

Expression und Funktionalität von NOD1 und NOD2 in murinen Prädipozyten des mesenterialen Fetts

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Thorsten Stroh
aus Berlin

2011

Angefertigt wurde die Arbeit in der Zeit von September 2007 bis Januar 2011 an der Charité – Universitätsmedizin Berlin Campus Benjamin Franklin unter Leitung von Privatdozentin Dr. med. Britta Siegmund in der Medizinischen Klinik I für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie.

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Blankenstein

2. Gutachter: PD Dr. Britta Siegmund

Disputation am 03.06.2011

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bit	<i>Binary Digit</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CARD	Caspase-rekrutierenden Domäne
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
Ct	<i>Crossing Point</i>
Da	Dalton
DAP	Diaminopimelinsäure
17-DMAG	17-(Dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	Fötale Rinderserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HSP	Hitzeschockprotein
HV	<i>High Voltage</i>
iE-DAP	γ -D-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure
iE-Lys	γ -D-Glutamyl-Lysin

Ig	Immunglobulin
IGBT	<i>Insulated Gate Bipolar Transistor</i>
IKK	<i>Inhibitor of NF-κB-Kinase</i>
IL	Interleukin
IRF1	<i>Interferon Regulatory Faktor 1</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reich
LT-DAP	Laktyl-tetra-Diaminopimelinsäure
LV	<i>Low Voltage</i>
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
M-CSF	Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
MDP	Muramyl-dipeptid
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88</i>
M-Tri _{DAP}	N-Acetyl-Muramyl-L-Alanyl- γ -D-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure
NF- κ B	Nukleärer Faktor- κ B
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
OD	Optische Dichte
RICK	<i>Rip-like interacting caspase-like apoptosis-regulatory protein kinase</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PP	Polypropylen
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PS	Polystyrol
RLU	<i>Relative Light Unit</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RU	<i>Relative Response Units</i>
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>

SOC	<i>Super Optimal Broth</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAB	<i>TAK1-binding protein</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAK	<i>TGFβ-activated protein kinase</i>
TAMRA	Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNBS	Trinitrobenzensulfonsäure
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TRAF	<i>TNF Receptor Associated Factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ubc	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme</i>
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Mesenteriales Fett als multifunktionales Organ.....	1
1.2	Funktion und klinische Relevanz der <i>Pattern Recognition</i> -Rezeptoren <i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i> (NOD)-Proteine 1 und 2	3
1.3	Die Domänenstruktur von NOD1 und NOD2.....	5
1.4	Elektroporation als effiziente Transfektionsmethode eukaryontischer Zellen.....	9
1.5	Arbeitshypothese und sich daraus ableitende Fragestellungen	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Antikörper	13
2.2	Zytokine	14
2.3	Oligonukleotide.....	14
2.4	Untersuchungsmaterial.....	17
2.5	Kultur eukaryontischer Zellen	19
2.5.1	Kulturbedingungen und Medien	19
2.5.2	Isolation primärer Zellen	20
2.5.3	Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen	21
2.5.4	Vitalfärbung zur Bestimmung der Lebendzahl	22
2.5.5	Nachweis von Mykoplasmen	22
2.5.6	Durchflusszytometrie	23
2.5.7	Inkubation von Präadipozyten und Makrophagen mit <i>Nucleotide- binding Oligomerization Domain</i> (NOD)1- und 2-spezifischen Liganden und Lipopolysaccharid	23
2.6	Molekularbiologische Methoden	24
2.6.1	Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen.....	24
2.6.2	Reverse Transkription von mRNA	24
2.6.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	26

2.6.4	Transformation von kompetenten <i>Escherichia coli</i>	27
2.6.5	Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren.....	28
2.6.6	Isolation von Plasmid-DNA	28
2.6.7	Restriktionsspaltungen	29
2.6.8	DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	29
2.6.9	Ligation von DNA.....	30
2.6.10	DNA-Sequenzierung.....	31
2.6.11	Amplifikation von DNA	31
2.6.12	Relative und absolute Quantifizierung von DNA mittels quantitativer <i>Real-Time-PCR</i>	33
2.6.13	Ortsgerichtete Mutagenese.....	37
2.7	Proteinbiochemische Methoden	38
2.7.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	38
2.7.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.7.3	Western Blot und immunologische Detektion der immobilisierten Proteine	40
2.7.4	Quantifizierung von Zytokinen mittels <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> und <i>Cytometric Bead Array</i>	41
2.7.5	Nachweis der Luciferase-vermittelter Biolumineszenz eines Nukleären Faktor- κ B-Reporterplasmids.....	42
2.7.6	Ligand-Rezeptor Bindungsstudien mittels Oberflächen-Plasmon- Resonanz-Spektroskopie.....	43
2.8	Transfektion eukaryontischer Zellen.....	44
2.8.1	Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen mit Plasmid-DNA.....	44
2.8.2	Nucleofection muriner Präadipozyten	46
2.8.3	Stabile Transfektion der Zelllinie J558L	46
2.8.4	Transfektion muriner Präadipozyten mit <i>Small Interfering RNA</i>	48
2.9	Statistische Auswertung	48

3	Ergebnisse	49
3.1	Entwicklung und Etablierung einer neuartigen Elektroporationsstrategie für den spezifischen <i>Knock-down</i> durch <i>Small Interfering</i> (si)RNA.....	49
3.1.1	Aufbau und Funktionsweise des Transfektionssystems ELPorator 1000.....	49
3.1.2	Erzeugung von Stromimpulsen wählbarer Länge mittels Mikrocontrollern	50
3.1.3	Vergleich der Transfektionseffizienzen des ELPorator 1000 mit der Methode der Nucleofection am Beispiel der Transfektion primärer muriner Präadipozyten mit einem <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> (EGFP)-kodierenden Plasmid.....	55
3.1.4	Einfluss der Impulskombination auf Effizienz der Transfektion von Plasmid-DNA in murinen Präadipozyten.....	56
3.1.5	Einfluss der eingesetzten DNA-Menge auf die Effizienz der Transfektion von Plasmid-DNA.....	57
3.1.6	Transfektionseffizienzen und Zellerhalt nach Transfektion von Suspensionszellen mit Plasmid-DNA.....	59
3.1.7	Effizienz der Transfektion definierter Subpopulationen in Zellgemischen mit Plasmid-DNA	60
3.1.8	Auswirkung der Menge an eingesetzter siRNA auf die Dauer des <i>Gen-Knock-downs</i> nach Transfektion mit kombinierten <i>High Voltage</i> - und <i>Low Voltage</i> -Impulsen	62
3.1.9	Funktionale Auswirkungen transfizierter siRNA.....	64
3.2	Etablierung einer <i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i> (NOD)1 und 2- spezifischen quantitativer <i>Real-Time-PCR</i>	65
3.2.1	Validierung von Plasmidstandards für NOD1 und NOD2	65
3.2.2	Linearer Zusammenhang zwischen Zellzahl und daraus isolierter Gesamt-RNA-Menge und Ausschluss von Verunreinigungen mit genomischer DNA.....	68
3.2.3	Basale Expression von NOD1 und NOD2 in murinen Präadipozyten.....	70
3.3	Modulation der Expression von NOD1 und NOD2 durch NOD-Liganden und proinflammatorische Stimuli in murinen Präadipozyten.....	73

3.3.1	Expression von NOD1-mRNA.....	73
3.3.2	Expression von NOD2-mRNA.....	74
3.3.3	Zytokinantwort muriner Präadipozyten auf spezifische Liganden für NOD1 und NOD2.....	76
3.4	Spezifität des NOD1-Liganden Laktyl-tetra-Diaminopimelinsäure und dadurch ausgelöster Signaltransduktionsweg in murinen Präadipozyten	78
3.4.1	Effektivität des NOD1- <i>Knock-downs</i> in murinen Präadipozyten mittels spezifischer siRNA.....	78
3.4.2	NOD1-Spezifität von Laktyl-tetra-Diaminopimelinsäure bei Präadipozyten.....	79
3.4.3	Beteiligung von Hitzeschockprotein 90 an der NOD1-vermittelten IL-6-Produktion durch Präadipozyten.....	80
3.4.4	Aktivierung des Nukleären Faktor- κ B-Signaltransduktionsweges in Präadipozyten durch NOD1-spezifische Stimulation	81
3.4.5	Synergistischer Effekt des NOD2-Liganden Muramyldipeptid mit Lipopolysaccharid auf die IL-6-Produktion muriner Makrophagen.....	83
3.5	Rekombinante Herstellung der NOD1- und NOD2-Proteine	85
3.5.1	Klonierung von murinem NOD1 und NOD2 aus einem cDNA-Pool.....	85
3.5.2	NOD2 als EGFP-Fusionsprotein im Vektor pEGFP-N2.....	87
3.5.3	Überexpression von NOD2 im eukaryontischen System.....	90
3.5.4	Etablierung und Charakterisierung stabil exprimierender Zellklone für das NOD2-EGFP-Fusionsprotein	92
3.5.5	Definition eines geeigneten Puffersystems für die Herstellung von Zellextrakten, die das native NOD2-EGFP-Fusionsproteins enthielten	93
3.6	Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie	94
3.6.1	Nachweis der spezifischen Bindung eines immobilisierten anti-EGFP-Antikörpers an das NOD2-EGFP-Fusionsprotein	94
3.6.2	Bindung des NOD2-Liganden MDP durch das NOD2-EGFP-Fusionsprotein	95
3.6.3	Test weiterer NOD-Liganden auf Bindung durch NOD2-EGFP	97

4	Diskussion	99
4.1	Ausgangsfragestellung.....	99
4.2	Expression der <i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i> (NOD)- Proteine 1 und 2 in primären Präadipozyten des mesenterialen Fetts.....	100
4.3	Modulation der Expressionshöhe von NOD1 und NOD2 durch exogene und endogene Faktoren in primären Präadipozyten aus dem mesenterialen Fett.....	103
4.4	Effiziente Transfektion primäre Präadipozyten aus dem mesenterialen Fett der Maus <i>mit Small Interfering</i> (si)RNA und Vektor- bzw. Reporterkonstrukten.....	107
4.5	Charakterisierung des durch die Interaktion von NOD1 mit spezifischen Liganden in Präadipozyten rekrutierten Signaltransduktionsweges	111
4.6	Nachweis der direkten Bindung von Muramyldipeptid durch NOD2.....	113
5	Zusammenfassung.....	118
6	Literaturverzeichnis	122
7	Abbildungsverzeichnis	133
8	Veröffentlichungen.....	136
9	Danksagung.....	137
10	Lebenslauf.....	138

1 Einleitung

1.1 Mesenteriales Fett als multifunktionales Organ

Das Fettgewebe der Vertebraten stellt einen Bindegewebstyp dar und lässt sich in braunes und weißes Fettgewebe unterteilen. Das plurivakuoläre Fettgewebe besitzt zahlreiche Mitochondrien wodurch es im Gegensatz zu dem weißen Fettgewebe eine braune Färbung aufweist. Die hohe Anzahl der Mitochondrien im braunen Fettgewebe erklärt sich aus dessen Funktion, die in der Erzeugung von Wärme durch Thermogenese besteht. Bei diesem Prozess wird durch die stete Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) in einem Substratzyklus zwischen Glykolyse und Glukoneogenese Wärme erzeugt. Die hierfür benötigten hohen Mengen an ATP wiederum stammen aus der Oxidation von Fettsäuren in den Mitochondrien, bei der die Reduktionsäquivalente in Form von reduziertem Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, Flavin-Adenin-Dinukleotid und Acetyl-Coenzym A anfallen, die in der Atmungskette bzw. im Citratzyklus der ATP-Bildung dienen. Braunes Fettgewebe findet sich beim Menschen vor allem bei Neugeborenen, da diese keine Wärme durch Kältezittern erzeugen können [1]. Dagegen kommt weißes Fettgewebe mit wenigen Ausnahmen, wie z.B. Hand- und Fußrücken, im ganzen Körper verteilt vor. Neben der Funktion als Energiespeicher dient es in der Unterhaut als subkutanes Fett der Wärmeisolierung. Als sogenanntes Baufett dienen Fettpolster zum einen als mechanischer Schutz, z.B. unter den Fußsohlen oder dem Gesäß, zum anderen als Organlager, wie z.B. den Nieren und dem Herzmuskel.

Histologisch betrachtet besteht das Fettgewebe zum größten Teil aus Adipozyten. Adipozyten sind ca. 100 µm große Zellen, die sich lichtmikroskopisch als runde Zellen darstellen, die mit einer großen, fetthaltigen Vakuole ausgefüllt sind. Solch eine Vakuole findet sich bei den Vorläufern der Adipozyten, den Präadipozyten, dagegen nicht. Präadipozyten erscheinen als spindelförmige, fibroblastenähnliche Zelle mit einem prominenten, runden Zellkern. Notwendige Faktoren für eine Ausreifung von Präadipozyten in Adipozyten sind neben Insulin auch die Aktivierung des *Peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) γ , z.B. durch Fettsäure-Derivate sowie Transkriptionsfaktoren aus der Familie der *C/enhancer binding proteins* (C/EBP) [2, 3]. Die Adipogenese hat neben der Expression multipler Gene der Lipogenese auch eine erhöhte Zytokinproduktion in Gegenwart von *Toll-like-Rezeptor* (TLR)-Liganden des Fettgewebes zur Folge [4]. Neben Adipozyten und Präadipozyten, finden sich im Fettgewebe sekundär eingewanderte Zellen wie z.B. Lymphozyten und Makrophagen, aber auch Blutgefäße und Fettgewebmatrix [5].

Aktuelle Forschungen belegen, dass das Fettgewebe als ein aktives endokrines Organ betrachtet wird, das zahlreiche Mediatoren sezerniert, die aufgrund ihres Ursprunges als Adipokine bezeichnet werden. Es sind zurzeit mehr als 50 verschiedene Mediatoren bekannt, die die unterschiedlichsten Aufgaben im Organismus wahrnehmen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Das Fettgewebe als Quelle immunmodulierender Mediatoren (Auszug nach [6]).

Mediator	Wirkung		Referenz
	Metabolismus	Immunsystem	
IL-1	anorektische Wirkung, erhöht Lipolyse, hemmt Differenzierung von Adipozyten	proinflammatorisch	[7]
IL-6	vermindert Sensitivität gegenüber Insulin, erhöht Lipolyse	proinflammatorisch, anti-apoptotisch	[8, 9]
TNF- α	hemmt Signaltransduktion des Insulin-Rezeptors	proinflammatorisch	[10, 11]
IL-8		Chemokin für Neutrophile	[10]
MCP-1		Chemokin für Makrophagen	[12]
Adiponektin	reguliert die Wirkung von Insulin	anti-inflammatorisch	[13]
Leptin	Sättigungsgefühl	proinflammatorisch	[14]
Apelin	hemmt die Ausschüttung von Insulin	fördert die Bildung von IL-6 und IL-8	[15]
Mic-1	hemmt Appetit	proapoptotisch	[16]

Als Beispiel sei das 1994 entdeckte Leptin genannt [17]. Leptin wird in Abhängigkeit der Nahrungszufuhr von Adipozyten gebildet und signalisiert dem zentralen Nervensystem ein Sättigungsgefühl, das die weitere Nahrungszufuhr vermindert [18]. Die strukturelle Ähnlichkeit von Leptin mit der Gruppe der langkettigen helikalen Zytokinen, zu der auch die IL-6 und IL-12 gezählt werden, führten zu der Aufklärung der Funktionen von Leptin als ein Zytokin [19].

Obwohl Leptin außer von Adipozyten auch von T-Zellen im Kontext eines Entzündungsgeschehen gebildet wird, konnte das von den Adipozyten gebildete Leptin als das biologisch relevante Leptin bei intestinalen Entzündungen identifiziert werden [20]. Es fördert die Proliferation von naiven T-Zellen [21] unterstützt aber zugleich eine T-Helferzell Typ 1 (Th1) Immunantwort, während es sich hemmend auf eine Polarisation von naiven T-Zellen in den T-Helferzellen Typ 2 (Th2) auswirkt [22]. So konnte gezeigt werden, dass Leptin-defiziente Mäuse gegenüber einer Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS)-induzierten Kolitis geschützt sind [23].

Diese Ergebnisse und der Nachweis der Expression funktionaler *Pattern Recognition*-Rezeptoren (PRR) aus der Gruppe der TLRs durch Adipozyten und ihre Vorläufer, den Präadipozyten [4], stellten erstmals eine Verbindung zwischen dem Fettgewebe und dem angeborenen Immunsystem her. Die TLRs stellen eine Gruppe von evolutionär konservierten Proteinen dar, die Abbauprodukte von Bakterien, Pilzen oder Viren erkennen. Im Menschen konnten bislang 11 Vertreter identifiziert werden, von denen 10 funktional sind [24].

Einen makroskopische Hinweis auf eine mögliche Beteiligung des Fettgewebes bei entzündlichen Prozessen lieferte bereits 1932 die klinische Beschreibung einer Hypertrophie des darmassoziierten Fettgewebes bei Patienten mit Morbus Crohn, einer chronisch verlaufenden Entzündung, die den ganzen Verdauungstrakt betreffen kann, sich aber häufig im Darm manifestiert. Aufgrund des charakteristischen Auftretens um die entzündeten Darmbereiche, wird dieses hypertrophe Fettgewebe auch als „*creeping fat*“ bezeichnet [25].

Weitere Beispiele für die Beteiligung des Fettkörpers an entzündungsassoziierten Prozessen stellen erhöhte Serumspiegel der vom Fettkörper sezernierten proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α bei Diabetes vom Typ II und der Adipositas dar [26]. Hohe Konzentrationen dieser Zytokine finden sich auch bei der akuten Pankreatitis und identifizieren auch hier Fettleibigkeit als Risikofaktor [27]. Aber auch bei rheumatischen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, finden sich erhöhte Konzentrationen von Adiponektin und Resistin in der Synovialflüssigkeit betroffener Gelenke [28].

All diese Befunde zeigen auf, dass das Fettgewebe nicht mehr bloß als reiner Energiespeicher verstanden werden darf, sondern ihm auch als endokrines Organ eine Rolle bei entzündlichen Prozessen im Kontext der angeborenen Immunität zufällt.

1.2 Funktion und klinische Relevanz der *Pattern Recognition*-Rezeptoren *Nucleotide-binding Oligomerization Domain* (NOD)-Proteine 1 und 2

Die *Nucleotide-binding Oligomerization Domain* (NOD)-Proteine 1 und 2 gehören wie die TLRs zu der Gruppe der PRR, die durch Gruppen strukturell konservierter Antigene aktiviert werden [29-33]. Anders als die überwiegend membranständigen TLRs sind NOD1 und NOD2 zytosolisch lokalisiert [34]. Die Expression von NOD1 ist für die verschiedensten epithelialen Zelltypen beschrieben [35], während NOD2 hauptsächlich von myeloiden Zellen exprimiert wird [36]. Bei den putativen Liganden für NOD1 und NOD2 handelt es sich um Kohlenhydratstrukturen aus der bakteriellen Zellwand. Für

NOD1 ist Laktyl-tetra-Diaminopimelinsäure (LT-DAP), ein Motiv aus der Zellwand Gram-negativer Bakterien [29], während für NOD2 Muramyl-dipeptid (MDP), ein Bestandteil des Peptidoglykans Gram-positiver Bakterien, als spezifischer Ligand beschrieben wird [31]. NOD1 spielt eine wichtige Rolle bei der proinflammatorischen Antwort auf invasive Enteropathogene wie z.B. *Shigella flexneri* und enteroinvasive *Escherichia coli* [32, 37] aber auch auf nicht-invasive Bakterien, wie z.B. *Helicobacter pylori* [33]. Die Funktion von NOD2 wird als Adjuvantrezeptor gesehen, der in Verbindung mit TLRs das adaptive Immunsystem aktiviert [38]. Studien konnten eine Redundanz von TLRs und NOD1/NOD2 nachweisen, insbesondere bei Epithelien im Magen-Darm-Trakt führt eine verminderte Expression von TLRs zu einer erhöhten Toleranz von spezifischen Liganden, während die Expression von NOD1/NOD2 unverändert oder sogar erhöht ist [32, 37, 39-41].

Verschiedene Krankheitsbilder konnten mit Veränderungen in NOD-Genen assoziiert werden. Bei diesen Veränderungen handelt es sich um Einzelnukleotid-Polymorphismen, die entweder zu einem Aminosäureaustausch oder aber zu einem Translationsabbruch führen. Polymorphismen im Gen für NOD1 sind mit einem erhöhten Risiko an bestimmten Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Asthma zu erkranken, assoziiert [42, 43]. Dagegen konnten im Falle des Gens für NOD2 Polymorphismen identifiziert werden, die mit einem erhöhten Risiko an Morbus Crohn zu erkranken verbunden sind. Diese Polymorphismen treten bei Gesunden mit einer Häufigkeit von ca. 12 % auf, während ca. 46 % aller Morbus Crohn Patienten eine Genvariante von NOD2 tragen [44]. Träger einer heterozygoten Genvariante besitzen ein dreifach erhöhtes Risiko an Morbus Crohn zu erkranken, während das Risiko für Träger einer homozygoten Genvariante um das 38-fache erhöht ist [44], was auf einen Zusammenhang zwischen NOD2 und der Entwicklung der Erkrankung hinweist. Darüber hinaus konnten Mutationen in der zentral gelegenen NOD-Domäne von NOD2 mit dem Blau-Syndrom [45], einer granulomatösen chronischen Entzündung der Haut sowie der *Early-onset* Sarkoidose in Zusammenhang gebracht werden [46].

1.3 Die Domänenstruktur von NOD1 und NOD2

NOD1 setzt sich aus einer N-terminalen Caspase-rekrutierenden Domäne (CARD), einer Oligonukleotid-bindenden Oligomerisierungs-Domäne sowie C-terminal aus einer Leucin-reichen (LRR) Domäne zusammen. Im Unterschied zu NOD1 besitzt NOD2 zwei CARD-Domänen, bei sonst vergleichbarer Domänenzusammensetzung (Abb. 1). Einen vergleichbaren modularen Aufbau findet sich bei pflanzlichen Resistenzproteinen. Funktional lassen sich die drei Domänen als Effektor-, Dimerisierungs- und Ligand-bindende Domäne beschreiben [36, 47].

Die Familie der CARDS, die die Effektor-Domäne von NOD1 und NOD2 bilden, gehört dabei zu der Superfamilie der Todesdomänen-Proteine [48]. Die Kristallstruktur der CARD von NOD1 zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zu bekannten CARDS und weist als charakteristisches Merkmal eine Struktur von α -Helices auf, die antiparallel angeordnet und über eine Schleifenkonformation miteinander verbunden sind [49]. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Ornamenten der griechischen Kunst, wird diese Proteinstruktur auch als „*Greek key motif*“ bezeichnet [50]. Die CARD von NOD1 wird von sechs α -Helices gebildet, von denen die sechste einen Knick aufweist und im Falle einer Homodimer-Bildung mit den Helices eins und fünf, sowie mit Bereichen zwischen Helix eins und zwei einer weiteren NOD1-CARD interagiert [48]. Ihre Funktion üben diese Effektor-Domänen durch Interaktion mit Adapterproteinen aus, die ebenfalls eine CARD aufweisen. Voraussetzung für eine CARD-CARD-Interaktion ist eine Konformationsänderung, durch die definierte Aminosäuren in den α -Helices zwei und drei für die Interaktion mit der CARD von Adapterproteinen zugänglich werden.

C-terminal an die CARD schließt sich die zentral lokalisierte Oligonukleotid-bindende Oligomerisierungs-Domäne an. Charakteristisches Merkmal dieser Domäne ist eine Phosphat-bindende Schleife (Walker A Motiv), die aus einem β -Faltblatt und einer α -Helix gebildet wird und mit Phosphatresten von ATP oder Guanosin triphosphat interagiert. Ein Mg^{2+} -Ionen bindendes Walker B Motiv legt eine ATP-hydrolysierende Funktion dieser Domäne nahe und sie weist so einen typischen Aufbau von ATPasen der AAA+-Familie auf [51, 52].

Die LRR-Domäne befindet sich am C-terminalen Ende der NOD-Proteine. LRR-Domänen finden sich außer in NOD-Proteinen auch in TLRs und in über 2000 weiteren Proteinen in Eukaryonten. LRR-Domänen falten zu einer Hufeisen-ähnlichen Struktur mit einer β -Faltblatt Konformation auf der konkaven Seite und einer α -Helix auf der konvexen Seite [53]. Die Funktion der LRR-Domäne wird in der Erkennung bakterieller Strukturen gesehen [54]. Gezeigt werden konnte dies bereits für die LRR-Domänen verschiedener TLRs [55]. Im NOD2-Protein konnten Strukturen innerhalb der LRR-Domäne identifiziert werden, die für eine Ligand-induzierte Aktivierung von Bedeutung sind [56], wenngleich eine direkte Interaktion von NOD2 mit einem bestimmten Liganden bis heute nicht nachgewiesen werden konnte.

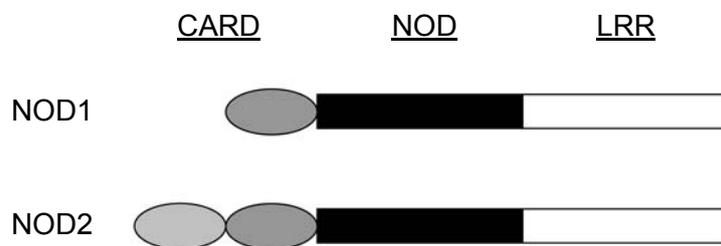


Abb. 1: Domänenstruktur von NOD1 und NOD2.

NOD1 und NOD2 bestehen aus einer bzw. zwei Caspase-rekrutierenden (CARD) Effektor-Domänen, einer zentralen Oligonukleotid-bindenden Oligomerisierungsdomäne (NOD) und einer C-terminalen Leucin-reichen Domäne (LRR).

Nach Bindung eines Liganden an die LRR-Domäne von NOD1 bzw. NOD2 wird eine Konformationsänderung des Moleküls diskutiert, die zu einer Dimerisierung des Rezeptors führt [57], in dessen Folge die Serin-Threonin-Kinase RICK (*Rip-like interacting caspase-like apoptosis-regulatory protein kinase*) aktiviert wird. Nach NOD1-vermittelter Aktivierung wird RICK durch TRAF (*TNF Receptor Associated Factor*)2 und TRAF5 ubiquitiniert, während dies bei einer Aktivierung von NOD2 TRAF6 übernimmt. Im Folgenden kommt es zu einer Ubiquitinierung von TRAF6, was wiederum zu einer Ubiquitinierung von *Inhibitor of NF- κ B-Kinase* (IKK) γ (NEMO) durch die E2-Ligase *Ubiquitin-conjugating enzyme* (Ubc)13 führt. Ubiquitiniertes IKK γ rekrutiert daraufhin den *TGF β -activated protein kinase* (TAK)1 / *TAK1-binding protein* (TAB)-Komplex, wodurch TAK1 aktiviert wird, das die *Mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase und den IKK-Komplex, bestehend aus IKK α , IKK β und IKK γ phosphoryliert. Der IKK-Komplex phosphoryliert den Nukleäre Faktor (NF)- κ B-Inhibitor I κ B, der I κ B-Komplex wird ubiquitiniert und schließlich degradiert. Hieraus resultiert die Freisetzung und Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern [58].

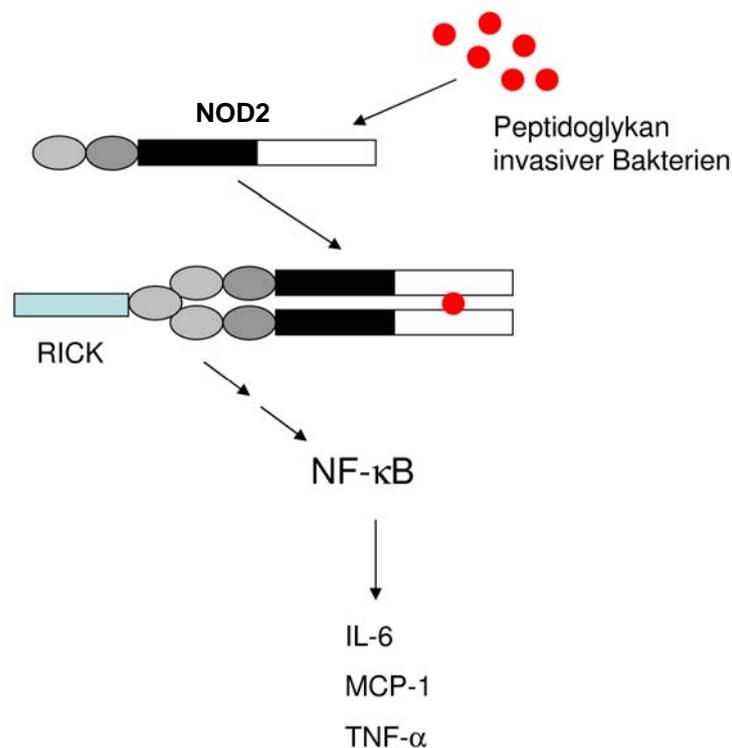


Abb. 2: Signaltransduktionsweg nach der Aktivierung von NOD2.

Kohlenhydratstrukturen aus dem Peptidoglykan invasiver Bakterien binden an die LRR-Domäne von NOD2, wodurch es zu einer Dimerisierung von NOD2-Molekülen kommt. Über die CARD-Domäne des Dimers wird die CARD-Domäne der Kinase RICK mittels CARD-CARD-Interaktion rekrutiert, wodurch es schlussendlich zu einer Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern und zur Bildung von proinflammatorischen Zytokinen kommt.

Der postulierten direkten Bindung von MDP durch NOD2 kommt somit eine entscheidende Funktion bei der Aktivierung von NOD2 und der weiteren Signaltransduktion zu, konnte bis heute aber auf molekularer Ebene nicht gezeigt werden. Eine rekombinante Darstellung von NOD2 würde die Möglichkeit für Ligand-Bindungsstudie mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie eröffnen. Mittels dieser Technik könnte die direkte Bindung des beschriebenen Liganden erstmal gezeigt werden und es wird erwartet, dass weitere bindende Strukturen identifiziert werden würden, die Rückschlüsse auf die für eine Bindung durch NOD2 erforderlichen Strukturmerkmale zulassen würden.

Durch sequentielle Expression einzelner Domänen von NOD2 wäre es zudem möglich, die Beteiligung der jeweiligen Domänen an der Ligand-Interaktion zu charakterisieren. Durch Ligand-Bindungsstudien ließe sich ferner die Frage nach einer durch Polymorphismen in den Genen von NOD2 ausgelösten Änderung in der Bindungscharakteristik bakterieller Kohlenhydrate aufklären, wodurch die Beteiligung dieser Rezeptoren bei der Krankheitsentstehung, z.B. von Morbus Crohn, aufgeklärt werden könnte.

Eine weiterführende Charakterisierung der Funktionen von NOD2 kann durch *Knock-down* der Genexpression mittels NOD-spezifischer *Small Interfering* (si)RNA oder durch eine Überexpression der Rezeptoren in relevanten Zellen erfolgen.

Eine entscheidende Voraussetzung für die vorgeschlagenen Studien ist eine Transfektionsmethode, die eine hocheffiziente Transfektion eukaryontischer Zellen mit NOD2-Vektorkonstrukten ermöglicht, die aufgrund ihrer Größe hohe Anforderungen an die Transfektionsmethode stellen.

1.4 **Elektroporation als effiziente Transfektionsmethode eukaryontischer Zellen**

Reproduzierbar hohe Transfektionsraten stellen eine wesentliche Bedingung sowohl für Überexpressionsanalysen als auch für funktionale *Knock-down* Experimente mit siRNA und mit Vektor- bzw. Reporterkonstrukten dar. Die hohe Polyklonalität und Varianz individueller physiologischer Zustände sind dabei häufige Ursache für eine nur ineffiziente Einführung von Nukleinsäuren in primäre Zellen und haben zur Entwicklung unterschiedlicher Transfektionsstrategien geführt.

Hohe Transfektionsraten sowie eine stabile Expression nach Rekombination der eingeschleusten Nukleinsäure mit der chromosomalen DNA sind Vorteile der Transduktion mit viralen Vektoren [59]. Nachteile dieser Methode liegen in der aufwendigen Herstellung und Verpackung der Fremdnukleinsäure in Viruspartikel, in der durch die virale Hülle limitierte Größe der transduzierbaren Nukleinsäure, der Wirtsspezifität der Virushüllen und der geringen Kopienzahlen. Neben der viralen Transduktion werden aber auch chemische Methoden für den Transfer ‚nackter‘ Nukleinsäuren in Zellen herangezogen. Bei der Calcium-Phosphat-Präzipitation bindet einzuschleusende DNA an ausfallendes Calcium-Phosphat und diese Aggregate können von den Zielzellen durch Endozytose aufgenommen werden. Die Effizienz dieser Methode ist von vielen verschiedenen Faktoren abhängig. So spielen hier Reinheit und Konzentration der einzuschleusenden DNA, der pH-Wert des Mediums, die Salzkonzentration und die Inkubationsdauer der Präzipitate mit den Zielzellen eine entscheidende Rolle. Die sich aus den genannten Punkten ergebende hohe Störanfälligkeit, verbunden mit einer hohen Zytotoxizität und der Beschränkung dieser Methode auf adhärent wachsende Zellen, stellen die großen Nachteile dieser Methode dar und spiegeln sich in sehr niedrigen Transfektionsraten primärer Zellen wider, für die in der Literatur Werte zwischen 4 % und 10 % angegeben werden [60, 61]. Eine weitere biochemische Transfektionsstrategie stellt die Lipofektion dar. Diese Methode beruht auf der Fusion von DNA-enthaltenden Liposomen mit der Membran der Zielzelle und der darauffolgenden Freisetzung der DNA in das Innere der Zielzelle. Auch hier lassen sich in der Literatur für die Transfektion primärer Zellen Transfektionsraten unter 10 % finden [61]. Wird die DNA mit kationischen Polymeren, wie z.B. Diethylaminoethyl-Dextran, komplexiert, besteht zwar eine gute Zellverträglichkeit, aber die Transfektionsraten sind stark vom verwendeten Zelltyp abhängig. Sie erreichen bis zu 60 % bei murinen Hepatozyten, während von der Zelllinie 3T3-L1-Präadipozyten nur etwa 5 % der Zellen transfiziert werden [62].

Transfektionen lassen sich aber auch mit Hilfe des elektrischen Stromes erreichen. Diese Methode wird als Elektroporation bezeichnet. Bei der Elektroporation, inklusive der sogenannten Nucleofection, wird mittels kurzer Stromimpulse physikalisch die Integrität der Zellmembran gestört und Makromoleküle können in die Zelle eingeschleust werden [63]. Der Zeitraum dieser Membranstörung stellt dabei den kritischen Punkt dieser Methode dar. Zu kurze Impulszeiten führen zu keiner bzw. zu einer unzureichenden Porenbildung, während zu lange Impulse durch die Ausbildung zu großer Poren die Zellen stark schädigen [64-66].

Durchgesetzt haben sich zum einen Elektroporationssysteme, die mit einem exponentiell abnehmenden Impuls arbeiten, bei dem die Impulslänge nur durch den Leitwert der Probe oder die Parallelschaltung von Widerständen beeinflussbar ist, zum anderen solche Systeme, die Rechteckimpulse erzeugen (Abb. 3). Die Vorteile der Rechteckimpulse sind in der Möglichkeit zu sehen, Amplitude und Länge der applizierten elektrischen Impulse variieren zu können. Eine einmal eingestellte Amplitude und Länge des Impulses bleibt während des Impulses weitestgehend konstant, ohne dass diese Faktoren wesentlich vom Leitwert der zu transfizierenden Zellsuspension beeinflusst werden. Beide Arten von Elektroporationssystemen speichern die Energie, die während des Impulses an die Zellsuspension abgegeben wird, in Kondensatoren. Bei einem exponentiell abnehmenden Impuls wird die komplette Energie des Kondensators an die Zellsuspension abgegeben, während bei Systemen, die mit Rechteckimpulsen arbeiten, der Impuls nach einer einstellbaren Zeit mittels einer technischen Anordnung unterbrochen wird. Beide Systeme unterscheiden sich hinsichtlich der Kapazität der Kondensatoren voneinander. So benötigen Systeme, die Rechteckimpulse erzeugen, in der Regel höhere Kondensatorkapazitäten, um genügend Ladung für einen gleichbleibenden Impuls bereitstellen zu können.

Die Elektroporation kann als ein zweistufiger Prozess betrachtet werden. Die Porenbildung erfolgt durch einen initialen elektrischen Impuls hoher Feldstärke, der die Schwellenspannung der Zellmembran überschreiten muss. Das Einschleusen von Makromolekülen durch die zuvor gebildeten Poren benötigt dagegen einen Impuls mit geringerer Feldstärke aber längerer Einwirkzeit. Durch diesen Impuls kommt es zu einer elektrophoretischen Wanderung der die Zelle umgebenden Makromoleküle [67]. Eine Elektroporationsmethode, die die unterschiedlichen elektrischen Parameter beider Prozesse kombiniert, liefert hohe Transfektionseffizienzen bei gleichzeitig hoher Vitalität der zu transfizierenden Zellen. Kommerziell nicht erhältlich ist ein System, bei dem der Anwender gezielt und nachvollziehbar die elektrischen Parameter der bekannten Zellphysiologie entsprechend wählen kann. Konstruktion und Bau eines solchen Elektroporationssystems ist Gegenstand dieser Arbeit.

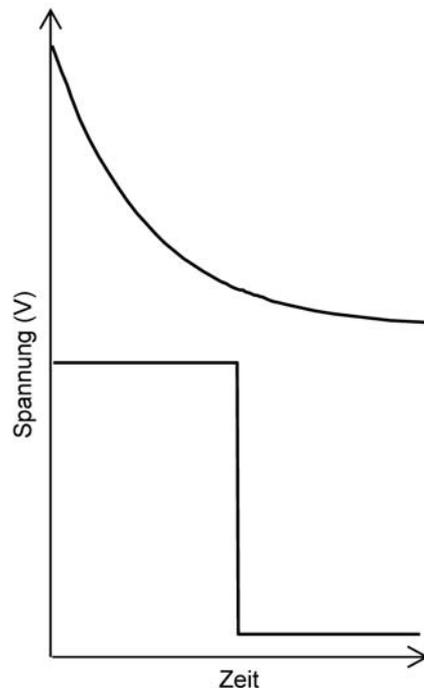


Abb. 3: Für die Elektroporation genutzte Impulsformen.

