundäres Strukturelement an den beiden Termini der Struktur. Am N-Terminus vor der ersten dieser sechs vollständigen LRR befindet sich eine komplette  $\alpha$ -Helix ( $\alpha_1$ ), am C-Terminus ein zusätzlicher  $\beta$ -Strang ( $\beta_7$ ) (Abbildung 3.7). Bei diesen terminalen Sekundärstrukturelementen muss sichergestellt sein, dass es sich nicht um solche von weiteren Leucin-reichen Wiederholungen handelt und die hier gelöste Struktur alle LRR des hNalp1 umfasst. Durch einen Computer-gestützten Sequenzvergleich des hNalp1 mit einem artifiziellen „RI-like“ Protein, bestehend aus 1482 Aminosäuren in 52 LRR (alternierend Typ A und B) der RI-ähnlichen Konsensussequenz, sollten daher mögliche weitere LRR im hNalp1 identifiziert werden (Abbildung 4.2 und Anhang). Aus diesem Vergleich lässt sich schließen, dass es sich bei der  $\alpha_1$ -Helix (AS 794-804) von hNalp1-LRR nicht um die  $\alpha$ -Helix einer weiteren LRR handelt, denn in der Aminosäuresequenz N-terminal zu dieser Helix fehlt der hoch konservierte Bereich, der für die Ausbildung des  $\beta$ -Stranges verantwortlich ist (Abbildung 4.2). Entsprechendes gilt für den letzten  $\beta$ -Strang ( $\beta_7$ , AS 982-984) der Struktur. Die C-terminal darauf folgende Aminosäuresequenz weist kaum Übereinstimmungen mit der RI-ähnlichen Konsensussequenz auf, sodass es sich auch hier wohl nicht um den Beginn einer weiteren C-terminalen LRR handelt (Abbildung 4.2). Bei dieser Analyse konnten auch in keinem anderen Bereich des Proteins hNalp1 weitere Abschnitte identifiziert werden, die eine Homologie mit der RI-ähnlichen Konsensussequenz aufweisen und auf das Vorhandensein weiterer Leucin-reicher Wiederholungen innerhalb des Proteins schließen lassen (Anhang). Auf Basis dieser Sequenzanalyse (Abbildung 4.2), auf der auch die Grenzen des hier verwendeten Konstrukts gewählt wurden, der daraus gelösten Kristallstruktur (Abbildung 3.7)



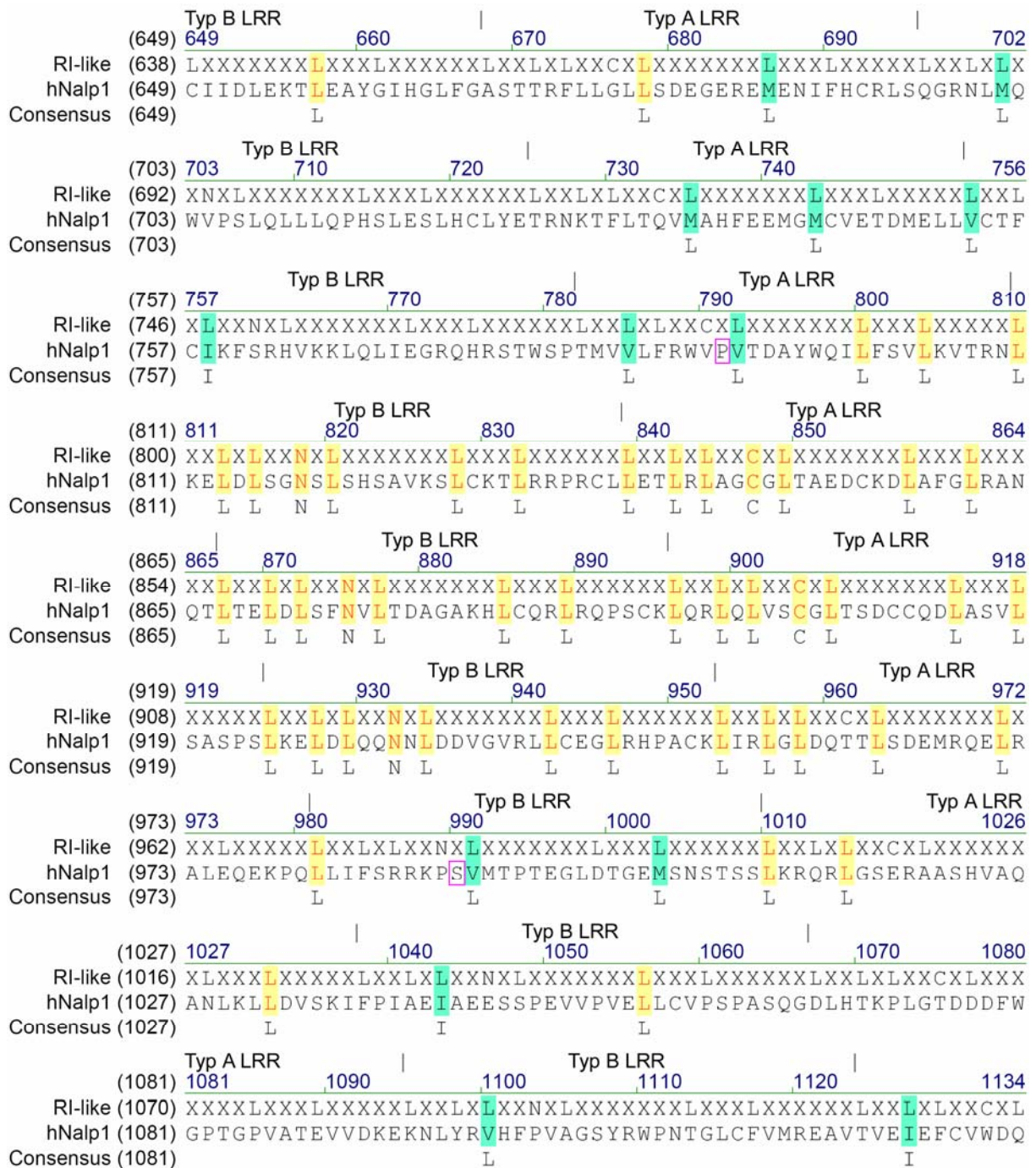


Abbildung 4.2: Sequenzabgleich von hNalp1 mit dem artifiziiellen „RI-like“ Protein.

Das „RI-like“ Protein wurde aus 52 Wiederholungen der RI-ähnlichen Konsensussequenz zusammengesetzt (1485 AS, alternierend 26 Typ A LRR und 26 Typ B LRR). Dabei sind nur die konservierten Leucine (L) der Konsensuspositionen 1, 4, 6, 11, 19 und 23 sowie das Cystein (C) bzw. Asparagin (N) der Konsensusposition 9 definiert, alle übrigen Positionen sind durch X markiert. Der Abgleich zwischen den beiden Aminosäuresequenzen wurde mit dem Programm Vector NTI 6 (InforMax) durchgeführt. Identische Aminosäuren sind gelb unterlegt, homologe Aminosäuren grün. Die Zahlen hinter den Proteinnamen geben die AS Position der Sequenz an. Die Zahlen über dem Sequenzverlauf die Position des gemeinsamen Consensus. Die erste und die letzte Aminosäure des kristallisierten Proteinfragments hNalp1-LRR sind violett markiert. Es ist eine hohe Übereinstimmung im Bereich innerhalb der Fragmentgrenzen zu erkennen. Die konservierten Positionen der „RI-like“ Sequenz finden sich dort nahezu vollständig in hNalp1 wieder. Im Gegensatz dazu nimmt die Übereinstimmung in den N- und C-terminal gelegenen Abschnitten deutlich ab. Identische bzw. Homologe Aminosäuren treten hier nur noch unregelmäßig auf. Weitere Leucin-reiche Wiederholungen außerhalb der gewählten Fragmentgrenzen sind nicht zu erkennen.

und der Tatsache, dass mit N- und C-terminal verlängerten Expressionskonstrukten kein lösliches Protein erzeugt werden konnte, ist davon auszugehen, dass hNalp1 über nicht mehr als sechs Leucin-reiche Wiederholungen verfügt und die im Rahmen dieser Arbeit gelöste Struktur die gesamte LRR-Domäne des Proteins hNalp1 umfasst.