Exemplarisch dargestellt ist der exponentiell abnehmende Spannungsverlauf eines Kondensators während der Entladung (oben). Ein Rechteckimpuls wird erhalten, wenn die Entladung eines Kondensators mit höherer Kapazität durch eine technische Anordnung beendet wird (unten).

1.5 Arbeitshypothese und sich daraus ableitende Fragestellungen

Entzündliche Darmerkrankungen gehen oft mit einem Verlust der Barrierefunktion der Mukosa einher, was zu einer vermehrten Translokation von Bakterien der Darmflora in das umliegende Gewebe führt. Insbesondere beobachtet man dies bei der transmuralen Entzündung im Verlauf des Morbus Crohn [25, 59, 68]. Hierdurch könnten NOD1 und NOD2 in Präadipozyten durch bakterielle Abbauprodukte stimuliert oder in ihrer Expression moduliert werden, was wiederum zu einer Aufrechterhaltung oder Verstärkung der Entzündungsreaktion führen würde.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergaben sich daraus folgende Fragestellungen:

1. Werden NOD1 und NOD2 in primären Präadipozyten aus dem mesenterialen Fett exprimiert?
2. Welche exogenen und endogenen Faktoren modulieren die Expressionshöhe von NOD1 und NOD2 in primären Präadipozyten aus dem mesenterialen Fett?
3. Welcher Signalweg wird durch die Interaktion von NOD1/2 mit spezifischen Liganden in Präadipozyten rekrutiert?
4. Wie können primäre Präadipozyten aus dem mesenterialen Fett der Maus mit ‚nackten‘ Nukleinsäuren für funktionale *Knock-down* Untersuchungen mit *Small Interfering* (si)RNA und Vektor- bzw. Reporterkonstrukten effizient transfiziert werden?
5. Wie kann die direkte Bindung von bakteriellen Kohlenhydraten durch NOD2 nachgewiesen werden?

2 Material und Methoden

2.1 Antikörper

Antigen	Herkunft, Subtyp, Klon	Konjugation	Hersteller
<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)1</i>	Kaninchen, polyklonal	-	Cell Signaling Technology (Frankfurt am Main)
<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)2</i>	Kaninchen, Serum	-	Imgenex (San Diego, USA)
β -Actin	Maus, IgG1, AC-15	-	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)</i>	Ziege, polyklonal	-	AbD Serotec (Düsseldorf)
CD4	Maus, IgG1, 13B8.2	APC	BD Biosciences (Heidelberg)
CD8	Maus, IgG2a, BW135/80	APC	BD Biosciences
CD14	Maus, IgG2b κ M Φ P9	APC	BD Biosciences
CD19	Maus, IgG1 κ HIB19	APC	BD Biosciences

Sekundäre Antikörper

Antigen	Herkunft, Subtyp	Konjugation	Hersteller
Maus-Ig	Kaninchen, polyklonal	Meerrettich-Peroxidase	Dako (Hamburg)
Ziege-Ig	Kaninchen, polyklonal	Meerrettich-Peroxidase	Dako
Kaninchen-Ig	Ziege, polyklonal	Meerrettich-Peroxidase	Dako

2.2 Zytokine

Protein	Spezifische Aktivität [U/mg]	Stammkonzentration [µg/ml]	Gelöst in	Hersteller
IL-1β (murin)	>5x10 ⁸	10	Phosphat- gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	PeproTech (London, Großbritannien)
M-CSF (murin)	>1x10 ⁶	10	PBS	PeproTech
TNF-α (murin)	>1x10 ⁷	10	PBS	PeproTech

2.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden durch TIB Molbiol (Berlin) hergestellt und hatten eine für die *Real-Time*-Polymerasekettenreaktion (PCR) geeignete Reinheit. Die Stammlösungen der Oligonukleotide mit 500 µg/ml für die reverse Transkription und 50 µM für die PCR wurden bis zur Verwendung in *Aliquots* bei -20°C aufbewahrt. Unmarkierte *Small interfering (si)RNAs* wurden von der Fa. Qiagen (Hilden) bezogen. Die gegen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) gerichtete Fluoreszenz-markierte siRNA stammte von der Fa. Applied Biosystems (Darmstadt).

Primer für reverse Transkription und Klonierungen

Template	Name	Sequenz (5' → 3')
mRNA	Oligo-dT ₁₅	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
NOD1	sense BamHI	CTGGCTACTGGATCCATGGAGGAACACGGC
	antisense EcoRI	CCAGGAGCGTCCGGAATTCGAAGCAGATG
NOD2	sense BamHI-Xmal	GGGAAGTGGATCCATGAGATCCAGCTGTTG
	antisense BamHI-Xmal	CTTGCTCCCGGGCACACTACTTTG
	sense Xmal-EcoRI	CAAAGTAGTGTGCCCGGGAGCAAG
	antisense Xmal-EcoRI	CCAGGCCCTGAATTCCTCACTCACAACG
GAPDH	sense	CATCCTGCACCACCAACTGC
	antisense	ACGCCACAGCTTTCCAGAGG

pCR2.1	M13 forward	GTAAAACGACGGCCAG
	M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

Primer für Standard-PCR

Template	Name	Sequenz (5' → 3')
NOD1	sense	CTTGCATTCAATGGCATCTC
	antisense	ACATCGGTGTGCACTGTGGA
NOD2	sense	AGCAGAACTTCTTGTCCCTGA
	antisense	TCACAACAAGAGTCTGGCGT
GAPDH	sense	ACCACAGTCCATGCCATCAC
	antisense	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

Primer und 6-Carboxyfluorescein (FAM) und Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin (TAMRA)-markierte Sonden für absolute Quantifizierungen

Template	Name	Sequenz (5' → 3')
NOD1	sense	CCTGTCAGGAGCCCACACCT
	antisense	CCCTGCTGGCTTTGAGTGG
	Sonde	FAM – CGCGGCTGAGACCCTGCAGA – TAMRA
NOD2	sense	GCAACAGGGAGGAGCTTCCA
	antisense	ACATCAGGCCAGCAGCAGTG
	Sonde	FAM – TGC GTGGCCAAACCGCTGTC – TAMRA
GAPDH	sense	CATCCTGCACCACCAACTGC
	antisense	ACGCCACAGCTTTCCAGAGG

Small Interfering (si)RNA

Template	Name	Sequenz (5' -> 3')
NOD1	sense	GCUCAUUCGGACCAAACUTT
	antisense	AGUUUUGGUCCGAAUGAGCTG
<i>Toll-like-Rezeptor (TLR)4</i>	sense	GGAAGUUCACAUAGCUGAAAdTdT
	antisense	UUCAGCUAUGUGAACUCCdGdG
GAPDH-Cy3	sense	keine Angaben verfügbar
	antisense	
Kontrolle	sense	UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT
	antisense	ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT

Plasmide und Bakterien

Plasmid		pCR2.1-TOPO (pCR2.1)	pEGFP-N2 (pEGFP)
Eigenschaften	Replikationsursprung	ColE1, f1	ColE1, f1, SV40
	Resistenzen	Ampicillin, Kanamycin	Ampicillin, Neomycin
	Promotor	P _{lac}	P _{CMV}
Anwendung		Sequenzierung klonierter cDNA	Konstitutive Expression in eukaryontischen Zellen
Hersteller		Invitrogen (Karlsruhe)	BD Biosciences

Für die Vermehrung von Plasmiden wurden Transformations-kompetente *E. coli* TOP10 (Genotyp: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ) der Firma Invitrogen verwendet. Alle Arbeiten in der Sicherheitsstufe 1 nach Gentechnik-Gesetz/-Sicherheitsverordnung wurden in der gentechnischen Anlage der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie am Campus Benjamin Franklin (Aktenzeichen: VC II2-21/91) durchgeführt.

2.4 Untersuchungsmaterial

Die Organentnahme aus Mäusen zu wissenschaftlichen Zwecken wurde beim Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (Tötungsanzeige T0186/03) angezeigt. Für die Organentnahme wurden die Mäuse unter CO₂-Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Experimente mit humanem Blut von gesunden Spendern erfolgte mit Genehmigung der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Ethikvotum EA4/059/10).

Mäusestamm	Bezeichnung	Herkunft	Referenz
Wildtyp (WT)	C57BL/10	Harlan Winkelmann	[69]
Wildtyp	C57BL/6J	Harlan Winkelmann	[4]
TLR2/4 ^{-/-}	C57BL/10	Max-Planck-Institut für Immunbiologie (Freiburg)	[4]

Zellen/Zelllinien	Spezies	Herkunft	Referenz
Primäre WT-Prädipozyten aus mesenterialem Fett	Maus	Isoliert aus weiblichen C57BL/10 Mäusen	[4]
Primäre TLR2/4 ^{-/-} -Prädipozyten aus mesenterialem Fett	Maus	Isoliert aus weiblichen C57BL/10 TLR4 ^{-/-} Mäusen	[70]
Knochenmark-Vorläuferzellen	Maus	Isoliert aus weiblichen C57BL/6J Mäusen	[71]
3T3L1 ATCC CL-173	Maus	Embryonale Fibroblasten	[72]
J558L ATCC TIB-6	Maus	Plasmozytisches Lymphom	[73]
K562 ATCC CCL-243	Mensch	Akute Myelozytische Leukämie	[74]
Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes	Mensch	Isoliert aus Spenderblut	[75]
U937 ATCC CRL-1593.2	Mensch	Histiozytisches Lymphom	[76]

2.5 Kultur eukaryontischer Zellen

2.5.1 Kulturbedingungen und Medien

Die Zellkultur erfolgte unter Verwendung einer Sicherheitswerkbank der Fa. Heraeus (Hanau) mit laminarer Luftströmung zur Gewährleistung einer keimarmen Umgebung. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank Heracell 150 (Heraeus, Hanau) bei 37 °C und 6 % CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre. Soweit nicht anders vermerkt wurden alle Zentrifugationsschritte für 7 min bei 450g und 4 °C durchgeführt. Das verwendete fötale Rinderserum (FCS) wurde zur Inaktivierung des Komplements für 30 min bei 56 °C inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

Medien

Standardmedium 1.1:	DMEM/HAM's F-12 10 % FCS 2 mM L-Glutamin
Standardmedium 1.1a:	DMEM/HAM's F-12 10 % FCS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 250 ng/ml Amphotericin B
Standardmedium 1.2:	RPMI 1640 10 % FCS 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat
Standardmedium 1.3	DMEM 10 % FCS 4,5 g/l Glukose
Einfriermedium:	Standardmedium 20 % FCS 10 % Dimethylsulfoxid

Verdaumedium: HBSS w/ Ca^{2+} , Mg^{2+}
3,5 % Rinderserumalbumin (BSA)
550 μM Glukose
1,5 mg/ml Kollagenase II

Grundmedien, L-Glutamin, BSA und Natriumpyruvat wurden von der Fa. PAA Laboratories, (Pasching, Österreich), Penicillin und Amphotericin B von der Fa. Biochrom (Berlin), FCS von der Fa. Linaris (Wertheim-Bettingen) bezogen. Kollagenase II stammte von Sigma-Aldrich.

2.5.2 Isolation primärer Zellen

Murine Präadipozyten

Für die Kultivierung primärer Präadipozyten wurde aus Mäusen mesenteriales Fett präpariert, mit HBSS gewaschen und anschließend in Verdaumedium bei 37 °C für 30 min unter Schütteln inkubiert. Daraufhin wurden die Zellverbände durch Passage durch ein Zellsieb mit einer Maschenweite von 100 μm vereinzelt und nach Auffüllen auf 50 ml in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit HBSS bei 290g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation lagen im Pellet die Präadipozyten vor während reife Adipozyten auf der Flüssigkeit schwammen und mit einer Pipette abgenommen wurden. Die Präadipozyten wurden dreimal mit Standardmedium 1.1 gewaschen und anschließend 1×10^5 Zellen je Vertiefung einer 48-Loch-Zellkulturplatte in Standardmedium 1.1a ausgesät. Das Medium wurde alle 24 h ausgetauscht, wodurch alle nicht-adhärenten Zellen sukzessiv entfernt wurden. Die Funktionalität der isolierten Zellen in Adipozyten zu differenzieren wurde durch Kultur in Differenzierungsmedien überprüft [77].

Murine Knochenmark-Vorläuferzellen

Das Knochenmark wurde aus dem Femur von C57BL/6J Mäusen gewonnen. Hierzu wurden die Muskeln und Sehnen vom Knochen entfernt und dieser aus den Gelenken gelöst. Mit einer Schere wurden die Epiphysen des Knochens abgetrennt. Das Knochenmark wurde dann mit Hilfe einer Spritze und einer feinen Kanüle mit RPMI 1640 aus dem Knochen herausgespült und in einem Röhrchen gesammelt. Eine Differenzierung in Makrophagen erfolgte durch Kultur für 7 Tage in Gegenwart von 10 $\mu\text{g/ml}$ M-CSF [71].

Peritoneal-Exsudat-Zellen der Maus

Peritoneal - Exsudat - Zellen der Maus üben durch Produktion von Wachstumsfaktoren und Phagozytose abgestorbener Zellen stimulierende Wirkungen auf das Wachstum von stark vereinzelt Zellen aus. Gewonnen wurden diese Zellen aus der Bauchhöhle von C57Bl6/J-Mäusen. Hierzu wurde in die Bauchhöhle mit einer sterilen Spritze 5 ml eiskaltes RPMI1640 injiziert, ohne dabei die inneren Organe zu verletzen. Nach kurzem Massieren des Bauchraumes mit der flachen Seite einer sterilen Pinzette wurde das RPMI aus der Maus mit der Spritze abgesaugt und in einem auf Eis stehendem sterilen Glaskolben, der zuvor mit 50 ml Standardmedium 1.2. befüllt worden war, gesammelt. Die Zellsuspension wurde daraufhin auf 96-Loch-Zellkulturplatten mit 100 µl je Vertiefung verteilt und im Brutschrank kultiviert.

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes des Menschen

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden aus Heparin-Blut isoliert. Das Blut wurde 1:2 mit PBS verdünnt und vorsichtig in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen geben, das zuvor mit 20 ml Ficoll (Biochrom) befüllt worden war. Bei der anschließenden Dichtgradientenzentrifugation sammelten sich die mononukleären Zellen in der Interphase, während Erythrozyten, Granulozyten sowie tote Zellen pelletiert wurden. Die Zellen der Interphase wurden daraufhin mit einer Pipette abgenommen, in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, mit Standardmedium 1.2 gewaschen und standen anschließend für die Experimente zur Verfügung.

PBS: 137 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 10 mM Na₂HPO₄
 1,8 mM KH₂PO₄
 pH 7,2

Alle verwendeten Reagenzien stammten von der Fa. Carl Roth (Karlsruhe).

2.5.3 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zellen wurden durch schrittweises Abkühlen in einem Dimethylsulfoxid enthaltenden Medium eingefroren. Das Dimethylsulfoxid wirkt einer Eiskristallbildung innerhalb und außerhalb der Zellen entgegen und schützt die Zellen so vor einer mit der Eiskristallbildung verbundenen Schädigung. Abgelöste Zellen oder Suspensionszellen

(3×10^6) wurden pelletiert, in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Das schrittweise Abkühlen erfolgte in einer dickwandigen Styroporbox bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Für eine Langzeitlagerung wurden die Röhrchen anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen der Zellen erfolgte in $37\text{ }^\circ\text{C}$ warmen Wasser. Unmittelbar nach dem Auftauen wurden die Zellen in 10 ml kaltes Standardmedium überführt und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde daraufhin in Standardmedium resuspendiert und die Zellen für die Kultur in Zellkulturflaschen angesetzt.

2.5.4 Vitalfärbung zur Bestimmung der Lebendzahl

Die Bestimmung der Lebendzahl wurde nach Anfärbung mit Trypanblau durchgeführt. Trypanblau lagert sich bei toten Zellen aufgrund der erhöhten Membrandurchlässigkeit im Zytoplasma an und färbt diese blau während lebende Zellen ungefärbt bleiben. Hierzu wurden 20 μl Zellsuspension mit dem gleichen Volumen der Trypanblaulösung gemischt und in eine Zählkammer nach Neubauer überführt. Die Zählung der Zellen erfolgte unter einem inversen Mikroskop vom Typ MBL 3100 (A. Krüss Optronic, Hamburg).

Trypanblaulösung: 0,05 % Trypanblau (Biochrom) in PBS

2.5.5 Nachweis von Mykoplasmen

Kontaminationen von Zellkulturen mit Mykoplasmen sind ein weit verbreitetes Problem. Bei Mykoplasmen handelt es sich um extra- und intrazellulär wachsende Parasiten, die die Wirtszellen zum einen durch die Konkurrenz um Nährstoffe (z.B. Argininverbrauch) beeinflussen [78], zum anderen können sie durch eine Stimulation von TLRs die Zytokinproduktion modulieren oder auch chromosomale Abberationen verursachen [79]. Eine regelmäßige Untersuchung der verwendeten Zellen auf eine Kontamination mit Mykoplasmen stellt somit eine wesentliche Voraussetzung für eine verlässliche und reproduzierbare Datengewinnung bei *in vitro* Experimenten dar.

Das verwendete „VenorGeM-Mykoplasmen-Detektionskit“ der Fa. Minerva Biolabs (Berlin) beruht auf der spezifischen Amplifikation eines Abschnittes der 16 S rRNA-Region des Mykoplasmen-genoms mittels PCR. Hierfür wurden aus Zellkulturen mit 90 % Konfluenz 100 μl Kulturüberstand abgenommen, für 5 min in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgekocht und anschließend zentrifugiert. Von diesem Überstand wurden 2 μl für eine PCR nach Herstellerangaben eingesetzt. Das amplifizierte Produkt

ließ sich nach elektrophoretischer Auftrennung mittels horizontaler Gel-Elektrophorese vom Typ Midi S (Peqlab, Erlangen) in einem 1,5 %-igen Agarosegel (Carl Roth) nach Färbung mit Ethidiumbromid (Carl Roth) sichtbar machen.

2.5.6 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (FACS) werden resuspendierte Zellen hydrodynamisch vereinzelt und an einer Laser-Lichtquelle vorbeigeführt. Der Laserstrahl trifft auf die Zelle, wodurch es zu einer Zerstreuung des eingestrahnten Lichtes kommt. Das Vorwärtsstreulicht gibt dabei Auskunft über die Größe der untersuchten Zelle, das Seitwärtsstreulicht über ihre Granularität. Werden Zellen zusätzlich mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, geben diese nach Anregung Licht ab, dessen Intensität proportional zur Menge des eingesetzten fluoreszierenden Farbstoffes ist. Tote Zellen lassen sich mit DNA-interkalierendem Propidiumiodid (PI) (Sigma-Aldrich) spezifisch anfärben, das durch die nicht mehr intakten Membranen dieser Zellen diffundiert und sie damit markiert [80]. Für die Auswertung werden nur die nicht durch PI gefärbten, also vitalen Zellen herangezogen

FACS-Puffer: 0,5 % BSA in PBS

PI-Lösung: 50 µg/ml PI in PBS

Die auf eine EGFP-Expression zu untersuchenden Zellen wurden geerntet und mit kaltem FACS-Puffer gewaschen. Für die durchflusszytometrische Messung wurden je Ansatz 2×10^5 Zellen in 600 µl FACS-Puffer resuspendiert und 1 µl der PI-Lösung hinzugegeben. Im Falle der PBMC wurden diese nach dem Waschen mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt, die spezifisch für die jeweiligen Subpopulationen waren. Durchgeführt wurden FACS-Analysen an einem FACSCanto in Kombination mit der Auswertesoftware FACSDiva (BD Biosciences).

2.5.7 Inkubation von Präadipozyten und Makrophagen mit *Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)1*- und *2*-spezifischen Liganden und Lipopolysaccharid

Für eine Inkubation von Präadipozyten bzw. Makrophagen mit NOD1- und NOD2-spezifischen Liganden, wurden $7,5 \times 10^4$ Zellen in jede Vertiefung einer 48-Loch-Platte mit 1 ml Standardmedium 1.1 (Präadipozyten) bzw. Standardmedium 1.2 (Makrophagen) ausgesät. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel mit angewärmtem Medium durchgeführt und die Zellen mit den spezifischen Liganden für NOD1 und NOD2

bzw. LPS für 48 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Kulturüberstände der Ansätze in Reaktionsgefäße überführt, bei 9600g zellfrei zentrifugiert und anschließend in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

Ligand	Chemische Bezeichnung	Hersteller
LT-DAP	Laktyl-tetra-Diaminopimelinsäure	Stephen Girardin (Universität Toronto, Kanada)
MDP	N-Acetylmuramyl L-Alanyl-D-Isoglutamin	InvivoGen (Toulouse, Frankreich)
LPS	Lipopolysaccharid	InvivoGen

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen

Die Isolation von Gesamt-RNA wurde mithilfe des „RNeasy mini Kit“ der Fa. Qiagen (Hilden) durchgeführt, das auf der Bindung von kurzkettigen Nukleinsäure-Molekülen an Glasfasermaterial unter chaotropen Bedingungen beruht. Die Durchführung richtete sich nach Herstellerangaben. In Ergänzung zum Protokoll erfolgte nach Bindung der RNA an das Säulenmaterial der empfohlene Verdau mit DNase, der möglichen Verunreinigungen der RNA-Präparation mit genomischer DNA entgegenwirkte.

2.6.2 Reverse Transkription von mRNA

Eine mRNA kann erst dann als Matrize in einer PCR dienen, nachdem sie mit einer reversen Transkriptase in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben worden ist [81]. Bei der reversen Transkriptase handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die für den Synthesestart des komplementären Stranges kurze doppelsträngige Abschnitte auf diesem benötigt. Solche Abschnitte lassen sich durch die Zugabe von Oligo(dT)₁₅-Primern erhalten, die mit dem Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende eukaryontischer mRNA hybridisieren [82]. Umgeschrieben wurden jeweils 600 µg Gesamt-RNA, die in 20 µl *Aqua dest.* vorlagen. Der erste Schritt bestand aus einem Verdau mit DNase I um Kontaminationen der cDNA mit genomischer DNA auszuschließen. Nach Hitzeinaktivierung und Zugabe von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wurden die Oligo(dT)₁₅-Primer sowie die Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) hinzugegeben. Nach kurzer Denaturierung für 5 min bei 65 °C wurden die

Proben auf 4 °C heruntergekühlt und der Puffer für die reverse Transkriptase, Dithiothreitol für die Aufrechterhaltung der enzymatischen Aktivität der reversen Transkriptase [83] und ein RNase-Inhibitor zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen erfolgte die Zugabe der *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV) reversen Transkriptase und eine Inkubation der Ansätze für 50 min bei 37 °C im Heizblock (Eppendorf). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die reverse Transkriptase durch Behandlung bei 70 °C für 15 min inaktiviert.

Bezeichnung	Stammlösung	Volumen für eine Reaktion [µl]
<i>Verdau genomischer DNA</i>		
DNase I-Puffer	10x	2,5
DNase I	1 U/µl	2,0
<i>Aqua dest.</i>		0,5
15 Minuten 20°C		
<i>Inaktivierung der DNase I</i>		
EDTA	25 mM	2,5
10 min 65°C		
<i>Primer-Mix</i>		
Oligo(dT) ₁₅	500 µg/ml	2,0
dNTP-Mix	jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP	4,0
<i>Aqua dest.</i>		20,5
5 min 65°C		
<i>Reaktions-Mix</i>		
First-strand-buffer	5x	16,0
DTT-Lösung	100 mM	8,0
RNaseOUT	40 U/µl	1,0
M-MLV	200 U/µl	1,0
50 min 37°C		
15 min 70°C		

Die verwendeten Reagenzien wurden von der Fa. Invitrogen bezogen.

2.6.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA beruht auf der negativen Ladung der DNA bei einem neutralem pH. Die Auftrennung erfolgt in einer mit Laufpuffer umspülten Agarosematrix, in der große Moleküle stärker aufgehalten werden als kleine bzw. verknäulte Moleküle und dementsprechend langsamer in Richtung Anode wandern. Die Agarose-Konzentration wird dabei so gewählt, dass die mittlere Porengröße größer ist als die aufzutrennenden Fragmente und so deren Wanderung nicht vom Trägermaterial behindert wird (Ogston-Theorie). Kleine Moleküle wandern demnach schneller als große, da ihnen eine höhere Anzahl passierbarer Poren zu Verfügung stehen.

Es wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8 und 1,5 % in Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der mit DNA-Probenpuffer versetzten Nukleinsäuren erfolgte bei einer Spannung von 100 V und wurde beendet, sobald die Bromphenolfront zwei Drittel der Gesamtlaufstrecke erreicht hatte. Das Gel wurde daraufhin in einer frischen Färbelösung für 30 min inkubiert und die DNA-Banden anschließend auf einem Transilluminator (Peqlab) bei einer Wellenlänge von 320 nm sichtbar gemacht [84].

Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer:	4,9 g/l	Tris-Base
	0,37 g/l	EDTA
	1,2 ml/l	Eisessig

DNA-Probenpuffer (6x):	30 %	Glycerol
	0,25 %	Bromphenolblau
	in TAE-Puffer	

Färbelösung:	1 µg/ml Ethidiumbromid
	in TAE-Puffer

TAE-Puffer wurde von der Fa. Genaxxon BioSciences (Ulm), DNA-Probenpuffer und Agarose von der Fa. Carl Roth bezogen.

2.6.4 Transformation von kompetenten *Escherichia coli*

Mittels eines kurzen Hitzeschockes ist es möglich ringförmig geschlossene Plasmid-DNA in *E. coli* einzuschleusen, deren Membran zuvor chemisch kompetent gemacht worden war [85]. Durch eine Selektion mittels Antibiotika wachsen nur solche Bakterienzellen zu Kolonien heran, die eine Antibiotikaresistenz aufgenommen haben [86].

Kompetente Bakterien vom Stamm *E. coli* TOP10 wurden auf Eis aufgetaut und anschließend wurden zu 25 µl Bakteriensuspension bis zu 1 µg zu transformierende DNA hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Ansätze 90 s bei 42 °C inkubiert und anschließend für zwei Minuten zurück auf Eis gestellt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 250 µl *Super Optimal Broth* (SOC)-Medium und eine Inkubation für eine Stunde bei 37 °C. Von den Transformationsansätzen wurden 20 – 100 µl auf *Lysogeny Broth* (LB)-Selektionsagar mit Ampicillin oder Kanamycin ausgestrichen und die Petrischalen über Nacht bei 37 °C inkubiert.

LB-Agar:	5 g/l	Hefeextrakt	SOC-Medium:	20 g/l	Trypton
	5 g/l	Trypton		5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl		10 mM	NaCl
	15 g/l	Agar		2,5 mM	KCl
				10 mM	MgCl ₂
				10 mM	MgSO ₄
				20 mM	Glukose

Selektionsagar: LB-Agar
100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin

Alle verwendeten Reagenzien wurden von der Fa. Carl Roth bezogen.

2.6.5 Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren wurde spektrophotometrisch bei 260/280 nm mittels NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch die Ermittlung der optischen Dichte bei 260 nm und eines nukleinsäurespezifischen Faktors (DNA: 50; RNA: 40) an dem für *Aqua dest.* kalibrierten Spektrophotometer. Kontaminierende Proteine weisen bei 280 nm ein Absorptionsmaximum auf, während Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge nur etwa halb soviel eingestrahktes Licht absorbieren, wie bei 260 nm, so dass der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} ein Maß für die Reinheit von Nukleinsäurepräparationen darstellt (DNA: 1,8–1,9; RNA: >1,9) [87]. Aus jeder Nukleinsäure-Präparation wurden zwei unabhängige Proben vermessen und die Konzentration der Lösung aus dem Mittelwert errechnet.

2.6.6 Isolation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mittels kommerzieller Aufreinigungssysteme isoliert. Für zu erwartende Mengen bis zu 20 µg Plasmid-DNA wurde ein „Invisorb Spin Plasmid Mini Two“ - Kit der Fa. Invitex (Berlin) eingesetzt. Plasmid-DNA im präparativen Maßstab bis 500 µg wurden mit dem „Plasmid Maxi Prep“ - Kit der Fa. Qiagen durchgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Gelöst wurde die präparierte Plasmid-DNA in sterilem *Aqua dest.*

2.6.7 Restriktionsspaltungen

Die Restriktion von DNA erfolgte mit Restriktasen, die spezifische Sequenzen von mindestens vier Nukleotiden einer doppelsträngigen DNA erkannten und hydrolytisch die Phosphodiesterbindungen spalteten [88]. Anwendung fanden Restriktionsspaltungen in dieser Arbeit bei der Analyse von prokaryontischen Zellklonen auf die Integration einer bestimmten Nukleinsäuresequenz und bei der Klonierung von NOD1 und NOD2 in pro- und eukaryontische Expressionsvektoren. Eine weitere Anwendung bestand in der Linearisierung der generierten Plasmid-Standards für die quantitative *Real-Time*-PCR im präparativen Maßstab. Der Verdau mit den entsprechenden Restriktasen erfolgte in einem vom Hersteller empfohlenen Puffer bei 37 °C für 1 h. Die Vollständigkeit der Spaltungen wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese bestätigt.

Beispiel einer präparativen DNA-Restriktion:

50 µg DNA
20 µl Restriktionspuffer (10x)
10 µl Restriktase 1
10 µl Restriktase 2
110 µl *Aqua dest.*

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktasen und Restriktionspuffer wurden von der Fa. New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

2.6.8 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Für die DNA-Isolierung aus Agarosegelen wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein zuvor gewogenes Reaktionsgefäß überführt. Nach erneutem Wiegen ließ sich das Gewicht der ausgeschnittenen Agarose errechnen und die weiteren Schritte dementsprechend anpassen. Die Elution aus der Agarose erfolgte mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Fa. Qiagen nach Herstellerangaben.

2.6.9 Ligation von DNA

Durch eine Ligation wurden 3'- und 5'-Enden einer Nukleinsäure mithilfe einer Ligase unter Verbrauch von ATP verknüpft. Auf diese Weise konnte in einen geöffneten Vektor ein Fragment kloniert werden, wodurch eine transformierbare, ringförmig geschlossene Plasmid-DNA entstand. Eine Religation des geöffneten Vektors konnte durch eine Dephosphorylierung des Vektors verhindert werden [89]. Eine weitere Art der Ligation stellt eine, an einen linearisierten Vektor gebundene, Topoisomerase I dar. Diese verbindet einzelsträngige Adenin-Überhänge von PCR-Produkten mit komplementären Thymidin-Überhängen des Vektors, wodurch es ebenfalls zu einem Ringschluss kommt [90, 91].

Für eine Dephosphorylierung wurden 5 µg linearisierter Vektor mit 1 µl Phosphatasepuffer, 2 µl Phosphatase und *Aqua dest.* in einem Gesamtvolumen von 10 µl 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung der Phosphatase bei 65 °C für 10 min wurden die Ansätze auf 50 µl mit *Aqua dest.* aufgefüllt. Die Ligation von 100 ng desphosphoryliertem Vektor wurde mit einem zweifachen Überschuss an isoliertem Fragment, 2 µl Ligasepuffer, 1 µl DNA-Ligase in einem Volumen von 20 µl bei Raumtemperatur für 60 min durchgeführt. Anschließend wurde die Ligase hitzeinaktiviert und die Ligation mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die direkte Klonierung von 2 µl amplifizierter cDNA in pCR2.1 erfolgte durch Zugabe von 1 µl Salzlösung, 1 µl *Aqua dest.* und 1 µl linearisiertem pCR2.1. Nach Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur wurden jeweils 2 µl der Ligationsansätze in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 transformiert.

Phosphatasepuffer (10x):	500 mM	Bis-Tris-Propan, pH 6,0
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	ZnCl ₂

Phosphatase:	5 000 U/ml	<i>Antarctic Phosphatase</i>
--------------	------------	------------------------------

Ligasepuffer (10x)	500 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	100 mM	MgCl ₂
	10 mM	ATP
	100 mM	DTT

DNA-Ligase	4x10 ⁵ U/ml	T4 DNA-Ligase
------------	------------------------	---------------

pCR2.1:	10 ng/µl linearisierte Plasmid-DNA mit Topoisomerase I
Salzlösung:	1,2 M NaCl ₂
	60 mM MgCl ₂

pCR2.1 und die Salzlösung stammten von der Fa. Invitrogen. Phosphatase, Ligase sowie die entsprechenden Puffer wurden von Fa. New England Biolabs bezogen.

2.6.10 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der Fa. SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Für die Auswertung der erhaltenen Sequenzen wurde die Software *Geneious 5.0* (Biomatters Ltd., Auckland, Neuseeland) verwendet. In den Vektor pCR2.1-TOPO klonierten DNA-Fragmente wurden unter Verwendung der M13 reverse oder M13 forward Primer sequenziert.

2.6.11 Amplifikation von DNA

Die Polymersasenkettenreaktion (PCR) stellt eine Methode für die Erzeugung großer Mengen einer spezifischen DNA-Sequenz *in vitro* dar [92, 93]. Erreicht wird diese Amplifizierung durch einen dreistufigen zyklischen Prozess. Für diesen Prozess werden zwei synthetische Oligonucleotidprimer benötigt, die jeweils mit einem der beiden komplementären Stränge der zu amplifizierenden Sequenz hybridisieren und so den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt am 5'- und 3'-Ende begrenzen. Diese Primer dienen einer thermostabilen, Mg²⁺-abhängigen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*) als Startpunkt. Die PCR beginnt mit der thermischen Denaturierung der doppelsträngigen DNA zu Einzelsträngen, die als Matrizen (*Template*) dienen. Im zweiten Schritt (*Annealing*) wird die Temperatur gesenkt, wodurch die im Überschuss vorhanden Primer spezifisch mit der zu amplifizierenden Sequenz hybridisieren. Die optimale Temperatur für diesen Schritt hängt von der Länge und Sequenz der verwendeten Primern ab und bestimmt maßgeblich die Spezifität der Reaktion. Der dritte Schritt stellt die Synthese-Phase (*Elongation*) dar. Die hitzestabile DNA-Polymerase erkennt die Primer als Startpunkt für die Neusynthese der komplementären Stränge an den 3'-Enden der spezifischen Primer. Die Zeit für die Synthese-Phase richtet sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz und erfolgt im Falle der *Taq*-Polymerase bei 72 °C. In jedem Zyklus verdoppelt sich theoretisch die Anzahl der gewünschten DNA-Fragmente. Der Prozess endet mit einer Synthese von überhängenden Adenosin-

Resten an die 3'-Enden der synthetisierten Stränge (*Final Extension*) [93]. Eine PCR in Verbindung mit einer reversen Transkription weist spezifische RNA-Moleküle nach, die in geringen Konzentrationen vorliegen und ermöglicht so eine Untersuchung der Genexpression auf transkriptioneller Ebene [94]. Durchgeführt wurde die Standard-PCR in einem Thermocycler T3000 (Biometra, Göttingen) für die Klonierungen von NOD1 und NOD2, für ortsgerichtete Mutagenesen und für den Nachweis von Mykoplasmen in Zellkulturüberständen.

Bezeichnung	Stammlösung	Volumen für eine Reaktion (µl)
TopTaq PCR-Puffer (10x)	Firmeneigene Rezeptur, enthält Tris·HCl, KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 15 mM MgCl ₂ , Stabilisatoren; pH 8,7 (20°C).	5
dNTP-Mix	jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP	1
Primer sense	5 µM	2
Primer antisense	5 µM	2
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,25
DNA-Template		2,5
<i>Aqua dest.</i>		37,25

Polymerase sowie TopTaq PCR-Puffer stammten von der Fa. Qiagen, der dNTP-Mix von der Fa. Carl Roth.

Schritt	Temperatur (°C)	Haltezeit (s)	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95	600	1
Amplifikation			
Denaturierung	95	60	
Annealing	58-63	60	35
Extension	72	180	
Final Extension	72	600	1

2.6.12 Relative und absolute Quantifizierung von DNA mittels quantitativer *Real-Time-PCR*

Relative Quantifizierung einer Genexpression mittels quantitativer Real-Time-PCR

Eine *Real-Time-PCR* unterscheidet sich von einer Standard-PCR durch die Detektion der bei der PCR entstehenden Zunahme an DNA in Echtzeit. Diese Detektion kann zum einen durch mit DNA interkalierenden Farbstoffen (z.B. SYBR-Green [95]) oder durch Hydrolyse-Sonden erfolgen, die die Spezifität des Nachweises weiter erhöhen. Hydrolyse-Sonden sind kurze Oligonukleotide, die am 5'-Ende einen fluoreszenten Reporter-Farbstoff, am 3'-Ende einen Quencher tragen. Durch die räumliche Nähe zum Quencher wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes in der intakten Sonde unterdrückt. Sonden werden so gewählt, dass sie eine Sequenz wenige Basen stromabwärts des sense-Primers hybridisieren. Während der *Annealing*-Phase hybridisiert die Sonde aufgrund ihrer – im Vergleich mit den Primern – höheren Schmelztemperatur zuerst mit der Matrize und wird während der *Elongation* aufgrund der Exonuklease Aktivität der *Taq*-Polymerase abgebaut. Hierdurch werden Reporter-Farbstoff und Quencher voneinander getrennt und die Fluoreszenz des Reporters detektierbar. Als Maß in der einer *Real-Time-PCR* dient der sogenannte Crossing Point (Ct), der der Anzahl von PCR-Zyklen entspricht, bei der ein definiertes Fluoreszenzniveau erreicht wird. Diese Zyklenzahl ergibt sich aus der Steigung der Regression im Wendepunkt der exponentiellen Fluoreszenzzunahme. Eine relative Quantifizierung einer Genexpression erlaubt eine Aussage darüber, um welchen Betrag sich die Genexpression in dem zu untersuchenden cDNA-Pool im Verhältnis zu einem cDNA-Kontroll-Pool verändert hat. Eine relative Quantifizierung setzt eine interne

Transkript-Kontrolle vergleichbarer Expressionshöhe in beiden Präparationen voraus, so dass Änderungen der Transkript-Kontrolle lediglich auf unterschiedlichen Mengen an Ausgangsmaterial beruhen. Die interne Kontrolle dient dem Ausgleichen solcher Variationen des Ausgangsmaterials, was als Normierung bezeichnet wird. Eine Normierung kann zum einen mithilfe einer relativen Standardkurve oder aber mittels der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode erreicht werden.

Da eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem Ct-Wert besteht, konnten aus einem cDNA-Pool mit einer hohen zu erwartenden Expression der betreffenden Gene durch sequenzielle Verdünnung Standardkurven für Ziel-Gen und Kontroll-Transkripts erzeugt werden. Anhand dieser Standardkurven konnten die zu untersuchenden cDNA-Pools vermessen werden, und durch Division beider Werte wurden die auf die Expression des Kontroll-Transkripts normierten Werte erhalten. Diese Werte wurden wiederum ins Verhältnis zu einem Kontroll-cDNA-Pool gesetzt und so durch Division die x-fache Änderung der Expression im Vergleich zur Kontrolle erhalten.

Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode kommt ohne eine Standardkurve aus. Bei dieser Methode werden die Ct-Werte von Ziel-Gen und Kontroll-Transkript aller cDNA-Pools voneinander subtrahiert. Werden daraufhin diese ΔCt Werte des zu untersuchenden cDNA-Pools von dem ΔCt -Wert des cDNA-Kontroll-Pools subtrahiert, ergibt dies den $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert. Dieser Wert gibt an, um wie viel PCR-Zyklen sich die Expression des Ziel-Gens in den beiden untersuchten cDNA-Pools unterscheiden. Die Expressionsänderung berechnet sich nach der Formel: x-fache Expressionsänderung = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ [96]. Wichtige Grundvoraussetzung für die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode stellen vergleichbare PCR-Effizienzen der beteiligten PCRs für Ziel-Gen und Kontroll-Transkript dar.

Eine relative Quantifizierung der Genexpression anhand von Standardkurven wurde bei der Frage der Expressionsänderung von NOD1 und NOD2 nach spezifischer Stimulation eingesetzt. Durchgeführt wurden diese Messungen an einem LightCycler (Roche, Mannheim) und Reagenzien der Fa. Invitrogen mit einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 6 min. Es schlossen sich 40 Zyklen an: Denaturierung bei 95 °C für 25 s, *Annealing* und *Extension* bei 60 °C für 45 s.

Die Ansätze für eine relative Quantifizierung setzten sich zusammen:

Bezeichnung	Stammlösung	Volumen für eine Reaktion (μl)
Platinum SYBR-Green qPCR Super Mix UDG (Invitrogen)	Firmeneigene Rezeptur, Taq-Polymerase, dNTPs, SYBR-Green	12,5
Primer sense	5 μ M	1
Primer antisense	5 μ M	1
BSA	20x	1
DNA-Template		4
<i>Aqua dest.</i>		5,5

Absolute Quantifizierung einer Genexpression mittels quantitativer Real-Time-PCR

Die absolute Quantifizierung einer Genexpression lässt Aussagen über die Anzahl an spezifischen mRNA-Molekülen je Zelle zu. Hierzu ist die genaue Kenntnis der Zellzahl erforderlich, die durch mehrmaliges Zählen mittels Zählkammer nach Neubauer ermittelt wurde. Ebenfalls ist eine quantitative RNA-Präparation erforderlich, da Schwankungen an diesem Punkt alle weiteren Ergebnisse verfälschen würden. Überprüft wurde dies, indem Gesamt-RNA aus einer verschiedenen Anzahl von Zellen präpariert und spektrophotometrisch vermessen wurden, was den linearen Zusammenhang zwischen eingesetzter Zellzahl und erhaltener Menge an Gesamt-RNA belegte. Um den Fehler durch die reverse Transkriptase so gering wie möglich zu halten, wurden jeweils vergleichbare Mengen Gesamt-RNA umgeschrieben und später auf die eingesetzte Zellzahl zurückgerechnet. Eine weitere Grundvoraussetzung für eine absolute Quantifizierung stellen Standards der zu analysierenden DNA-Abschnitte dar, deren Molekülkonzentrationen bekannt sind. Solche Standards können z.B. Plasmide sein, in die die von den spezifischen Primern amplifizierten DNA-Abschnitte hineinkloniert wurden. Plasmide lassen sich hochrein herstellen und ihre Konzentration spektrophotometrisch exakt ermitteln. Da die Basenabfolge der so generierten Plasmide bekannt ist, kann daraus das Molekulargewicht der Plasmidstandards berechnet

werden. Aus Konzentration und Molekulargewicht lässt sich mit Hilfe der Avogadro-Zahl die Anzahl der Moleküle je μl berechnen.

Beispiel: Plasmid mit 7100 Basenpaaren mit $[c]=1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

$$7100 \text{Nukleotide} \times 330 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 2 = 4686000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$\frac{4686000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{6,02214199 \times 10^{23} \frac{\text{Moleküle}}{\text{mol}}} = 7,78 \times 10^{-18} \frac{\text{g}}{\text{Molekül}}$$

$$1 \mu\text{gPlasmid} = \frac{0,000001\text{g}}{7,78 \times 10^{-18} \frac{\text{g}}{\text{Molekül}}} = 1,28 \times 10^{11} \text{Moleküle}$$

Eingesetzt wurde die Methode der absoluten Quantifizierung für die Ermittlung der basalen Expression von NOD1 und NOD2, sowie für die Ermittlung des siRNA-vermittelten *Knock-downs*. Durchgeführt wurden diese Messungen an einem StepOnePlus *Real-Time*-PCR-System (Applied Biosystems) mit einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 10 min. Es schlossen sich 40 Zyklen an: Denaturierung bei 95 °C für 15 s, *Annealing* und *Extension* bei 60 °C für 60 s.

Die Ansätze für eine absolute Quantifizierung setzten sich zusammen:

Bezeichnung	Stammlösung	Volumen für eine Reaktion (µl)
TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)	Firmeneigene Rezeptur, Taq-Polymerase, dNTPs	6,25
Primer sense	5 µM	0,5
Primer antisense	5 µM	0,5
Sonde	5 µM	0,25
DNA-Template		2
<i>Aqua dest.</i>		3

2.6.13 Ortsgerichtete Mutagenese

Die für die Klonierungen verwendete *Taq*-Polymerase weist eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 1:9 000 [97] auf, wodurch gerade bei langen Amplifikaten mit Nukleotidaustauschen zu rechnen war. Führt solche Austausche zu einer veränderten Aminosäuresequenz im exprimierten Protein wurden sie mittels des „QuikChange site-directed mutagenesis kit“ der Fa. Stratagene (Amsterdam, Niederlande) korrigiert. Ausgehend von komplementären Primern mit den auszutauschenden Nukleotidsequenzen wurde eine PCR nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Matrize diente das Plasmid mit dem zu korrigierenden Fehler in der Nukleotidabfolge. Die bei der Mutagenese verwendete *PfuTurbo*® DNA-Polymerase

synthetisiert beide komplementären Stränge mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $1:10^6$, wodurch das Risiko eines erneuten Basenaustausches deutlich reduziert wurde. Da die zu korrigierenden Plasmide aus einem *E. coli* Stamm isoliert wurden, der DNA methyliert, konnten die Ausgangs-Plasmide nach erfolgter PCR mit der für methylierte DNA spezifischen Endonuklease DpnI abgebaut werden. Im Anschluss an die ortsgerichtete Mutagenese wurden chemisch kompetente *E. coli* XL1 mit 2 μ l aus jedem Ansatz transformiert. Der Erfolg des Nukleotidaustausches wurde durch Sequenzierung der entstandenen Plasmide überprüft.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde mittels der Methode nach Bradford durchgeführt [98]. Diese Methode beruht auf der Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau G-250 mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen in saurerer Lösung. Durch eine Bindung an Proteine wird der Farbstoff in seiner unprotonierten blauen Zustandsform stabilisiert und sein Absorptionsmaximum verschiebt sich von 470 nm nach 595 nm. Die gesuchte Proteinkonzentration ließ sich so mithilfe einer, aus einer Proteinlösung bekannter Konzentration hergestellten, Standardreihe spektrophotometrisch ermitteln. Als Protein für die Standardreihe wurde eine BSA-Lösung verwendet, von der Konzentrationen von 0,05 bis 1 mg/ml mit isotonischer Kochsalzlösung hergestellt wurden. Es wurden daraufhin je 5 μ l Probe bzw. Standard mit 200 μ l 1:5 verdünntem Bradford-Reagenz (Bio-Rad Laboratories, München) in einer Mikrotiterplatte gemischt. Nach 10 min Inkubation erfolgte die spektrophotometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 595 nm.

2.7.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch eine Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine nach ihrem apparenten Molekulargewicht aufgetrennt werden [99]. Ohne Zusatz von SDS wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Gel sowohl durch ihre Form und Größe als auch durch ihre Gesamtladung bestimmt. In Gegenwart des Detergenz dissoziieren die Proteine in ihre Untereinheiten. Die Auftrennung der Proteine beruht auf der Assoziation der Polypeptidkette mit dem Detergenz. Diese Assoziation hat eine starke negative Aufladung durch die Sulfatgruppen des SDS zur Folge durch die die Eigenladung des Proteins maskiert wird, wodurch sich ein konstantes Verhältnis zwischen Ladung und Masse einstellt. Die Auftrennung lässt sich durch den Einsatz

eines diskontinuierlichen Puffersystemes verbessern, weshalb zwei Gele mit unterschiedlicher Pufferzusammensetzung in einer Mini-Gel Elektrophoresekammer (Bio-Rad) kombiniert wurden.

10 µl der aufzutrennenden Proben wurden mit 8 µl reduzierendem bzw. nichtreduzierendem Beladungspuffer versetzt, 5 min im Wasserbad gekocht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Im Sammelgel wurden die Proben mit einer Stromstärke von 15 mA, im Trenngel mit 22 mA je Gel aufgetrennt.

Trenngel 12 %:

5,2 ml	Acrylamid - Lösung (25 % Acrylamid, 0,35 % Bisacrylamid)
2,0 ml	Trenngelpuffer (1,5 M Tris - HCl; pH 8,8)
0,1 ml	10 % SDS
3,0 ml	8 M Harnstoff
10 µl	TEMED
0,225 ml	10 % Ammoniumpersulfat

Trenngel 7 %:

2,9 ml	Acrylamid - Lösung (25 % Acrylamid, 0,35 % Bisacrylamid)
2,3 ml	<i>Aqua dest.</i>
2,0 ml	Trenngelpuffer (1,5 M Tris - HCl; pH 8,8)
0,1 ml	10 % SDS
3,0 ml	8 M Harnstoff
10 µl	TEMED
0,225 ml	10 % Ammoniumpersulfat

Sammelgel 2 %:

600 µl	Acrylamid - Lösung (30 % Acrylamid, 1,5 % Bisacrylamid)
250 µl	Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, pH 6,8 mit Phosphorsäure)
25 µl	10 % SDS
1,5 ml	8 M Harnstoff
2,5 µl	TEMED
75 µl	10 % Ammoniumpersulfat

10x Laufpuffer:

144 g/l	Glycin
30 g/l	Tris-Base
10 g/l	SDS

Beladungspuffer:	5,0 ml	8 M Harnstoff
	2,0 ml	Sammelgelpuffer
	1,0 ml	20 % SDS
	1,5 ml	Glycerol
	0,5 ml	β -Mercaptoethanol (reduzierend) bzw. <i>Aqua dest.</i> (nichtreduzierend)
	1	Spatelspitze Bromphenolblau

Das verwendete TEMED stammte von der Fa. Bio-Rad, alle weiteren Reagenzien wurden von der Fa. Carl Roth bezogen.

2.7.3 Western Blot und immunologische Detektion der immobilisierten Proteine

Ein Western Blot ermöglicht den Nachweis eines Proteins mit spezifischen mono- oder polyklonalen Antikörpern nach elektrophoretischer Auftrennung [100, 101]. Der elektrophoretisch aufgetrennte Proteinextrakt wird dazu auf eine PVDF-Membran transferiert, und diese wird für den Nachweis mit dem spezifischen Antikörper verwendet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Polyacrylamidgel in Transferpuffer für 55 min in einer Mini-Trans Blot Elektrophoresekammer (Bio-Rad) bei 250 mA auf die PVDF-Membran transferiert und diese anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Membran wurde in 5 % Magermilchpulver (Sucofin, Zeven), angesetzt in PBS mit 0,05 % Tween 20 (Carl Roth), für 1 h geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in einem Volumen von 4 ml Blockpuffer in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen auf einem Rollenmischer für 1,5 h bei Raumtemperatur. Die verwendeten Antikörperkonzentrationen richteten sich nach den Herstellerangaben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Blots in kleine Schalen überführt und zehnmals mit PBS/Tween 20 gewaschen. Als sekundärer Nachweisantikörper wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper benutzt, der gegen Antikörper der Spezies gerichtet war, aus dem der primäre Antikörper stammte. Die Verdünnung richtete sich nach Angaben des Herstellers. Der Nachweis des gebundenen sekundären Antikörpers erfolgte mittels Chemilumineszenz. Die Membran wurde zehnmals mit PBS/Tween 20 gewaschen und mit einem Substrat (GE Healthcare, München) versetzt, das Luminol und Wasserstoffperoxid enthält. Durch die Meerrettich-Peroxidase wird das Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid oxidiert und sendet beim Elektronenübergang von einem angeregten Zustand in den Grundzustand ein Photon im

blauen Bereich des Lichtspektrums aus. Auf diese Weise lassen sich spezifische Antigene bis in den pikomolaren Bereich nachweisen [102, 103].

Transferpuffer: 3,03 g/l Tris-Base
14,4 g/l Glycin
200 ml/l Methanol

Das verwendete Methanol stammte von der Fa. Merck (Darmstadt), alle übrigen Reagenzien von der Fa. Carl Roth.

2.7.4 Quantifizierung von Zytokinen mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* und *Cytometric Bead Array*

Die Bestimmung der Konzentration von IL-6 in Zellkulturüberständen erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Kits (BD Pharmingen, Heidelberg) bzw. eines *Cytometric Bead Array* (CBA) (BD Biosciences).

Ein ELISA beruht auf dem Prinzip des Zweiseitenbindungstest, bei dem ein immobilisierter anti-IL-6-Antikörper im Zellüberstand vorhandenes IL-6 bindet und dieser von einem biotinylierten zweiten anti-IL-6-Antikörper, der ein anderes Epitop des IL-6 erkennt, gebunden wird. Der Nachweis des biotinylierten Antikörpers erfolgte mittels einer Meerrettich-Peroxidase, die kovalent an Streptavidin gekoppelt war. Anhand einer Verdünnungsreihe eines Standards mit definierter Konzentration an IL-6 war eine Quantifizierung des Zytokins in Zellkulturüberständen möglich. Die Sensitivität des Testes wurde vom Hersteller mit 3,8 pg/ml als doppelter Wert der Standardabweichung der Leerkontrolle angegeben. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer IL-6-Standardreihe gearbeitet, die einen Bereich von 15,6–1 000 pg/ml IL-6 abdeckte. Proben wurden dementsprechend, verdünnt um in diesem Bereich quantifiziert werden zu können. Alle Arbeitsschritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Auswertung erfolgt mithilfe eines Opsys MR ELISA-Readers (Dynex Technologies, Chantilly, USA).

Ein CBA nutzt Partikel definierter Fluoreszenzen als feste Phase. An diese Partikel ist ein IL-6-spezifischer Antikörper kovalent gekoppelt. Der Nachweis von gebundenem IL-6 erfolgt durch einen Fluoreszenz-markierten IL-6-spezifischen Antikörper, der ein weiteres Epitop des IL-6-Moleküls erkennt. Anhand der Fluoreszenzintensität in Kombination von Standards mit bekannten IL-6-Konzentrationen lassen sich Aussagen über die in den Proben vorliegende IL-6-Konzentration treffen. Die Sensitivität des

Testes wurde vom Hersteller mit 1,4 pg/ml als doppelter Wert der Standardabweichung der Leerkontrolle angegeben. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer IL-6-Standardreihe gearbeitet, die einen Bereich von 9,76–2 500 pg/ml IL-6 abdeckte und die Proben dementsprechend verdünnt, um in diesem Bereich quantifiziert werden zu können. Die Auswertung erfolgte nach durchflusszytometrischer Datenerfassung mithilfe der Software FCAB Array (BD Biosciences).

2.7.5 Nachweis der Luciferase-vermittelten Biolumineszenz eines Nukleären Faktor- κ B-Reporterplasmids

Der Nachweis einer Aktivierung des Nukleären Faktor (NF)- κ B-Signaltransduktionsweges ist mittels eines Reporterplasmids möglich, das mehrere Kopien der NF- κ B-Konsensussequenz κ B enthält, die an die TATA-Region des HSV-TK-Promotors des *Herpes simplex* Virus fusioniert wurden [104]. Bindet NF- κ B an κ B, kommt es zur Transkription des nachgeschalteten Gens, das für die Luciferase aus *Photinus pyralis* kodiert. Luciferasen oxidieren in Anwesenheit von ATP, Mg^{2+} -Ionen und Sauerstoff Luciferol zu instabilen Dioxetanen, bei deren Zerfall Biolumineszenz entsteht. Die Luciferase benötigt für ihre Aktivität keine posttranslationalen Modifizierungen, so dass ihre Aktivität sofort nach der Translation nachweisbar ist [105, 106]. Testsysteme, die auf der Luciferase-Reaktion basieren, sind sehr sensitiv, da es keine Hintergrundaktivität in den Wirtszellen gibt und die Quantenausbeute der vermittelten Chemilumineszenzreaktion sehr hoch ist [107]. Auf Luciferase-Aktivität zu untersuchende Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend in *Reporter Lysis Buffer* (Promega) durch Einfrieren und Auftauen lysiert. Nach Abzentrifugieren bei 9600g für 10 min und Einstellen der Lysate auf vergleichbare Proteinkonzentrationen, wurden jeweils 20 μ l Lysat in eine Vertiefung einer weißen 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt. Nach Zugabe von 60 μ l Luciferol-haltigem Substrat wurde die Biolumineszenz mittels eines Mithras LB 940 *Luminescence readers* (Berthold Technologies, Bad Wildberg) für jeweils 0,5 s gemessen. Als Ergebnisse wurden relative *Relative Light Units* (RLU) ausgegeben.

2.7.6 Ligand-Rezeptor Bindungsstudien mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie

Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie dient der Ermittlung der Bindungskinetik zwischen zwei interagierenden Molekülen. Bei dieser Methode wird mittels eines Prismas eine totale innere Reflexion auf einem dünnen Metallfilm erzeugt. Bedingt durch die totale Reflexion wird zwar keine Energie transmittiert, das elektrische Feld der Photonen erstreckt sich aber bis zu einem Viertel der Wellenlänge hinter die Grenzfläche des Prismas und erzeugt so eine harmonische Welle, die parallel zur Oberfläche läuft. Ein Teil dieser Welle dringt auch in das angrenzende optisch dünnere Medium ein und bildet das evaneszente Feld. Bei einem bestimmten Einstrahlwinkel (Resonanzwinkel) kommt es zu einer gekoppelten Resonanz zwischen den eingestrahnten Photonen und den Elektronen im Metall, welche zur Ausbildung einer Plasmaschwingung führt, die als Oberflächenplasmon bezeichnet wird. Durch dieses Oberflächenplasmon wird die gesamte Energie der Photonen im Metall zerstreut, so dass in einer Reflexionskurve bei diesem bestimmten Winkel ein Minimum auftritt. Das Oberflächenplasmon wiederum erzeugt das evaneszente Plasmonfeld, das dieselbe Wellenlänge aufweist, wie das evaneszente Feld der einfallenden Lichtwelle. Die Wellenlänge des Plasmonfeldes wird durch die an den Metallfilm angrenzende dielektrische Schicht direkt beeinflusst. Bereits einfache, molekulare Schichten auf dem Metallfilm reichen aus, die Wellenlänge des Plasmonfeldes zu verschieben. Diese Änderung der Wellenlänge hat eine Verschiebung in der Resonanzfrequenz zur Folge, die vom Detektor als Änderung des Resonanzwinkels detektiert werden kann [108-110]. Da dieser Resonanzwinkel abhängig vom Brechungsindex ist, erfolgt die Ausgabe der Messwerte als *Resonance Units* (RU), wobei 1 RU einem Brechungsindex von 10^{-6} entspricht.

Die Bindungsstudien wurden an einem Biacore T100 in Kombination mit der Biacore T100 GxP Software (GE Healthcare) in Kooperation mit Dr. Walter Stöcklein am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik in Göltingen durchgeföhrt. Für die Messungen wurde ein NOD2-EGFP-Fusionsprotein über einen EGFP-spezifischen Antikörper, der kovalent an einen Biacore CM5 (GE Healthcare) Sensorchip gekoppelt wurde, auf diesem als Ligand immobilisiert. Als Laufpuffer diente 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 6,8. Die Analyten wurden in verschiedenen Konzentrationen in Laufpuffer über den Sensorchip geföhrt und so auf eine Bindung durch NOD2 analysiert (Tabelle 2).

Tabelle 2: Verwendete Analyten in der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie.

Analyt	Chemische Bezeichnung	Hersteller
MDP LD	N-Acetylmuramyl L-Alanyl-D-Isoglutamin	Invivogen (Toulouse, Frankreich))
MDP DD	N-Acetylmuramyl D-Alanyl-D-Isoglutamin	Invivogen
iE-DAP	γ -D-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure	Invivogen
iE-Lys	γ -D-Glutamyl-Lysin	Invivogen
M-Tri _{DAP}	N-Acetyl-Muramyl-L-Alanyl- γ -D-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure	Invivogen

2.8 Transfektion eukaryontischer Zellen

2.8.1 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen mit Plasmid-DNA

Starke elektrische Felder sind in der Lage in Zellmembranen eukaryontischer Zellen Poren zu erzeugen, durch die z.B. Fremdnukleinsäuren in die Zellen eingeschleust werden können. Den Vorgang der Porenbildung mittels elektrischen Stroms wird als Elektroporation bezeichnet.

Am Tage vor der Transfektion wurden die zu transfizierenden Zellen das letzte Mal passagiert so dass sie sich am Tage der Transfektion in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Zu transfizierende Zellen wurden in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt und das Kulturmedium abzentrifugiert (7 min, 450g, 4 °C). Das Zellsediment wurde in einem kleinen Volumen frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gestellt.

Für die Transfektion wurde der Überstand quantitativ mit einer Pipette steril abgenommen und die Zellen in 100 μ l Elektroporationspuffer resuspendiert. Nach Zugabe der zu transfizierenden Menge an Plasmid-DNA wurde erneut resuspendiert und die Suspension quantitativ in eine Elektroporationsküvette mit 2 mm Spaltbreite (Biozym Scientific, Hamburg) überführt. Transfiziert wurden die Zellen mittels eines *High Voltage* (HV), eines *Low Voltage* (LV) oder kombinierter HV/LV-Impulse (Abb. 4). Unmittelbar

nach der Transfektion wurden die Zellen in mit angewärmtem Kulturmedium vorbereitete Kulturschalen überführt und im Brutschrank kultiviert.

Elektroporationspuffer: 90 mM Natriumphosphat
 10 mM Magnesiumchlorid
 50 mM Glukose
 pH 7,2

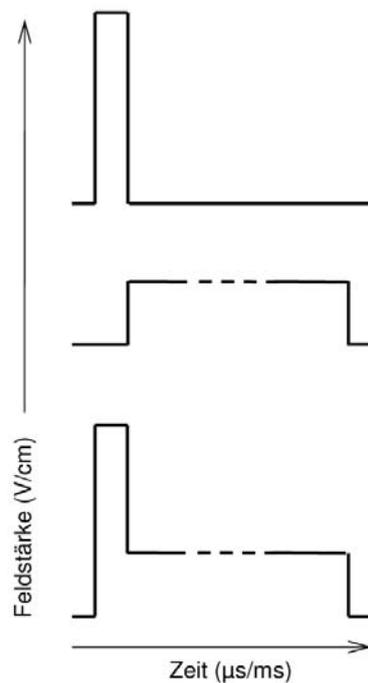


Abb. 4: Optimale Impulsformen für die unterschiedlichen Prozesse während einer Elektroporation.

Dargestellt ist ein HV-Impuls, der aufgrund seiner hohen Feldstärke die Zellmembran permeabilisiert (oben). Ein LV-Impuls weist eine deutlich geringere Feldstärke auf und ermöglicht einen elektrophoretischen Stofftransport der zu transfizierenden Moleküle (mitte). Eine HV/LV-Impuls ermöglicht eine Kombination aus Permeabilisierung und Stofftransport (unten).

Tabelle 2: Optimale elektrische Parameter für eine Transfektion verschiedener Zelltypen mittels kombinierter Rechteckimpulse.

<i>Zelltyp</i>	<i>1. Impuls (HV)</i>		<i>2. Impuls (LV)</i>	
Adhärente Zellen				
Murine Präadipozyten	3 kV/cm	400 μ s	1,5 kV/cm	5 ms
3T3L1	3 kV/cm	400 μ s	1,5 kV/cm	5 ms
Suspensionszellen				
J558L	3 kV/cm	100 μ s	0,75 kV/cm	10 ms
K562	3 kV/cm	100 μ s	0,75 kV/cm	10 ms
PBMC	4,5 kV/cm	100 μ s	0,75 kV/cm	3 ms

2.8.2 Nucleofection muriner Präadipozyten

Die sogenannte Nucleofection ist eine Transfektionsmethode, die vom Hersteller (Lonza Cologne, Köln) als Kombination eines Elektroporationssystem (Nucleofector) mit einer speziell auf den jeweiligen Zelltyp abgestimmten Chemie beschrieben wird. Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert. Resuspendiert wurden die Zellen in 100 μ l Nucleofector Solution V. Nach Zugabe von 2 μ g pEGFP-N1 wurden die Zellen im Nucleofector mit dem Programm T-030 transfiziert und anschließend in mit angewärmtem Kulturmedium vorbereitete Kulturschalen überführt und im Brutschrank kultiviert

2.8.3 Stabile Transfektion der Zelllinie J558L

Stabil transfizierte Zellen können das heterologe Gen episomal, d.h. als Plasmid, oder ins Chromosom integriert weitergeben. In einer gemischten Population transfizierter und nicht-transfizierter Zellen haben die nicht-transfizierten Zellen in der Regel einen Wachstumsvorteil, so dass nach längerer Kultur transfizierte Zellen sukzessive aus dem Gemisch verschwinden. G418 (Carl Roth) ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum, das sowohl das Wachstum pro- als auch eukaryontischer Zellen verhindert. Eine Aminoglykosid-Phosphotransferase inaktiviert das Antibiotikum. Das Gen für dieses Enzym wird mit dem interessierenden Gen transfiziert [111]. Durch die Klonierung von

Zellen aus dem Transfektionsgemisch zu einem frühen Zeitpunkt werden Zellpopulationen erzeugt, die aus nur einer stabil transfizierten Ausgangszelle hervorgegangen sind.

Nach 24 h wurde den J558-Zellen, die mit dem NOD2-EGFP-Expressionsvektor transfiziert worden waren, G418 zu einer Endkonzentration von 0,8 mg/ml aus einer sterilen 100-fach konzentrierten Stammlösung zugesetzt. Die Zellen wurden für weitere 4 Tage im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellsuspensionen in 50 ml-PP-Zentrifugenröhrchen überführt und in frischem Medium soweit verdünnt, dass drei vitale Zellen in 100 µl Medium mit einer Konzentration an G418 von 1,6 mg/ml vorlagen. Von diesen Verdünnungen wurden 100 µl in jede Vertiefung einer Zellkulturplatte (96 Vertiefungen, flacher Boden) pipettiert, die tags zuvor mit 100 µl je Vertiefung murinen Peritoneal-Exsudat-Zellen vorbereitet worden waren. Die Kultur erfolgte im Brutschrank. Nach einer Woche wurden die gewachsenen Zellklone mittels Durchflusszytometrie auf eine EGFP-Expression hin analysiert. Von positiven Klonen wurde wiederum eine Verdünnung hergestellt, so dass eine Zelle je 100 µl Kulturmedium mit 1,6 mg/ml G418 vorlag. Von dieser Verdünnung wurden jeweils 100 µl je Vertiefung auf mit murinen Peritoneal-Exsudat-Zellen vorbereitete Zellkulturplatten (96 Vertiefungen, flacher Boden) überführt. Nach weiteren 7 Tagen wurde die Zellkulturplatte erst mikroskopisch auf die Anzahl der Klone je Vertiefung untersucht, anschließend erfolgte eine erneute durchflusszytometrische Analyse auf eine EGFP-Expression. Positive Einzelklone wurden daraufhin in Kultur genommen und zeitnah kryopräserviert.

2.8.4 Transfektion muriner Präadipozyten mit *Small Interfering RNA*

Die Expression eines Genes lässt sich durch kurze, doppelsträngige RNA Moleküle unterdrücken. Diese *Small Interfering* (si)RNA muss dabei eine zum Ziel-Gen homologe Sequenz aufweisen. Für das Einschleusen dieser RNA wurde ebenfalls die Methode der Elektroporation angewandt.

Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert. Resuspendiert wurden die Zellen in 100 µl Elektroporationspuffer. Nach Zugabe von 100-120 pmol der entsprechenden siRNA wurde die Suspension nochmals resuspendiert und anschließend in einer Küvette mit 2 mm Spaltbreite mit einem initialen HV-Impuls von 3 kV/cm für 400 µs gefolgt von einem LV-Impuls mit einer Feldstärke von 1,5 kV/cm für 5 ms transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden in einem mit angewärmten Kulturmedium befüllten 15 ml-Zentrifugenröhrchen gepoolt und schließlich in einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen je Vertiefung einer 24-Loch-Kulturplatte ausgesät und für 24 h im Brutschrank kultiviert.

2.9 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Daten wurden die kommerziellen Tabellenkalkulationsprogramme Excel™ (Microsoft, München) sowie GraphPad Prism™ (GraphPad Software, La Jolla, USA) verwendet. Die Berechnung der Signifikanzen wurden mit Hilfe des doppelseitigen t-Tests für Gauss'sche Normalverteilung durchgeführt. Signifikanzen zwischen zwei zu untersuchenden Gruppen wurden mittels des t-Test nach Student berechnet. Bei mehreren miteinander zu vergleichenden Gruppen erfolgte die Berechnung der Varianzen nach einer einfaktoriellen *Analysis of Variance* (ANOVA). Signifikanzen gegenüber einer Kontrollgruppe wurden mittels eines Dunnett-Tests berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung und Etablierung einer neuartigen Elektroporationsstrategie für den spezifischen *Knock-down* durch *Small Interfering (si)RNA*

3.1.1 Aufbau und Funktionsweise des Transfektionssystems ELPorator 1000

Die Transfektion stellte eine zentrale Methode der vorliegenden Arbeit dar, was zu der Entwicklung und Bau des neuartigen Elektroporationssystems ELPorator 1000 führte. Das Transfektionssystem ELPorator 1000 besteht aus zwei separaten Modulen, die elektrisch miteinander verbunden werden können (Abb. 5). Modul I ist so dimensioniert, dass es Spannungen von 0–1 000 V und Impulszeiten von 1–999 μ s bereitstellen kann. Als Ladungsspeicher dient eine Kondensatorbank mit einer Kapazität von 113 μ F, die über ein Hochspannungsnetzteil auf die gewünschte Spannung aufgeladen werden kann. Über einen kontrollierbaren Leistungshalbleiter vom Typ eines *Insulated Gate Bipolar Transistors* (IGBT) kann die Kondensatorbank über eine von 1–999 μ s wählbare Zeit mit der Küvette leitend verbunden werden. Modul II verfügt über einen vergleichbaren Aufbau. Die Spannung lässt sich bei diesem Modul im Bereich von 0–350 V einstellen, die Impulszeit ist im Bereich von 0,1–99,9 ms frei wählbar. Aufgrund der Notwendigkeit Energie für mehrere Millisekunden bereitstellen zu müssen, weist die Kondensatorbank von Modul II mit 940 μ F eine deutlich höhere Kapazität auf als die Kondensatorbank von Modul I. Durch Parallelschaltung und einer Kommunikation beider Module untereinander, lassen sich kombinierte Rechteckimpulse erzeugen, die unterbrechungsfrei aufeinander folgen.

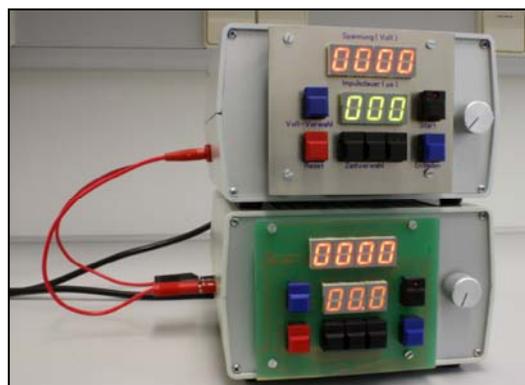


Abb. 5: Das modular aufgebaute Transfektionssystem ELPorator 1000.

Das Transfektionssystem ELPorator 1000 besteht aus einem HV-Modul (oben) und einem LV-Modul (unten). Durch eine Parallelschaltung der Ausgänge sowie einer Verbindung mittels einer Steuerleitung auf der Rückseite der Module, lassen sich kombinierte Rechteckimpulse erzeugen, die kontinuierlich aufeinander folgen.

3.1.2 Erzeugung von Stromimpulsen wählbarer Länge mittels Mikrocontrollern

Hardware

Die zentralen Steuerungseinheiten eines jeden Moduls des ELPorator 1000 werden von zwei Mikrocontrollern gebildet. Unter dem Begriff des Mikrocontrollers versteht man einen Prozessor, bei dem Peripheriefunktionen und Programmspeicher mit auf dem Chip integriert sind, wodurch preisgünstige und kompakte Schaltungen möglich sind. Für das Transfektionsgerät wurden 8-Binary Digit (Bit) Mikrocontroller der Fa. Atmel (San José, USA) verwendet, die in der Programmiersprache Assembler programmiert wurden. Ein Mikrocontroller wertet dabei die Eingaben der Impulszeit aus, konvertiert diese dezimal eingegebenen Werte in das binäre System und steuert anhand dieser Daten die Dauer des Impulses (Abb. 6). Eine weitere Aufgabe dieses Mikrocontrollers besteht in der numerischen Darstellung der eingestellten Impulszeit sowie der Überwachung der Stromstärke während des Impulses. Der zweite Mikrocontroller dient der Regelung der Hochspannungserzeugung. Zum einen regelt und überwacht dieser Mikrocontroller die Ladespannung der Kondensatorbank, zum anderen gibt er Ist- und Sollwerte dieser Ladespannung auf einer numerischen Anzeige an.

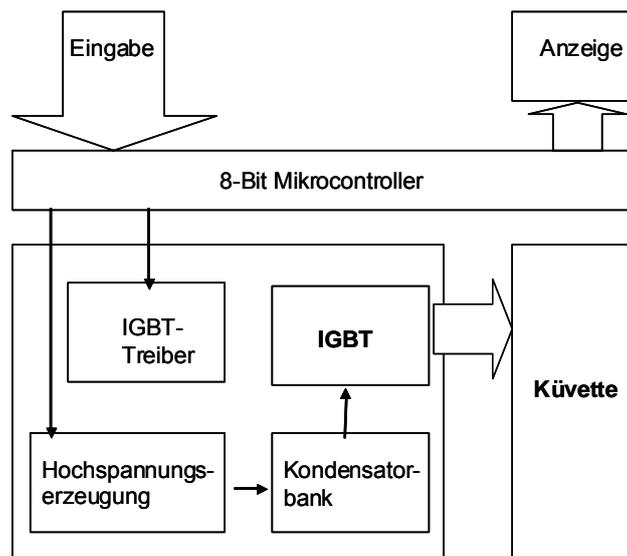


Abb. 6: Schematische Aufbau eines Moduls des Transfektionssystems ELPorator 1000.

Ein Mikrocontroller wertet die Eingaben für Spannung und Impulszeit aus und gibt die eingestellten Zeiten auf einer Anzeige an. Der Mikrocontroller steuert ebenfalls das Hochspannungsnetzteil und lädt über dieses die Kondensatorbank auf die eingestellte Spannung auf. Wird der Impuls vom Anwender gestartet, so steuert der Mikrocontroller den IGBT-Treiber an, der wiederum den IGBT leitend schaltet, wodurch die Küvette mit der Kondensatorbank leitend verbunden wird. Nach Ablauf der Impulszeit wird der IGBT-Treiber vom Mikrocontroller deaktiviert und der IGBT sperrt.

Software

Aufgrund der Komplexität des Programmes soll im Folgenden lediglich auf das Prinzip eingegangen werden, mit dem Impulse definierbarer Länge erzeugt werden können. Ein wesentlicher Bestandteil eines Mikrocontrollers sind seine Timer-Funktionen. Unter diesen Timer-Funktionen versteht man 8-Bit fassende Register, die als binäre Zähler verstanden werden können und vom Systemtakt des Mikrocontrollers inkrementiert werden (Abb. 7). Ist die Taktfrequenz bekannt, können mithilfe dieser Timer genaue Zeitabläufe definiert werden. Die verwendeten Mikrocontroller verfügen ebenfalls über einen aus zwei 8-Bit Registern zusammengesetzten 16-Bit-Timer, der für die Steuerung der Impulslänge verwendet wurde. Die über die Eingabetaster dezimal eingestellte Impulszeit wird durch das Programm in einen Binärwert umgerechnet und mit dem Faktor 8 multipliziert. Diese Multiplikation ist erforderlich, da der Systemtakt 8 MHz beträgt und ein Takt somit genau 125 ns dauert, die eingegebenen Werte aber stets als ganze Mikrosekunden vorliegen. Mit dem Ergebnis der Multiplikation wird der 16-Bit-Timer geladen. Da die Timer bei jedem Takt inkrementiert werden, wird von dem Binärwert des 16-Bit-Timer das Komplement gebildet. Wird der Impuls nun gestartet, wird zum einen der IGBT-Treiber aktiviert, was einen Stromfluss aus der Kondensatorbank in die Küvette zur Folge hat, zum anderen wird bei jedem Systemtakt der 16-Bit-Timer inkrementiert. Erreicht der Timer den Wert 2^{16} , erfolgt beim nächstfolgenden Takt ein Überlauf des Timers, was das Auslösen einer Unterbrechung (Interrupt) des laufenden Programms zur Folge hat. Bei einem solchen Interrupt springt das Programm des Mikrocontrollers zu einer definierten Stelle im Programm, an der es zur Deaktivierung des IGBT-Treiber kommt, wodurch der Impuls beendet wird.