Die hohe Auflösung von 1,65 Å der hNalp1-LRR Struktur ermöglicht einen sehr detaillierten Einblick in den molekularen Aufbau und die intramolekularen Wechselwirkungen innerhalb der LRR-Domäne. Im Vergleich mit anderen LRR Strukturen lassen sich dabei trotz grundsätzlicher Übereinstimmungen auch einige deutliche Unterschiede erkennen, die die Struktur von hNalp1-LRR von anderen LRR Strukturen unterscheidet. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der strukturellen Aufklärung zum besseren Verständnis der Funktionsweise. Die Tertiärstruktur von hNalp1-LRR wird durch eine ganze Reihe von Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Die Stabilität des  $\beta$ -Faltblatts auf der konkaven Seite entsteht durch die typischen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Atomen des Proteinrückgrats benachbarter paralleler  $\beta$ -Stränge. Vier Aminosäuren bilden dabei drei Wasserstoffbrückenbindungen zum vorangehenden und drei zum nachfolgenden  $\beta$ -Strang im  $\beta$ -Faltblatt aus (Abbildung 3.11). Weitere Wasserstoffbrückenbindungen findet man außerdem zwischen Aminosäuren benachbarter aufsteigender Schleifen. An diesen Interaktionen ist u.a. das Asparagin bzw. Cystein der Konsensussequenz LxxLxLxxN/CxL maßgeblich beteiligt (Abbildung 3.12), weshalb man von einer Asparagin/Cystein Leiter spricht<sup>210</sup>. Dieses für LRR charakteristische Strukturelement kommt in anderen LRR Proteinen alternativ auch als reine Asparagin- oder reine Cystein-Leiter vor<sup>210-211</sup>. Das Besondere an der Asn/Cys-Leiter von hNalp1-LRR ist dabei, dass die Cysteine trotz Abwesenheit eines reduzierenden Agens im Lösungsmittel nicht oxidiert vorliegen und die Tertiärstruktur des Proteins erhalten bleibt. Damit steht die Asn/Cys-Leiter von hNalp1-LRR im Gegensatz zu ihrem Pendant im RI, wo der Mangel an reduzierenden Agenzien zur Oxidation der Sulfhydrylgruppen führt, was dann die Inaktivierung und eine intrazelluläre Degradation des Proteins zur Folge hat<sup>212-213</sup>. Die Aminosäure N-terminal zum Asparagin bzw. Cystein befindet sich immer in einer linkshändigen  $\alpha$ -helikalen Konformation ( $\alpha_L$ ), wodurch die Peptidkette abknickt und in die aufsteigende Schleife übergeht<sup>214-216</sup>. Durch dieses, sich über die gesamte Länge der LRR Struktur wiederholende Muster von Haupt- und Seitenketten Wasserstoffbrückenbindungen in der aufsteigenden Schleife, wird dort eine kontinuierliche Oberfläche geformt. Ein definiertes Wasserrückgrat (*water spines*) auf der konvexen Seite der helikalen Struktur, wie man es z.B. beim Internalin B (InIB) findet<sup>217</sup>, fehlt dagegen in der hNalp1-LRR Kristallstruktur. Der Grund hierfür könnte in den



unterschiedlichen Sekundärstrukturelementen der konvexen Seite zwischen hNalp1-LRR und InlB liegen. Im Gegensatz zu den kurzen  $3_{10}$ -Helices des InlB lassen die  $\alpha$ -Helices von hNalp1-LRR deutlich weniger Raum zwischen den einzelnen LRR, so dass sich keine Wassermoleküle zwischen den benachbarten LRR positionieren können, um diese zu vernetzen. Das Innere der helikalen LRR-Domäne bilden die Seitenketten hydrophober Aminosäuren, insbesondere die der konservierten Leucine (Abbildung 3.10). Auf diese Weise entsteht ein, für globuläre Proteine typischer, hydrophober Kern, und destabilisierende Hohlräume werden verhindert. Außerdem optimiert eine derartig dichte Packung die van der Waals Kräfte zwischen den Seitenketten und leistet so einen großen Beitrag zur Stabilität der gesamten LRR Struktur.

In zahlreichen Kristallstrukturen konnte gezeigt werden, dass LRR Proteine über die konkave Oberfläche ihrer LRR-Domäne Bindungen mit ihren Liganden eingehen<sup>136, 218-223</sup> oder Dimere ausbilden<sup>224-225</sup>. Deshalb wird dieser Bereich allgemein als der Bereich angenommen, an dem Protein-Protein bzw. Protein-Ligand Interaktionen stattfinden. Allerdings gibt es auch Fälle, in denen eine Ligandbindung über andere Bereiche der LRR-Domäne erfolgt<sup>208, 226-229</sup>. Durch den Vergleich mit anderen LRR Proteinen ähnlicher Funktion können daher möglicherweise Rückschlüsse auf Art und Ort einer Komplexbildung zwischen hNalp1-LRR und einem Liganden geschlossen werden. Die Funktion der NLR als Immunorezeptoren ist die Detektion von antigenen Strukturen. Die gleiche Aufgabe haben auch die Variablen Lymphozytenrezeptoren (VLR) der Agnatha (Kieferlose, paraphyletisches Taxon mit den beiden ursprünglichen Wirbeltierklassen Schleimaale (Myxini) und Neunaugen (Petromyzontida))<sup>230</sup>. Bei den VLR erfolgt die Antigendetektion über ihre extrazelluläre Domäne, die aus einer variablen Anzahl an Leucin-reichen Wiederholungen besteht<sup>231-232</sup>. Obwohl es sich bei den VLR der Agnatha um Leukozytenrezeptoren handelt und ihre hohe Variabilität als Folge somatischer Rekombination<sup>230, 232</sup> eher auf eine Analogie zu den Immunglobulinen und T-Zell-Rezeptoren und damit der Zugehörigkeit zum adaptiven Immunsystem hindeutet, gibt es große sowohl strukturelle als auch funktionelle Übereinstimmungen mit den LRR enthaltenen Pathogen-erkennenden Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, zu denen die NLR gehören. Dies wird beim Vergleich zwischen den bislang bekannten VLR Strukturen und der hier aufgeklärten Struktur von hNalp1-LRR deutlich. Besonders interessant ist dabei der Vergleich mit dem VLR RBC36, dessen Struktur (pdb id: 3e6j) im Komplex mit seinem gebundenen spezifischen Liganden aufgeklärt werden konnte<sup>233</sup>. Bei dem Liganden dieses VLR handelt es sich um das H-Trisaccharid des

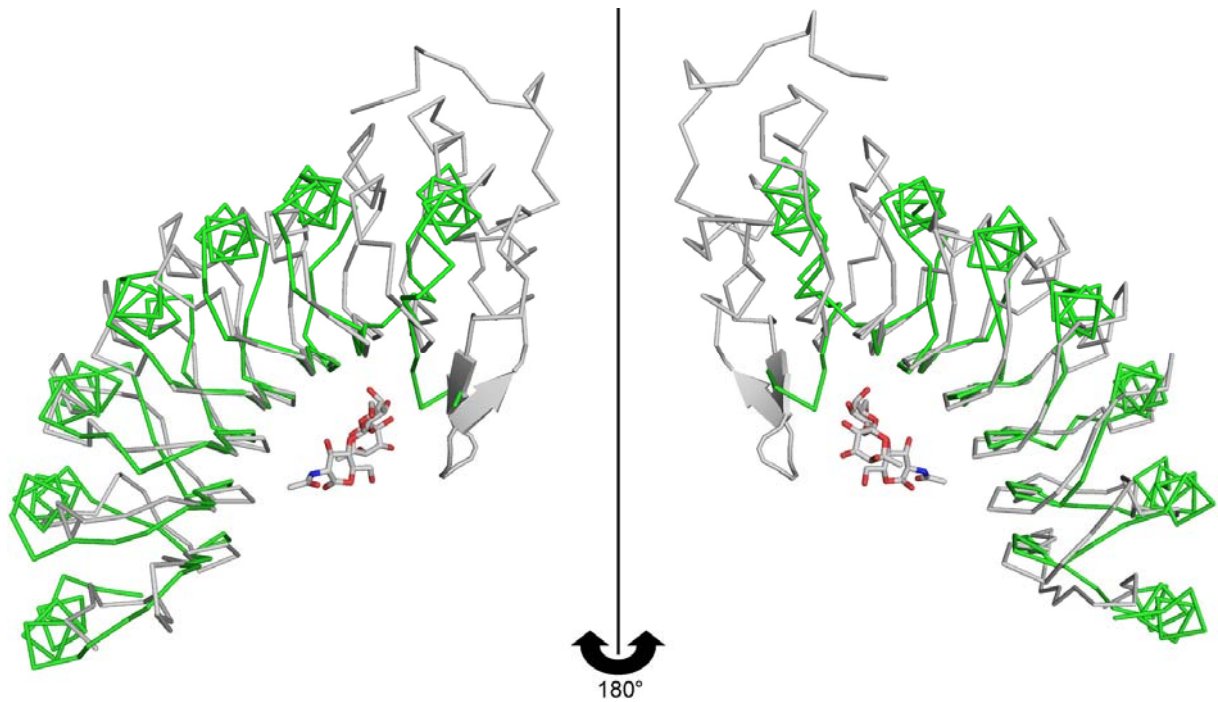


Abbildung 4.3: Überlagerung von hNalp1-LRR und VLR RBC36.

Die Struktur von hNalp1-LRR ist in grün dargestellt, die von VLR RBC36 und seines Liganden H-Trisaccharid in grau. Die Überlagerung zeigt die hohe strukturelle Übereinstimmung der beiden Rezeptoren auf ihrer konkaven Seite. Die sieben  $\beta$ -Stränge des  $\beta$ -Faltblatts überlagern in weiten Teilen. Deutliche Unterschiede bestehen in den Sekundärstrukturelementen der konvexen Seite. Am C-terminalen Ende des VLR RBC36 bildet dieser eine große Haarnadelschleife mit zwei antiparallelen  $\beta$ -Strängen aus, womit der gebundene Ligand zusätzlich stabilisiert wird. Eine solche Schleife ist in Ansätzen auch bei hNalp1-LRR zu erkennen, jedoch ist sie hier deutlich kleiner und ohne  $\beta$ -Strang ausgebildet. Die Abbildung wurde mit den Programmen PyMOL (DeLano Scientific LLC) und Photoshop (Adobe) erstellt.