Bit	8	7	6	5	4	3	2	1
Wertigkeit (dezimal)	128	64	32	16	8	4	2	1

Bit	8	7	6	5	4	3	2	1	Dezimalwert
Binärwert	0	1	1	0	0	1	0	0	100
Komplement	1	0	0	1	1	0	1	1	155

Abb. 7: Architektur und Wertigkeiten eines typischen 8-Bit-Registers.

Dargestellt ist die Architektur eines 8-Bit-Registers. Jedem einzelnen Bit des Registers ist eine dezimale Wertigkeit zugeordnet, wobei das rechte Bit die niedrigste Wertigkeit besitzt (oben). Als Beispiel ist ein Binärwert angegeben, der einem Dezimalwert von 100 entspricht. Das Komplement dieses Binärwertes ergibt den Dezimalwert 155 (unten).

Impulsformen

Eine Beurteilung der Impulsformen war nach graphischer Darstellung mittels eines digitalen Speicheroszilloskopes vom Typ DSO220 (Volkraft, Hirschau) möglich. Als Last diente eine mit 100 μl Elektroporationspuffer gefüllte Küvette mit 2 mm Spaltbreite. Es zeigte sich, dass mit dem Transfektionsystem die Erzeugung unterbrechungsfrei aufeinander folgender *High Voltage* (HV)- und *Low Voltage* (LV)-Impulse möglich war (Abb. 8). Durch den modularen Aufbau des Systems ist ebenfalls die Erzeugung von Einzelimpulsen problemlos möglich (Abb. 9). Die Ergebnisse der Messungen belegten ebenfalls die exakte Einhaltung der eingestellten Werte für Impulszeit und Spannung.

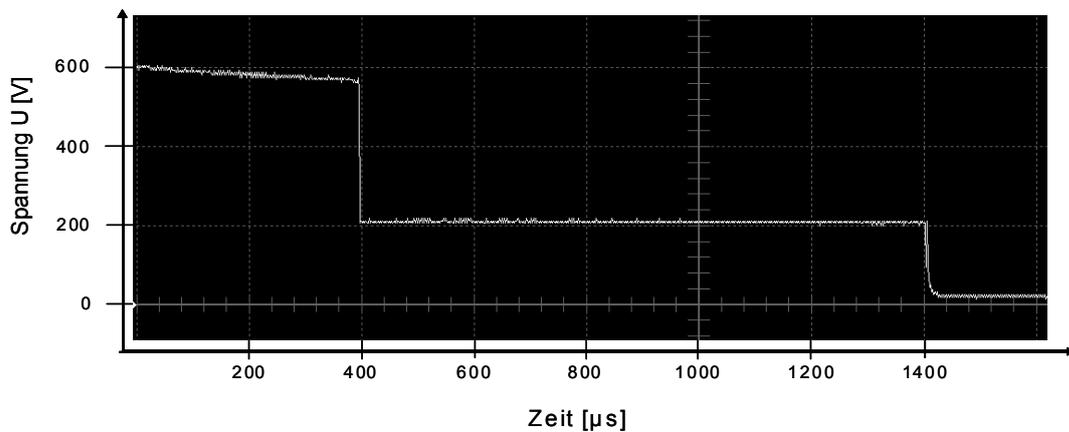


Abb. 8: Spannungsverlauf eines kombinierten HV/LV-Impulses.

Dargestellt ist ein 400 μs langer HV-Impuls mit einer Amplitude von 600 V, unterbrechungsfrei gefolgt von einem LV-Impuls mit einer Länge von 1 ms und einer Amplitude von 200 V. Die Horizontalablenkung betrug 200 $\mu\text{s}/\text{Division}$, die Vertikalablenkung 200 V/Division.

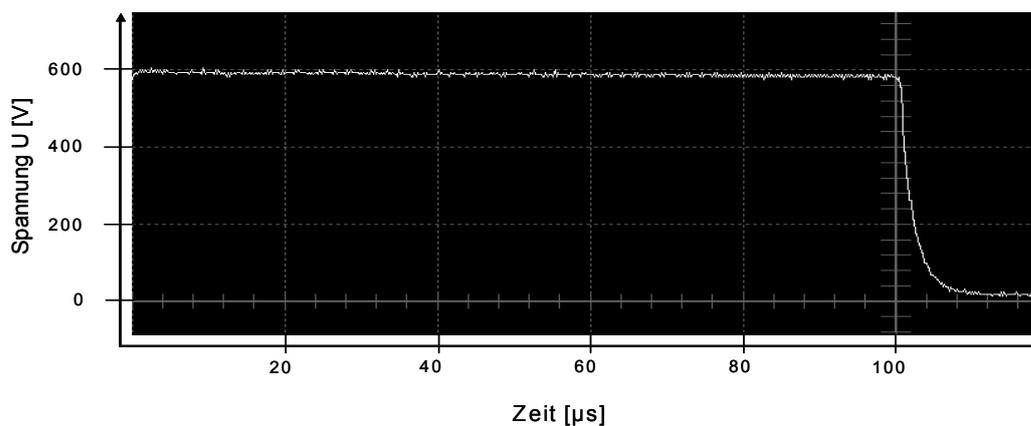


Abb. 9: Spannungsverlauf eines einzelnen HV-Impulses.

Dargestellt ist ein 100 μs langer HV-Impuls mit einer Amplitude von 600 V. Die Horizontalablenkung betrug 20 $\mu\text{s}/\text{Division}$, die Vertikalablenkung 200 V/Division.

Stromfluss

Mithilfe eines Messwiderstandes in der Zuleitung zur Küvette war es möglich den Stromfluss während einer Transfektion zu messen (Abb. 10). In dem angegebenen Beispiel war eine Küvette mit 2 mm Spaltbreite mit 100 μl Elektroporationspuffer befüllt. Mithilfe des Ohmschen Gesetzes ließ sich anhand des Spannungsabfalls über diesem Messwiderstand und der Kenntnis seines Widerstandwertes der resultierende Strom berechnen. Es konnte so eine Stromstärke von 10 A während eines primären Impulses von 600 V gemessen werden. Während eines sekundären Impulses von 200 V betrug die Stromstärke 3,8 A.

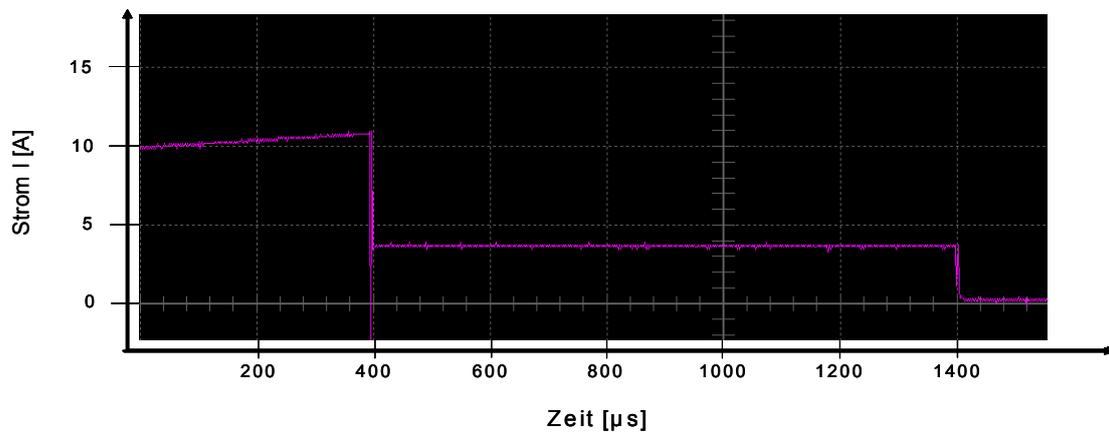


Abb. 10: Auftretende Stromstärken während eines kombinierten HV/LV-Impulses.

Gemessen wurde der Spannungsabfall über dem Messwiderstand während eines kombinierten Rechteckimpulses, bestehend aus einem HV-Impuls von 600 V für 400 μs , unterbrechungsfrei gefolgt von einem LV-Impuls mit einer Amplitude von 200 V und einer Länge von 1 ms. Die Einstellung für die Horizontalablenkung betrug 200 $\mu\text{s}/\text{Division}$, für die Vertikalablenkung 0,5 V/Division. Eine Division auf der y-Achse entsprach bei einem Messwiderstand von 0,1 Ohm einer Stromstärke von 5 A.

Sicherheitsaspekte

Das entwickelte Transfektionssystem erzeugt Spannungen und Ströme in einer Größenordnung, die bei Kontakt eine Gefahr für den Anwender darstellen. Es ist daher von größter Wichtigkeit für die Sicherheit des Anwenders Sorge zu tragen. Aus diesem Grund besitzt das Gerät neben einem isolierten Aufbau verschiedene Sicherheitsvorrichtungen, wie etwa eine Überstrombegrenzung, die bei Strömen von mehr als 60 A den weiteren Stromfluss unterbindet (Abb. 9). Dieser Mechanismus verhindert zuverlässig Funkenschläge in der Küvette, die mit einer hohen Geräusentwicklung und einem Verdampfen der zu transfizierenden Probe einhergehen würden. Die zweite Sicherheitsvorrichtung trägt dem Sachverhalt Rechnung, dass Halbleiter stets nur einen Pol im Stromkreis unterbrechen, überwiegend ist dies die Masse. Dies hätte zur Folge, dass an dem Kontakt für den Pluspol konstant das Potential der Kondensatorbank anliegen würde. Ein – bauartbedingt unwahrscheinliches – Berühren dieses Kontaktes birgt somit ein hohes Risiko eines Stromschlages. Abhilfe schafft hier ein Relais in der Plusleitung, das den Pluspol erst unmittelbar vor dem Impuls freigibt. Relais sind mechanische Schalter, mit Schaltzeiten im Millisekundenbereich, weshalb das Relais ca. eine Sekunde vor Auslösen des Impulses geschlossen wird, was vom zentralen Mikrocontroller zeitlich koordiniert wird.

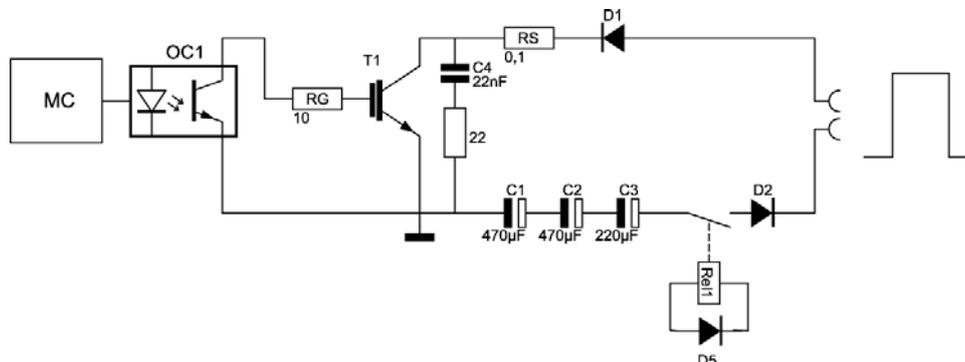


Abb. 11: Ausschnitt des Schaltplans der Ausgangsstufe von Modul I.

Der Mikrocontroller (MC) steuert den IGBT-Treiber (OC1) an, dieser aktiviert über einen Widerstand (RG) den IGBT (T1) und löst so einen Stromfluss durch die Küvette aus. Der Pluspol der Kondensatorbank (C1-C3) wird im Ruhezustand über ein Relais (Rel1) von der Küvette getrennt. Dioden (D1-D2) verhindern bei der Parallelschaltung von beiden Modulen des kompletten Systems ein Stromfluss von einem Modul in das andere.

3.1.3 Vergleich der Transfektionseffizienzen des ELPorator 1000 mit der Methode der Nucleofection am Beispiel der Transfektion primärer muriner Präadipozyten mit einem *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP)-kodierenden Plasmid

Eine etablierte und hocheffiziente Transfektionsmethode stellt die sogenannte Nucleofection dar, bei der durch die Verwendung von Zelltyp-spezifischen chemischen Substanzen in Verbindung mit der Methode der Elektroporation hohe Transfektionseffizienzen erreicht werden konnten (Abb. 12). Ein direkter Vergleich sollte zeigen, ob das Transfektionssystem ELPorator 1000 ähnlich hohe Transfektionsraten aufweist wie sie durch Nucleofection erhalten werden. Es wurden 3T3L1- und primäre Wildtyp (WT)-Präadipozyten mittels beider Methoden in Gegenwart von 2 µg pEGFP-N1 transfiziert und nach 24 h durchflusszytometrisch auf Expression des *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) untersucht. Sowohl von den 3T3L1-Präadipozyten als auch von WT-Präadipozyten wurden durch Verwendung des ELPorator 1000-Systems signifikant mehr Zellen transfiziert, als durch eine Nucleofection. Die Vitalität der Zellen war bei beiden Transfektionsmethoden vergleichbar, mit einem leichten Vorteil für das ELPorator 1000-System.

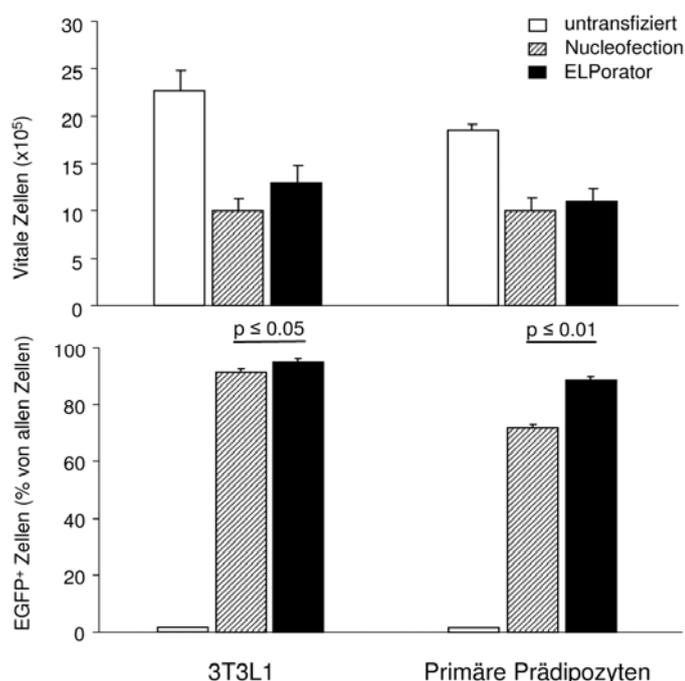


Abb. 12: Vergleich von Transfektionseffizienzen des ELPorator 1000-Systems mit der Nucleofection.

3T3L1- und WT-Präadipozyten wurden zum einen nach der Methode der Nucleofection, zum anderen unter Verwendung des ELPorator 1000-Systems mit 2 µg pEGFP-N1 transfiziert. Die Bestimmung von Vitalität und EGFP-Expression erfolgte 24 h nach Transfektion im Vergleich zu untransfizierten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n=5.

3.1.4 Einfluss der Impulskombination auf Effizienz der Transfektion von Plasmid-DNA in murinen Präadipozyten

Die Effekte verschiedener Impulsparameter wurden anhand der Transfektion von murinen Präadipozyten mit dem EGFP-kodierenden Plasmid pEGFP-N1 untersucht. 3T3L1-Präadipozyten wurden zu diesem Zweck mit einem einzelnen HV-, einem einzelnen LV- oder einem kombinierten HV/LV-Impuls transfiziert (Abb. 13). Es zeigte sich, dass sowohl ein einzelner LV-Impuls, als auch eine Impulskombination zu einer vergleichbaren Transfektionseffizienz von ca. 90 % EGFP-positive Zellen führte. Die so erreichte Transfektionseffizienz war deutlich höher, als sie nach Transfektion mit nur einem einzelnen HV-Impuls ermittelt werden konnte. Betrachtet man die Expressionshöhe des EGFP, so zeigte sich eine signifikant höhere Expression bei den Ansätzen, die mit einer Impulskombination transfiziert worden waren, gegenüber der Transfektion mit einem einzelnen LV-Impuls. Zellen mit einem hohen Kern-Zytoplasma-Verhältnis, wie z.B. Präadipozyten, profitierten somit sowohl hinsichtlich der Anzahl transfizierter Zellen, als auch in der Expressionshöhe der eingeschleusten DNA von einer Transfektionsstrategie, die auf der Kombination eines HV- und LV-Impulses beruhte. Weiterhin zeigten diese Ergebnisse Wege auf, wie die Expression einer transfizierten Nukleinsäure durch die Wahl der Impulsparameter in ihrer Höhe moduliert werden kann.

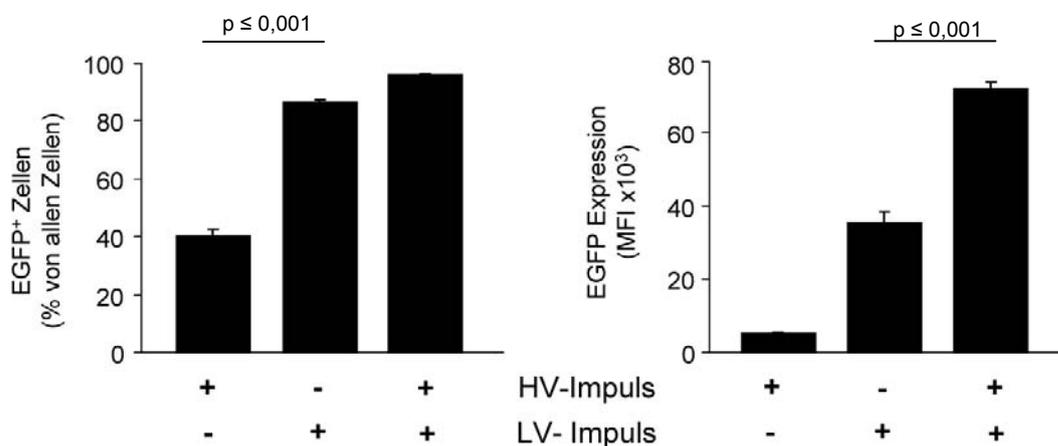


Abb. 13: Einfluss der Impulsstrategie auf Transfektionseffizienz und Expressionshöhe transfizierter muriner Präadipozyten.

3T3L1 Präadipozyten wurden in Gegenwart von 2 µg pEGFP-N1 mit einem HV-Impuls (3 kV/cm, 400 µs), einem LV-Impuls (1,5 kV/cm) oder aber einem kombinierten HV/LV-Impuls transfiziert. Die Transfektionseffizienzen und die Expressionshöhe des EGFP wurden 24 h nach Transfektion durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n=3.

3.1.5 Einfluss der eingesetzten DNA-Menge auf die Effizienz der Transfektion von Plasmid-DNA

Die verfügbare Menge an zu transfizierender Nukleinsäure stellt nicht selten einen limitierenden Faktor bei der Planung von Experimenten dar. Es sollte daher untersucht werden, wie effizient die unterschiedlichen Impuls-Bedingungen auch geringe Konzentrationen an zu transfizierender Nukleinsäure hinsichtlich Transfektionseffizienz und Expressionshöhe der eingeschleusten Nukleinsäure ausnutzen. Primäre WT-Präadipozyten wurden zum einen in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen des Vektors pEGFP-N1 mit einem einzelnen HV-Impuls transfiziert, zum anderen mit einem kombinierten HV/LV-Impuls. Eine Erhöhung der DNA-Konzentration in Verbindung mit einer Transfektion mittels eines HV-Impulses führte nur zu einer geringfügigen Zunahme der Transfektionseffizienz von ca. 20 % auf ca. 50 %. Eine kombinierte Impulsstrategie dagegen führte bereits bei 0,5 µg pEGFP-N1 zu einer Transfektionseffizienz von ca. 75 %. Ab 4 µg pEGFP-N1 wurde bei ca. 95 % EGFP-positiver Zellen ein Plateau erreicht (Abb. 14, links). Ein ähnliches Bild ergab sich für die Expressionshöhe des EGFP. Ein einzelner HV-Impuls lieferte eine vergleichsweise geringe EGFP-Expression der Zellen, die auch durch höhere DNA-Konzentrationen nicht wesentlich erhöht werden konnte. Anders dagegen bei der kombinierten Impulsstrategie. Hier führte eine Erhöhung der Menge der zu transfizierenden DNA zu einer ausgeprägten Steigerung der ohnehin schon sehr hohen Expression des EGFP. Ab 8 µg pEGFP-N1 wurde auch hier ein Plateau der EGFP-Expression ausgebildet (Abb. 14, rechts). Eine kombinierte Impulsstrategie lieferte in den durchgeführten Experimenten somit nicht nur generell höhere Transfektionseffizienzen und Expressionshöhen, sondern nutzt die eingesetzten DNA-Mengen effektiver aus.

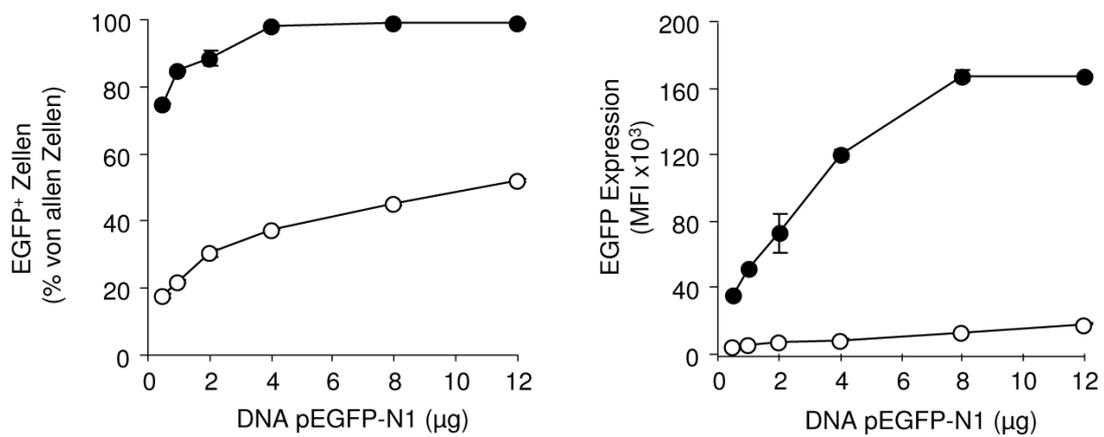


Abb. 14: Einfluss der Menge an zu transfizierender DNA auf Transfektionseffizienz und Expressionshöhe.

WT-Prädipozyten wurden in Gegenwart von 0,5-12 µg pEGFP-N1 mit einem HV-Impuls (3 kV/cm, 400 µs) (weiße Kreise) oder in Kombination mit einem unterbrechungsfrei folgendem LV-Impuls (1,5 kV/cm) (schwarze Kreise) transfiziert. Die Transfektionseffizienzen und die Expressionshöhe des EGFP wurden 24 h nach Transfektion durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von n=3.

3.1.6 Transfektionseffizienzen und Zellerhalt nach Transfektion von Suspensionszellen mit Plasmid-DNA

Neben den adhären wachsenden Präadipozyten wurde das ELPorator 1000-System auch für die Transfektion von Suspensionszellen getestet. Mit den Zelllinien J558L (murines Myelom), K562 (humane akute myelozytische Leukämie) und U937 (humane histiozytische Leukämie) wurden Zellen gewählt, die zum einen oft für die rekombinante Proteinexpression herangezogen werden, zum anderen der Erforschung maligner Transformation dienen. Alle Zellen ließen sich mit identischen Bedingungen sehr effektiv und zellerhaltend transfizieren (Abb. 15). Die Verwendung einer HV/LV-Impulskombination führte bei den untersuchten Suspensionszellen nur zu einer geringen Steigerung der Transfektionseffizienz aber zu einer sehr starken Expressionssteigerung des EGFP gegenüber einer Transfektion mit einem einzelnen HV-Impuls. Eine Sonderstellung nahm die Zelllinie U937 ein, bei der – zusätzlich zur Expressionssteigerung – auch die Transfektionseffizienz durch die Verwendung einer Impulskombination deutlich gesteigert werden konnte.

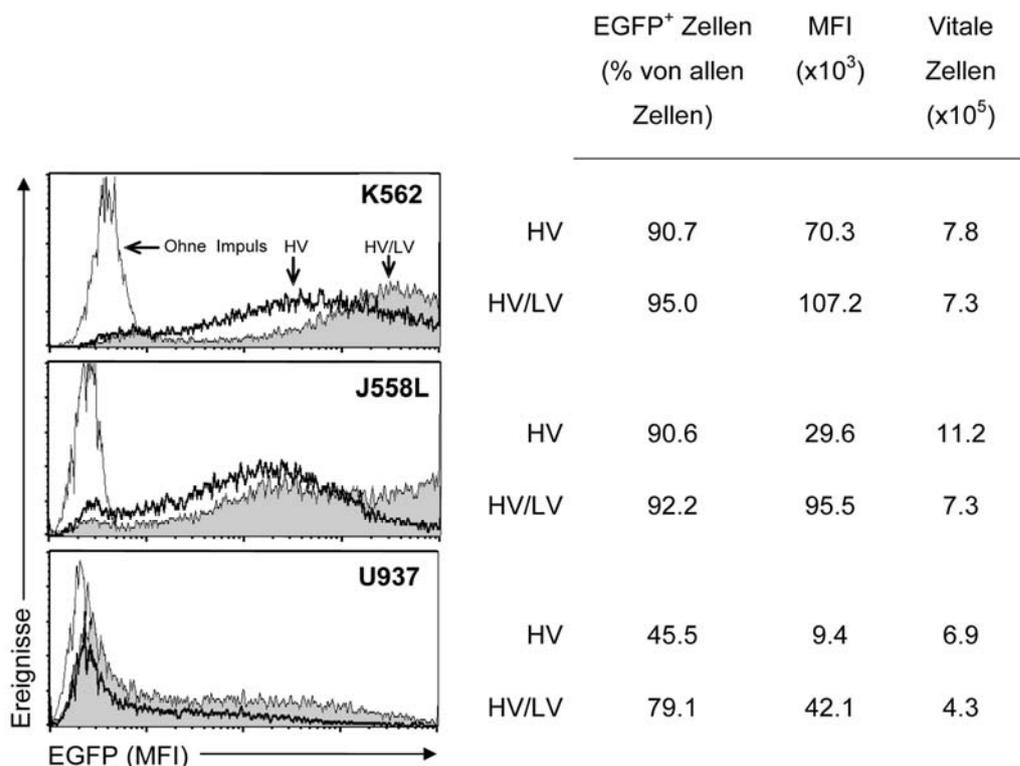


Abb. 15: Transfektion verschiedener Suspensionszelllinien unter Verwendung des ELPorator 1000-Systems.

Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in Gegenwart von $4 \mu\text{g}$ pEGFP-N1 mittels eines einzelnen HV-Impuls (3 kV/cm , $400 \mu\text{s}$) oder in Kombination mit einem LV-Impuls ($0,75 \text{ kV/cm}$, 10 ms) transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Bestimmung von Transfektionseffizienz und Expressionshöhe des EGFP durchflusszytometrisch. Die Bestimmung lebender Zellen erfolgte mittels Vitalfärbung mit Trypanblau.

3.1.7 Effizienz der Transfektion definierter Subpopulationen in Zellgemischen mit Plasmid-DNA

Die bisherigen Ergebnisse ergaben, dass sich viele unterschiedliche Zelltypen unter identischen Bedingungen transfizieren ließen, was zu der Frage nach der Transfizierbarkeit von Zellen in Zellgemischen führte. Aufgrund ihrer Zusammensetzung wurden für diese Experimente humane *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) herangezogen. Nach der Präparation wurden die PBMC in Gegenwart von 4 µg pEGFP-N1 transfiziert, nach 24 h mit subpopulationspezifischen Antikörpern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch charakterisiert. Zunächst wurden die prozentualen Verteilungen der Subpopulationen in untransfizierten und transfizierten PBMC bestimmt, um Aussagen über die Empfindlichkeit der einzelnen Subpopulationen gegenüber den verwendeten elektrischen Parametern zu erhalten (Abb. 16A). Der prozentuale Anteil CD4-positiver T-Zellen war nach Transfektion mittels eines HV - bzw. HV/LV-Impulses im Vergleich zu einer untransfizierten Kontrolle geringfügig erhöht, während der Anteil CD8-positiver Zellen durch die Transfektion unbeeinflusst geblieben ist. CD19-positive Zellen zeigten eine deutliche prozentuale Abnahme, was nahelegt, dass B-Zellen empfindlicher auf die verwendeten Transfektionsbedingungen reagieren als T-Zellen. CD14-positive Zellen erwiesen sich als sehr empfindlich. Ihr prozentualer Anteil nahm sowohl nach einem HV-Impuls, als auch nach einer HV/LV-Kombination stark ab. Die Transfektionseffizienzen für T- und B- Zellen betragen 70-75 %. Auch hier führte eine HV/LV-Impulskombination nur zu einer geringen Zunahme EGFP-positiver Zellen, aber zu einer signifikant höheren EGFP-Expression. Die Gesamtvitalität der PBMC wies sowohl nach einem HV-Impuls, als auch nach einer Impulskombination Werte von ca. 75 % auf (Abb. 16B).

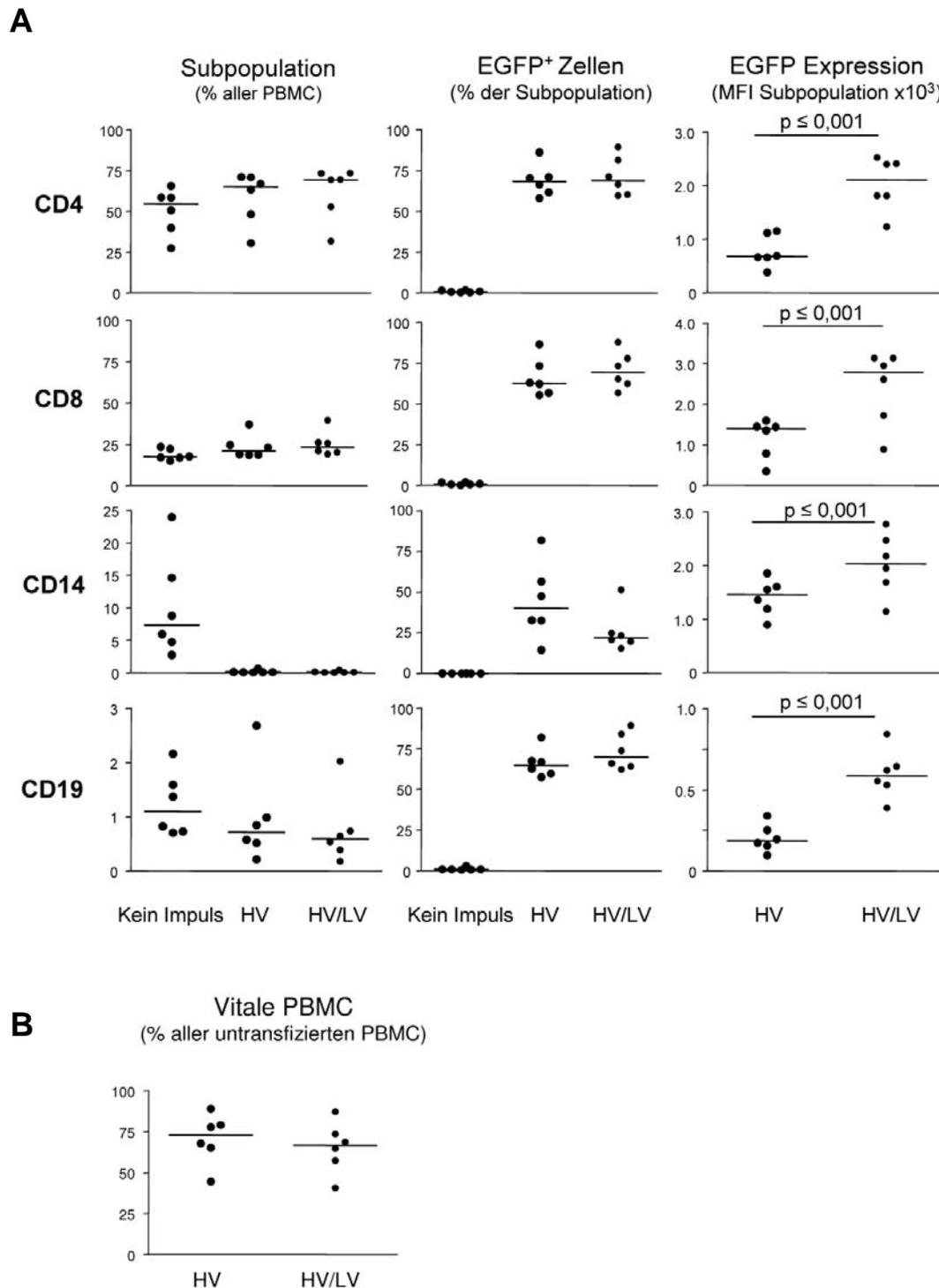


Abb. 16: Transfektion humaner PBMC unter Verwendung des ELPorator 1000-Systems und anschließender subpopulationsspezifischer Charakterisierung.

(A) Jeweils 3×10^6 PBMC wurden mit $4 \mu\text{g}$ pEGFP-N1 einem einzelnen HV-Impuls ($4,5 \text{ kV/cm}$, $400 \mu\text{s}$) oder mit einem HV-Impuls ($4,5 \text{ kV/cm}$, $100 \mu\text{s}$) in Kombination mit einem LV-Impuls ($0,75 \text{ kV/cm}$, 3 ms) transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung von Transfektionseffizienz und Expressionshöhe des EGFP. (B) Die Bestimmung lebender Zellen erfolgte mittels Färbung mit Propidiumiodid 24 h nach Transfektion. Dargestellt sind die Ergebnisse von $n=6$.

3.1.8 Auswirkung der Menge an eingesetzter siRNA auf die Dauer des Gen-*Knock-downs* nach Transfektion mit kombinierten *High Voltage*- und *Low Voltage*-Impulsen

Die Menge an eingeschleusten Makromolekülen zu maximieren ist besonders dann von großem Interesse, wenn es sich um Moleküle handelt, die sich in der Zelle nicht eigenständig vermehren können. Solche Makromoleküle stellen z.B. siRNAs dar, deren eingeschleuste Menge direkten Einfluss auf die Dauer des von ihnen vermittelten Gen-*Knock-downs* hat. Es wurde untersucht, ob durch die Verwendung einer kombinierten Impulsstrategie ein *Knock-down* der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)-Expression erreicht werden kann und ob dieser *Knock-down* länger anhält, als bei Verwendung eines einzelnen HV-Impulses. Zu diesem Zweck wurden primäre WT-Prädipozyten mit einer Cy3-markierten siRNA bzw. einer Kontroll-siRNA mittels eines HV-Impulses oder einer HV/LV-Impulskombination transfiziert. Die transfizierten Prädipozyten wurden nach 24, 48 und 72 h geerntet und die Kopienzahlen der GAPDH-mRNA mittels quantitativer Realtime PCR in Verbindung mit Plasmidstandards bestimmt (Abb. 17A). Es zeigte sich ein deutlich länger anhaltender Gen-*Knock-down* unter Verwendung einer HV/LV-Impulskombination. Selbst nach 72 h war der GAPDH-*Knock-down* bei diesen Ansätzen deutlich ausgeprägt, während er bei den Ansätzen, die mit einem einzelnen HV-Impuls transfiziert worden waren, annähernd den gleichen Wert aufwies, wie bei den Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert worden waren. Für einen Nachweis der Korrelation von aufgenommener Menge von siRNA und der Dauer des spezifischen *Knock-downs* wurden 5 h nach Transfektion ein Teil der Zellen durchflusszytometrisch auf ihren Cy3-Gehalt untersucht. Eine Transfektion mit einer HV/LV-Kombination führte zu einer deutlich höheren Aufnahme Cy3-markierter siRNA als nach Transfektion mit einem einzelnen HV-Impuls (Abb. 17B).

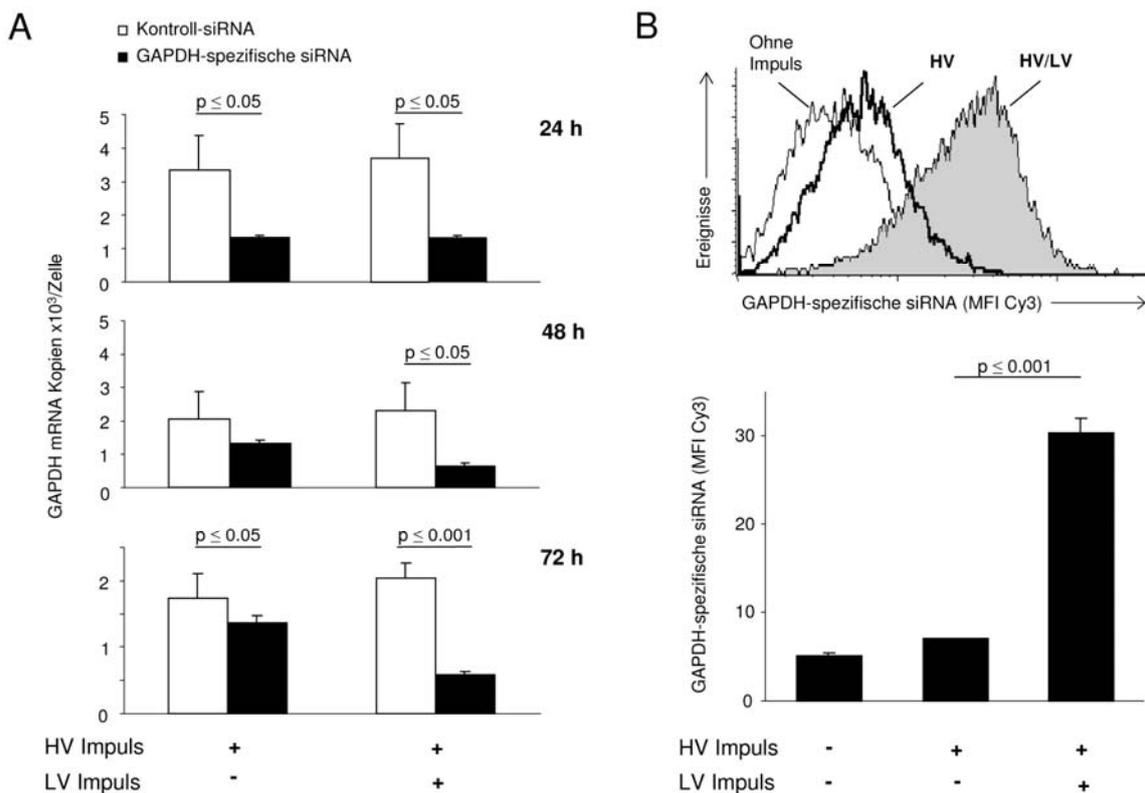


Abb. 17: Einfluss der Impulsstrategie auf die Menge an transfizierter siRNA und die Dauer des siRNA-vermittelten *Gen-Knock-downs*.

Primäre WT-Präadipozyten wurden in Gegenwart von 120 pmol Cy3-markierter GAPDH-spezifischer siRNA oder einer Kontroll-siRNA mittels eines einzelnen HV-Impulses (3 kV/cm, 400 μ s) oder einer HV/LV-Impulskombination (3 kV/cm, 400 μ s und 1,5 kV/cm, 5 ms) transfiziert. (A) Nach 24, 48 und 72 h wurde die Kopienanzahl der GAPDH-spezifischen mRNA mittels quantitativer PCR anhand eines Plasmidstandards bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von n=6. (B) 5 h nach Transfektion ließ sich die Aufnahme der Cy3-markierten GAPDH-spezifischen siRNA durch die Präadipozyten durchflusszytometrisch nachweisen. Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm (oben) und die MFI der transfizierten Zellen (unten). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von n=4.

3.1.9 Funktionale Auswirkungen transfizierter siRNA

Für die Beantwortung der Frage nach der Funktionalität der transfizierten Zellen, wurden WT-Prädipozyten mit 120 pmol einer *Toll-like*-Rezeptor (TLR)4-spezifischen siRNA bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 1 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS) oder aber 200 nM Laktyl-tetra-Diaminopimelinsäure (LT-DAP) stimuliert. Nach weiteren 24 h wurde in den Kulturüberständen die Konzentration von IL-6 mittels eines *Cytometric Bead Array* (CBA) nach Herstellerangaben bestimmt. Ansätze, die mit der TLR4-spezifischen siRNA transfiziert worden waren zeigten eine signifikant geringere IL-6-Produktion nach Stimulation mit LPS als Ansätze, die mit einer Kontroll-siRNA bzw. gar nicht transfiziert worden waren (Abb. 18). Stimulation mit dem NOD1-Liganden LT-DAP führte dagegen bei allen Ansätzen zu einer unverminderten IL-6-Produktion. Eine Transfektion von siRNA mittels einer HV/LV-Impulskombination führte somit zu einem ausgeprägteren und lang anhaltenden Gen-*Knock-down*, wobei die Funktionalität der transfizierten Zellen erhalten blieb.

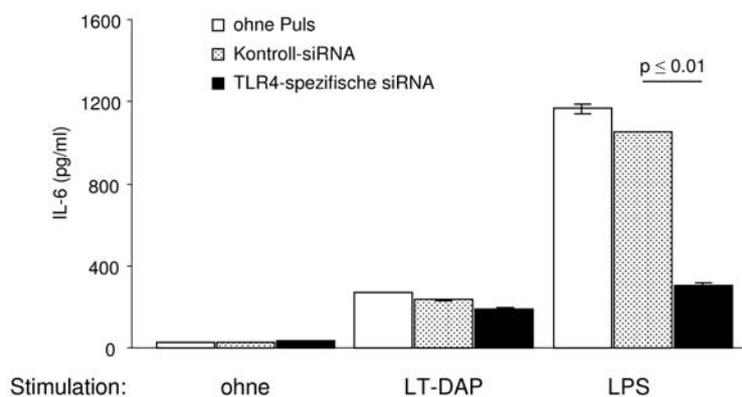


Abb. 18: Funktionalität mit siRNA transfizierter primärer muriner Prädipozyten.

Für den Nachweis der Funktionalität der mittels einer HV/LV-Impulskombination transfizierten WT-Prädipozyten wurden diese 24 h nach Transfektion mit 120 pmol TLR4-spezifischer siRNA zum einen mit dem TLR4-spezifischen Liganden LPS, zum anderen mit LT-DAP, dem spezifischen Liganden für NOD1, stimuliert und nach weiteren 24 h die Konzentration von IL-6 in den Kulturüberständen mittels CBA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von n=3.

Mit kombinierten Rechteckimpulsen des Transfektionssystem ELPorator 1000 ließen sich sowohl verschiedene Zelllinien, als auch primäre Zellen sehr effizient mit Plasmid-DNA bzw. siRNAs transfizieren. In einem direkten Vergleich war die Transfektionseffizienz dieses Systems höher als nach Transfektion mittels Nucleofection bei einer vergleichbaren Vitalität der transfizierten Zellen, was das System insbesondere für *Knock-down*-Experimente, bei die denen Menge an eingeschleuster Nukleinsäure über die Dauer des erzielten *Knock-downs* entscheidet, als sehr effektiv herausstellte.

3.2 Etablierung einer *Nucleotide-binding Oligomerization Domain* (NOD)1 und 2- spezifischen quantitativer *Real-Time*-PCR

3.2.1 Validierung von Plasmidstandards für NOD1 und NOD2

Für die Etablierung einer quantitativen *Real-Time*-PCR für NOD1 und NOD2 wurde die Sensitivität und Linearität des spezifischen Nachweises anhand definierter Kopienzahl des linearisierten Plasmidstandards für NOD1 und NOD2 ermittelt. Eine Titration von 10^1 bis 10^8 Plasmid-Molekülen je Ansatz zeigte für beide Moleküle den logarithmischen Zusammenhang zwischen Ct-Wert und eingesetzter Kopienzahl (Abb. 19 und 20). Beide Tests besaßen eine Sensitivität, die sie für den Nachweis von bis zu 10 Kopien des betreffenden Standardplasmids je Ansatz geeignet machten. Die aus den Steigungen der Standardkurven errechneten Effizienzen der PCR betrug 100,1 bzw. 102,3 %.

NOD1

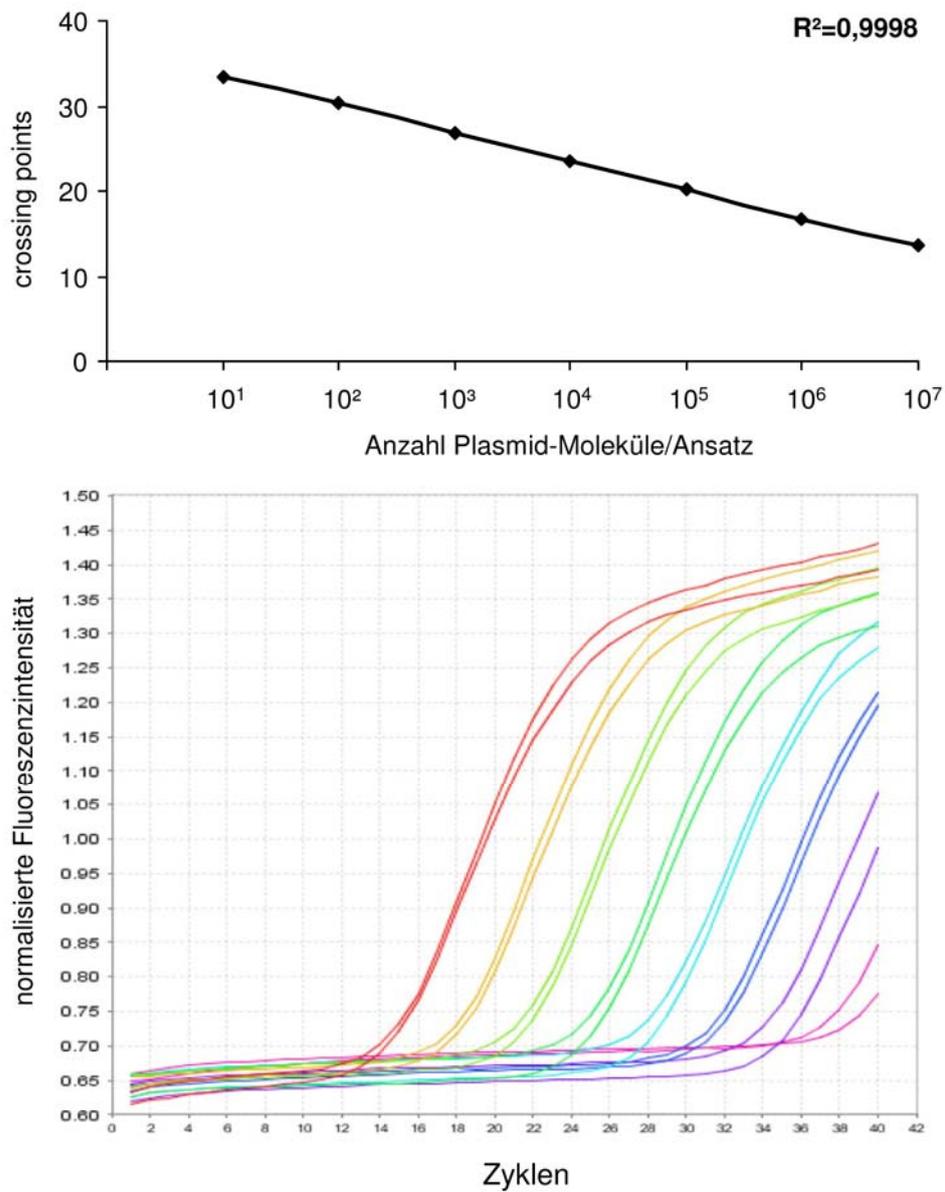


Abb. 19: Standardkurve und Amplifikationsplot einer quantitativen Real-Time-PCR mit einem NOD1-Plasmidstandard als Probe.

Dargestellt sind die Ct-Werte der eingesetzten Anzahl an linearisierten Plasmid-Molekülen des NOD1-Plasmidstandards. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) ist angegeben. Der Amplifikationsplot stellt die Zunahme der auf eine interne Referenz normalisierten Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Anzahl der PCR-Zyklen dar.

NOD2

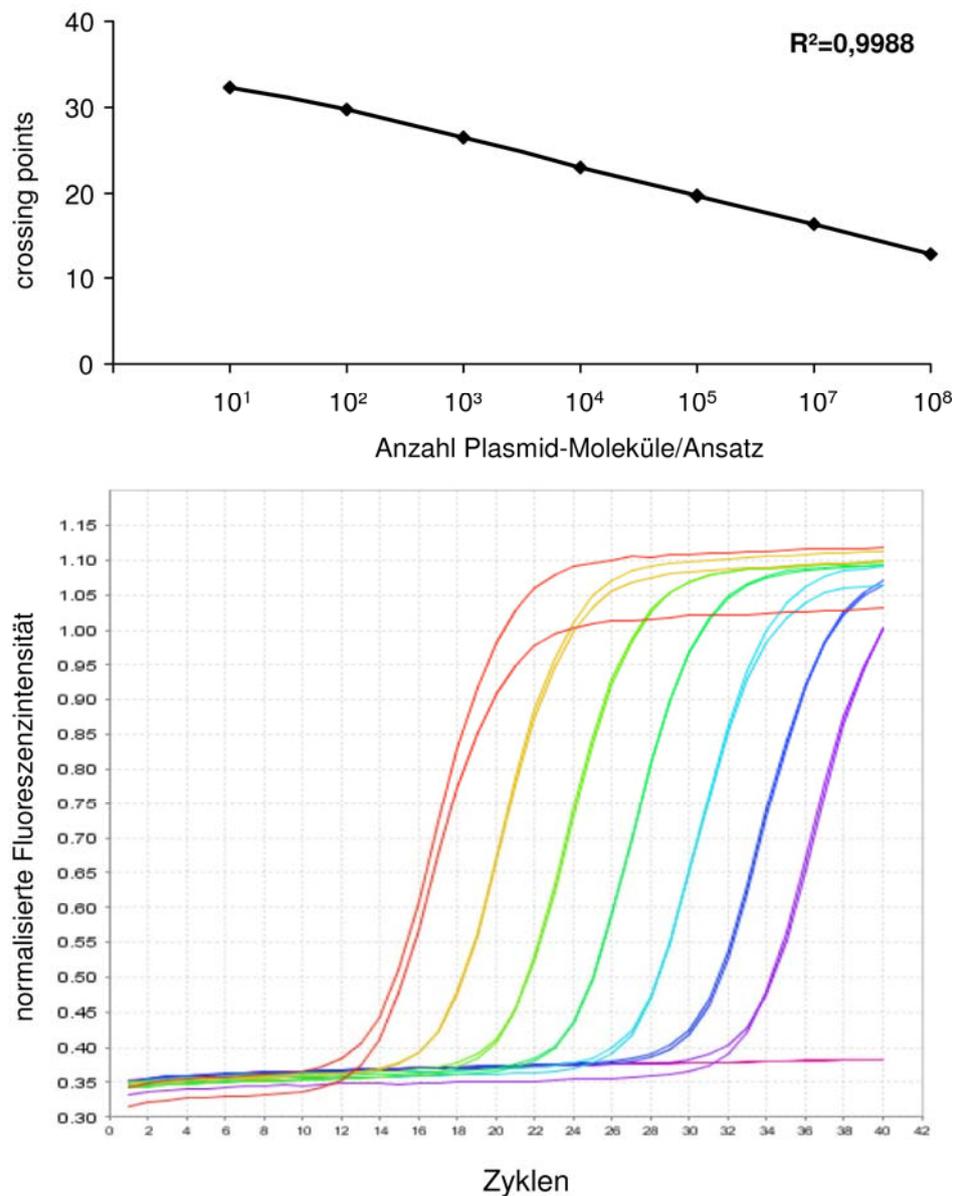


Abb. 20: Standardkurve und Amplifikationsplot einer quantitativen Real-Time-PCR mit einem NOD2-Plasmidstandard als Probe.

Dargestellt sind die Ct-Werte der eingesetzten Anzahl an linearisierten Plasmid-Molekülen des NOD2-Plasmidstandards. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) ist angegeben. Der Amplifikationsplot stellt die Zunahme der auf eine interne Referenz normalisierten Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Anzahl der PCR-Zyklen dar.

3.2.2 Linearer Zusammenhang zwischen Zellzahl und daraus isolierter Gesamt-RNA-Menge und Ausschluss von Verunreinigungen mit genomischer DNA

Eine exakte absolute Quantifizierung, die als Ergebnis die Anzahl Moleküle je Zelle lieferte, setzte eine reproduzierbare und quantitative Präparation der RNA aus den zu analysierenden Zellen voraus. Experimentelle Voraussetzung war somit die Korrelation zwischen Zellzahl und daraus gewonnener Menge an Gesamt-RNA. Im Bereich von $0,75$ bis 6×10^5 3T3L1-Prädipozyten bestand ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl präparierter Zellen und der daraus gewonnenen Menge Gesamt-RNA (Abb. 21).

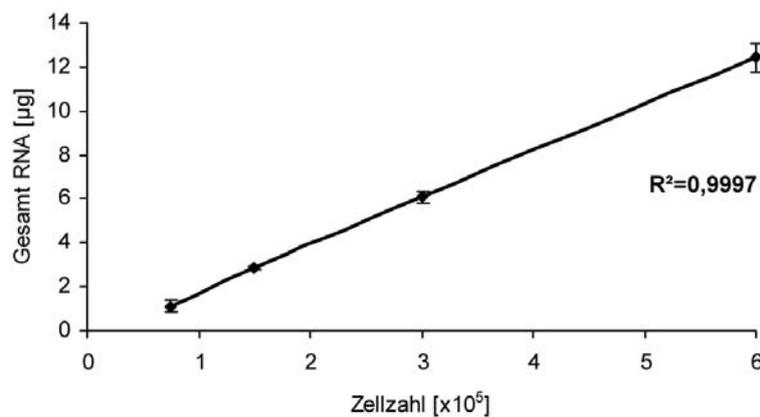


Abb. 21: Korrelation von Zellzahl und daraus präparierter Menge an Gesamt-RNA.

Aus $0,75$ bis 6×10^5 3T3L1-Prädipozyten wurde die Gesamt-RNA präpariert und spektrophotometrisch die Konzentration bestimmt. Der Wert für das Bestimmtheitsmaß (R^2) ist angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n=3$.

Verunreinigungen der zu untersuchenden Probe mit genomischer DNA während der RNA-Präparation verfälschen das Ergebnis einer Quantifizierung. In RNA-Präparationen, die zur Kontrolle auf Verunreinigungen mit genomischer DNA in Abwesenheit von dNTPs mit reverser Transkriptase inkubiert worden waren, kam es zu keinerlei Amplifikation. Kontrollproben mit korrekt umgeschriebener cDNA zeigten dagegen eine deutliche Amplifikation der überexprimierten NOD2-mRNA (Abb. 22).

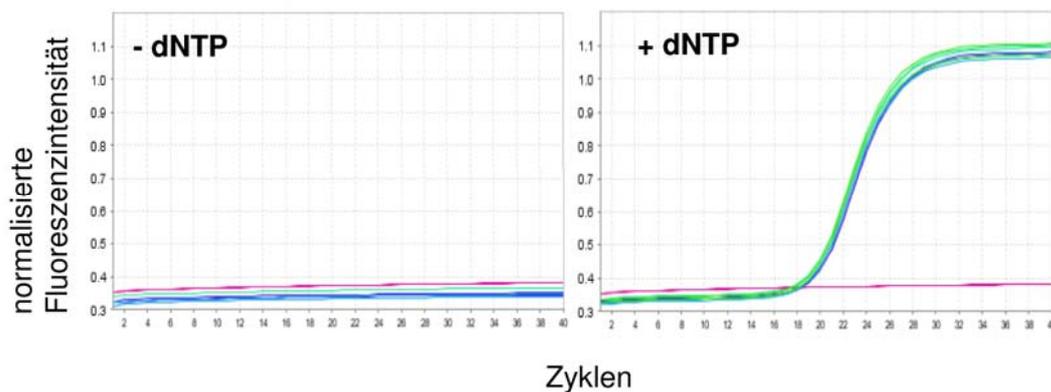


Abb. 22: Ausschluss von Verunreinigungen der generierten cDNA mit genomischer DNA.

Für einen Test der verwendeten RNA-Aufreinigungsmethode auf Verunreinigungen mit genomischer DNA, wurde RNA von NOD2-überexprimierenden J558L-Zellen präpariert und in Abwesenheit von dNTPs in cDNA umgeschrieben und anschließend eine quantitative *Real-Time*-PCR durchgeführt. Dargestellt ist der Amplifikationsplot, welcher die Zunahme der auf eine interne Referenz normalisierten Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Anzahl der PCR-Zyklen darstellt.

3.2.3 Basale Expression von NOD1 und NOD2 in murinen Präadipozyten

Im Vorfeld zu funktionalen Experimenten mit NOD1 und NOD2 in murinen Präadipozyten wurde die Frage nach der basalen Expression von NOD1 und NOD2 in diesen Zellen beantwortet. So wurden aus definierten Zellzahlen von primären WT-, TLR2/4^{-/-}- sowie 3T3L1-Präadipozyten RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Primäre WT-Präadipozyten und aus Vorläuferzellen generierte Makrophagen exprimierten mit ca. vier bzw. zwei Molekülen je Zelle vergleichbare Mengen an NOD1-mRNA. Mit etwa 14 Kopien je Zelle exprimierten TLR2/4^{-/-}-Präadipozyten von allen untersuchten Zelltypen am meisten NOD1-spezifische mRNA. Eine Expression von NOD1 konnte in 3T3L1-Präadipozyten nicht nachgewiesen werden (Abb. 23A). Die Expression von NOD2 war deutlich schwächer ausgeprägt als die von NOD1. Statistisch betrachtet exprimierten nur 20 % der WT- und 50 % der TLR2/4^{-/-}-Präadipozyten ein Molekül NOD2-mRNA. Eine NOD2-mRNA Expression durch 3T3L1-Präadipozyten bewegte sich nahe am Detektionslimit, konnte durch eine konventionelle PCR jedoch bestätigt werden (Abb. 23B). Deutlich mehr NOD2-mRNA exprimierten dagegen die untersuchten Makrophagen. Für diese konnte eine Expressionshöhe von ca. drei Molekülen spezifischer NOD2-mRNA je Zelle ermittelt werden.

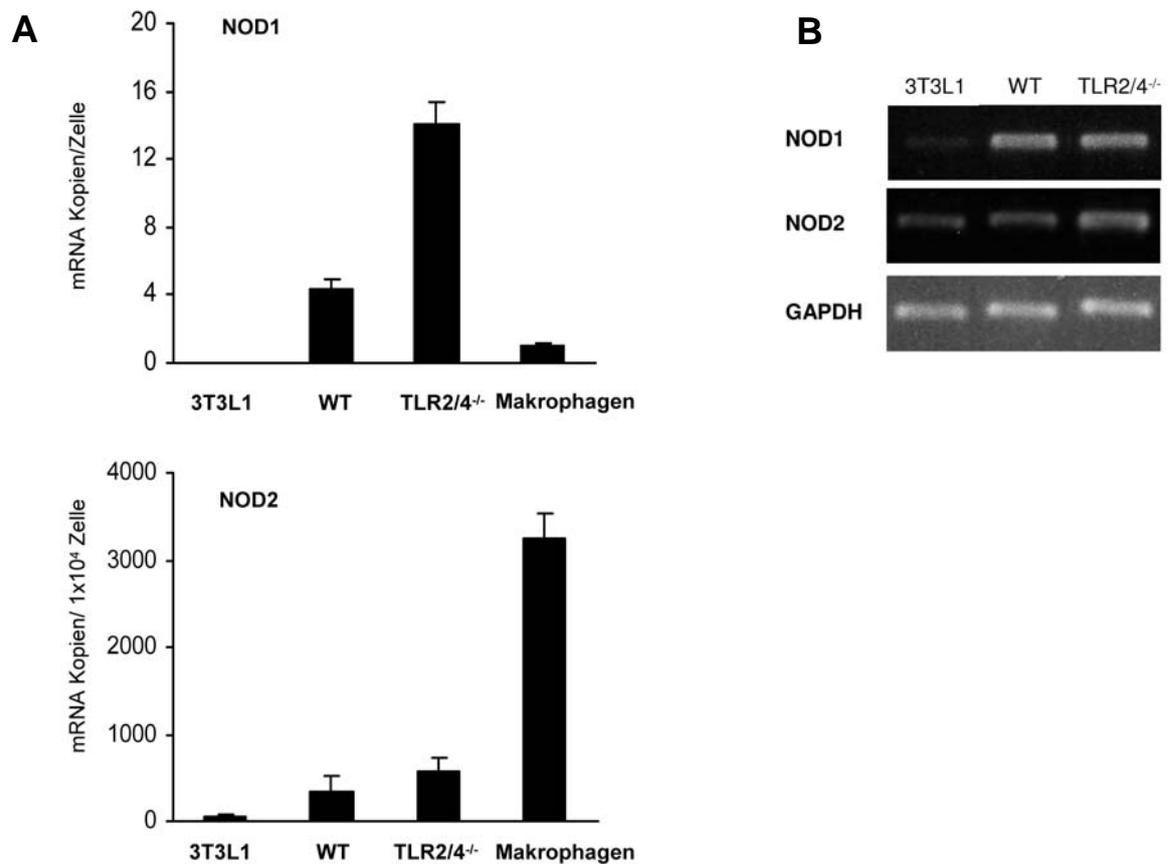


Abb. 23: Basale Expression von NOD1 und NOD2 in murinen Präadipozyten.

(A) Die mRNA definierter Zellzahlen muriner Präadipozyten wurde in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer *Real-Time-PCR* anhand von Plasmidstandards die Anzahl NOD1- und NOD2-spezifischer cDNA-Moleküle in den Proben ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n=4$. (B) Zeigt eine konventionelle PCR dieser Proben mit GAPDH als Referenzgen.

Für den Nachweis von NOD1 und NOD2 auf Proteinebene wurden von WT-, TLR2/4^{-/-}- und 3T3L1-Prädipozyten Gesamtlysate hergestellt und die Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer apparenten Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Die auf einer Membran immobilisierten Proteine wurden mit Hilfe NOD1- bzw. NOD2-spezifischer polyklonaler Antikörper nachgewiesen. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis von β -Aktin. In allen untersuchten Zellspezies ließen sich sowohl NOD1 als auch NOD2 deutlich darstellen (Abb. 24). Die bereits auf Transkriptebene gezeigte höhere Expression von NOD1 durch TLR2/4^{-/-}-Prädipozyten spiegelte sich dabei auch auf der Proteinebene wider. Abweichend von den Daten der mRNA-Expression ließ sich sowohl NOD1, als auch NOD2 auf Proteinebene in der Prädipozytenzelllinie 3T3L1 nachweisen.

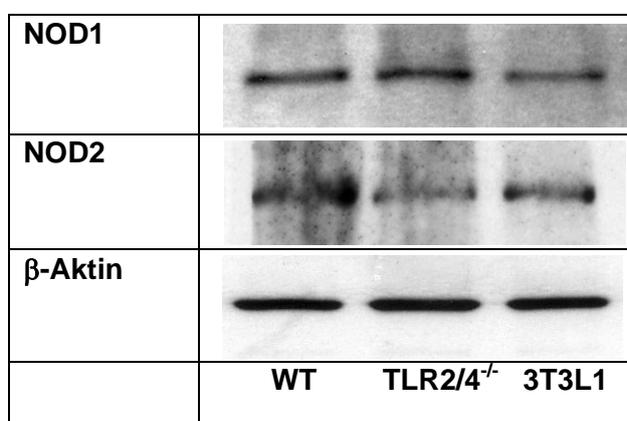


Abb. 24: Western Blot zum Nachweis der NOD1 und NOD2 Protein-Expression in murinen Prädipozyten.

Immunochemische Detektion von NOD1 und NOD2 in Gesamtlysaten von WT, TLR2/4^{-/-} und 3T3L1 Prädipozyten mittels spezifischer Antikörper.

Zusammenfassend kann für die Ergebnisse der Studien zur Expression von NOD1 und NOD2 in murinen Prädipozyten festgehalten werden, dass die basale Expression von NOD1 auf Transkriptebene in primären Prädipozyten stärker ausgeprägt war als in der Prädipozytenzelllinie 3T3L1. Primäre Prädipozyten wiesen mehr NOD1-spezifische mRNA auf als die untersuchten Makrophagen. Für NOD2 wurde eine deutlich schwächere basale Expression in primären Prädipozyten gefunden als für NOD1. In Makrophagen konnte dagegen eine deutlich höhere Expression von NOD2-spezifischer mRNA als in Prädipozyten detektiert werden. Auf Proteinebene konnte in allen untersuchten Prädipozyten eine Expression sowohl von NOD1 als auch von NOD2 gezeigt werden.

3.3 Modulation der Expression von NOD1 und NOD2 durch NOD-Liganden und proinflammatorische Stimuli in murinen Präadipozyten

3.3.1 Expression von NOD1-mRNA

Für eine weitere Charakterisierung der Expression von NOD1 und NOD2 durch primäre murine Präadipozyten wurde die Modulation der Expression zum einen durch NOD1- und NOD2-spezifische Liganden untersucht. Zum anderen wurde mithilfe von Zytokinen ein proinflammatorisches Milieu nachgeahmt und die Auswirkungen eines solchen Milieus auf die Expression von NOD1 und NOD2 auf Transkriptebene analysiert.

Weder die Anwesenheit von den untersuchten proinflammatorischen Zytokinen, noch eine Inkubation mit spezifischen Liganden für NOD1 und NOD2 führte zu einer signifikanten Änderung im Expressionsniveau von NOD1 auf Transkriptebene (Tabelle 3).

Tabelle 3: Relative Expressionshöhen von NOD1 in primären WT-Präadipozyten nach spezifischer und proinflammatorischer Stimulation.

Primäre WT-Präadipozyten wurden für die angegebenen Zeiten zum einen mit den NOD1-bzw. NOD2-spezifischen Liganden LT-DAP (200 nM) und MDP (10 µg/ml), zum anderen mit LPS (1 µg/ml) und den proinflammatorischen Zytokinen IL-1β (100 ng/ml) und TNF-α (100 ng/ml) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer *Real-Time*-PCR die NOD1-Expression relativ zu unstimulierten Kontrollen quantifiziert. Für eine Normalisierung der Proben diente die Expressionshöhe der GAPDH. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n=3.

Zeit (h)	Stimulation:				
	LPS	LT-DAP	MDP	IL-1β	TNF-α
1	1,05 ± 0,08	1,12 ± 0,08	1,18 ± 0,07	1,29 ± 0,09	1,23 ± 0,1
4	1,47 ± 0,15	1,15 ± 0,09	1,11 ± 0,09	1,44 ± 0,11	1,32 ± 0,08
8	1,72 ± 0,1	0,87 ± 0,05	1,12 ± 0,06	1,53 ± 0,15	1,02 ± 0,33

3.3.2 Expression von NOD2-mRNA

Eine proinflammatorische Stimulation mit TNF- α für 4 h führte sowohl in primären WT-Prädipozyten, als auch in der Prädipozytenzelllinie 3T3L1 zu einer signifikanten Expressionssteigerung von NOD2 auf Transkriptebene im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (Abb. 25). Die Steigerung fiel bei primären WT-Prädipozyten mit einer Erhöhung um das 18-fache dabei stärker aus als bei 3T3L1-Prädipozyten, bei denen eine Steigerung um das 10-fache gemessen wurde. Eine Stimulation mit IL-1 β führte zu einer 28-fachen Expressionssteigerung der NOD2-mRNA in WT-Prädipozyten, während eine vergleichbare Behandlung bei 3T3L1-Prädipozyten keine signifikante Zunahme an NOD2-spezifischer mRNA bewirkte. Eine Stimulation mit dem NOD1-Liganden LT-DAP führte nur bei WT-Prädipozyten zu einer 5-fachen Expressionssteigerung, während eine Inkubation mit dem NOD2-spezifischen Liganden MDP keine signifikante Änderung, weder in WT- noch in 3T3L1-Prädipozyten, der Expression von NOD2 auf Transkriptebene bewirkte. Die größte Expressionssteigerung war in WT-Prädipozyten nach 4 h Inkubation mit LPS mit einem Anstieg um das 40-fache messbar. Die Ergebnisse zeigten ferner, dass die gemessenen Änderungen in der Expression der NOD2-mRNA transiente Ereignisse darstellten. Bereits nach 8 h Inkubation war bei allen Ansätzen das ursprüngliche Expressionsniveau wieder annähernd erreicht.

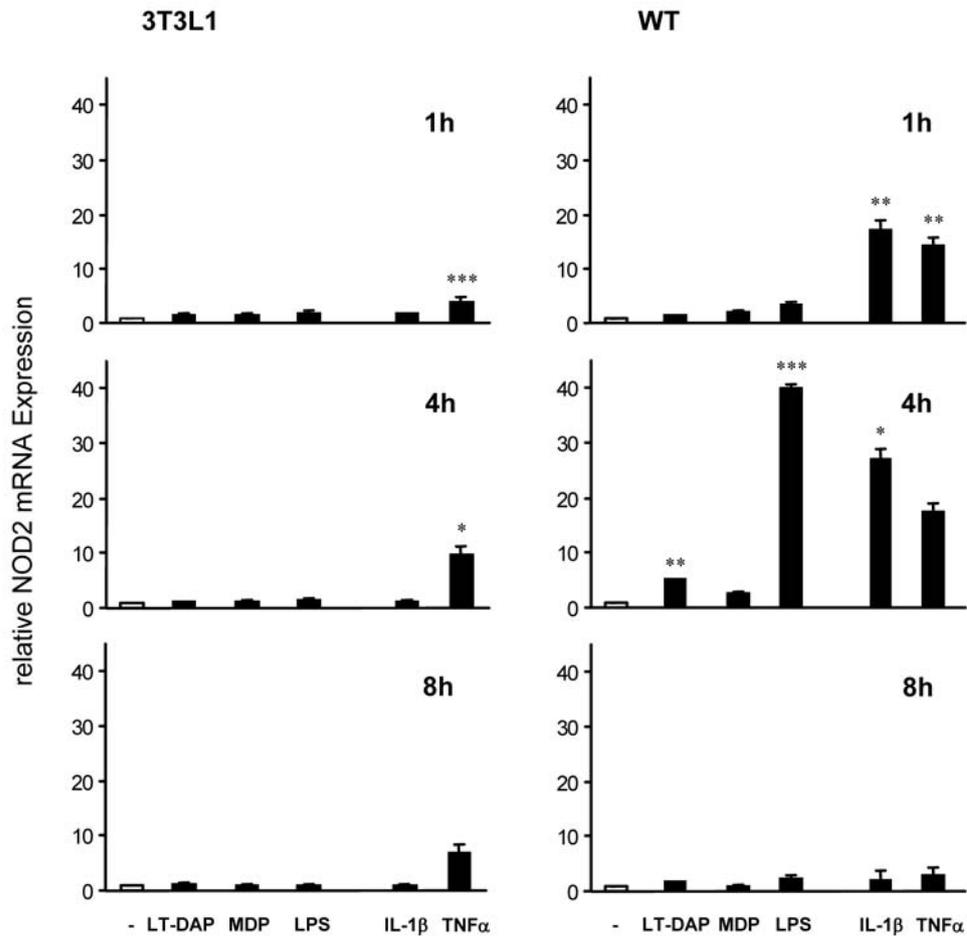


Abb. 25: Relative Expressionshöhen von NOD2 in murinen Präadipozyten nach spezifischer und proinflammatorischer Stimulation.

WT- und 3T3L1-Präadipozyten wurden für 1 h, 4 h und 8 h zum einen mit den NOD-spezifischen Liganden LT-DAP (200 nM) und MDP (10 µg/ml), zum anderen mit LPS (1 µg/ml) oder den proinflammatorischen Zytokinen IL-1β (100 ng/ml) und TNF-α (100 ng/ml) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die NOD2-mRNA wurde mittels quantitativer *Real-Time-PCR* quantifiziert und die Expression ins Verhältnis zu der Expression in unstimulierten Kontrollen gesetzt. Zur Normalisierung aller Proben diente die Expression der GAPDH. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n=4; *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001.

3.3.3 Zytokinantwort muriner Präadipozyten auf spezifische Liganden für NOD1 und NOD2

Die Funktionalität von NOD1 und NOD2 in murinen Präadipozyten wurde durch Stimulationsexperimente mit Hilfe spezifischer Liganden und der Bestimmung der IL-6-Produktion im Kulturüberstand mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) charakterisiert. Um eine mögliche Verunreinigung der NOD-Liganden mit LPS sicher ausschließen zu können, wurden ebenfalls TLR2/4^{-/-}-Präadipozyten für dieses Experiment herangezogen.

Eine NOD1-spezifische Stimulation führte sowohl in primären WT, als auch in TLR2/4^{-/-}-Präadipozyten zu einer vergleichbaren IL-6-Produktion, was für eine Funktionalität von NOD1 in Präadipozyten und gegen eine Verunreinigung des NOD1-Liganden mit LPS sprach (Abb. 26). Eine Stimulation mit dem NOD2-Liganden MDP induzierte dagegen in keiner der untersuchten Präadipozyten eine signifikante Produktion von IL-6. Mit einer sehr ausgeprägten IL-6-Produktion reagierten WT-Präadipozyten auf eine Stimulation mit LPS, während die Präadipozytenzelllinie 3T3L1 eine schwächere aber dennoch signifikante IL-6-Antwort zeigte. Erwartungsgemäß führte eine Inkubation TLR2/4^{-/-}-Präadipozyten mit LPS zu keiner messbaren IL-6-Konzentration im Kulturüberstand.

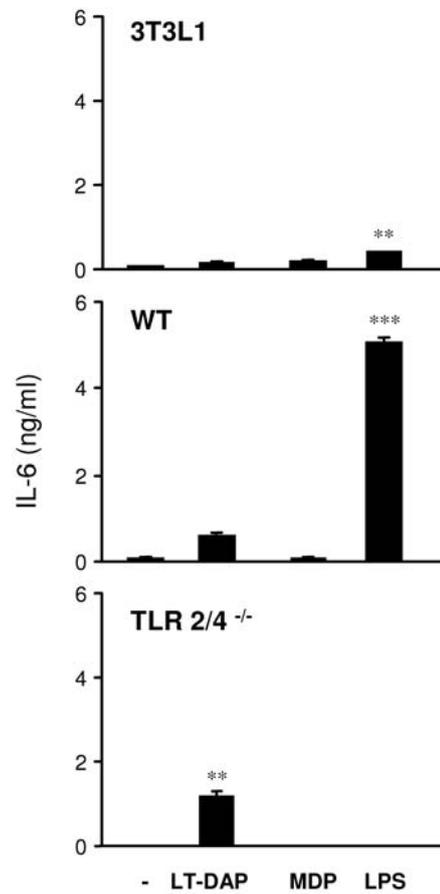


Abb. 26: Induktion von IL-6 nach NOD-spezifischer Stimulation muriner Präadipozyten.

Für den funktionellen Nachweis von NOD1 und NOD2 in murinen Präadipozyten wurden diese mit dem NOD1-Liganden LT-DAP (200 nM), dem NOD2-Liganden MDP (10 mg/ml) oder LPS (1 µg/ml) stimuliert. Nach Stimulation (48 h) wurde die IL-6-Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n=4; **p≤0,01; ***p≤0,001.

Die Ergebnisse der Expressions-Analysen zeigten auf, dass sich die Expression von NOD1 in primären Präadipozyten im Gegensatz zu der Expression von NOD2 weder durch Inkubation mit dem spezifischen Liganden LT-DAP noch durch Inkubation mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF- α zeitabhängig modulieren (Tabelle 3 und Abb. 25) ließ. Auf funktionaler Ebene führte eine Inkubation mit dem NOD1-spezifischen Liganden LT-DAP zu einer IL-6-Produktion durch primäre Präadipozyten, während eine Inkubation mit dem NOD2-spezifischen Liganden MDP zu keiner Produktion von IL-6 durch primäre Präadipozyten führte (Abb. 26).