H-Antigens humaner Erythrozyten der Blutgruppe 0<sup>233-234</sup>. In der Struktur dieses Komplexes ist zu sehen, dass die Bindung zwischen VLR RBC36 und H-Trisaccharid über drei Aminosäuren (D103, D152, Q153) des  $\beta$ -Faltblatts der konkaven Seite vermittelt wird<sup>233</sup>. Zur Stabilisierung des Komplexes trägt zusätzlich auch noch ein Tryptophan (W204) aus der  $\beta$ -Haarnadelschleife der LRRCT bei<sup>233</sup>. Diese  $\beta$ -Haarnadelschleife ragt vom C-Terminus her über das  $\beta$ -Faltblatt (Abbildung 4.3). Wie das H-Trisaccharid ist auch das MDP, der Ligand des hNalp1, ein exogenes Zuckerderivat, das als Antigen wirkt. Durch den Vergleich der beiden LRR Strukturen lassen sich deshalb möglicherweise Rückschlüsse über die Art und Weise einer Ligandbindung an hNalp1-LRR ziehen. In der Überlagerung von hNalp1-LRR und VLR RBC36 Struktur fällt auf, dass, trotz Zugehörigkeit zu unterschiedlichen LRR-Unterfamilien, besonders die  $\beta$ -Stränge der konkaven Seite ein hohes Maß an Übereinstimmung zeigen (Abbildung 4.3). Die auf der konkaven Oberfläche von hNalp1-LRR beobachtete Grube (Abbildung 3.8), die von den Aminosäuren E926 und D928 des fünften  $\beta$ -Strangs sowie Q900 und R955 geformt wird, liegt dabei in der Überlagerung

mit dem VLR RBC36 und seinem Liganden unterhalb des H-Trisaccharid. Diese Grube könnte daher eine mögliche Kontaktstelle für eine Ligandbindung darstellen. Außerdem formt auch der C-Terminus von hNalp1-LRR andeutungsweise eine Schleife über das  $\beta$ -Faltblatt, wenn auch kleiner und ohne  $\beta$ -Stränge (Abbildung 4.3). In dieser C-terminalen Schleife befindet sich die Aminosäure R986, für die bei der Strukturverfeinerung drei Seitenkettenkonformationen bestimmt werden konnten, was für einen hohen Freiheitsgrad dieses Restes spricht. Sie ragt von der C-terminalen Schleife her in Richtung der Grube (Abbildung 3.8). Des Weiteren konnten auf den konkaven Oberflächen der beiden NLR Proteine Nod1 und Nod2 durch Mutationsexperimente Aminosäuren identifiziert werden, die essentiell für eine Bindung zum jeweiligen Liganden sind<sup>108, 235</sup>. Diese Beobachtungen lassen die Hypothese zu, dass auch im Fall des hNalp1 die Ligandbindung über die LRR-Domäne und hier speziell über die konkave Seite stattfinden könnte. Die isolierte LRR-Domäne von hNalp1 stellt deshalb einen sehr guten Ausgangspunkt zur Überprüfung dieser Hypothese dar.

Die Tatsache, dass Faustin *et al.* in einem zellfreien System gezeigt haben, dass MDP die Bildung des hNalp1 Inflammasoms auslöst und zur Aktivierung von Caspase-1 führt<sup>38</sup>, legt die direkte Interaktion von hNalp1 und MDP nahe. Weil in dem von Faustin *et al.* durchgeführten Experiment die aktivierende Eigenschaft des MDP nur indirekt durch eine Bestimmung der Caspase-1 Aktivität ermittelt wurde, ist der genaue Ort und die Art der Interaktion zwischen hNalp1 und MDP jedoch unklar. Um zu überprüfen, ob die Bindung des Liganden über die LRR-Domäne des hNalp1 erfolgt, wurde deshalb das MDP in Interaktionsstudien mit hNalp1-LRR verwendet. Durch den Einsatz der biophysikalischen Analysemethoden Isothermale Titrationskalorimetrie, Fern-UV CD-Spektroskopie sowie Fluoreszenz- und Polarisationspektroskopie sollte eine mögliche direkte Interaktion von hNalp1-LRR und MDP überprüft werden. Mit keiner der durchgeführten Messungen konnte jedoch eine spezifische Bindung nachgewiesen werden.

Aus den Daten der biophysikalischen Messungen zu einer möglichen Interaktion von hNalp1-LRR und MDP ist die spezifische Interaktion dieser beiden Moleküle nicht abzuleiten, auch wenn die Ergebnisse von Faustin *et al.* für eine direkte Interaktion zwischen hNalp1 Protein und MDP sprechen und die Verwandtschaft der NLR zu den TLR für eine Analogie der Ligandbindung über die LRR-Domäne spricht. Faustin *et al.* postulieren einen zweistufigen Mechanismus für die Aktivierung des hNalp1 durch MDP<sup>38</sup>. Dabei soll es im ersten Schritt zu einer MDP vermittelten Konformationsänderung des hNalp1 Proteins kommen, die dann im zweiten Schritt die Bindung von NTP und die Oligomerisierung von hNalp1 ermöglicht. An diesem Mechanismus der Autoinhibition könnte die LRR-Domäne der

NLR direkt beteiligt sein<sup>236</sup>. Für eine solche Beteiligung sprechen auch Deletionsstudien mit anderen NLR<sup>108</sup>. Einen ähnlichen Aktivierungsmechanismus findet man auch bei dem NLR verwandten Rezeptor Adaptorprotein Apaf-1<sup>237</sup>. Bei Apaf-1 bindet der aktivierende Ligand Cytochrome C direkt und ausschließlich an der autoinhibitorischen regulatorischen WD40 Domäne des Proteins<sup>238</sup>. Geht man davon aus, dass hNalp1 vor seiner Aktivierung durch das MDP auch in einer autoinhibierten Konformation vorliegt, könnten an der Interaktionsfläche für das MDP neben der LRR-Domäne auch andere Bereiche des hNalp1 Proteins beteiligt sein. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen jedoch, dass die LRR-Domäne des hNalp1 alleine nicht ausreichend ist, um MDP zu binden.

Der Befund, dass Nalp1 nicht durch direkte Bindung von MDP an die LRR-Domäne aktiviert wird, ist in Einklang mit neueren Erkenntnissen über das nah verwandte NLR Protein Nalp3. Nalp3 bildet, wie Nalp1, in Gegenwart von ATP und einem geeigneten Stimulus ein Inflammasom<sup>239</sup>. Für Nalp3 wurden zahlreiche Agenzien unterschiedlicher Beschaffenheit als Stimulatoren identifiziert, z.B. Natriumuratkristalle<sup>81</sup>, Asbestfasern und Silica-Partikel<sup>82, 240</sup>, bakterielle RNA<sup>241</sup>, extrazelluläres ATP<sup>41</sup>, Rizin<sup>242</sup> und Amyloid-beta<sup>243</sup>. Die Verschiedenartigkeit dieser Stimulatoren legt den Schluss nahe, dass die Nalp3-Aktivierung nicht durch deren direkte Bindung erfolgt. Es wurden verschiedene alternative Modelle zur Aktivierung von Nalp3 postuliert, letztlich ist der tatsächliche Mechanismus jedoch ungeklärt<sup>244</sup>.

## Literaturverzeichnis

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molekularbiologie der Zelle, 4. Auflage. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KgaA, Weinheim. 2004.
2. Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan;11(1):47-59.
3. Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S. Pathogen recognition by innate receptors. *J Infect Chemother.* 2008 Apr;14(2):86-92.
4. Franchi L, McDonald C, Kanneganti TD, Amer A, Nunez G. Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors: intracellular pattern recognition molecules for pathogen detection and host defense. *J Immunol.* 2006 Sep 15;177(6):3507-13.
5. Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, Magalhaes JG, Fsihi H, Kufer TA, et al. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity.* 2007 Apr;26(4):445-59.
6. Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:141-65.
7. Kumagai Y, Akira S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 May;125(5):985-92.
8. Uehara A, Fujimoto Y, Fukase K, Takada H. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol Immunol.* 2007 May;44(12):3100-11.
9. Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nunez G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:365-98.
10. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:229-65.
11. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1982;1(8):945-51.
12. Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Feb;4(2):95-104.
13. Weber CH, Vincenz C. The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem Sci.* 2001 Aug;26(8):475-81.
14. Martinon F, Hofmann K, Tschopp J. The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Curr Biol.* 2001 Feb 20;11(4):R118-20.
15. Park HH, Lo YC, Lin SC, Wang L, Yang JK, Wu H. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:561-86.
16. Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity.* 2008 Mar;28(3):285-7.
17. Inohara N, Koseki T, Lin J, del Peso L, Lucas PC, Chen FF, et al. An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem.* 2000 Sep 8;275(36):27823-31.
18. Lech M, Avila-Ferrufino A, Skuginna V, Susanti HE, Anders HJ. Quantitative expression of RIG-like helicase, NOD-like receptor and inflammasome-related mRNAs in humans and mice. *Int Immunol.* 2010 Jun 28.
19. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem.* 2001 Feb 16;276(7):4812-8.
20. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, et al. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression

- profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem*. 2007 May;55(5):443-52.
21. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):816-25.
  22. Girardin SE, Tournebise R, Mavris M, Page AL, Li X, Stark GR, et al. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep*. 2001 Aug;2(8):736-42.
  23. Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, Galan JE, Nunez G, Janeway CA, et al. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature*. 2002 Mar 14;416(6877):194-9.
  24. Pauleau AL, Murray PJ. Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. *Mol Cell Biol*. 2003 Nov;23(21):7531-9.
  25. Opitz B, Puschel A, Beermann W, Hocke AC, Forster S, Schmeck B, et al. *Listeria monocytogenes* activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. *J Immunol*. 2006 Jan 1;176(1):484-90.
  26. Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem*. 1999 May 21;274(21):14560-7.
  27. Park JH, Kim YG, McDonald C, Kanneganti TD, Hasegawa M, Body-Malapel M, et al. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol*. 2007 Feb 15;178(4):2380-6.
  28. Chin AI, Dempsey PW, Bruhn K, Miller JF, Xu Y, Cheng G. Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses. *Nature*. 2002 Mar 14;416(6877):190-4.
  29. Hasegawa M, Fujimoto Y, Lucas PC, Nakano H, Fukase K, Nunez G, et al. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *EMBO J*. 2008 Jan 23;27(2):373-83.
  30. Abbott DW, Wilkins A, Asara JM, Cantley LC. The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitylation of a novel site on NEMO. *Curr Biol*. 2004 Dec 29;14(24):2217-27.
  31. Masumoto J, Yang K, Varambally S, Hasegawa M, Tomlins SA, Qiu S, et al. Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment in vivo. *J Exp Med*. 2006 Jan 23;203(1):203-13.
  32. Park JH, Kim YG, Shaw M, Kanneganti TD, Fujimoto Y, Fukase K, et al. Nod1/RICK and TLR signaling regulate chemokine and antimicrobial innate immune responses in mesothelial cells. *J Immunol*. 2007 Jul 1;179(1):514-21.
  33. Kyosseva SV. Mitogen-activated protein kinase signaling. *Int Rev Neurobiol*. 2004;59:201-20.
  34. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002 Aug;10(2):417-26.
  35. Srinivasula SM, Poyet JL, Razmara M, Datta P, Zhang Z, Alnemri ES. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem*. 2002 Jun 14;277(24):21119-22.
  36. Masumoto J, Taniguchi S, Ayukawa K, Sarvotham H, Kishino T, Niikawa N, et al. ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem*. 1999 Nov 26;274(48):33835-8.
  37. Liepinsh E, Barbals R, Dahl E, Sharipo A, Staub E, Otting G. The death-domain fold of the ASC PYRIN domain, presenting a basis for PYRIN/PYRIN recognition. *J Mol Biol*. 2003 Oct 3;332(5):1155-63.

38. Faustin B, Lartigue L, Bruey JM, Luciano F, Sergienko E, Bailly-Maitre B, et al. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell*. 2007 Mar 9;25(5):713-24.
39. Kanneganti TD, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Whitfield J, Franchi L, et al. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem*. 2006 Dec 1;281(48):36560-8.
40. Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, Lara-Tejero M, Lichtenberger GS, Grant EP, et al. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity*. 2006 Mar;24(3):317-27.
41. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*. 2006 Mar 9;440(7081):228-32.
42. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*. 2004 Jul 8;430(6996):213-8.
43. Masumoto J, Dowds TA, Schaner P, Chen FF, Ogura Y, Li M, et al. ASC is an activating adaptor for NF-kappa B and caspase-8-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Mar 28;303(1):69-73.
44. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*. 1992 Apr 30;356(6372):768-74.
45. Guarda G, So A. Regulation of inflammasome activity. *Immunology*. 2010 Jul;130(3):329-36.
46. Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis and host cell death responses during Salmonella infection. *Cell Microbiol*. 2007 Nov;9(11):2562-70.
47. Fink SL, Bergsbaken T, Cookson BT. Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 18;105(11):4312-7.
48. Amer A, Franchi L, Kanneganti TD, Body-Malapel M, Ozoren N, Brady G, et al. Regulation of Legionella phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J Biol Chem*. 2006 Nov 17;281(46):35217-23.
49. Sansonetti PJ, Phalipon A, Arondel J, Thirumalai K, Banerjee S, Akira S, et al. Caspase-1 activation of IL-1beta and IL-18 are essential for Shigella flexneri-induced inflammation. *Immunity*. 2000 May;12(5):581-90.
50. Mariathasan S, Weiss DS, Dixit VM, Monack DM. Innate immunity against Francisella tularensis is dependent on the ASC/caspase-1 axis. *J Exp Med*. 2005 Oct 17;202(8):1043-9.
51. Tsuji NM, Tsutsui H, Seki E, Kuida K, Okamura H, Nakanishi K, et al. Roles of caspase-1 in Listeria infection in mice. *Int Immunol*. 2004 Feb;16(2):335-43.
52. Bergsbaken T, Cookson BT. Macrophage activation redirects yersinia-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. *PLoS Pathog*. 2007 Nov;3(11):e161.
53. Hasegawa M, Yang K, Hashimoto M, Park JH, Kim YG, Fujimoto Y, et al. Differential release and distribution of Nod1 and Nod2 immunostimulatory molecules among bacterial species and environments. *J Biol Chem*. 2006 Sep 29;281(39):29054-63.
54. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 May 1;2(5):a000414.
55. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*. 2008 Mar;32(2):149-67.

56. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*. 2003 Jun 6;300(5625):1584-7.
57. Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol*. 2003 Jul;4(7):702-7.
58. Nigro G, Fazio LL, Martino MC, Rossi G, Tattoli I, Liparoti V, et al. Muramylpeptide shedding modulates cell sensing of *Shigella flexneri*. *Cell Microbiol*. 2008 Mar;10(3):682-95.
59. Zilbauer M, Dorrell N, Boughan PK, Harris A, Wren BW, Klein NJ, et al. Intestinal innate immunity to *Campylobacter jejuni* results in induction of bactericidal human beta-defensins 2 and 3. *Infect Immun*. 2005 Nov;73(11):7281-9.
60. Zilbauer M, Dorrell N, Elmi A, Lindley KJ, Schuller S, Jones HE, et al. A major role for intestinal epithelial nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) in eliciting host bactericidal immune responses to *Campylobacter jejuni*. *Cell Microbiol*. 2007 Oct;9(10):2404-16.
61. Kim JG, Lee SJ, Kagnoff MF. Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect Immun*. 2004 Mar;72(3):1487-95.
62. Opitz B, Forster S, Hocke AC, Maass M, Schmeck B, Hippenstiel S, et al. Nod1-mediated endothelial cell activation by *Chlamydia pneumoniae*. *Circ Res*. 2005 Feb 18;96(3):319-26.
63. Travassos LH, Carneiro LA, Girardin SE, Boneca IG, Lemos R, Bozza MT, et al. Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 2005 Nov 4;280(44):36714-8.
64. Welter-Stahl L, Ojcius DM, Viala J, Girardin S, Liu W, Delarbre C, et al. Stimulation of the cytosolic receptor for peptidoglycan, Nod1, by infection with *Chlamydia trachomatis* or *Chlamydia muridarum*. *Cell Microbiol*. 2006 Jun;8(6):1047-57.
65. Boughan PK, Argent RH, Body-Malapel M, Park JH, Ewings KE, Bowie AG, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem*. 2006 Apr 28;281(17):11637-48.
66. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*. 2004 Nov;5(11):1166-74.
67. Opitz B, Puschel A, Schmeck B, Hocke AC, Rosseau S, Hammerschmidt S, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*. 2004 Aug 27;279(35):36426-32.
68. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*. 2005 Feb 4;307(5710):731-4.
69. Herskovits AA, Auerbuch V, Portnoy DA. Bacterial ligands generated in a phagosome are targets of the cytosolic innate immune system. *PLoS Pathog*. 2007 Mar;3(3):e51.
70. Ferwerda G, Girardin SE, Kullberg BJ, Le Bourhis L, de Jong DJ, Langenberg DM, et al. NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2005 Nov;1(3):279-85.
71. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003 Apr;124(4):993-1000.



72. Kapetanovic R, Nahori MA, Balloy V, Fitting C, Philpott DJ, Cavaillon JM, et al. Contribution of phagocytosis and intracellular sensing for cytokine production by *Staphylococcus aureus*-activated macrophages. *Infect Immun*. 2007 Feb;75(2):830-7.
73. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*. 2003 Feb 21;278(8):5509-12.
74. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. 2003 Mar 14;278(11):8869-72.
75. Martinon F, Agostini L, Meylan E, Tschopp J. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol*. 2004 Nov 9;14(21):1929-34.
76. Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, et al. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*. 2008 Mar 6;452(7183):103-7.
77. Gurcel L, Abrami L, Girardin S, Tschopp J, van der Goot FG. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell*. 2006 Sep 22;126(6):1135-45.
78. Ozoren N, Masumoto J, Franchi L, Kanneganti TD, Body-Malapel M, Erturk I, et al. Distinct roles of TLR2 and the adaptor ASC in IL-1beta/IL-18 secretion in response to *Listeria monocytogenes*. *J Immunol*. 2006 Apr 1;176(7):4337-42.
79. Franchi L, Kanneganti TD, Dubyak GR, Nunez G. Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K<sup>+</sup> for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *J Biol Chem*. 2007 Jun 29;282(26):18810-8.
80. Petrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ*. 2007 Sep;14(9):1583-9.
81. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006 Mar 9;440(7081):237-41.
82. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*. 2008 May 2;320(5876):674-7.
83. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002 Apr 12;296(5566):301-5.
84. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jun;4(6):469-78.
85. Boyden ED, Dietrich WF. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet*. 2006 Feb;38(2):240-4.
86. Tonello F, Montecucco C. The anthrax lethal factor and its MAPK kinase-specific metalloprotease activity. *Mol Aspects Med*. 2009 Dec;30(6):431-8.
87. Franchi L, Warner N, Viani K, Nunez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev*. 2009 Jan;227(1):106-28.
88. Philpott DJ, Yamaoka S, Israel A, Sansonetti PJ. Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol*. 2000 Jul 15;165(2):903-14.
89. Gerlach RG, Hensel M. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2007 Oct;297(6):401-15.
90. Ratner AJ, Aguilar JL, Shchepetov M, Lysenko ES, Weiser JN. Nod1 mediates cytoplasmic sensing of combinations of extracellular bacteria. *Cell Microbiol*. 2007 May;9(5):1343-51.