3.4 Spezifität des NOD1-Liganden Laktyl-tetra-Diaminopimelinsäure und dadurch ausgelöster Signaltransduktionsweg in murinen Präadipozyten

3.4.1 Effektivität des NOD1-Knock-downs in murinen Präadipozyten mittels spezifischer siRNA

Die Experimente zum Nachweis der Spezifität des NOD1-Liganden LT-DAP erforderten einen spezifischen NOD1-Knock-down in Präadipozyten. Durch Transfektion von primären WT-Präadipozyten mit einer NOD1-spezifischen siRNA konnte eine Verminderung NOD1-spezifischer mRNA erreicht werden. Die stärkste Abnahme der NOD1-mRNA auf bis zu 31,6 % der Ausgangshöhe ließ sich mit der höchsten der eingesetzten Konzentrationen der NOD1-spezifischen siRNA von 800 nM erreichen. Konzentrationen von 400 und 600 nM führten im Vergleich mit 41,9 % bzw. 33,9 % zu einer geringeren Abnahme der relativen Anzahl von NOD1-spezifischer mRNA. Nach Transfektion (48h) zeigten die Ansätze, die in Gegenwart von 600 bzw. 800 nM siRNA transfiziert worden waren mit 50,4 bzw. 50,5 % vergleichbare Werte der messbaren NOD1-mRNA-Expression und lagen damit nur ca. 5 % unter den Ansätzen, die mit 400 nM siRNA transfiziert worden waren (Tabelle 4).

Tabelle 4: Erreichter NOD1-Knock-down mittels spezifischer siRNA in WT-Prädipozyten.

Primäre WT-Prädipozyten wurden in Gegenwart definierter Mengen NOD1-spezifischer siRNA mittels eines einzelnen HV-Impulses von 600 V und 400 μ s Länge transfiziert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer *Real-Time*-PCR unter Verwendung der Δ Ct-Methode analysiert. Als Referenz diente die Expressionshöhe der GAPDH. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD von n=3.

siRNA (nM)	NOD1-mRNA (% der Kontroll-siRNA) nach:	
	24 h	48 h
400	41,9 \pm 1,9	55,5 \pm 9,2
600	33,9 \pm 1,7	50,4 \pm 1,0
800	31,6 \pm 2,4	50,5 \pm 4,5

3.4.2 NOD1-Spezifität von Laktyl-tetra-Diaminopimelinsäure bei Prädipozyten

Im Anschluss an den Nachweis eines spezifischen NOD1-Knock-downs mittels NOD1-spezifischer siRNA konnte die NOD1-Spezifität des NOD1-Liganden LT-DAP in murinen Prädipozyten untersucht werden.

Nach Transfektion (24h) von primären WT-Prädipozyten in Gegenwart von 800 nM der NOD1-spezifischen siRNA bzw. einer Kontroll-siRNA, wurden diese mit LT-DAP bzw. dem TLR4-Liganden LPS stimuliert (Abb. 27). Die mit einer NOD1-spezifischen siRNA transfizierten Prädipozyten wiesen mit einer im Kulturüberstand gemessenen IL-6-Konzentration von 137 \pm 0,5 pg/ml ($p=0,005$) eine signifikant geringere IL-6-Konzentration auf als Prädipozyten, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert worden waren und bei denen 317 pg/ml IL-6 im Kulturüberstand gemessen werden konnten. Die Behandlung mit den zwei unterschiedlichen siRNAs hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die IL-6-Konzentrationen in Reaktion auf eine Inkubation mit LPS und belegte damit die Spezifität der verwendeten siRNAs.

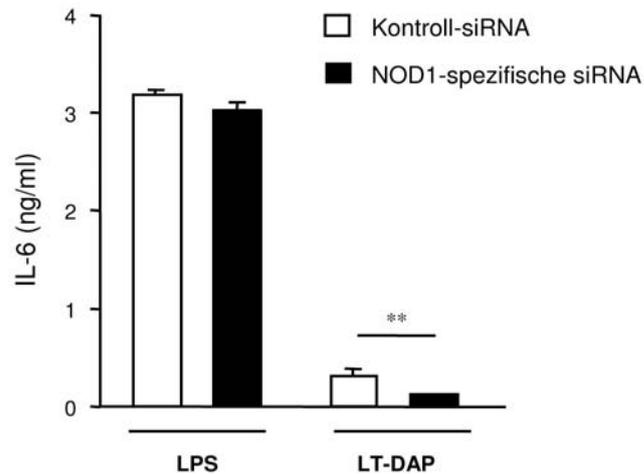


Abb. 27: NOD1-Spezifität des Liganden Laktyl-tetra-Diaminopimelinsäure.

Primäre WT-Prädipozyten wurden in Gegenwart von 800 nM NOD1-spezifischer bzw. Kontroll-siRNA transfiziert und nach 24h mit LT-DAP (200 nM) bzw. LPS (1 µg/ml) stimuliert. Nach 24 h erfolgte die Konzentrationsbestimmung von IL-6 im Kulturüberstand. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n=4; **p≤0,01.

3.4.3 Beteiligung von Hitzeschockprotein 90 an der NOD1-vermittelten IL-6-Produktion durch Prädipozyten

Das Hitzeschockprotein (HSP)90 ist als Chaperon u.a. an der Faltung von Proteinen im Nukleären Faktor (NF)-κB-Signaltransduktionsweg und damit indirekt an der Induktion von Ziel-Genen von NF-κB beteiligt. Für die Aufklärung der Ursache der NOD1-vermittelten Produktion von IL-6 wurden WT-Prädipozyten in Gegenwart des HSP90-Inhibitors 17-(Dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) mit dem NOD1-spezifischen Liganden LT-DAP stimuliert und 24 h später die Kulturüberstände mittels ELISA auf ihre IL-6-Konzentration analysiert. Als Positivkontrolle diente eine Stimulation mit LPS (Abb. 28).

Bei einer Stimulation von WT-Prädipozyten mit LT-DAP bewirkte die Gegenwart von 17-DMAG eine signifikante Abnahme der in Abwesenheit von 17-DMAG bei mit LT-DAP stimulierten Prädipozyten gemessenen IL-6-Konzentration von 305 pg/ml auf 23 pg/ml. Bei den mit LPS inkubierten Prädipozyten führte die Gegenwart von 17-DMAG zu einer gemessenen Konzentration an IL-6 von 416 pg/ml, während in Abwesenheit von 17-DMAG eine Konzentration von 2 822 pg/ml gemessen werden konnte.

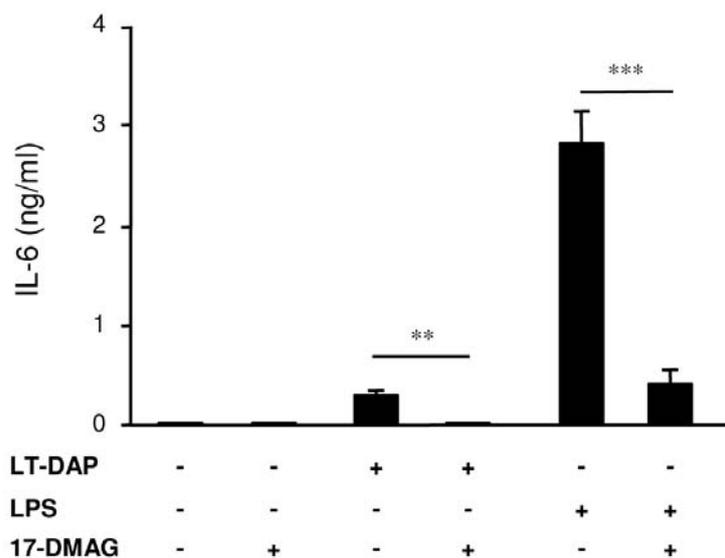


Abb. 28: HSP90-abhängige IL-6-Produktion nach NOD1-spezifischer Stimulation.

WT-Präadipozyten wurden in Gegenwart des HSP90-Inhibitors 17-DMAG (40 μ M) mit dem NOD1-Liganden LT-DAP (200 nM) bzw. LPS (1 μ g/ml) stimuliert. Nach 24 h erfolgte die Konzentrationsbestimmung von IL-6 im Kulturüberstand mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von n=4; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001.

3.4.4 Aktivierung des Nukleären Faktor- κ B-Signaltransduktionsweges in Präadipozyten durch NOD1-spezifische Stimulation

Die Ergebnisse der HSP90-abhängigen IL-6-Produktion nach spezifischer Stimulation von NOD1 gaben Hinweise auf eine Beteiligung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges. Für den Nachweis einer NF- κ B-Aktivierung nach NOD1-spezifischer Stimulation wurden WT- und 3T3L1-Präadipozyten mit einem NF- κ B-Reporterplasmid transfiziert, das im Falle einer NF- κ B-Aktivierung zur Expression des Enzyms Luciferase führte. Nach der Transfektion (24h) erfolgte eine NOD1- und NOD2-spezifische Stimulation. Als Positivkontrolle dienten mit LPS stimulierte Präadipozyten. Nach weiteren 24 h wurde die Luciferase-Aktivität in den Zelllysaten bestimmt (Abb. 29). Eine Stimulation mit dem NOD1-Liganden LT-DAP führte in WT-Präadipozyten mit einer gemessenen Luciferase-Aktivität von $22,9 \times 10^3$ RLU zu einer stärkeren NF- κ B-Aktivierung als eine Stimulation mit LPS, bei der für die Luciferase-Aktivität ein Wert von $12,4 \times 10^3$ RLU gemessen werden konnte. In 3T3L1-Präadipozyten führten Stimulationen mit LT-DAP und LPS mit ca. 15×10^3 RLU zu vergleichbaren Werten für die Luciferase-Aktivität. Eine Inkubation mit dem NOD2-Liganden MDP führte weder bei primären WT- noch bei 3T3L1-Präadipozyten zu einer signifikanten Luciferase-Aktivität.

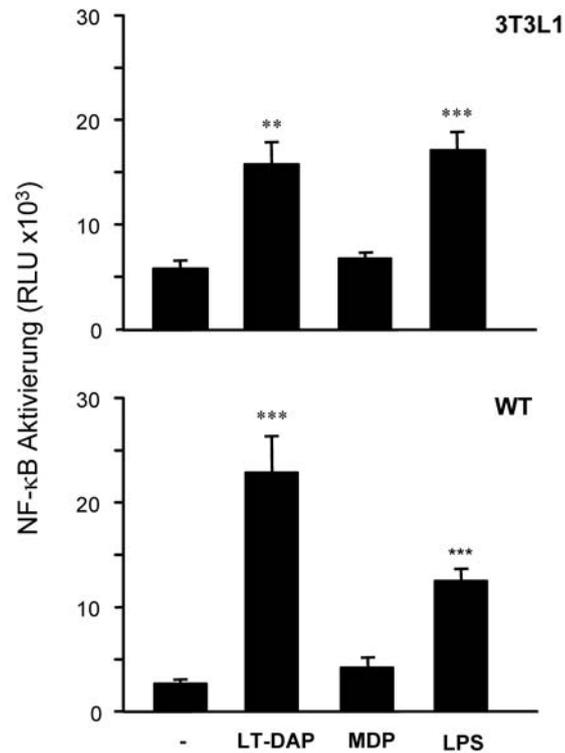


Abb. 29: NF-κB-Aktivierung durch NOD1- und NOD2-spezifische Stimulation.

WT- und 3T3L1-Präadipozyten wurden mit einem NF-κB-Reporterplasmid transfiziert und 24 h später mit dem NOD1-Liganden LT-DAP (200 nM), dem NOD2-Liganden MDP (10 mg/ml) bzw. LPS (1 µg/ml) stimuliert. Nach weiteren 24 h erfolgte die Bestimmung der Luciferase-Aktivität in den Zelllysaten mittels eines Luminometers. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von n=6; **p≤0,01; ***p≤0,001.

3.4.5 Synergistischer Effekt des NOD2-Liganden Muramyl-dipeptid mit Lipopolysaccharid auf die IL-6-Produktion muriner Makrophagen

Die Stimulationen von Präadipozyten mit dem NOD2-Liganden MDP allein führte zu keiner signifikanten IL-6-Produktion (Abb. 26). Die basale Expression von NOD2-spezifischer mRNA war schwach ausgeprägt, konnte aber durch eine Inkubation mit LPS signifikant gesteigert werden (Abb. 23 und 25). Es wurde daraufhin untersucht, ob eine gleichzeitige Stimulation von WT-Präadipozyten mit MDP in Kombination mit LPS einen synergistischen Effekt auf eine IL-6-Produktion ausübte. Als Kontrolle dienten Makrophagen, die aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark generiert worden waren. Eine gleichzeitige Inkubation von WT-Präadipozyten mit MDP und LPS führte mit ca. 5 ng/ml zu einer vergleichbaren IL-6-Konzentration, wie sie nach alleiniger Stimulation mit LPS gemessen werden konnte (Abb. 30). Ein synergistischer Effekt beider Stimulanzien ließ sich dagegen bei den untersuchten Makrophagen beobachten. Hier führte eine zusätzliche Inkubation mit MDP zu einer signifikanten Steigerung der LPS-induzierten IL-6-Konzentration von 3,8 ng/ml auf $5,5 \pm 0,03$ ng/ml ($p=0,0002$).

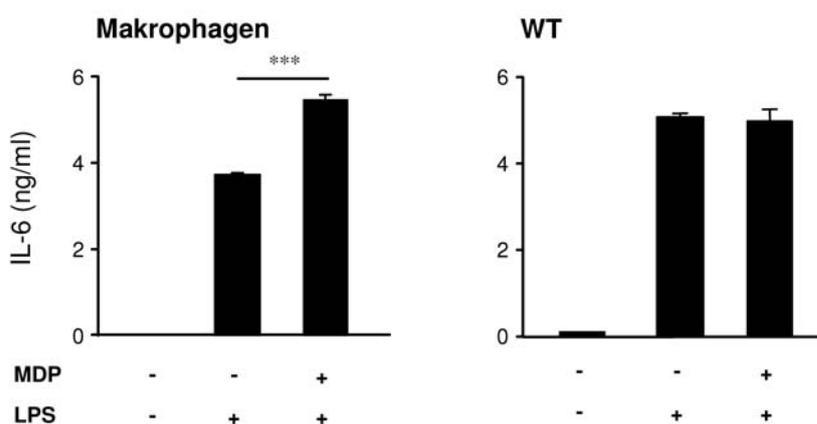


Abb. 30: Effekt von MDP und LPS auf die IL-6-Produktion.

Aus Vorläuferzellen generierte Makrophagen sowie WT-Präadipozyten wurden zum einen mit LPS (1 μ g/ml), zum anderen mit LPS in Kombination mit dem NOD2-Liganden MDP (10 μ g/ml) stimuliert. Nach 48 h erfolgte die Bestimmung der IL-6-Konzentration in den Kulturüberständen mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n=4$; $***p \leq 0,001$.

Es konnte durch einen *Knock-down* von NOD1 mittels siRNA gezeigt werden, dass LT-DAP einen spezifischen Liganden für NOD1 darstellte (Abb. 27). Eine spezifische Stimulation von NOD1 hatte eine HSP90-abhängige Aktivierung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges sowohl in primären Präadipozyten, als auch in der Zelllinie 3T3-L1 zur Folge (Abb. 29). Die Funktionalität des NOD2-spezifischen Liganden MDP konnte durch einen synergistischen Effekt auf die IL-6-Produktion durch Makrophagen bei gleichzeitiger TLR4-Stimulation mit LPS gezeigt werden (Abb. 30).

3.5 Rekombinante Herstellung der NOD1- und NOD2-Proteine

3.5.1 Klonierung von murinem NOD1 und NOD2 aus einem cDNA-Pool

Die bisherigen Ergebnisse belegten die Expression und Funktionalität des NOD1-Proteins in murinen Präadipozyten, während für NOD2 nur in Makrophagen eine Reaktion auf die Stimulation mit seinem beschriebenen Liganden MDP als synergistischer Effekt in Kombination mit LPS nachgewiesen werden konnte. In der Literatur war eine direkte Interaktion von NOD1 und NOD2 mit LT-DAP bzw. MDP bis dato nicht gezeigt worden.

Die folgenden Experimente befassten sich mit der Erzeugung von Expressionsvektoren für NOD1 und NOD2. Aus einem aus murinen Präadipozyten hergestellten cDNA-Pool konnte NOD1 als Ganzes kloniert werden, während von NOD2 keine vollständige cDNA amplifiziert werden konnte. Aus diesem Grunde wurde die NOD2 cDNA in zwei Teilstücken amplifiziert (Abb. 31) und diese in einen pCR 2.1 Vektor kloniert. Unter Verwendung eines BamHI-Spaltortes im pCR 2.1-Vektor stromaufwärts der klonierten Sequenz wurde das Teilstück A (1727 bp) mittels der Restriktionsendonukleasen BamHI und XmaI aus dem Vektor herausgeschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor ligiert, der das Teilstück B (1372 bp) enthielt. Die NOD2-cDNA konnte aus diesem Vektor schließlich mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI herausgeschnitten werden und stand so für weitere Klonierungen zur Verfügung.

Die klonierten Fragmente von NOD1 und NOD2 wurden sequenziert und Abweichungen im Vergleich zu der veröffentlichten Sequenz (NOD1: NM_172729; NOD2: NM_145857) mittels ortsgerichteter Mutagenese entsprechend korrigiert. Insgesamt mussten bei NOD1 zwei, im Falle von NOD2 drei Nukleotidaustausche vorgenommen werden da es sonst zu einem Aminosäureaustausch gekommen wäre. Bei drei weiteren Sequenzabweichungen im klonierten NOD2-Fragment wurde auf eine Korrektur mittels ortsgerichteter Mutagenese verzichtet da die entsprechenden Nukleotidaustausche keine Änderung der Aminosäuresequenz bewirkten.

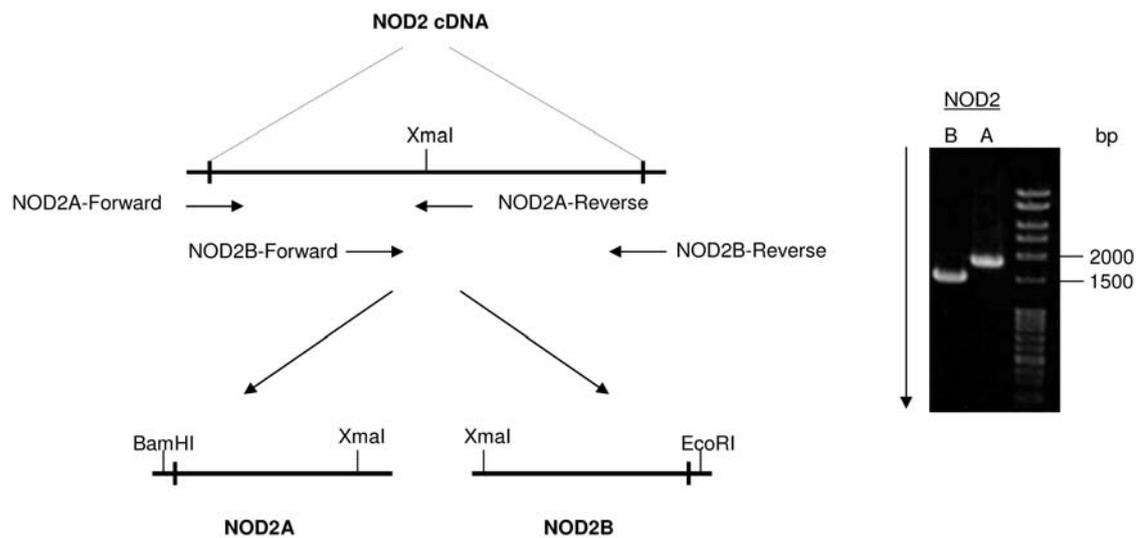


Abb. 31: Klonierung einer vollständigen NOD2-cDNA aus zwei Teilstücken.

Die Klonierung der NOD2-cDNA erfolgte mittels zweier Teilstücke. Primer für Teilstück A wurden so gewählt, dass sie zum einen BamHI-Spaltort vor das 5'-Ende der NOD2-Sequenz einfügten, zum anderen, dass sie kurz hinter dem 3'-Ende eines mittig in der NOD2-Sequenz lokalisierten XmaI-Spaltortes hybridisierten. Die Primer für Teilstück B hybridisierten vor dem XmaI-Spaltort und lasen in Richtung 3'-Ende der NOD2-Sequenz, an dessen Ende sie einen EcoRI-Spaltort einfügten. Beide Teilstücke ließen sich in einem 0,8 %igen Agarosegel darstellen.

3.5.2 NOD2 als EGFP-Fusionsprotein im Vektor pEGFP-N2

Die Wahl des Protein-*Tags* richtete sich zum einen nach dem Verwendungszweck, zum anderen nach den biochemischen Eigenschaften des rekombinanten Proteins. Da es sich bei dem NOD2-Protein mit einem Molekulargewicht von 112 kDa um ein relativ großes Protein handelte, wurde als C-terminaler *Tag* das 27 kDa große EGFP verwendet. Dies hatte weiterhin den Vorteil, dass seine Expression leicht durchflusszytometrisch verfolgt werden konnte. Daneben war auf Grund der Größe des EGFP davon auszugehen, dass es im nativen Fusionsprotein für Antikörper zugänglich ist. Für die Möglichkeit einer affinitätschromatographische Aufreinigung der nativen Proteine über Gelmatrix-gekoppelte Co^{++} - und Zn^{++} -Ionen war ein zusätzlicher His-*Tag*, bestehend aus sechs Histidinen, erforderlich.

Als Vektor wurde mit pEGFP-N2 der gleiche Vektor gewählt, der in den Transfektionsexperimenten in allen transfizierten Zelltypen hohe Expressionsraten des EGFP gezeigt hatte (Tabelle 2). Im Vektor pEGFP-N2 entstand nach Einfügen der gewünschten Sequenz ein Fusionsprotein mit C-terminalem EGFP. Da dieser Vektor keine Expression eines His-*Tags* vorsah, musste er entsprechend modifiziert werden. Als Prinzip für die Modifikation der multiplen Klonierungsstelle wurde die Methode eines überhängenden Primers verwendet (Abb. 32). Das entstandene Fragment wurde aufgereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen NheI und BamHI verdaut und anschließend in den analog geschnittenen und aufgereinigten Vektor pEGFP-N2 kloniert. Die Plausibilität der Sequenz wurde durch eine Sequenzierung überprüft. Der entstandene Vektor pHisEGFP-N2 verfügte über eine beabsichtigte Verschiebung des Leserasters, so dass im leeren Zustand des Vektors kein EGFP exprimiert wurde. Das korrekte Leseraster ergab sich nach Klonierung des NOD2-Fragmentes in den Vektor pHisEGFP.

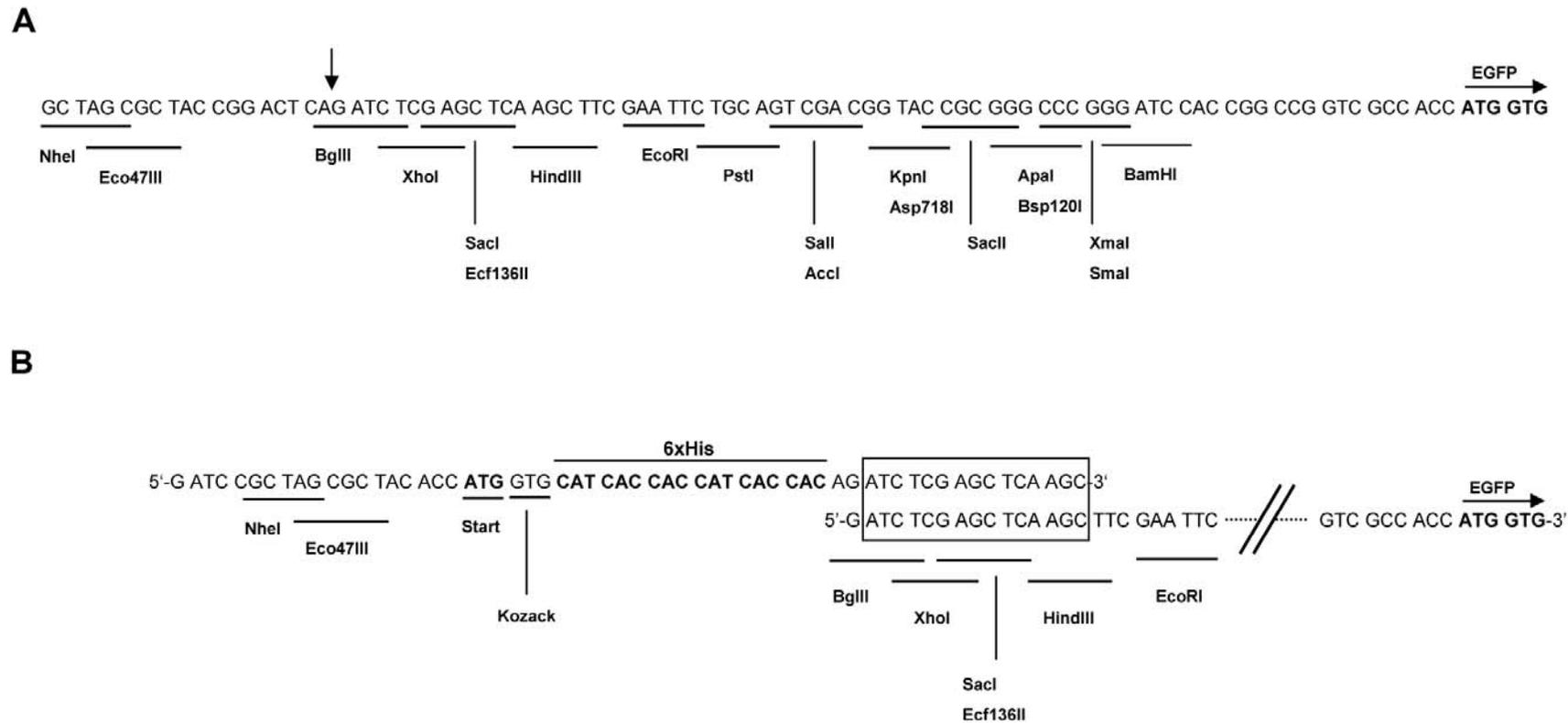


Abb. 32: Erweiterung der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pEGFP-N2 um die Sequenz eines His-Tags.

(A) Multiple Klonierungsstelle des Vektors pEGFP-N2 mit Kennzeichnung der Spaltstelle für die Restriktionsendonuklease BglIII. (B) Veranschaulicht das Prinzip der PCR mit überhängenden Primern für das Einfügen eines His-Tags in die Sequenz des pEGFP-N2. Der sense-Primer hybridisierte nur zum Teil an den antisense-Strang des Vektors (siehe umrandete Sequenz). Die überhängenden Basen enthielten die ursprünglichen Restriktionsorte für NheI und Eco47III, fügten im Anschluss aber ein Start-Codon, eine Kozack-Sequenz sowie sechs Histidine und zwei Basen für die Angleichung des Leserasters nach Klonierung des NOD2-Fragmentes in die Sequenz ein. Der antisense-Primer hybridisierte in der Sequenz des EGFP und las in die multiple Klonierungsseite hinein. Als Produkt der PCR entstand ein Fragment, das die Sequenz der modifizierten multiplen Klonierungsstelle sowie Teile des EGFP enthielt.

Mithilfe der klonierten und mit Restriktionsorten versehenen NOD2-cDNA und des modifizierten Vektors pHisEGFP-N2 konnten Vektoren erzeugt werden, die für das NOD2-EGFP-Fusionsprotein kodierten. Da das EGFP das resultierende Molekül deutlich vergrößerte und der Einfluss auf die Bindungseigenschaften der vorgesehenen rekombinanten Moleküle nicht bekannt war, wurde bei einem weiteren Konstrukt ein Stop-Codon hinter die NOD2-kodierende Sequenz eingefügt (Abb. 33). Für das Einfügen der NOD2-cDNA in den Vektor pHisEGFP wurde der Vektor mit den Restriktionsendonukleasen BglIII und EcoRI, die NOD2-cDNA mit BamHI und EcoRI geschnitten. Aufgrund kompatibler Spaltorte kann eine mit BamHI geschnittene Sequenz mit einer Sequenz ligiert werden, die mit BglIII geschnitten wurde. Die Korrektheit der kompletten Sequenz wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

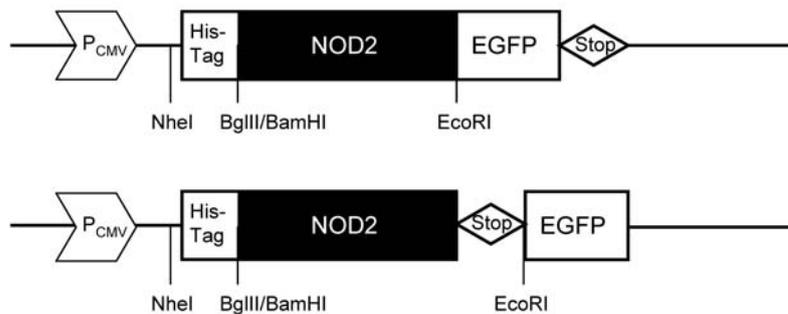


Abb. 33: Schemata der erzeugten NOD2-Expressionsvektoren.

Unter Kontrolle des CMV-Promotors (P_{CMV}) wurde von dem oberen Vektorkonstrukt ein NOD2-Protein mit N-terminalem His-Tag und C-terminalem EGFP exprimiert. Bei dem unten dargestellten Konstrukt wurde die Expression des EGFP durch ein Stop-Codon unmittelbar nach der NOD2-Sequenz verhindert. Für ein Herausschneiden der His-NOD2-Sequenz standen die Spaltorte für NheI und BamHI zur Verfügung.

3.5.3 Überexpression von NOD2 im eukaryontischen System

Die Funktionalität der generierten Expressionsvektoren für murines NOD2 wurde anhand der Expression transfizierter Zellen überprüft. Dazu wurden J558L-Zellen mit beiden Konstrukten transfiziert und die Expression von EGFP 24 h nach Transfektion mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es konnte in den mit dem NOD2-EGFP-Konstrukt transfizierten Ansätzen ein Anteil an EGFP-positiven Zellen von 25,6 % ermittelt werden, während sowohl in untransfizierten als auch in Ansätzen, die nur für die Expression von NOD2 transfiziert worden waren, keine grüne Fluoreszenz gemessen werden konnte (Abb. 34A). Der spezifische Nachweis der NOD2-Expression erfolgte mittels Western Blot. Gesamtlysate der transfizierten Zellen wurden in einem 7,5 %igen Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen und anschließend geblottet. Der Nachweis der immobilisierten Proteine erfolgte zum einen mit einem kommerziellen Serum, das für den Nachweis von NOD2 in Kaninchen mit Hilfe eines Peptids aus dem N-terminalen Bereich des NOD2-Proteins generiert wurde, zum anderen mit einem monoklonalen EGFP-spezifischen Antikörper (Abb. 34B). Das NOD2-spezifische Serum lieferte eine Vielzahl von Banden. Mithilfe der untransfizierten Kontrolle ließ sich in J558L-NOD2-Zellen eine Bande in der erwarteten Größe des exprimierten Proteins von ca. 112 kDa identifizieren. In den Gesamtlysaten der Zellen, die mit dem Vektor für das NOD2-EGFP-Konstrukt transfiziert worden waren, fehlte diese Bande bei 112 kDa, dafür wies dieser Blot eine Bande bei ca. 139 kDa auf, was der errechneten Größe des NOD2-EGFP-Konstruktes entsprach. Bestätigen ließ sich dies durch einen Nachweis mittels eines EGFP-spezifischen Antikörpers.

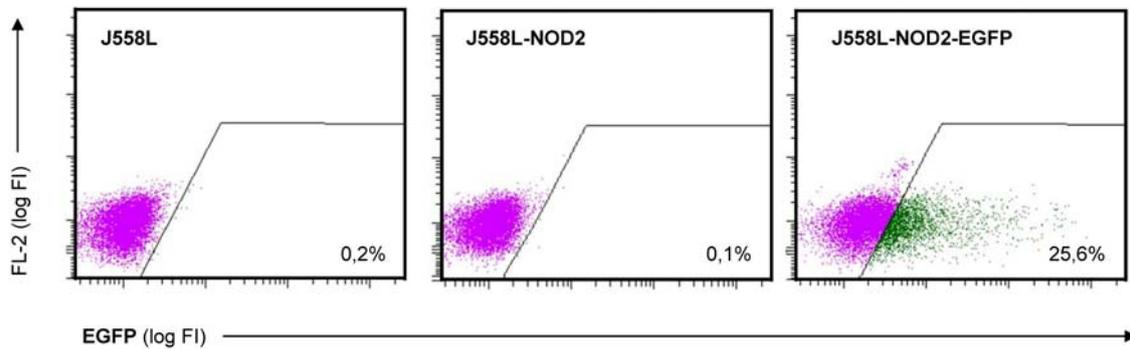
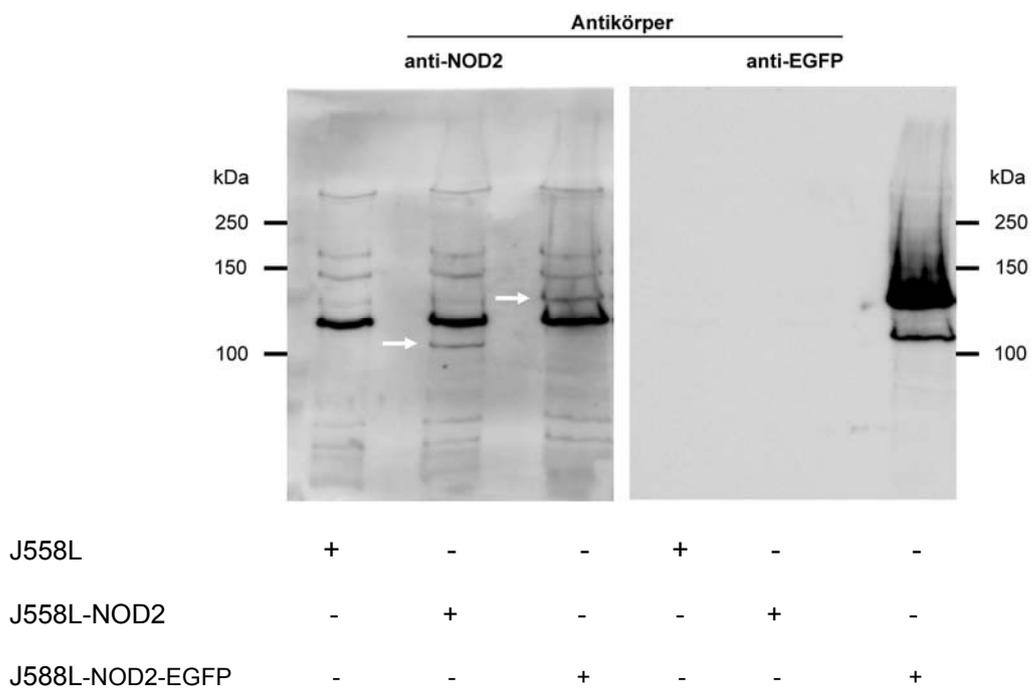
A**B**

Abb. 34: Funktionalität der erzeugten NOD2-Expressionsvektoren.

J558L Zellen wurden sowohl mit dem NOD2-Expressionsvektor transfiziert, als auch mit dem Vektor, der für das NOD2-EGFP-Konstrukt kodierte. (A) Durchflusszytometrische Analyse der transfizierten Zellen. Angegeben ist der prozentuale Anteil grün fluoreszierender Zellen an der Gesamtpopulation (B) Spezifischer Nachweis von NOD2 bzw. EGFP mittels Western Blot. Pfeile kennzeichnen Banden in Höhe der erwarteten Größe des NOD2- bzw. NOD2-EGFP-Fusionsproteins.

3.5.4 Etablierung und Charakterisierung stabil exprimierender Zellklone für das NOD2-EGFP-Fusionsprotein

Aufgrund der für eine rekombinante Herstellung des NOD2-EGFP-Fusionsproteins benötigten Mengen an transfizierten Zellen wurden mit Hilfe des ELPorator 1000-Systems die Zellklone BB1B5 und BB1B12 auf Grundlage der Suspensions-Zelllinie J558L generiert, die das Fusionsprotein stabil exprimierten. Eine Quantifizierung der NOD2-EGFP-Expression auf Transkriptebene ergab eine Expression von 437 ± 10 bzw. 380 ± 38 Molekülen NOD2-EGFP-mRNA je Zelle, während eine untransfizierte J558-Zelle lediglich eine Kopie NOD2-mRNA exprimierte (Abb. 35A). Aufgrund einer etwas höheren Expressionsrate (Daten nicht gezeigt) wurden für die folgenden Versuche der Klon BB1B5 weiterkultiviert, der Klon BB1B12 kryokonserviert. Eine durchflusszytometrische Analyse der BB1B5-Kultur ergab 93,5 % NOD2-EGFP-positive Zellen bei einer mittleren Fluoreszenzintensität von 1234 Fluoreszenzeinheiten (Abb. 35B).