91. Lenz LL, Mohammadi S, Geissler A, Portnoy DA. SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 14;100(21):12432-7.
92. Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol*. 2006 Jun;7(6):569-75.
93. Ismair MG, Vavricka SR, Kullak-Ublick GA, Fried M, Mengin-Lecreulx D, Girardin SE. hPepT1 selectively transports muramyl dipeptide but not Nod1-activating muramyl peptides. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006 Dec;84(12):1313-9.
94. Locovei S, Wang J, Dahl G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett*. 2006 Jan 9;580(1):239-44.
95. Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J*. 2006 Nov 1;25(21):5071-82.
96. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Kim YG, Chen G, Park JH, Franchi L, et al. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity*. 2007 Apr;26(4):433-43.
97. Marina-Garcia N, Franchi L, Kim YG, Miller D, McDonald C, Boons GJ, et al. Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2. *J Immunol*. 2008 Mar 15;180(6):4050-7.
98. Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, Jansen T, Jacobs L, Kramer M, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *J Immunol*. 2005 May 15;174(10):6518-23.
99. Uehara A, Yang S, Fujimoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Shibata K, et al. Muramyl dipeptide and diamino pimelic acid-containing desmuramyl peptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cell Microbiol*. 2005 Jan;7(1):53-61.
100. Leber JH, Crimmins GT, Raghavan S, Meyer-Morse NP, Cox JS, Portnoy DA. Distinct TLR- and NLR-mediated transcriptional responses to an intracellular pathogen. *PLoS Pathog*. 2008 Jan;4(1):e6.
101. Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R, et al. Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol*. 2006 Jun;7(6):576-82.
102. Miao EA, Andersen-Nissen E, Warren SE, Aderem A. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol*. 2007 Sep;29(3):275-88.
103. Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect*. 2002 Jul;4(9):903-14.
104. Kim YG, Park JH, Shaw MH, Franchi L, Inohara N, Nunez G. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. *Immunity*. 2008 Feb;28(2):246-57.
105. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):599-603.
106. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):603-6.

107. Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, et al. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology*. 2003 Jan;124(1):140-6.
108. Tanabe T, Chamaillard M, Ogura Y, Zhu L, Qiu S, Masumoto J, et al. Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J*. 2004 Apr 7;23(7):1587-97.
109. Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ, Franke B, Sprong T, Naber TH, et al. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur J Immunol*. 2004 Jul;34(7):2052-9.
110. van Heel DA, Ghosh S, Butler M, Hunt KA, Lundberg AM, Ahmad T, et al. Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet*. 2005 May 21-27;365(9473):1794-6.
111. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*. 2004 Nov;53(11):1658-64.
112. Voss E, Wehkamp J, Wehkamp K, Stange EF, Schroder JM, Harder J. NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem*. 2006 Jan 27;281(4):2005-11.
113. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jul;3(7):521-33.
114. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol*. 2004 Aug;5(8):800-8.
115. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000 Nov;13(5):715-25.
116. Blau EB. Familial granulomatous arthritis, iritis, and rash. *J Pediatr*. 1985 Nov;107(5):689-93.
117. Miceli-Richard C, Lesage S, Rybojad M, Prieur AM, Manouvrier-Hanu S, Hafner R, et al. CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat Genet*. 2001 Sep;29(1):19-20.
118. Chamaillard M, Philpott D, Girardin SE, Zouali H, Lesage S, Chareyre F, et al. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar 18;100(6):3455-60.
119. Kile RL, Rusk HA. A CASE OF COLD URTICARIA WITH AN UNUSUAL FAMILY HISTORY. *J Am Med Assoc*. 1940 March 23, 1940;114(12):1067-8.
120. Muckle TJ, Wellsm. Urticaria, deafness, and amyloidosis: a new heredo-familial syndrome. *Q J Med*. 1962 Apr;31:235-48.
121. Prieur AM, Griscelli C, Lampert F, Truckenbrodt H, Guggenheim MA, Lovell DJ, et al. A chronic, infantile, neurological, cutaneous and articular (CINCA) syndrome. A specific entity analysed in 30 patients. *Scand J Rheumatol Suppl*. 1987;66:57-68.
122. Lee AG, Warren RW. Optic disc edema in neonatal onset multisystem inflammatory disease (NOMID). *J Neuroophthalmol*. 1999 Sep;19(3):180-1.
123. Stojanov S, Kastner DL. Familial autoinflammatory diseases: genetics, pathogenesis and treatment. *Curr Opin Rheumatol*. 2005 Sep;17(5):586-99.
124. Neven B, Prieur AM, Quartier dit Maire P. Cryopyrinopathies: update on pathogenesis and treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008 Sep;4(9):481-9.
125. Neven B, Callebaut I, Prieur AM, Feldmann J, Bodemer C, Lepore L, et al. Molecular basis of the spectral expression of CIAS1 mutations associated with phagocytic cell-mediated autoinflammatory disorders CINCA/NOMID, MWS, and FCU. *Blood*. 2004 Apr 1;103(7):2809-15.

126. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*. 2004 Mar;20(3):319-25.
127. Dowds TA, Masumoto J, Zhu L, Inohara N, Nunez G. Cryopyrin-induced interleukin 1beta secretion in monocytic cells: enhanced activity of disease-associated mutants and requirement for ASC. *J Biol Chem*. 2004 May 21;279(21):21924-8.
128. Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med*. 2007 Mar 22;356(12):1216-25.
129. Jin Y, Birlea SA, Fain PR, Spritz RA. Genetic variations in NALP1 are associated with generalized vitiligo in a Romanian population. *J Invest Dermatol*. 2007 Nov;127(11):2558-62.
130. Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol*. 1998 Apr;17(1):1-19.
131. Kresse H, Schonherr E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J Cell Physiol*. 2001 Dec;189(3):266-74.
132. Matilla A, Radrizzani M. The Anp32 family of proteins containing leucine-rich repeats. *Cerebellum*. 2005;4(1):7-18.
133. Hohenester E, Hussain S, Howitt JA. Interaction of the guidance molecule Slit with cellular receptors. *Biochem Soc Trans*. 2006 Jun;34(Pt 3):418-21.
134. Chen Y, Aulia S, Li L, Tang BL. AMIGO and friends: an emerging family of brain-enriched, neuronal growth modulating, type I transmembrane proteins with leucine-rich repeats (LRR) and cell adhesion molecule motifs. *Brain Res Rev*. 2006 Aug;51(2):265-74.
135. Ko J, Kim E. Leucine-rich repeat proteins of synapses. *J Neurosci Res*. 2007 Oct;85(13):2824-32.
136. Price SR, Evans PR, Nagai K. Crystal structure of the spliceosomal U2B''-U2A' protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA. *Nature*. 1998 Aug 13;394(6694):645-50.
137. Liker E, Fernandez E, Izaurralde E, Conti E. The structure of the mRNA export factor TAP reveals a cis arrangement of a non-canonical RNP domain and an LRR domain. *EMBO J*. 2000 Nov 1;19(21):5587-98.
138. Niemann HH, Schubert WD, Heinz DW. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. *Microbes Infect*. 2004 Jan;6(1):101-12.
139. Bierre H, Sabet C, Personnic N, Cossart P. Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect*. 2007 Aug;9(10):1156-66.
140. DeYoung BJ, Innes RW. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat Immunol*. 2006 Dec;7(12):1243-9.
141. McHale L, Tan X, Koehl P, Michelmore RW. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biol*. 2006;7(4):212.
142. Ryan CA, Huffaker A, Yamaguchi Y. New insights into innate immunity in *Arabidopsis*. *Cell Microbiol*. 2007 Aug;9(8):1902-8.
143. Martinon F, Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol*. 2005 Aug;26(8):447-54.
144. Pancer Z, Cooper MD. The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:497-518.
145. West AP, Koblansky AA, Ghosh S. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:409-37.

146. Rogozin IB, Iyer LM, Liang L, Glazko GV, Liston VG, Pavlov YI, et al. Evolution and diversification of lamprey antigen receptors: evidence for involvement of an AID-APOBEC family cytosine deaminase. *Nat Immunol.* 2007 Jun;8(6):647-56.
147. Buchanan SG, Gay NJ. Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 1996;65(1-2):1-44.
148. Kajava AV. Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J Mol Biol.* 1998 Apr 3;277(3):519-27.
149. Bella J, Hindle KL, McEwan PA, Lovell SC. The leucine-rich repeat structure. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Aug;65(15):2307-33.
150. Kobe B, Deisenhofer J. Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature.* 1993 Dec 23-30;366(6457):751-6.
151. Enkhbayar P, Kamiya M, Osaki M, Matsumoto T, Matsushima N. Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins. *Proteins.* 2004 Feb 15;54(3):394-403.
152. McEwan PA, Scott PG, Bishop PN, Bella J. Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans. *J Struct Biol.* 2006 Aug;155(2):294-305.
153. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73.
154. Thein SL, Wallace RB. The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. in *Human Genetic Disease A Practical Approach* (Davies, K E, ed). 1986;IRL, Oxford:33-50.
155. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988 Jan 29;239(4839):487-91.
156. Le Pecq JB, Paoletti C. A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Anal Biochem.* 1966 Oct;17(1):100-7.
157. Hudson B, Jacobs R. The ultraviolet transitions of the ethidium cation. *Biopolymers.* 1975;14(6):1309-12.
158. Aaij C, Borst P. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta.* 1972 May 10;269(2):192-200.
159. Sharp PA, Sugden B, Sambrook J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry.* 1973 Jul 31;12(16):3055-63.
160. Borst P. Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: how it started. *IUBMB Life.* 2005 Nov;57(11):745-7.
161. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7.
162. Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Apr;86(7):2172-5.
163. Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro.* 1977 Apr;13(4):213-7.
164. Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 1988 Jul 15;67(1):31-40.
165. Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.* 1987 Nov 1;166(2):368-79.

166. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
167. Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem.* 1985 Dec;151(2):369-74.
168. Gill SC, von Hippel PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem.* 1989 Nov 1;182(2):319-26.
169. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 1995 Nov;4(11):2411-23.
170. D'Arcy A. Crystallizing proteins - a rational approach? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1994 Jul 1;50(Pt 4):469-71.
171. Leavitt S, Freire E. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr Opin Struct Biol.* 2001 Oct;11(5):560-6.
172. Luque I, Freire E. Structure-based prediction of binding affinities and molecular design of peptide ligands. *Methods Enzymol.* 1998;295:100-27.
173. Hellmann N, Jaenicke E, Decker H. Two types of urate binding sites on hemocyanin from the crayfish *Astacus leptodactylus*: an ITC study. *Biophys Chem.* 2001 May 18;90(3):279-99.
174. Greenfield N, Fasman GD. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry.* 1969 Oct;8(10):4108-16.
175. McPherson A. Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur J Biochem.* 1990 Apr 20;189(1):1-23.
176. Garman E. 'Cool' crystals: macromolecular cryocrystallography and radiation damage. *Curr Opin Struct Biol.* 2003 Oct;13(5):545-51.
177. Rodgers DW. Cryocrystallography. *Structure.* 1994 Dec 15;2(12):1135-40.
178. Arndt UW, Wonacott AJ. The rotation method in crystallography. North Holland Publishing Co, Amsterdam. 1977.
179. Drenth JP. Principles of protein X-ray crystallography. Springer, New York. 1994.
180. Diederichs K, Karplus PA. Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nat Struct Biol.* 1997 Apr;4(4):269-75.
181. Kabsch W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of Applied Crystallography.* 1993;26(6):795-800.
182. Rossmann MG. The molecular replacement method. *Acta Crystallogr A.* 1990 Feb 1;46 ( Pt 2):73-82.
183. Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, et al. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Protein Sci.* 2007 Nov;Chapter 2:Unit 2 9.
184. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr.* 2007 Aug 1;40(Pt 4):658-74.
185. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1994 Sep 1;50(Pt 5):760-3.
186. Matthews BW. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol.* 1968 Apr 28;33(2):491-7.
187. Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1997 May 1;53(Pt 3):240-55.
188. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2004 Dec;60(Pt 12 Pt 1):2126-32.
189. Brunger AT. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature.* 1992 Jan 30;355(6359):472-5.

190. Hiller S, Kohl A, Fiorito F, Herrmann T, Wider G, Tschopp J, et al. NMR structure of the apoptosis- and inflammation-related NALP1 pyrin domain. *Structure*. 2003 Oct;11(10):1199-205.
191. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):783-801.
192. Ramakrishnan C, Ramachandran GN. Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. II. Allowed conformations for a pair of peptide units. *Biophys J*. 1965 Nov;5(6):909-33.
193. Kabsch W, Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*. 1983 Dec;22(12):2577-637.
194. Papageorgiou AC, Shapiro R, Acharya KR. Molecular recognition of human angiogenin by placental ribonuclease inhibitor--an X-ray crystallographic study at 2.0 Å resolution. *EMBO J*. 1997 Sep 1;16(17):5162-77.
195. Schubert WD, Urbanke C, Ziehm T, Beier V, Machner MP, Domann E, et al. Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell*. 2002 Dec 13;111(6):825-36.
196. Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA, Schiphorst ME, de Groot PG, Sixma JJ, et al. Structures of glycoprotein Ibalph and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science*. 2002 Aug 16;297(5584):1176-9.
197. Fan QR, Hendrickson WA. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*. 2005 Jan 20;433(7023):269-77.
198. Liu L, Botos I, Wang Y, Leonard JN, Shiloach J, Segal DM, et al. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science*. 2008 Apr 18;320(5874):379-81.
199. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*. 2009 Apr 30;458(7242):1191-5.
200. Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA. K2D2: estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Struct Biol*. 2008;8:25.
201. Magde D, Rojas GE, Seybold PG. Solvent Dependence of the Fluorescence Lifetimes of Xanthene Dyes. *Photochemistry and Photobiology*. 1999;70(5):737-44.
202. Manon F, Favier A, Nunez G, Simorre JP, Cusack S. Solution structure of NOD1 CARD and mutational analysis of its interaction with the CARD of downstream kinase RICK. *J Mol Biol*. 2007 Jan 5;365(1):160-74.
203. Coussens NP, Mowers JC, McDonald C, Nunez G, Ramaswamy S. Crystal structure of the Nod1 caspase activation and recruitment domain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Feb 2;353(1):1-5.
204. Srimathi T, Robbins SL, Dubas RL, Hasegawa M, Inohara N, Park YC. Monomer/dimer transition of the caspase-recruitment domain of human Nod1. *Biochemistry*. 2008 Feb 5;47(5):1319-25.
205. Pinheiro AS, Proell M, Eibl C, Page R, Schwarzenbacher R, Peti W. Three-dimensional structure of the NLRP7 pyrin domain: insight into pyrin-pyrin-mediated effector domain signaling in innate immunity. *J Biol Chem*. 2010 Aug 27;285(35):27402-10.
206. Pinheiro AS, Eibl C, Ekman-Vural Z, Schwarzenbacher R, Peti W. The NLRP12 pyrin domain: structure, dynamics, and functional insights. *J Mol Biol*. 2011 Nov 4;413(4):790-803.
207. Bae JY, Park HH. Crystal structure of NALP3 protein pyrin domain (PYD) and its implications in inflammasome assembly. *J Biol Chem*. 2011 Nov 11;286(45):39528-36.

208. Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*. 2007 Sep 21;130(6):1071-82.
209. Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn SJ, Ryu YH, Mah S, et al. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity*. 2009 Dec 18;31(6):873-84.
210. Kobe B, Deisenhofer J. Proteins with leucine-rich repeats. *Curr Opin Struct Biol*. 1995 Jun;5(3):409-16.
211. Bublitz M, Holland C, Sabet C, Reichelt J, Cossart P, Heinz DW, et al. Crystal structure and standardized geometric analysis of InlJ, a listerial virulence factor and leucine-rich repeat protein with a novel cysteine ladder. *J Mol Biol*. 2008 Apr 18;378(1):87-96.
212. Fominaya JM, Hofsteenge J. Inactivation of ribonuclease inhibitor by thiol-disulfide exchange. *J Biol Chem*. 1992 Dec 5;267(34):24655-60.
213. Blazquez M, Fominaya JM, Hofsteenge J. Oxidation of sulfhydryl groups of ribonuclease inhibitor in epithelial cells is sufficient for its intracellular degradation. *J Biol Chem*. 1996 Aug 2;271(31):18638-42.
214. Jenkins J, Pickersgill R. The architecture of parallel beta-helices and related folds. *Prog Biophys Mol Biol*. 2001 Oct;77(2):111-75.
215. Pickersgill R, Jenkins J, Harris G, Nasser W, Robert-Baudouy J. The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium. *Nat Struct Biol*. 1994 Oct;1(10):717-23.
216. Jenkins J, Mayans O, Pickersgill R. Structure and evolution of parallel beta-helix proteins. *J Struct Biol*. 1998;122(1-2):236-46.
217. Marino M, Braun L, Cossart P, Ghosh P. Structure of the InlB leucine-rich repeats, a domain that triggers host cell invasion by the bacterial pathogen *L. monocytogenes*. *Mol Cell*. 1999 Dec;4(6):1063-72.
218. Kobe B, Deisenhofer J. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*. 1995 Mar 9;374(6518):183-6.
219. Hao B, Zheng N, Schulman BA, Wu G, Miller JJ, Pagano M, et al. Structural basis of the Cks1-dependent recognition of p27(Kip1) by the SCF(Skp2) ubiquitin ligase. *Mol Cell*. 2005 Oct 7;20(1):9-19.
220. Iyer S, Holloway DE, Kumar K, Shapiro R, Acharya KR. Molecular recognition of human eosinophil-derived neurotoxin (RNase 2) by placental ribonuclease inhibitor. *J Mol Biol*. 2005 Apr 1;347(3):637-55.
221. Johnson RJ, McCoy JG, Bingman CA, Phillips GN, Jr., Raines RT. Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein. *J Mol Biol*. 2007 Apr 27;368(2):434-49.
222. Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, et al. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*. 2007 Sep 7;130(5):906-17.
223. Morlot C, Thielens NM, Ravelli RB, Hemrika W, Romijn RA, Gros P, et al. Structural insights into the Slit-Robo complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 18;104(38):14923-8.
224. Scott PG, McEwan PA, Dodd CM, Bergmann EM, Bishop PN, Bella J. Crystal structure of the dimeric protein core of decorin, the archetypal small leucine-rich repeat proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 2;101(44):15633-8.
225. Scott PG, Dodd CM, Bergmann EM, Sheehan JK, Bishop PN. Crystal structure of the biglycan dimer and evidence that dimerization is essential for folding and stability of class I small leucine-rich repeat proteoglycans. *J Biol Chem*. 2006 May 12;281(19):13324-32.