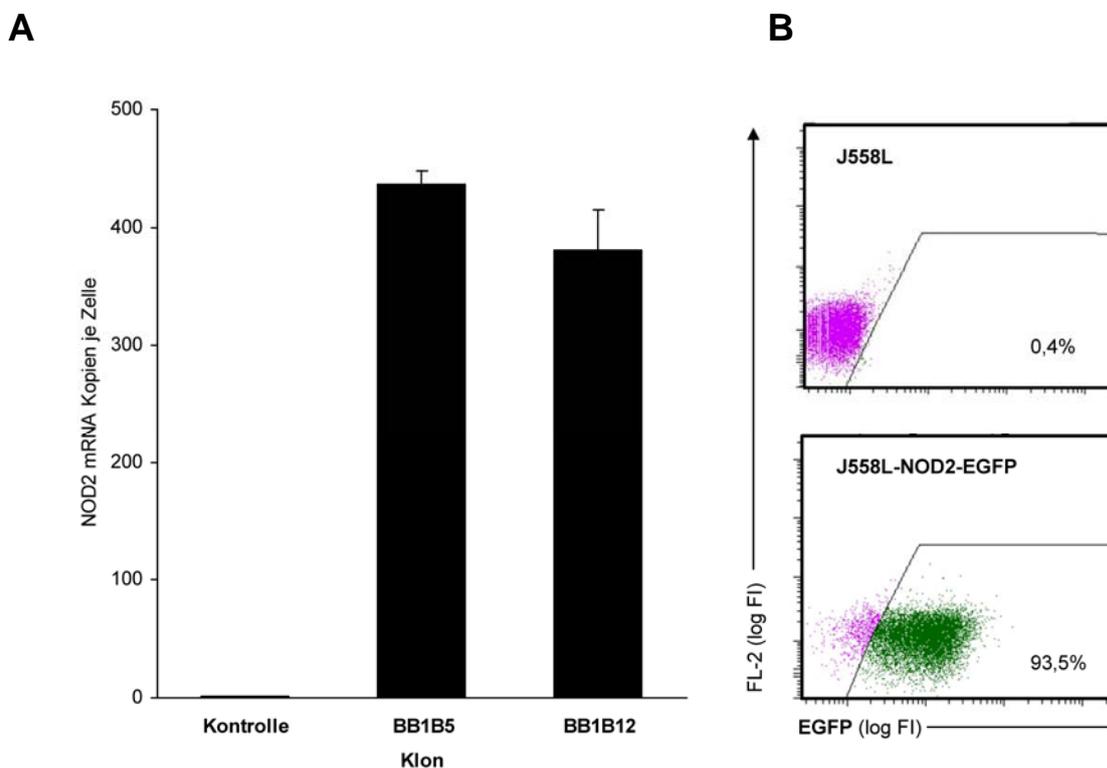


Abb. 35: Charakterisierung der Expression von NOD2-EGFP auf Transkript- und Proteinebene durch stabil transfizierte Zellklone.

(A) Aus definierten Zellzahlen der etablierten Klone BB1B5 und BB1B12 sowie den Ausgangszellen wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer *Real-Time*-PCR anhand eines Plasmidstandards absolut quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von $n=4$. (B) Durchflusszytometrische Analyse der EGFP-Expression des Klones BB1B5. Die Zahlenwerte geben den prozentualen Anteil grün fluoreszierender Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation an.

3.5.5 Definition eines geeigneten Puffersystems für die Herstellung von Zellextrakten, die das native NOD2-EGFP-Fusionsproteins enthielten

Eine Aufreinigung des NOD2-EGFP-Fusionsproteins erforderte zunächst ein geeignetes Puffersystem, in dem das Fusionsprotein stabil vorlag. Hierzu wurden vergleichbare Zellzahlen des Klones BB1B5 mit Puffern unterschiedlicher pH-Werte durch Einfrieren und Auftauen lysiert und der Überstand anschließend in einer nichtreduzierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der spezifische Nachweis des Fusionsproteins erfolgte über seinen EGFP-Anteil in einem Western Blot. Es zeigte sich eine stark pH-abhängige Zunahme der Signalintensität größer als dem errechneten Molekulargewicht von 139 kDa des NOD2-EGFP-Fusionsproteins. Ab einem pH > 7,0 war eine deutliche Zunahme der Signalintensitäten im Bereich von 250 kDa zu erkennen, die bei pH > 7 weiter zunahm, während die spezifische Bande des Fusionsproteins stetig abnahm (Abb. 36). Es zeigte sich ebenfalls eine unvollständige Lyse der Zellen ab pH < 7.

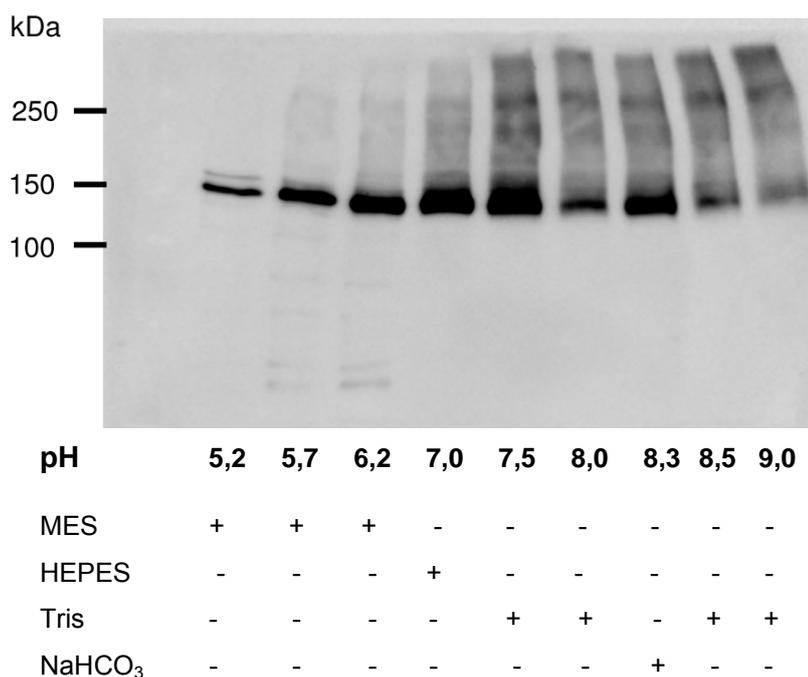


Abb. 36: Komplexbildung des NOD2-EGFP-Fusionsprotein in Abhängigkeit des pH.

Vergleichbare Zellzahlen des Klones BB1B5 wurden mittels Puffern (50 mM Puffersubstanz, 1 M NaCl) mit unterschiedlichen pH-Werten lysiert und in einem 7,5 %-igen Polyacrylamidgel unter nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend geblottet. Der immunchemische Nachweis des Fusionsproteins erfolgte über seinen EGFP-Anteil mittel eines spezifischen Antikörpers.

Die Ergebnisse der Experimente für eine rekombinante Darstellung zeigten auf, dass sowohl die cDNA von NOD1 als auch von NOD2 aus einem cDNA-Pool amplifiziert werden konnte. Nach Klonierung in einen Vektor entstand ein Fusionsprotein mit C-terminalem EGFP, während bei einem weiteren Konstrukt die Expression hinter der NOD-spezifischen Sequenz durch das Einfügen eines Stop-Codons endete. Anhand der Transfektion von J558L-Zellen und nachfolgender Selektion konnten zwei Klone etabliert werden, die das NOD2-EGFP-Fusionsprotein stabil exprimierten. Einer dieser Klone wurde in großer Menge hochgezüchtet und ein Puffersystem definiert, das das native NOD2-EGFP-Fusionsprotein in einem Zelllysat für die nachfolgenden Versuche verfügbar machte.

3.6 Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie

3.6.1 Nachweis der spezifischen Bindung eines immobilisierten anti-EGFP-Antikörpers an das NOD2-EGFP-Fusionsprotein

Ein Nachweis der direkten Interaktion von NOD2 mit seinem putativen Liganden MDP wurde bis heute in der Literatur nicht veröffentlicht. Da eine Aufreinigung des NOD2-EGFP-Fusionsproteins trotz intensiver Bemühungen nicht gelang (Daten nicht gezeigt), wurde aus diesem Grunde Zellextrakte aus Zellen hergestellt, die das NOD2-EGFP-Fusionsprotein überexprimierten. Diese Extrakte wurden daraufhin über die Fließzelle eines Sensorchips für die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie gegeben, an die zuvor ein EGFP-spezifischer Antikörper kovalent gekoppelt worden war und so das NOD2-EGFP-Fusionsprotein auf dem Sensorchip immobilisierte. Für den Ausschluss von unspezifischen Bindungen war eine weitere Fließzelle des gleichen Biosensors mit einem FITC-spezifischen Antikörper beladen, während die restlichen zwei Fließzellen des Sensorchips unbehandelt belassen wurden. Das erhaltene Sensogramm zeigte eine spezifische Bindung sowohl des rekombinanten GFP, als auch des NOD2-EGFP-Fusionsproteins (Abb. 37) durch den EGFP-spezifischen Antikörper auf, während das Sensogramm aller Kontrollen eine mit dem Indexsprung vergleichbare Signalstärke aufwies.

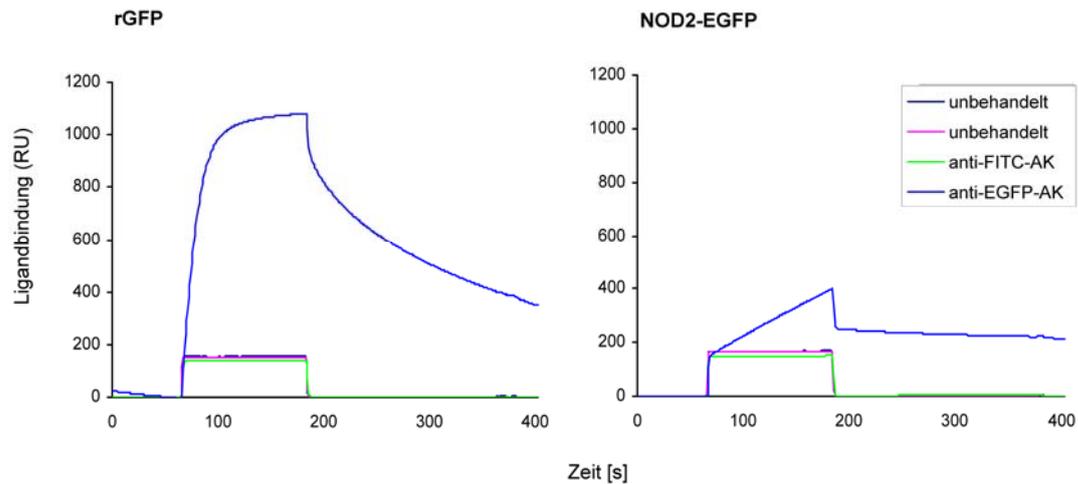


Abb. 37: Nachweis der spezifischen Bindung von rekombinatem GFP und NOD2-EGFP durch einen immobilisierten EGFP-spezifischen Antikörper mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie.

Rekombiantes GFP (37 nM) bzw. ein Lysat NOD2-EGFP-exprimierender Zellen wurden über die vier Fließzellen des Sensorchips gegeben und Assoziation und Dissoziation über den angegebenen Zeitraum in Echtzeit aufgezeichnet.

3.6.2 Bindung des NOD2-Liganden MDP durch das NOD2-EGFP-Fusionsprotein

Für den Nachweis einer Bindung von MDP durch das NOD2-EGFP wurde der Sensorchip zunächst mit 1160 RU des Fusionsproteins beladen und anschließend MDP in LD- bzw. DD-Isoform (Abb. 38A) in einer Konzentration von 1 mM in Laufpuffer in die Fließzellen injiziert. Das Sensogramm zeigte das Ergebnis der Fließzelle, die mit dem EGFP-spezifischen Antikörper behandelt worden war, abzüglich der Signale, die mit dem FITC-spezifischen Antikörper beschickten Fließzelle erhalten worden waren. Es zeigte sich eine deutliche Bindung des MDP sowohl in der LD-Form, als auch in seiner DD-Form an das NOD2-EGFP Fusionsprotein. Während die Assoziation der LD-Form ein stabiles Gleichgewicht bei 9 RU zeigte, wies die DD-Form eine über den betrachteten Zeitraum steigende Assoziation bis auf über 20 RU auf (Abb. 38B). Es konnte für beide untersuchten Strukturen keine Bindung an rekombinantes GFP allein gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Als Kontrolle für die Funktionalität des MDP in der LD-Isoform wurden humane PBMC mit 10 µg/ml MDP LD bzw. MDP DD für 48 h inkubiert und anschließend die IL-1 β Konzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt. Während eine Inkubation mit MDP LD zu einer deutlichen IL-1 β Konzentration im Kulturüberstand führte, konnte nach Inkubation mit MDP in der DD-Isoform kein IL-1 β im Überstand nachgewiesen werden (Abb. 38C).

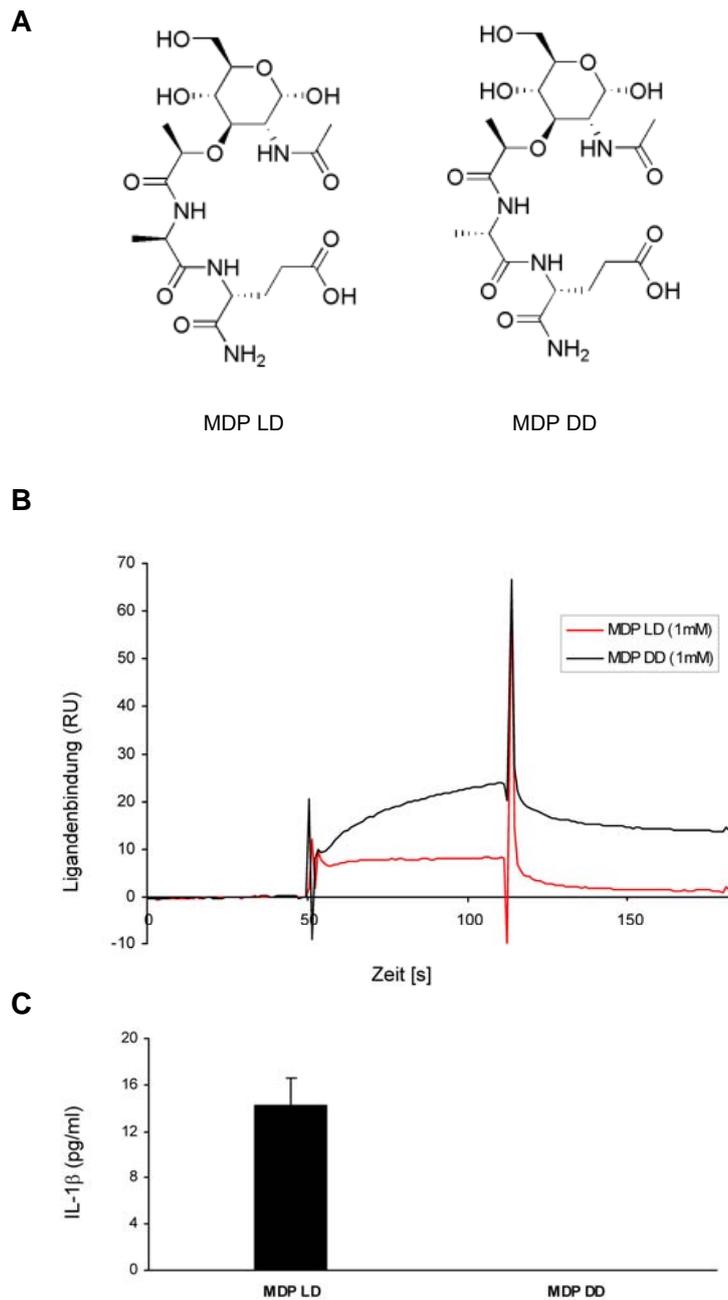


Abb. 38: Nachweis der Bindung von Muramyldipeptid durch NOD2 mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz.

(A) Dargestellt ist MDP in seiner aktiven LD-Form (N-Acetylmuramyl-L-Alanyl-D-Iso-glutamin) und seiner inaktiven DD-Form (N-Acetylmuramyl-D-Alanyl-D-Iso-glutamin). Das Molekulargewicht beider Substanzen betrug 492,5 g/mol. (B) Der Sensorchip wurde mit NOD2-EGFP beladen und anschließend die zu untersuchenden Strukturen in einer Konzentration von 1 mM injiziert. Das Sensogramm zeigt die um die Kontroll-Fließzelle bereinigten Daten (vergl. Text). (C) Humane PBMC wurden für 48h mit MDP in LD-bzw. DD-Isoform inkubiert und nach 48 h die Konzentration an IL-1 β im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von n=6.

3.6.3 Test weiterer NOD-Liganden auf Bindung durch NOD2-EGFP

Analog der Bindungsstudien mit dem NOD2-spezifischen Liganden MDP wurden der spezifische Ligand für humanes NOD1 iE-DAP, sowie die Variante iE-Lys, bei der die Diaminopimelinsäure durch Lysin substituiert vorliegt, in einer Konzentration von 1 mM auf Bindung durch NOD2-EGFP untersucht. Als drittes Molekül wurde das M-Tri_{DAP} gewählt, das sowohl als Ligand für NOD1, aber auch als schwächerer Ligand für NOD2 beschrieben wird. Es handelt sich bei M-Tri_{DAP} um ein um einen Diaminopimelinsäurerest verlängertes MDP. Für iE-Lys konnte keine Bindung durch NOD2-EGFP detektiert werden. Die Interaktion von iE-DAP mit NOD2-EGFP fiel mit gemessenen 2 RU sehr schwach aus und lag an der Nachweisgrenze der Methodik, die sich aus der Stabilität der Basislinie ergab (Abb. 39). Im Gegensatz dazu zeigte M-Tri_{DAP} eine deutliche Bindung durch NOD2-EGFP. Die Bindungscharakteristik ähnelt dabei der des MDP in seiner DD-Isoform (Abb. 40).

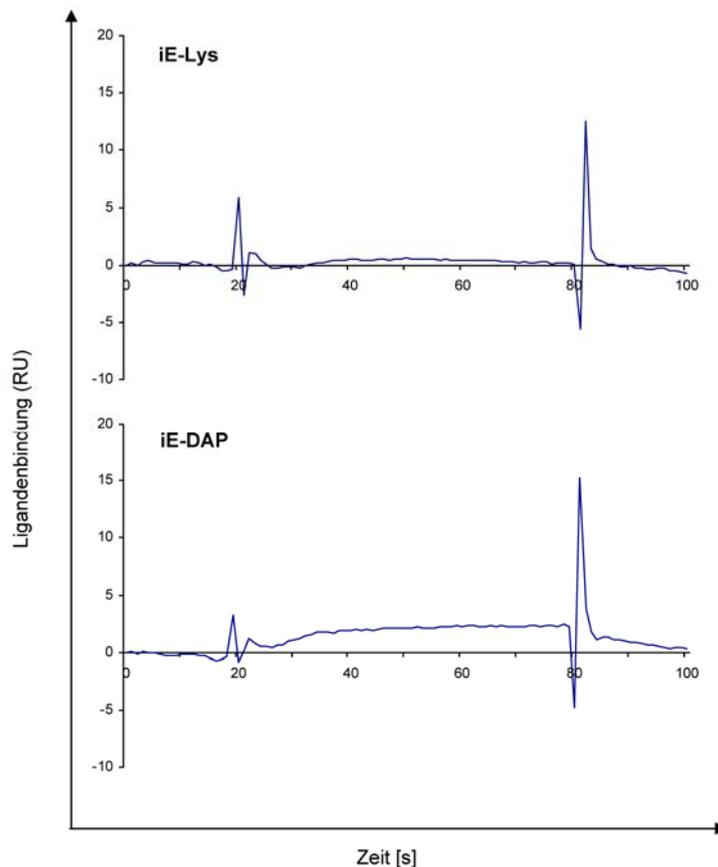


Abb. 39: Sensogramm der Interaktion zwischen NOD1-Liganden und NOD2-EGFP.

Der Sensorchip wurde mit NOD2-EGFP beladen und anschließend die zu untersuchenden Strukturen in einer Konzentration von 1 mM injiziert. Das Sensogramm zeigt die um die Kontroll-Fließzelle bereinigten Daten.

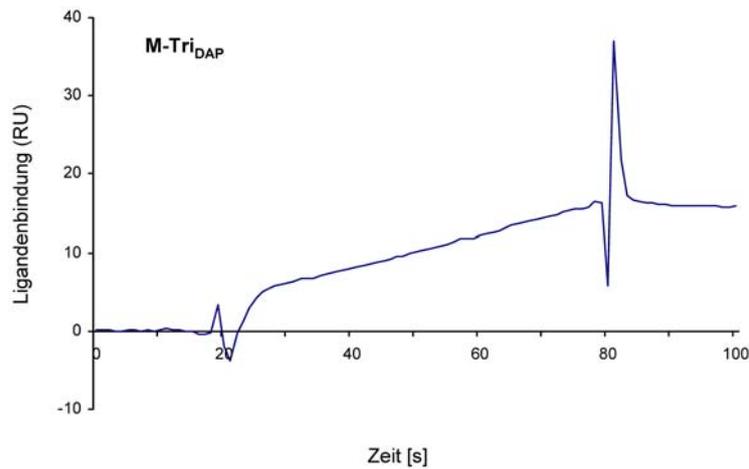


Abb. 40: Sensogramm der Interaktion zwischen dem NOD1- und NOD2-spezifischen Liganden M-Tri_{DAP} und NOD2-EGFP.

Der Sensorchip wurde mit NOD2-EGFP beladen und anschließend M-Tri_{DAP} von 1 mM injiziert. Das Sensogramm zeigt die um die Kontroll-Fließzelle bereinigten Daten.

Durch Bindungsstudien mittels der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie konnte eine Bindung von MDP durch das NOD2-EGFP-Fusionsprotein gezeigt werden. Das MDP wird dabei nicht nur in seiner stimulatorisch wirksamen LD-Form gebunden, sondern ebenfalls in seiner DD-Form. Inkubationen von PBMCs mit MDP in DD-Form führten im Gegensatz zu der DL-Form zu keiner nachweisbaren IL-1 β -Produktion in PBMCs. NOD1-spezifische Liganden zeigten keine deutliche Bindung durch das NOD2-EGFP-Fusionsprotein, während für MTri_{DAP}, das sowohl Strukturmerkmale von NOD1- als auch von NOD2-Liganden aufweist, eine Bindung durch das Fusionsprotein gezeigt werden konnte.

4 Diskussion

4.1 Ausgangsfragestellung

Die Expression funktionaler *Toll-like-Rezeptoren (TLRs)* und die Fähigkeit der Präadipozyten zu phagozytieren legen eine aktive Funktion des mesenterialen Fetts im angeborenen Immunsystem nahe [4]. Weitere Indizien dafür können in den immunregulatorischen Fähigkeiten vieler vom Fettkörper sezernierter Adipokine gesehen werden. Pathologische Befunde, wie Hypertrophien des mesenterialen Fetts im Verlauf des Morbus Crohns um die entzündeten Darmbereiche, liefern zusätzlich Hinweise auf eine Beteiligung des Fettgewebes an immunologischen Reaktionen [25]. Die Ätiologie des Morbus Crohn ist bis heute nicht ausreichend verstanden und wird als Zusammenspiel von genetischen Faktoren, Umweltfaktoren und von Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmflora gesehen, was zu einem fehlerhaft reguliertem intestinalen Immunsystem führt. Ein Suszeptiliätsfaktor für Morbus Crohn konnte im Jahr 2001 in dem Gen gefunden werden, das für *Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)2* kodiert [36]. Im gleichen Jahr konnten Veränderungen in diesem Gen mit einem stark erhöhten Risiko in Verbindung gebracht werden, an Morbus Crohn zu erkranken [112]. NOD2 gehört zu der Proteinfamilie der LRR-Proteine, zu der auch das im Jahr 1999 erstmals beschriebene NOD1 gehört [47, 51]. Im Jahr 2001 wurden erste Hinweise geliefert, dass LRR-Proteine bakterielle Komponenten mittels ihrer Leucin-reichen (LRR)-Domäne detektieren und es in Folge zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nukleärer Faktor (NF)- κ B kommt [54]. Die Funktion sowohl von NOD1 als auch von NOD2 wird heute als *Pattern Recognition-Rezeptor* gesehen, denen eine Funktion bei der NF- κ B-abhängigen Abwehrreaktion nach Erkennung von Abbauprodukten der bakteriellen Zellwand zugesprochen wird. Mittels der Stimulation mit charakterisierten Kohlenhydratstrukturen, die aus der Zellwand Gram-positiver bzw. Gram-negativer Bakterien abgeleitet wurden, konnte für humanes NOD1 die γ -D-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure (iE-DAP) [113] und für murines NOD1 die Laktyltetra-Diaminopimelinsäure (LT-DAP) als aktivierende Substanz charakterisiert werden [30]. Im Falle von NOD2 konnte das seit längerer Zeit als Immunadjuvanz bekannte Muramyl-dipeptid (MDP) als ein Motiv identifiziert werden, das nach Inkubation mit NOD2, nicht aber bei NOD1-überexprimierenden HEK293T-Zellen, eine NF- κ B-Aktivierung auslöste [31, 114, 115].

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob murine Präadipozyten die *Pattern Recognition-Rezeptoren* NOD1 und NOD2 exprimierten, und so eine aktive Rolle an Abwehrreaktionen des angeborenen Immunsystems in dem oben beschriebenen Sinne ausüben könnten. Dabei wurden Methoden zur reproduzierbaren

Darstellung von NOD1 und NOD2 auf transkriptioneller sowie translationaler Ebene etabliert. Auf transkriptioneller Ebene konnte eine quantitative *Real-Time*-PCR etabliert werden, die eine absolute Quantifizierung der mRNA von NOD1 und NOD2 anhand von generierten Plasmidstandards sowohl in murinen Präadipozyten als auch in aus Vorläuferzellen generierten Makrophagen erlaubte. Zeitabhängige Änderungen der Expressionshöhe von NOD1 und NOD2 durch Inkubation muriner Präadipozyten mit NOD1- und NOD2-spezifischen Liganden oder den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β und TNF- α konnten mittels quantitativer *Real-Time*-PCR in Relation zu unbehandelten Kontrollen bestimmt werden. Die Funktionalität der untersuchten Rezeptoren wurde durch Bestimmung einer Zytokinantwort nach Inkubation mit spezifischen Liganden untersucht und mittels funktioneller *Knock-down* Untersuchungen validiert. Der durch NOD1-spezifische Stimulation aktivierte Signalweg wurde mittels Transfektion muriner Präadipozyten mit einem Reporterplasmid charakterisiert. Eine wesentliche methodische Voraussetzung für die funktionelle Charakterisierung von NOD1 und NOD2 bestand in der effizienten Transfektion muriner Präadipozyten mit Reporterplasmiden und *Small Interfering* (si)RNA. Hierfür wurde ein Elektroporationssystem entwickelt, das mit kombinierten Rechteckimpulsen arbeitet und es dem Anwender erlaubt, gezielt und nachvollziehbar die elektrischen Parameter entsprechend der bekannten Zellphysiologie zu wählen. Es wurden Bedingungen für eine hocheffiziente Transfektion von murinen Präadipozyten, verschiedenen Suspensionszellen sowie primären humanen *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) etabliert. Mittels dieser Technik wurde ein eukaryontischer Zellklon erzeugt, der ein NOD2-EGFP-Fusionsprotein stabil exprimiert. Mithilfe dieses Klones war eine biochemische Charakterisierung von NOD2 möglich, wodurch Zellextrakte erhalten werden konnten, in denen das NOD2-EGFP-Fusionsprotein stabil vorlag und für Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien mittels der Oberflächen-Plasmon-Resonanz herangezogen werden konnten.

4.2 Expression der *Nucleotide-binding Oligomerization Domain* (NOD)-Proteine 1 und 2 in primären Präadipozyten des mesenterialen Fetts

Eine Expression von NOD1 konnte bis heute in den unterschiedlichsten epithelialen Zellen nachgewiesen werden [35, 47, 51], während die Expression von NOD2 hauptsächlich in Zellen der myeloiden Reihe sowie in Paneth-Zellen am Grunde der Dünndarmkrypten nachgewiesen werden konnte [36, 116, 117]. Eine schwach

ausgeprägte Expression von NOD2 konnte auch für das intestinale Epithel gezeigt werden [118]. Die Bestimmung der basalen Expression von NOD1 und NOD2 in primären murinen Präadipozyten sowie der Zelllinie 3T3L1 erfolgte sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene.

Für den Nachweis auf Transkriptebene standen zwei Methoden zur Verfügung. Die Methode der semiquantitativen PCR erfolgte über die Beurteilung der Bandenintensität in Agarosegelen und birgt die Risiken der vom Bearbeiter abhängigen Varianz und diente der Bestätigung der Ergebnisse, die mit der Methode der quantitative *Real-Time*-PCR erhalten wurden. Eine quantitative *Real-Time*-PCR eignet sich sowohl für eine semiquantitative als auch für eine absolute Aussage über die Höhe einer Genexpression. Die semiquantitative Quantifizierung stellt die Expressionshöhe in Relation zu einem Referenzgen dar und setzt neben einer vergleichbaren absolute Expressionshöhe dieser Referenz eine vergleichbare Effizienz der PCR-Reaktion von Ziel- und Kontroll-cDNA voraus, während eine genaue Kenntnis über die eingesetzte Zellzahl nicht erforderlich ist [119, 120]. Dahingegen erfordert eine absolute Quantifizierung, die eine Aussage über die Anzahl der untersuchten mRNA-Kopien je Zelle anhand von Plasmidstandards macht, die Verwendung definierter Zellzahlen [121]. Aufgrund der Verwendung der identischen Primer für Ziel-cDNA und Plasmidstandards beeinflusst die PCR-Effizienz diese Methode nicht.

Eine absolute Quantifizierung anhand von Plasmidstandards wurde für die Bestimmung der basalen Expression von NOD1 und NOD2 etabliert. Die Aussagekraft dieser Methode hing dabei von verschiedenen Faktoren ab. Es musste zum einen eine quantitative Isolation der Gesamt-RNA aus einer definierten Anzahl von Zellen erfolgen, zum anderen musste diese präparierten RNA frei von genomischer DNA sein, da dies zu einer Verfälschung der Messergebnisse geführt hätte [121]. Der lineare Zusammenhang zwischen Zellzahl und daraus isolierter Gesamt-RNA-Menge ließ sich durch die Präparation der Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Ausgangs-Zellzahlen reproduzierbar zeigen. Durch Kontrollen, die keine dNTPs während der Umschreibung der mRNA in cDNA enthielten, konnte eine Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Expressionshöhe einer Referenzgen-unabhängigen absoluten Quantifizierung identifizierten primäre murine Präadipozyten als einen weiteren Zelltyp, der NOD1 exprimiert. Es konnte eine etwa doppelt so hohe Kopienzahl NOD1-spezifischer mRNA je Zelle gemessen werden, als in aus Vorläuferzellen generierte Makrophagen. Mit ca. 12 Kopien war die Expression NOD1-spezifischer mRNA bei TLR2/4^{-/-}-Präadipozyten deutlich höher als bei Wildtyp (WT)-Präadipozyten, während in 3T3L1 keine Expression NOD1-spezifischer mRNA

nachgewiesen werden konnte. Somit ist eine Beeinflussung der NOD1 Expression durch das Fehlen von TLR2 und/oder TLR4 wahrscheinlich. Eine mögliche Ursache der gesteigerten NOD1-Expression in TLR2/4^{-/-}-Prädipozyten könnte in einem synergistischen Effekt der gleichzeitigen Aktivierung von NOD1 und TLR2 begründet sein. Eine Koinkubation von THP1-Zellen mit Liganden für TLR2 und NOD1 führt zu einer ausgeprägteren IL-8-Produktion, als die Stimulation nur eines der beiden Rezeptoren [122]. In humanen intestinalen Epithelzellen konnte eine verminderte Reaktion auf TLR2-Liganden gefunden werden und wird von den Autoren mit der Notwendigkeit der Toleranz gegenüber der Darmflora erklärt [40]. Beide Sachverhalte zusammengenommen belegen zum einen eine Redundanz der von TLR2- und NOD1- ausgelöster Reaktionen, zum anderen bieten sie eine Erklärung für die erhöhte NOD1-Expression durch den Ausgleich in der Reaktivität auf invasive Pathogene bei fehlender TLR2-Funktionalität.

Die Expression NOD2-spezifischer mRNA war in murinen Prädipozyten deutlich schwächer ausgeprägt als in den untersuchten Makrophagen, ließ sich aber mittels der semiquantitativen PCR bestätigen (Abb. 23). Die Analyse der Expression von NOD1 und NOD2 auf Proteinebene wurden mittels Western Blot und NOD1/2-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Abweichend von der Transkriptebene konnte NOD1 auch in Lysaten der Zelllinie 3T3L1 dargestellt werden (Abb. 24). Die höhere Expression von NOD1-spezifischer mRNA in TLR2/4^{-/-}-Prädipozyten spiegelte sich auch auf Proteinebene durch eine erhöhte Menge an NOD1-Protein im Vergleich zu den in WT-Prädipozyten gefundenen NOD1-Konzentrationen wider. Analog zu NOD1 finden sich auf Proteinebene nachweisbare Mengen von NOD2 in allen untersuchten Proben. Da für NOD2 nur eine schwache basale Expression auf Transkriptebene nachgewiesen wurde, war die deutliche Darstellung von NOD2 im Western Blot unerwartet und lieferte Hinweise auf eine induzierbare, transiente Expression von NOD2-spezifischer mRNA. Hieraus leitete sich die Frage nach einer Modulation der Expression von NOD1 und NOD2 ab. Da das transmurale Entzündungsgeschehen im Verlauf eines Morbus Crohn oft mit einer bakterieller Translokation in das umliegende Gewebe einher geht [25, 59, 68], stellten sowohl die spezifische Stimulation von NOD1 und NOD2 als auch die Nachahmung eines proinflammatorisches Milieu Möglichkeiten dar, die Expression dieser Proteine zu modulieren.

4.3 Modulation der Expressionshöhe von NOD1 und NOD2 durch exogene und endogene Faktoren in primären Präadipozyten aus dem mesenterialen Fett

Im Falle von NOD1 konnten Studien bereits zeigen, dass in Epithelzellen die Expression von NOD1 durch proinflammatorisches Interferon (IFN)- γ hochreguliert werden kann. Dieser Effekt erklärt sich über eine Bindungsstelle für den *Interferon Regulatory Factor* (IRF)1 in dem Promotor des Genes, das für NOD1 kodiert [123]. Die Expression von IRF-1 wiederum ist durch IFN- γ , IL-1 β , IL-6 und TNF- α induzierbar [124]. Des Weiteren verfügt der Promotor des Genes, das IRF-1 kodiert, über eine Bindungsstelle für NF- κ B [125]. Arbeiten zu der Induzierbarkeit der Expression von IRF-1 an Langerhans-Insel-Zellen zeigen dagegen aber geringe Effekte von NF- κ B-aktivierendem IL-1 β auf die Expression von IRF-1 [126], was gewebsspezifische Unterschiede in der Wirkung von IL-1 β auf die Expression von IRF-1 nahelegt.

Murine WT-Präadipozyten, die mit dem spezifischen NOD1-Liganden LT-DAP inkubiert worden waren, zeigten im betrachteten Zeitraum keine signifikante Erhöhung der Expression NOD1-spezifischer mRNA (Tabelle 3). Ein vergleichbares Ergebnis wurde nach Inkubation mit dem NOD2-spezifischen Liganden MDP erhalten. Eine geringfügige Expressionssteigerung konnte durch die Inkubation mit IL-1 β und TNF- α gefunden werden, was sich durch die Induzierbarkeit von IRF-1 durch diese Zytokine erklären ließ und durch Studien bestätigt wird, die ebenfalls eine nur geringe Änderung der Expressionshöhe NOD1-spezifischer mRNA durch die verwendeten Zytokine beschreiben [123]. Eine deutlichere Expressionssteigerung NOD1-spezifischer mRNA konnte nach Inkubation mit dem TLR4-Liganden Lipopolysaccharid (LPS) beobachtet werden und lässt sich damit erklären, dass es durch LPS zu einer TLR4-abhängigen Aktivierung von NF- κ B kommt [24, 127]. IRF-1 wiederum wird durch NF- κ B induziert und interagiert mit dem *Myeloid differentiation primary response gene* (MyD)88, dem zentralen Adaptermolekül in der TLR-Signaltransduktionskette, um so in den Zellkern zu gelangen und dort als Transkriptionsfaktor für NOD1 wirkt [128].

Welche Aussage lassen sich durch die erhaltenen Ergebnisse der Expression von NOD1 auf Transkriptebene für eine mögliche Beteiligung von NOD1 in Präadipozyten bei der intestinalen Entzündung treffen? Es finden sich in der Darmwand von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöhte Konzentrationen von IL-1 β und TNF- α sowie von IFN- γ [129, 130]. Insbesondere IFN- γ wird von aktivierten Th1-Zellen im Verlauf einer Th1-induzierten Immunantwort gebildet und kann so zu einer starken Expressionssteigerung des intrazellulären *Pattern Recognition*-Rezeptors NOD1

beitragen, wodurch die Abwehr intrazellulärer Pathogene durch eine verstärkte Aktivierung von NF- κ B in Präadipozyten unterstützt werden würde.