226. Seewald MJ, Korner C, Wittinghofer A, Vetter IR. RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger. *Nature*. 2002 Feb 7;415(6872):662-6.
227. Celikel R, McClintock RA, Roberts JR, Mendolicchio GL, Ware J, Varughese KI, et al. Modulation of alpha-thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Ibalpha. *Science*. 2003 Jul 11;301(5630):218-21.
228. Dumas JJ, Kumar R, Seehra J, Somers WS, Mosyak L. Crystal structure of the GpIbalpha-thrombin complex essential for platelet aggregation. *Science*. 2003 Jul 11;301(5630):222-6.
229. Kim JI, Lee CJ, Jin MS, Lee CH, Paik SG, Lee H, et al. Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling. *J Biol Chem*. 2005 Mar 25;280(12):11347-51.
230. Alder MN, Rogozin IB, Iyer LM, Glazko GV, Cooper MD, Pancer Z. Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate. *Science*. 2005 Dec 23;310(5756):1970-3.
231. Kim HM, Oh SC, Lim KJ, Kasamatsu J, Heo JY, Park BS, et al. Structural diversity of the hagfish variable lymphocyte receptors. *J Biol Chem*. 2007 Mar 2;282(9):6726-32.
232. Pancer Z, Amemiya CT, Ehrhardt GR, Ceitlin J, Gartland GL, Cooper MD. Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature*. 2004 Jul 8;430(6996):174-80.
233. Han BW, Herrin BR, Cooper MD, Wilson IA. Antigen recognition by variable lymphocyte receptors. *Science*. 2008 Sep 26;321(5897):1834-7.
234. Alder MN, Herrin BR, Sadlonova A, Stockard CR, Grizzle WE, Gartland LA, et al. Antibody responses of variable lymphocyte receptors in the lamprey. *Nat Immunol*. 2008 Mar;9(3):319-27.
235. Girardin SE, Jehanno M, Mengin-Lecreulx D, Sansonetti PJ, Alzari PM, Philpott DJ. Identification of the critical residues involved in peptidoglycan detection by Nod1. *J Biol Chem*. 2005 Nov 18;280(46):38648-56.
236. Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):372-9.
237. Reubold TF, Wohlgemuth S, Eschenburg S. Crystal structure of full-length apaf-1: how the death signal is relayed in the mitochondrial pathway of apoptosis. *Structure*. 2011 Aug 10;19(8):1074-83.
238. Yuan S, Yu X, Topf M, Ludtke SJ, Wang X, Akey CW. Structure of an apoptosome-procaspase-9 CARD complex. *Structure*. 2010 May 12;18(5):571-83.
239. Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, Willingham SB, Ye Z, Zimmermann AG, et al. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 8;104(19):8041-6.
240. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*. 2008 Aug;9(8):847-56.
241. Kanneganti TD, Ozoren N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature*. 2006 Mar 9;440(7081):233-6.
242. Lindauer M, Wong J, Magun B. Ricin Toxin Activates the NALP3 Inflammasome. *Toxins (Basel)*. 2010 Jun 1;2(6):1500-14.
243. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*. 2008 Aug;9(8):857-65.

- 
244. Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, Kim S, Schmid-Burgk J, Cavlar T, et al. Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Mar;68(5):765-83.

## Anhang

Analyse der Kristallstruktur von hNalp1-LRR nach Abschluss der Verfeinerung mit dem Programm SFcheck aus dem CCP4 Programmpaket.

<p style="text-align: center;"><b>Crystal</b></p> <p>Cell parameters:  a: 84.69 A    b: 84.69 A    c: 130.47 A  <math>\alpha</math>: 90.00    <math>\beta</math>: 90.00    <math>\gamma</math>: 120.00  Space group: P 61 2 2</p>	<p style="text-align: center;"><b>Structure Factors</b></p> <p><b>Input</b></p> <p>Nominal resolution range: 29.8 – 1.65 A  Reflections in file: 33885  Unique reflections above 0: 33885                            above 1<math>\sigma</math>: 33883                            above 3<math>\sigma</math>: 30565</p> <p><b>SF CHECK</b></p> <p>Nominal resolution range: 29.8 – 1.65 A  (max. from input data, min. from author)</p> <p>Used reflections: 33884  Reflections out of resolution: 1  Completeness: 99.8 %  R<sub>stand</sub>(F) = <math>\langle \sigma(F) \rangle / \langle F \rangle</math> : 0.014  Anisotropic distribution of Structure Factors  ratio of eigen values: 0.8886 0.8886 1.0000  B<sub>overall</sub> (by Patterson): 26.A<sup>2</sup>  Optical resolution: 1.42 A  Expected opt. resol. for complete data set: 1.42 A  Estimated minimal error: 0.004 A</p>
<p style="text-align: center;"><b>Model</b></p> <p>1890 atoms (217 water molecules)  Number of atoms with aniso_U: 1890  Number of chains: 3  Volume not occupied by model: 41.6 %  <math>\langle B \rangle</math> (for atomic model): 27.5 A<sup>2</sup>  <math>\sigma(B)</math>: 11.33 A<sup>2</sup>  Matthews coefficient: 2.55  Corresponding solvent % : 51.43</p>	<p style="text-align: center;"><b>Model vs. Structure Factors</b></p> <p>R-factor for all reflections: 0.225  Correlation factor: 0.941  R-factor: 0.230  for F &gt; 2.0<math>\sigma</math>  nom. resolution range: 29.80 – 1.65A  reflections used: 33876</p> <p>Rfree: 0.246  Nfree: 1694  R-factor without free-refl.: 0.229  Non free-reflections: 32182  <math>\langle u \rangle</math> (error in coords by Luzzati plot): 0.218 A  Estimated maximal error: 0.059 A  DPI: 0.070 A</p> <p style="text-align: center;"><b>Scaling</b></p> <p>Scale: 1.150  Bdiff: -0.99  Anisothermal Scaling (Beta):  -0.0100 -0.0100 0.9954 -0.0050 0.0000 0.0000  Solvent correction – Ks,Bs: 0.721 250.002</p>
<p style="text-align: center;"><b>Refinement</b></p> <p>Program: REFMAC 5.5.0070  Nominal resolution range: 29.8 – 1.65 A  Reported R-factor: 0.148  Number of reflections used: 32189  Reported Rfree: 0.18  Sigma cut-off: N.A.</p>	

## Kompletter Vergleich von hNalp1-LRR mit dem artifiziiellen „RI-like“ Protein.

		Section 1					
	(1)	1	10	20	30	40	54
RI-like	(1)	-----LXXLXLXXNXLXXXXXXXXLXXXLXXXXXXXXLXXLXLXXCXLXXXX					LXXXX
hNalp1	(1)	MAGGAWGRLACYLEFLKKEELKEFQLLLANKAHSRSSSGETPAQPEKTSGM					MEVAL
Consensus	(1)						L
		Section 2					
	(55)	55	60	70	80	90	108
RI-like	(44)	XXXXLXXXLXXXXXIXXLXLXXNXLXXXXXXXXLXXXLXXXXXXXXLXXLXLXXCXL					LXXXX
hNalp1	(55)	SYLVAQYGEQRAWDIALHTWEQMGILRSLSLCAQAQEGAGHSPSPFPYSPSEPHLGSP					
Consensus	(55)						L L
		Section 3					
	(109)	109	120	130	140	150	162
RI-like	(98)	XXXXXXXXLXXXLXXXXXXXXLXXLXLXXNXLXXXXXXXXLXXXLXXXXXXXXLXXLXLXX					LXXLXX
hNalp1	(109)	SQPTSTAVLMPWIHELPAAGCTQGSERRVLRQLPDTSGRRWREISASLYQALPS					
Consensus	(109)						L L L
		Section 4					
	(163)	163	170	180	190	200	216
RI-like	(152)	CXLXXXXXXXXLXXXLXXXXXIXXLXLXXNXLXXXXXXXXLXXXLXXXXXXXXLXXLXL					LXXLX
hNalp1	(163)	SPDHESPSQESPNAPTSTAVLGSWGSPPQPSLAPREQEAPGTQWPLDETSGLIYY					
Consensus	(163)						L N
		Section 5					
	(217)	217	230	240	250	260	270
RI-like	(206)	LXXCXLXXXXXXXXLXXXLXXXXXIXXLXLXXNXLXXXXXXXXLXXXLXXXXXXXXLX					LX
hNalp1	(217)	TEIREREREKSEKGRPPWAAVVGTPPQAHTSLQPHHPWEPSVRESLCSTWPWK					
Consensus	(217)						
		Section 6					
	(271)	271	280	290	300	310	324
RI-like	(260)	XLXLXXCXLXXXXXXXXLXXXLXXXXXIXXLXLXXNXLXXXXXXXXLXXXLXXXXX					LXXXX
hNalp1	(271)	NEDFNQKFTQLLLLQRPHPRSQDPLVKRSWPDYVEENRGLHIEIRDLFGLDTP					
Consensus	(271)						
		Section 7					
	(325)	325	330	340	350	360	378
RI-like	(314)	LXXLXLXXLXXCXLXXXXXXXXLXXXLXXXXXIXXLXLXXNXLXXXXXXXXLXXLXX					LXXXXLXX
hNalp1	(325)	QEPRIVLQGAAGIGKSTLARQVKEAWGRGQLYGDRFQHVYFYFSCRELAQSKVV					
Consensus	(325)						I I N L L
		Section 8					
	(379)	379	390	400	410	420	432
RI-like	(368)	XXXXLXXLXLXXCXLXXXXXXXXLXXXLXXXXXIXXLXLXXNXLXXXXXXXXLXXLXX					LXXXX
hNalp1	(379)	SLAEILIGKDGATPAPIRQILSRPERILFILDGVDEPGWVLQEPSSELCLHWSQ					
Consensus	(379)						L L
		Section 9					
	(433)	433	440	450	460	470	486
RI-like	(422)	LXXXXXXXXLXXLXLXXCXLXXXXXXXXLXXXLXXXXXIXXLXLXXNXLXXXXXXXXL					LXXXXXXL
hNalp1	(433)	PQPADALGSLGKTIPEASFLITARTTALQNLIPSLEQARWVEVLGFSESSR					
Consensus	(433)						L L L
		Section 10					
	(487)	487	500	510	520	530	540
RI-like	(476)	XXXLXXXXXXXXLXXLXLXXCXLXXXXXXXXLXXXLXXXXXIXXLXLXXNXLXXXXX					LXXXXXX
hNalp1	(487)	KEYFYRYFTDERQAIRAFRLVKSNEKELWALCLVPVSWLACTCLMQQMKRKEKL					
Consensus	(487)						L L L L N

Section 11							
	(541)	541	550	560	570	580	594
RI-like	(530)	XXLXXXXLXXXXXXXXLXXLX	I	XXCX	L	XXXXXXXXXXLXXXXXX	LX
hNalp1	(541)	TLTSKTTTTLCLHYLAQA	L	QAQP	L	GPQLRDLCSLAAEGIWQKKT	L
Consensus	(541)		L	L			L

Section 12							
	(595)	595	600	610	620	630	648
RI-like	(584)	XXXXX	I	XXXXLXXXXXXXXLXXLX	LXXCX	L	XXXXXXXXXXLXXXL
hNalp1	(595)	GLDGA	I	ISTFLKMGILQEHP	I	PLSYSFIHL	CFQE
Consensus	(595)		I				L

Section 13							
	(649)	649	660	670	680	690	702
RI-like	(638)	LXXXXXXXX	L	XXXXLXXXXXXXXLXXLX	LXXCX	L	XXXXXXXXXXLXXXL
hNalp1	(649)	CIIDLEKT	L	EAYGIHGLFGAST	T	RFLLG	L
Consensus	(649)		L				L

Section 14							
	(703)	703	710	720	730	740	756
RI-like	(692)	XNLXXXXXXXXLXXLX	XXXXXX	LXXLX	LXXCX	L	XXXXXXXXXXLXXXL
hNalp1	(703)	WVPSLQ	L	LLQPHSLES	L	HCLYETR	NKTF
Consensus	(703)					L	L

Section 15							
	(757)	757	770	780	790	800	810
RI-like	(746)	X	L	XXNLXXXXXXXXLXXLX	XXXXXX	LXXLX	LXXCX
hNalp1	(757)	C	I	KFSRHVKKLQLIEGR	Q	HRSTW	SPTMV
Consensus	(757)	I					L

Section 16							
	(811)	811	820	830	840	850	864
RI-like	(800)	XXLXL	LXXNX	LXXXXXXXXL	XXXL	XXXXXXXXL	XXL
hNalp1	(811)	KE	L	DL	SGN	SLSHSAVKSL	CKT
Consensus	(811)	L	L	N	L		L

Section 17							
	(865)	865	870	880	890	900	918
RI-like	(854)	XXLXXL	LXXNX	LXXXXXXXXL	XXXL	XXXXXXXXL	XXL
hNalp1	(865)	QT	L	TE	L	DSFNV	L
Consensus	(865)	L	L	L	N	L	

Section 18							
	(919)	919	930	940	950	960	972
RI-like	(908)	XXXXX	LXX	L	LXXNX	LXXXXXXXXL	XXXL
hNalp1	(919)	SASPS	L	KE	L	DL	QQ
Consensus	(919)		L	L	L	N	L

Section 19							
	(973)	973	980	990	1000	1010	1026
RI-like	(962)	XXLXXXXX	LXXLX	LXXNX	L	XXXXXXXXL	XXXL
hNalp1	(973)	ALEQEK	P	QL	L	IFSR	RKPS
Consensus	(973)		L		L		

Section 20							
	(1027)	1027	1040	1050	1060	1070	1080
RI-like	(1016)	XLXXX	L	XXXXLXXLX	L	XXNL	LXXXXXXXX
hNalp1	(1027)	ANLKL	L	DVSKIF	P	IAE	SSPEV
Consensus	(1027)		L		I		L

		Section 21					
(1081)	1081	1090	1100	1110	1120	1134	
RI-like (1070)	XXXXLXXXLXXXXXXXXLXXLX	I	XXNXLXXXXXXXXLXXXLXXXXXXXXLXX	I	XLXXCXL		
hNalp1 (1081)	GPTGVPVATEVVDKEKNLYRV	V	HFPVAGSYRWPNTGLCFVMREAVTVE	I	EFCVVDQ		
Consensus (1081)		L		I			
		Section 22					
(1135)	1135	1140	1150	1160	1170	1188	
RI-like (1124)	XXXXXXXXLXXX	L	XXXXLXXXLXXXLXXXXXXXX	L	XXXXLXXXXXXXX	LXXLXLXX	
hNalp1 (1135)	FLGEINPQHSWV	V	VAGPL	L	DIKAEFGAVEAVHLPHF	V	
Consensus (1135)		L	L		L	L L	
		Section 23					
(1189)	1189	1200	1210	1220	1230	1242	
RI-like (1178)	CXLXXXXXXXXLXXXLXXXXXXXXLXXLXLXXNX	L	XXXXXXXXLXXX	L	XXXXXXXXLXX	LX	
hNalp1 (1189)	EEGMLLEKPARVELHHIVLENPSFSP	L	GVL	L	KMIHNALRFIP	V	
Consensus (1189)				L	L	L	
		Section 24					
(1243)	1243	1250	1260	1270	1280	1296	
RI-like (1232)	LXXCXLXXXXXXXXLXXXLXXXXX	L	XXLXLXXNXLXXXXXXXX	L	XXXLXXXXXXXXLX		
hNalp1 (1243)	PEEVTFLYLI	L	IPSDCSIRKAIDD	L	EMKFQFVRIHKPPPLTP	L	
Consensus (1243)				L		L	
		Section 25					
(1297)	1297	1310	1320	1330	1340	1350	
RI-like (1286)	XLX	L	XXCXLXXXXXXXXLXXXLXXXXXXXXLXXLX	L	XXNXLXXXXXXXXLXXX	L	
hNalp1 (1297)	SGM	L	EILPKELELCYRSPGEDQLFSEFYVGH	L	GSGIRLQVKDKKDETLV	WEALV	
Consensus (1297)	L			L		L	
		Section 26					
(1351)	1351	1360	1370	1380	1390	1404	
RI-like (1340)	XLXX	L	XLXXCXLXXXXXXXXLXXXLXXXXXXXXLXXLXLXX	N	L	XXXXXXXXL	
hNalp1 (1351)	KPGD	L	IMPATTL	L	IPPARIAVPSPLDAPQLLHFVDQYRE	Q	
Consensus (1351)	L		I			N I L	
		Section 27					
(1405)	1405	1410	1420	1430	1440	1458	
RI-like (1394)	XXXXLXXXLXLXXCXLXXXXXXXXLXXXLXXXXXXXXLXXLXLXXNXLXXXXXXXX	L	XXX				
hNalp1 (1405)	GQVLSQEYERVLAENTRPSQMRKLFSLSQSWDRKCKDGLYQALKETHPH	L	IME				
Consensus (1405)						L	
		Section 28					
(1459)	1459	1470	1480	1493			
RI-like (1448)	I	XXXXXXXXLXX	L	X	L	XXCXLXXXXXXXXLXXXLXXXXX	
hNalp1 (1459)	I	WEKGSKKGL	L	P	L	SS-----	
Consensus (1459)	L		L	L			

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die auf so vielfältige Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danke

Prof. Dr. Alfred Wittinghofer

für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, das tolle wissenschaftliche Umfeld sowie für das Interesse an meiner Arbeit und deren Begutachtung.

Dr. Susanne Eschenburg

für das spannende und herausfordernde Thema, die große Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen während der gesamten Zeit, interessante und anregende Diskussionen und natürlich für das intensive Korrekturlesen dieser Arbeit.

Prof. Dr. Roland Winter

für die spontane und unbürokratische Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Thomas Reubold

für die Betreuung im Labor, die vielen fachlichen Gespräche und Anregungen und die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft.

Sabine Wohlgemuth

für die technische Unterstützung und die stets angenehme Atmosphäre im Labor.

der X-Ray Community

für die Einführung in die Technik und die Unterstützung bei allen Problemen damit.

meinen Bürokollegen

für die allzeit gute Stimmung und den Spaß, aber auch für inspirierende Gespräche und Tipps.

allen Mitgliedern der ehemaligen Abteilung I Strukturelle Biologie

für die schöne Zeit, die ich nie vergessen werde.

allen Mitarbeitern des MPI Dortmund

für das angenehme und professionelle Umfeld.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, die mich in all meinen Vorhaben immer vorbehaltlos unterstützt hat und ohne die ich diesen Weg nie hätte gehen können. Danke!