Im Unterschied zu der Promotorregion des NOD1-kodierenden Genes besitzt die Promotorregion des NOD2-kodierenden Genes Bindungsstellen für NF- κ B, sodass eine Aktivierung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges zu einer Expressionssteigerung von NOD2-spezifischer mRNA führt [131]. Analog zu den Experimenten zur Expression von NOD1, wurden Auswirkungen einer Inkubation mit spezifischen Liganden von NOD1 und NOD2 sowie proinflammatorischer Zytokine auf die Expression NOD2-spezifischer mRNA in murinen Präadipozyten in einer zeitabhängigen Kinetik analysiert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der NOD1-Expression führte eine Inkubation mit dem spezifischen Ligand von NOD1 zu einer signifikanten Expressionssteigerung NOD2-spezifischer mRNA. Da eine Stimulation von NOD1 zu einer Aktivierung von NF- κ B führt [51] und dies durch eigene Ergebnisse bestätigt werden konnte (Abb. 29), wird vom Autor in dieser NF- κ B-Aktivierung der Grund für die Expressionssteigerung von NOD2-spezifischer mRNA gesehen. Eine Inkubation muriner Präadipozyten mit dem Liganden von NOD2 führte dagegen zu keiner signifikanten Expressionssteigerung an NOD2-spezifischer mRNA (Abb. 25). Die deutlichste Zunahme an NOD2-spezifischer mRNA konnte in der vorliegenden Arbeit nach Inkubation mit dem TLR4-Liganden LPS gezeigt werden. Die Bindung von LPS durch TLR4 führt zu einer Aktivierung von NF- κ B [24, 127], wodurch wiederum der Promotor des NOD2-kodierenden Genes aktiviert wird. Die verwendeten proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α stellen Aktivatoren des NF- κ B-Signaltransduktionsweges dar [132, 133] und wirkten so über die Aktivierung von NF- κ B fördernd auf die Expression NOD2-spezifischer mRNA. Die Expressionssteigerung stellte sich dabei als transientes Ereignis dar, mit einer starken Ausprägung nach 4 h Inkubation mit den jeweiligen Liganden. Bereits nach 8 h war das Ausgangsniveau wieder erreicht, obgleich die Liganden über die ganze Zeit anwesend gewesen waren. Die Daten dieser Kinetik legen den Schluss nahe, dass es sich bei der NOD2-spezifischen mRNA um eine sogenannte *short-lived* RNA handelte, deren Halbwertszeiten unter 2 h betragen [134].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten zum einen, dass die Expression NOD2-spezifischer mRNA unter nachgeahmten Bedingungen einer intestinalen Entzündung gesteigert war, zum anderen erklären sie die Diskrepanz, wie sie zwischen der nur sehr geringen basalen Expression und der deutlichen Darstellung von NOD2 auf Proteinebene gezeigt werden konnte, mit der Kurzlebigkeit der NOD2-mRNA. Weiterführende Experimente müssten klären, inwiefern die nur kurze Induktion der Expression der NOD2-spezifischen mRNA einen aktiven Regulationsmechanismus

darstellt, der eine permanente Hochregulation von NOD2 verhindert. Die biologische Relevanz dieses Mechanismus wäre in der Verhinderung einer fortwährenden Aktivierung von NF- κ B durch NOD2 zu sehen. Hinweise auf eine mögliche aktive Regulation liefert die indizierbare Toleranz gegenüber Liganden von TLRs, deren biologischer Relevanz in der Verhinderung einer überschießenden Entzündungsreaktion gesehen wird [135]. Ein weiteres Beispiel stellt die Regulation der Expression des IL-6-Rezeptors bei Kupffer Zellen dar. Eine Rezeptor-spezifische Stimulation führt zu einer Verminderung der Expression des IL-6-Rezeptors und wird durch eine autokrine Rückkopplung von IL-6 auf die IL6-Rezeptor-Expression erklärt [136].

Die Charakterisierung der Funktionalität der *Pattern Recognition*-Rezeptoren NOD1 und NOD2 erfolgte anhand des Nachweises einer Zytokinproduktion nach Inkubation mit spezifischen Liganden. Als Zytokin wurde IL-6 gewählt, da es frühzeitig in Verlauf einer Entzündungsreaktionen gebildet wird [137]. Seine Funktion besteht u.a. in der Induktion von Akut-Phase-Proteinen in der Leber [138]. IL-6 wird oft in Verbindung mit IL-1 und TNF- α gebildet. IL-6-defiziente Tieren zeigten in diesem Kontext erhöhte Konzentrationen an IL-1 und TNF- α , wodurch IL-6 auch antiinflammatorische Funktionen zugesprochen werden [139]. Aufgrund der Tatsache, dass sich NOD1-defiziente Mäuse als empfänglicher für Infektionen mit *Helicobacter pylori* erwiesen [33], wird vom Autor der vorliegenden Arbeit der Standpunkt einer proinflammatorischen Rolle der NOD1-induzierten IL-6-Produktion vertreten.

Wichtigste Voraussetzung für eine NOD1-spezifische Stimulation der Präadipozyten war der Nachweis der Spezifität des verwendeten Liganden LT-DAP. Der Beweis einer Beteiligung eines putativen Rezeptors an einer Signaltransduktionskette kann entweder durch eine Überexpression des Rezeptors oder aber durch eine gezielte Verminderung seiner Expression erfolgen. Nachteile einer Überexpression sind in der Gefahr der Auslösung wirtsabhängiger Reaktionen auf den eingeschleusten Vektor und in möglichen Verunreinigungen der Vektorpräparation zu sehen [140]. Da keine NOD1-defizienten murinen Präadipozyten zur Verfügung standen, erfolgte der Nachweis der NOD1-Spezifität von LT-DAP an WT-Präadipozyten, bei denen die NOD1-Expression mittels der Technik der RNA-Interferenz vermindert wurde. Diese Technik setzt kurze, doppelsträngige RNA-Moleküle ein, deren Sequenz homolog zum jeweiligen Ziel-Transkript ist und zu einer Degradation des Komplexes aus eingefügter RNA und des Transkriptes des stumm zu schaltenden Genes führt [141, 142].

Bei einer vergleichbaren Produktion von IL-6 in Gegenwart von LPS, war die Konzentration an IL-6 bei WT-Präadipozyten signifikant vermindert, deren NOD1-mRNA-

Expression mittels RNA-Interferenz um bis zu 70 % vermindert war (Abb. 27 und Tabelle 4). Dies wurde als Beweis der NOD1-Spezifität von LT-DAP betrachtet.

In Gegenwart des NOD1-spezifischen Liganden LT-DAP wurde eine deutliche IL-6-Produktion im Kulturüberstand primärer muriner Präadipozyten mittels ELISA bestimmt (Abb. 26). Dass diese IL-6-Produktion nicht durch mögliche Verunreinigungen des LT-DAP mit LPS herrührte, das durch TLR4-Aktivierung ebenfalls zu einer signifikanten IL-6-Produktion führte, wurde durch eine signifikante IL-6-Produktion in TLR2/4^{-/-}-Präadipozyten in Gegenwart von LT-DAP ausgeschlossen. Die höheren gemessenen IL-6-Konzentrationen in den Überständen von LT-DAP-stimulierten TLR2/4^{-/-}-Präadipozyten erklären sich höchstwahrscheinlich aus der höheren NOD1-Expression in diesen Zellen, die sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene gezeigt werden konnte (Abb. 23 und 24).

Der NOD2-spezifische Ligand MDP führte in keinem Experiment zu einer detektierbaren IL-6-Produktion. Mögliche Ursachen sind in der nur geringen Expression von NOD2 in murinen Präadipozyten zu sehen. Eine weitere Erklärung bietet die Tatsache, dass es sich bei NOD2 um einen zytoplasmatisch-lokalisierten Rezeptor handelt, der prozessierte bakterielle Abbauprodukte erkennt. So konnte an primären humanen Makrophagen erst eine Reaktion auf MDP gefunden werden, als dieses mittels Mikroinjektion in die Zellen eingebracht wurde [31]. Durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse konnte aber ein synergistischer Effekt bei einer gleichzeitigen Inkubation von aus Vorläuferzellen generierten murinen Makrophagen mit MDP und dem TLR4-Liganden LPS auf die Zytokinantwort bestätigt werden, was die Funktionalität des verwendeten MDP belegte (Abb. 30). Der zugrunde liegende Mechanismus des Synergismus von MDP und LPS wird in einer MDP-induzierten Expressionssteigerung von MyD88 und damit verbunden gesteigertem TLR-signaling gesehen [143, 144].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten die konstitutive Expression funktionaler NOD1-Rezeptoren durch murine primäre Präadipozyten zeigen. Mittels *Knock-down*-Studien wurde LT-DAP als spezifischer Ligand von NOD1 in Präadipozyten identifiziert, der eine IL-6-Produktion in diesen Zellen auslöste. Dagegen war die Expression von NOD2 deutlich schwächer ausgeprägt, konnte aber insbesondere in einem proinflammatorischen Milieu als transientes Ereignis gezeigt werden, während die Bedeutung einer Expression von NOD2 in Präadipozyten aber unklar blieb.

4.4 Effiziente Transfektion primäre Präadipozyten aus dem mesenterialen Fett der Maus mit *Small Interfering* (si)RNA und Vektor- bzw. Reporterkonstrukten

Ein kritischer Punkt für die Untersuchung der unmittelbaren Funktion eines Genproduktes auf Einzelzellniveau ist, dass die Expression des zu untersuchenden Gens in jeder Zelle effizient unterdrückt werden muss. Transfektionsmethoden, die auf dem Anlegen eines elektrischen Feldes an die zu transfizierenden Zellen basieren, stellen eine sehr effiziente und reproduzierbare Methode für die Transfektion eukaryontischer Zellen dar und beruhen auf dem Prinzip der strominduzierten, reversiblen Bildung wässriger Poren in der Plasmamembran, was als Elektroporation bezeichnet wird [63, 145]. Für die während der Elektroporation entstehenden Poren liefert das Modell nach *Zimmermann* eine plausible Erklärung [146]. Dieses Modell geht von der Annahme aus, dass sich die Zellmembran, aufgrund ihrer isolierenden Eigenschaften, wie ein technischer Kondensator verhält. Die Lipidphase entspricht dem Dielektrikum und die wässrige Phase auf beiden Seiten der Membran den Platten des Kondensators. Wird eine Zelle in ein äußeres elektrisches Feld gebracht, so findet an der Zellmembran eine Ladungstrennung statt und der Kondensator lädt sich auf. Durch diese Ladungstrennung beiderseits der Membran kommt es zur Anziehung der entgegengesetzten Ladungen, wodurch die Membran komprimiert wird. Bis zu einer bestimmten Schwellenspannung kann die Membran auf Grund ihrer elastischen Rückstellkräfte diesen elektromechanischen Druck kompensieren. Überschreitet jedoch die über der Membran abfallende Spannung einen kritischen Wert, so ist die Kompressionskraft so stark, dass sie die Membran durchbricht und die Zellmembran leitend wird. Die während der Elektroporation entstehenden Poren sind dabei nicht gleichmäßig über die gesamte Zelloberfläche verteilt. Vielmehr unterscheiden sich Bereiche auf der Membran in den Bedingungen, bei denen eine Porenbildung stattfindet. Sind Poren in der Plasmamembran gebildet, wird der für die Elektroporation benötigte Unterschied im elektrischen Potential zwischen Zytosol und umgebenden Medium stark vermindert, was die Ausbildung weiterer Poren behindert und der anliegende Strom zytotoxisch wirkt [147, 148]. Die für eine effiziente Transfektion erforderlichen Eigenschaften des elektrischen Feldes und der Pufferbedingungen stehen somit in einem engen Zusammenhang mit der Physiologie der zu transfizierenden Zellen.

Die Ergebnisse der Transfektionsstudien mit einer NOD1-spezifischen siRNA sowie dem NF- κ B-Reportplasmid belegten eine Transfizierbarkeit von murinen Präadipozyten mittels einzelner Rechteckimpulse (Abb. 29 und Tabelle 4), zeigten im Falle der Transfektion in Gegenwart der NOD1-spezifischen siRNAs aber auch, dass die erreichte

Hemmung der Expression NOD1-spezifischer mRNA nicht durch die Menge an eingesetzter siRNA begrenzt war, sondern die verwendeten elektrischen Parameter hierbei limitierend gewirkt haben müssen. Im Falle der Transfektion von siRNA stellt die Anzahl transfizierter Moleküle den limitierenden Faktor für einen langanhaltenden *Gen-Knock-down* dar, woraus sich die Fragestellung nach elektrischen Parametern ableitete, die eine gesteigerte Transfektionseffizienz bei gleichzeitig hoher Vitalität der transfizierten Zellen ermöglichte.

Für die Optimierung der Transfektion eukaryontischer Zellen wurde ein neuartiges Elektroporationssystem vom Autor entwickelt, das auf einer unterbrechungsfreien Kombination zweier Rechteckimpulse basiert, die sich in Amplitude und Länge unterscheiden und bei dem für jeden Impuls die elektrischen Bedingungen frei gewählt werden können (Abb. 4). Durchgeführte Studien, die sich mit der Transfektion mittels Kombination zweier Rechteckimpulse befassten, belegten eine höhere Transfektionseffizienz nur in Verbindung mit suboptimalen DNA-Mengen im Vergleich zu einer Transfektion mittels eines einfachen Impulses, doch folgten bei diesen Studien die verwendeten Impulse nicht unterbrechungsfrei aufeinander, sondern in einem Abstand von 100 μ s bis 20 ms [67, 149].

Bei der technischen Realisierung des ELPorator 1000-Systems erwiesen sich Kapazitäten der ladungsspeichernden Kondensatorbänken von 110 μ F für das *High Voltage* (HV)-Modul und 960 μ F für das *Low Voltage* (LV)-Modul in Kombination mit der Leitfähigkeit des verwendeten Phosphatpuffer als geeignet, eine gleichbleibende Entladung zu erzielen. Die maximal im HV-Modul gespeicherte Energie betrug bei maximaler Ladung der Kondensatoren 55 Joule, während das LV-Modul maximal 58,8 Joule an Energie speichern konnte. Zum Vergleich beträgt die während einer medizinischen Defibrillation mittels eines monophasischen Impuls an den Patienten abgegebene Energiemenge 360 Joule [150].

Rechteckimpulse konnten durch das aktive Beenden der Entladung erhalten werden (Abb. 8 und 9). Eine für diesen Zweck geeignete technische Anordnung musste zum einen über eine hohe Sperrspannung verfügen, durch die die maximale Impulshöhe vorgegeben wurde, zum anderen Ströme im zweistelligen Amperebereich schalten können, die während einer typischen Elektroporation mittels Oszillosgraphen gemessen werden konnten (Abb. 10). Eine weitere Anforderung an diese technische Anordnung war eine hohe Geschwindigkeit, mit der sie leitend und auch wieder sperrend geschaltet werden konnte. Mechanische Schalter, wie z.B. Relais, weisen Schaltzeiten im Bereich von Millisekunden auf und waren deshalb ungeeignet. Thyristoren, wie sie z.B. in der Motorsteuerung von Waschmaschinen hohe Ströme regulieren, eignen sich nur für

exponentiell abnehmende Impulse, da sie nicht aktiv abschaltbar sind, sondern erst bei Wegfall der Versorgungsspannung, wie z.B. beim Nulldurchgang des Wechselstromes, erneut sperren. Ein Bauteil, das alle gestellten Bedingungen erfüllte, war ein *Insulated Gate Bipolar Transistor* (IGBT), der mithilfe eines Treiberbausteines angesteuert wurde und Spannungen bis 1200 V und Ströme von bis zu 104 A schalten konnte (<http://www.datasheetcatalog.org/datasheet/siemens/BUP314.pdf> (21.01.2010)). IGBTs stellen eine Weiterentwicklung des klassischen Transistors hin zu einem Bauteil der Leistungselektronik dar [151]. Das vom Autor entwickelte Elektroporationssystem ELPorator 1000 löst die Aufgabe der Erzeugung unterbrechungsfrei aufeinanderfolgender Rechteckimpulse durch seinen modularen Aufbau und dem Einsatz von programmierbaren Mikrocontrollern. Am Ende des HV-Impulses gibt der Mikrocontroller des HV-Moduls ein Steuersignal an das LV-Modul aus, woraufhin dieses den LV-Impuls startet.

Um Aussagen über die Effektivität des entwickelten Systems bewerten zu können, erfolgte ein direkter Vergleich dieser neu entwickelten Transfektionsmethode mit der Methode der Nucleofection, die in der Literatur als sehr effektive Transfektionsmethode beschrieben wird [152-155]. Die Nucleofection beruht auf einer Kombination von nicht näher charakterisierter Elektroporationsbedingungen und spezifischen Puffersystemen, die sich nach dem zu transfizierenden Zelltyp richten. Der direkte Vergleich der Transfektionseffizienzen von Präadipozyten mit einem EGFP-kodierenden Plasmid belegte eine signifikant höhere Transfektionseffizienz des ELPorator 1000-Systems als die Methode der Nucleofection bei vergleichbarer Vitalität der Zellen (Abb. 12). Es zeigte sich bei der Transfektion muriner Präadipozyten mit einem einfachen LV-Impuls bereits eine sehr hohe Transfektionseffizienz, die durch Kombination des LV-Impulses mit einem vorgeschalteten HV-Impuls nicht signifikant gesteigert werden konnte (Abb. 13). Die Kombination beider Impulse führte aber zu einer etwa doppelt so hohen Expression des EGFP, als sie nach Transfektion mit einem einzelnen HV-Impuls beobachtet werden konnte. Erklären ließ sich dieser Sachverhalt mit der Menge an eingeschleuster Nukleinsäure. In der Literatur konnte bereits ein direkter Zusammenhang zwischen der Menge eingeschleuster GFP-kodierender Plasmide und der Expression des GFP bei HeLa-Zellen gezeigt werden [156]. Durch die während der Elektroporation entstandenen Poren können Moleküle durch den Prozess der Diffusion, der Elektrophorese und der Elektroosmose in die Zelle gelangen [157]. Für Makromoleküle, wie z.B. DNA, konnte die Elektrophorese als der entscheidende Prozess für den Eintritt in die Zelle identifiziert werden [67], während kleine Moleküle passiv mittels Diffusion in die Zelle gelangen können [158]. Das Konzept der Effizienzsteigerung des ELPorator 1000-Systems kann

mit der Bereitstellung von optimalen elektrischen Parametern für die Teilprozesse Porenbildung und Stofftransport während einer Transfektion erklärt werden. Ein einzelner HV-Impuls permeabilisiert die Zellmembran stärker als ein LV-Impuls, führt aber aufgrund seines kurzen Anliegens nur zu einer vergleichsweise geringen Einschleusung von Nukleinsäure durch den Prozess der elektrophoretische Wanderung der Nukleinsäuren in die Zelle. Der LV-Impuls dagegen ist weniger effektiv in der Erzeugung von Poren in der Zellmembran. Aufgrund seiner geringeren Amplitude wirkt er weniger zytotoxisch und kann deshalb in seiner Länge ausgedehnt werden und führte so zu einer ausgeprägteren elektrophoretischen Wanderung der Nukleinsäure, so dass annähernd jede Zelle transfiziert wurde. Eine weitere Untermauerung dieses Konzeptes lieferten Experimente zur Rolle der eingesetzten Konzentrationen der Nukleinsäuren auf die Anzahl transfizierter Zellen und die Expressionshöhe der eingeschleusten Nukleinsäure. Höhere Nukleinsäure-Konzentrationen, in Kombination mit einem einfachen HV-Impuls, führten zu einer nur geringen Erhöhung der Anzahl transfizierter Zellen und zu keiner deutlichen Steigerung der Expression der eingeschleusten Nukleinsäure (Abb. 14). Dagegen führte die Impulskombination zu einer starken Zunahme der Expression der eingeschleusten Nukleinsäure und zu einer nahezu quantitativen Transfektion der eingesetzten murinen Präadipozyten.

Experimente zur Transfektion von Suspensionszellen zeigten am Beispiel humaner PBMCs auf, dass diese Zellen hinsichtlich der Anzahl transfizierter Zellen weit weniger stark von einer Impulskombination profitierten als die untersuchten adhärent wachsenden Präadipozyten. Bei PBMCs lieferte eine Transfektion mit einem HV-Impuls eine vergleichbare Anzahl transfizierter Zellen, wie sie durch Transfektion mit einer HV/LV-Impulskombination erhalten werden konnte. Die Impulskombination führte aber wiederum zu einer erhöhten Expression der eingeschleusten Nukleinsäure (Abb. 16). Diese Ergebnisse ließen sich auch auf verschiedene Suspensions-Zelllinien übertragen, einzig bei der Zelllinie U937 führte die HV/LV-Impulskombination zu einer höheren Anzahl transfizierter Zellen, als nach Transfektion mit einem einzelnen HV-Impuls (Abb. 15). Bedenkt man die Notwendigkeit für die Expression einer eingeschleusten Nukleinsäure in den Zellkern zu gelangen, so erklärt sich der beobachtete Unterschied zwischen adhärent wachsenden Zellen und Suspensionszellen mit dem Kern:Zytoplasma-Verhältnis der jeweiligen Zellen. Bei Zellen mit einem hohen Zytoplasmaanteil mußte die eingeschleuste Nukleinsäure einen weiteren Weg bis in den Kern zurücklegen als bei Zellen mit einem vergleichsweise großem Kern und wenig Zytoplasma und profitierte deshalb von einem längeren Impuls. Bei Zellen mit wenig Zytoplasma, wie z.B. den verwendeten Suspensionszellen, reicht die Länge des HV-

Impulses aus, die Nukleinsäure bis in den Kern wandern zu lassen. Eine Impulskombination erhöhte zwar signifikant die Menge an eingeschleuster Nukleinsäure nicht jedoch die Anzahl transfizierter Zellen.

Einen Beweis, dass die höheren Expressionsraten, wie sie mit einer HV/LV-Impulskombination erhalten wurden, auf einer höheren Aufnahme von Nukleinsäuren und nicht auf eine veränderte Promotorstärke des verwendeten Vektors zurückzuführen waren, stellten die Transfektionsexperimente muriner Präadipozyten in Gegenwart einer Fluoreszenz-markierten siRNA dar. Transfektion in Gegenwart dieser markierten siRNA mittels einer HV/LV-Strategie führten zu einer deutlich gesteigerten Fluoreszenzaufnahme der Präadipozyten, als sie nach Transfektion mit einem einzelnen HV-Impuls beobachtet werden konnte (Abb. 17B). Diese höhere Aufnahme an siRNA spiegelte sich auch auf funktioneller Ebene durch einen deutlich länger anhaltenden *Knock-down*, bei gleichbleibender Reaktion auf TLR-Liganden, wider (Abb. 17A).

Das Elektroporationssystem ELPorator 1000 ermöglicht somit nicht nur eine hocheffiziente und zellschonende Transfektion eukaryontischer Zellen unter Verwendung eines kostengünstigen Phosphatpuffers, sondern bietet auch die Möglichkeit, die Anzahl an transfizierten Molekülen zu modulieren. Möglich wird dies durch den modularen Aufbau des Systems. Dieser modulare Aufbau ermöglicht es dem Anwender die elektrischen Parameter für die initiale Porenbildung und den sich anschließenden elektrophoretischen Stofftransport in die Zelle optimal auf die Physiologie der zu transfizierenden Zellen abzustimmen.

4.5 Charakterisierung des durch die Interaktion von NOD1 mit spezifischen Liganden in Präadipozyten rekrutierten Signaltransduktionsweges

Neben der Modulation der Expression mittels siRNA lässt sich eine effiziente Transfektionsmethode ebenfalls für die Aufklärung des von einem Rezeptor ausgelösten Signaltransduktionsweg einsetzen. Ein Signaltransduktionsweg lässt sich neben Verwendung spezifischer Inhibitoren des vermuteten Signaltransduktionsweges anhand von Reportersystemen beschreiben, die durch Reaktionen im Verlauf der Signaltransduktion aktiviert werden und ihre Aktivierung über den Reporter nachweisbar machen. Obgleich mehrerer Studien eine NOD1-abhängige Aktivierung von NF- κ B [37, 159] zeigten, vertritt eine im Jahr 2010 erschienene Studie die Meinung einer Aktivierung des *IFN-stimulated gene factor 3* (ISGF3) Signaltransduktionsweges bei nur geringer Aktivierung von NF- κ B in mukosalen Epithelzellen durch NOD1. Die biologische

Relevanz eines gegenüber NF- κ B dominanten ISGF3 Signaltransduktionsweges wird in der Induktion von INF- α gesehen, das zu einer Immunantwort gegen *H. pylori* beiträgt [160, 161]. Für die Beantwortung der Frage nach dem durch NOD1 in murinen Präadipozyten ausgelösten Signaltransduktionsweg wurde in der vorliegenden Arbeit eine Hitzeschockprotein (HSP)90-abhängige IL-6 Produktion gezeigt. Die durch den NOD1-Liganden LT-DAP ausgelöste IL-6-Produktion konnte durch einen Inhibitor von HSP90 signifikant vermindert werden (Abb 28). Bei HSP90 handelt es sich um ein zytoplasmatisches Protein, das unter Stressbedingungen verstärkt gebildet und deshalb als Hitzeschockprotein bezeichnet wird. HSP90 zeichnet als molekulares Chaperon verantwortlich für die Faltung und Aktivierung vieler Substratproteine, wie z.B. dem *NF-kappaB-inducing kinase* (NIK)-Protein, das für die Prozessierung von NF- κ B2 p100 und damit für die Aktivierung von NF- κ B verantwortlich ist [162]. Eine Hemmung von HSP90 ließ sich durch 17-DMAG erreichen, ein Analogon des Antibiotikums Geldanamycins, das selektiv die ATPase-Aktivität von HSP90 hemmt und zu einer Verarmung von IKK α , IKK β und IKK γ führt [163, 164]. Die Ergebnisse dieser Experimente gaben Hinweise auf eine NF- κ B-Aktivierung durch Aktivierung des NOD1-Rezeptors.

Einen weiteren Beweis der NF- κ B-Aktivierung mittels NOD1 stellten die Experimente mit einem NF- κ B-Reporterplasmid dar. Dieses Plasmid verfügte über mehrere Kopien der NF- κ B-Konsensussequenz, die an die TATA-Region des Promotors des *Herpes simplex* Virus fusioniert wurden und nach Aktivierung zur Expression des Enzyms Luciferase führte. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten eine signifikante NF- κ B-Aktivierung sowohl in primären murinen Präadipozyten als auch in der Zelllinie 3T3L1 nach Inkubation mit dem NOD1-spezifischen Liganden LT-DAP (Abb. 29). Auf den ersten Blick standen die für die Zelllinie 3T3L1 erhaltenen Ergebnisse im Widerspruch zu den für diese Zellen erhaltenen Daten der Zytokinproduktion nach Inkubation mit dem NOD1-spezifischen Liganden LT-DAP, erklären sich aber aus der hohen Sensitivität des Luciferase-basierten Testsystem [107]. Die aus beiden Experimenten erhaltenen Ergebnisse bestätigten zum einen die für NOD1 in artifiziellen Systemen mit NOD1-überexprimierenden HEK293T-Zellen beschriebene Aktivierung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges [57] an primären murinen Präadipozyten und zeigten zum anderen, dass die durch den NOD1-Liganden LT-DAP ausgelöste IL-6-Produktion HSP90- und damit NF- κ B-abhängig war.

Der NOD2-Ligand MDP löste dagegen in keiner der untersuchten Zellen eine messbare NF- κ B-Aktivierung aus und bestätigt damit die Ergebnisse der Messungen der Zytokinantworten (Abb. 26 und 29). Studien zu einer NF- κ B-Aktivierung durch NOD2

zeigten eine deutlich gesteigerte NF- κ B-Aktivierung durch NOD2, wenn dieses entweder überexprimiert [31] oder aber mit den für Morbus Crohn assoziierten Polymorphismen vorlag [165, 166]. Erklären ließe sich die nicht nachweisbare NF- κ B-Aktivierung durch NOD2 in murinen Präadipozyten mit der ohnehin schwachen Expression von Wildtyp-NOD2 durch diese Zellen (Abb. 23).

4.6 Nachweis der direkten Bindung von Muramyldipeptid durch NOD2

Neben der Expression der Rezeptoren und deren Modulation in murinen Präadipozyten durch das umgebende Milieu, ist der direkte Nachweis einer molekularen Interaktion für das weitere Verständnis von NOD1 und NOD2 von großer Bedeutung. Die Charakterisierung von Strukturen, die mit NOD2 interagieren, beruht zum größten Teil auf Überexpressionsstudien in artifiziellen Systemen. Auf diese Weise wurde in MDP ein Molekül gefunden, dass in Verbindung mit NOD2 eine Aktivierung von NF- κ B auslöst [31]. Der Beweis einer direkten Bindung von MDP durch NOD2 ist bis zum heutigen Tag in der Literatur nicht erbracht. Zum Teil widersprüchliche Ergebnisse aus Studien an NOD2-defizienten Tieren und *in vitro* Versuchen werden in der Literatur auch mit den verwendeten Präparationen des NOD2-Liganden MDP diskutiert [167]. So konnte gezeigt werden, dass eine NOD2-Defizienz zu einer verstärkten TLR2-abhängigen NF- κ B-Aktivierung mit daraus resultierender Hochregulation von Th1 Zytokinen, wie IL-12 und IFN- γ , führte [168], während *in vitro* Studien eine verminderte NF- κ B-Aktivierung bei fehlender NOD2-Expression aufzeigten [169]. Weitere Studien an NOD2-defizienten Mäusen zeigten eine höhere Empfindlichkeit lediglich gegenüber oralen bakteriellen Infektionen auf, wobei NOD2 für die Induktion der Expression von Cryptidinen, einer Gruppe anti-mikrobieller Peptide, essentiell ist [38]. Dies bestätigt den Befund einer gestörten α -Defensin-Produktion bei Patienten mit Morbus Crohn assoziierten Polymorphismen im NOD2-kodierenden Gen [170].

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Methode entwickelt werden, die es erlaubte, die Bindung von Liganden durch NOD2 zu untersuchen. Diese Methode nutzte die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie und kommt anders als ein *Scatchard plot* ohne radioaktive Markierung eines der Bindungspartner aus [171, 172]. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Darstellung der Bindungscharakteristik in Echtzeit und der Möglichkeit die Bindung von niedermolekularen Analyten (<500 Da) an Liganden nachzuweisen. Analysen mit einem auf einem Western Blot beruhenden Testsystem würden dagegen voraussetzen, dass die zu untersuchende Interaktion durch die

elektrophoretische Auftrennung erhalten bleibt und ein hinreichend großer Komplex entsteht, dessen verminderte Mobilität gegenüber eines ungebundenen Moleküls im Blot erkannt werden kann. Aus diesen Gründen wurde für die Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien die Methode der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie gewählt. Die notwendige Immobilisation eines Bindungspartners setzte dabei die rekombinante Herstellung von NOD2 voraus.

Eine rekombinante Expression von NOD2 im prokaryontischen System war nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt), so dass ein eukaryontischer Zellklon etabliert wurde, der nach der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Elektroporation über eine Antibiotikumresistenz stabilisiert wurde. Da dieser Zellklon durch Transfektion mittels eines ringförmig geschlossenen Plasmid erhalten wurde, ist von einem episomal Vorliegen der eingeschleusten Nukleinsäure auszugehen. Die Anzahl der NOD2-spezifischen mRNA war in diesem Klon mit ca. 430 Kopien je Zelle (Abb. 35) etwa zwei Größenordnungen höher als die basale NOD2-Expression in murinen Makrophagen (Abb. 23). Eine Aufreinigung des NOD2-EGFP-Fusionsproteins war aufgrund einer Komplexbildung nach Kontakt mit kohlenhydrat-basierten Matrices, wie sie für die Affinitätschromatographie oder die Größenausschlusschromatographie Anwendung finden, nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Die notwendige Immobilisation auf dem Sensorchip erfolgte demzufolge über einen immobilisierten anti-EGFP-Antikörper, der spezifisch NOD2-EGFP aus einem Gesamtlysat aus NOD2-EGFP-exprimierenden Zellen band. Die Immobilisation über einen Protein-*Tag* ist zuvor schon erfolgreich bei der Oberflächen-Plasmon-Spektroskopie, z.B. für biotinylierte Substanzen und die Glutathion-S-Transferase, eingesetzt worden [173-175]. Ebenfalls hat sich diese Methode bereits für Interaktionsstudien von Molekülen mit einem Molekulargewicht von <500 Da als ebenso geeignet erwiesen [174, 175], wie für schwache Interaktionen zwischen Antikörpern und Kohlenhydraten [176] oder Interaktionen zwischen Lektinen und Kohlenhydraten [177]. Vorteile dieser Art der Immobilisation wurden in der Regenerierbarkeit des Sensorchips gesehen. Bei unbekannter Rezeptor-Ligand-Interaktion muss die notwendige Regeneriermethode empirisch ermittelt werden, was gleichzeitig die Gefahr der irreversiblen Denaturierung des Rezeptors zu Folge haben kann [178]. Bei dem etablierten Testsystem konnte durch Änderung des pH die Antigen-Antikörper-Bindung gelöst werden und der Sensorchip anschließend mit nativem Rezeptor regeneriert werden.

Mithilfe des in dieser Arbeit etablierten Testsystemes konnte eine Bindung von MDP sowohl in seiner DL-Form als auch in seiner DD-Form gezeigt werden (Abb. 37B). Bei diesen beiden Formen des MDP handelt es sich um Isomere, von denen nur die DL-

Form als NOD2-Ligand beschrieben wird, während Inkubationen mit der DD-Form zu keiner Zytokinproduktion in NOD2-überexprimierenden HEK293T-Zellen führte [31]. Die ausbleibende Zytokinproduktion nach Inkubation mit MDP in der DD-Form konnte in dieser Arbeit an humanen PBMC bestätigt werden (Abb. 37C). Der für NOD1 spezifische Ligand iE-DAP zeigte dagegen eine nur sehr geringe Bindung durch NOD2 (Abb. 39). Ein Ligand, der die notwendigen Strukturmerkmale sowohl für die Interaktion mit NOD1 als auch mit NOD2 aufwies, stellte das M-Tri_{DAP} dar. Dieses M-Tri_{DAP} zeigte eine deutliche Bindung durch NOD2 (Abb. 40). Die Liganden lagen während der Messungen in einer Konzentration von 1 mM vor, wodurch die Affinität von NOD2 gegenüber den getesteten Molekülen als schwach zu charakterisieren war. Aus den Ergebnissen der Bindungsstudien ließ sich somit zum einen ableiten, dass zwischen MDP und NOD2 eine direkte Interaktion stattfindet. Dies stellt den in der Literatur fehlenden Beweis dar, dass es sich bei NOD2 um einen Rezeptor für destinkte Kohlenhydratstrukturen handelt. Zum anderen konnte durch die Bindung von MDP in DD-Form gezeigt werden, dass eine Ligand-Bindung nicht zwangsläufig mit einer Zytokinproduktion verbunden war. Unterstützung erhält diese Aussage durch Studien, die keine NF- κ B-Aktivierung in NOD2-überexprimierender HEK293-Zellen nach Inkubation mit M-Tri_{DAP} aufzeigen konnten [179]. M-Tri_{DAP} unterscheidet sich von MDP in DL-Form durch einen zusätzlichen Diaminopimelinsäurerest. Diese Sachverhalte eröffnen die Möglichkeit der Erklärung weiterer Funktionen von NOD2, die unabhängig der NF- κ B-aktivierenden Rolle von NOD2 zu suchen sind. Hinweise für eine solche Funktion liefern Studien, die die eine Verbindung von NOD2 und dem Protein ATG16L1 aufzeigen. ATG16L1 moduliert den für die Abwehr intrazellulärer Pathogene wichtigen Mechanismus der Autophagie. Die Rolle von NOD2 bei diesem Prozess wird in einer NF- κ B-unabhängigen Rekrutierung von ATG16L1 an die Plasmamembran gesehen, was die Autophagie eingedrungener Bakterien auslöst [180, 181]. Auch konnte kürzlich für die aufgereinigte LRR-Domäne von NOD2 eine direkte anti-mikrobielle Wirkung *in vitro* gezeigt werden [182]. Diese Daten legen nahe, dass die jeweilige Funktion von NOD2 von der Beschaffenheit des gebundenen Liganden abhängig ist. Vorstellbar wäre, dass bei einer hohen Konzentration von NOD2-Liganden (z.B. die Oberfläche von invasiven Bakterien) die für seine NF- κ B-aktivierende Rolle notwendige Dimerisierung von NOD2 nicht erfolgt, da alle NOD2-Moleküle mit Liganden abgesättigt sind oder große Strukturen gebunden haben, die eine Dimerisierung sterisch verhindern. Hierdurch käme es zu einer Induktion der Autophagie. Bei geringen Ligand-Konzentrationen bleibt die Fähigkeit der Dimerisierung erhalten und NOD2 wirkt NF- κ B-aktivierend. Untersuchungen zu der Rolle der Liganden bei der Dimerisierung von NOD2 würden

somit weiter zum Verständnis der Funktion von NOD2 beitragen. Weiterführende Experimente müssten zudem zeigen, welchen Beitrag die einzelnen Domänen des NOD2-Proteins für die Bindung eines Ligandes leisten. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse belgen zwar die Interaktion von NOD2 mit MDP auf molekularer Ebene, geben aber keine Auskunft über die Domäne, durch die die Bindung tatsächlich stattfindet. Eine Expression einzelner Domänen von NOD2 könnten somit bestätigen oder aber widerlegen, dass die Bindung des Liganden im Bereich der LRR-Domäne erfolgt, wie es in der Literatur anhand von Deletionsmutanten postuliert wird [54].

Mit der in dieser Arbeit etablierten Methode steht erstmals ein Testsystem zur Verfügung, mittels dessen potentieller Liganden auf ihre Bindung an NOD2 hin untersucht werden können. Von zentraler Bedeutung wäre die beschriebene Methode bei der Aufklärung der Auswirkungen von Morbus Crohn assoziierten Polymorphismen auf die Bindungseigenschaften von MDP durch humanes NOD2. Aber auch für den Nachweis der Interaktion von NOD2 mit anderen Proteinen wäre die entwickelte Methode geeignet. Ein Protein, für das mittels *Yeast Two-hybrid Screening* eine Interaktion mit humanem NOD2 aufgezeigt werden konnte, ist das Protein *Genes associated with Retinoid-IFN-induced Mortality* (Grim)-19 [183]. Dieses Protein erwies sich als essentiell für eine NOD2-vermittelte Aktivierung von NF- κ B. In derselben Studie konnte eine verminderte Expression von Grim-19 in Epithelzellen der entzündeten Mukosa nachgewiesen werden, wodurch die Abwehrreaktion durch eine schwächere NF- κ B-Aktivierung erschwert wird. *ErbB2-interacting protein* (Erbin) ist ein weiteres Protein, für das eine Bindung an NOD2 gezeigt werden konnte. Im Gegensatz zu Grim-19 konnte durch Überexpression von Erbin eine negativ-regulierende Wirkung von Erbin auf eine NOD2-vermittelten NF- κ B-Aktivierung demonstriert werden [184]. Eine weiterführende Charakterisierung der molekularen Interaktion von Grim-19 und Erbin mit NOD2 könnte zum Verständnis der aktivierenden Mechanismen von NOD2 beitragen und mithelfen seine Rolle bei entzündlichen Prozessen besser zu verstehen.

Durch die Verwendung eines Protein-*Tags* für die Immobilisierung des Proteins wäre dieses Verfahren auch auf andere Vertreter der LRR-Familie übertragbar. Möglich wäre so z.B. die Liganden von *NACHT*, *LRR and Pyrin domain containing protein* (Nalp)3 zu identifizieren, dem als Bestandteil des Inflammasomes eine zentrale Bedeutung bei der Prozessierung von proIL-1 β in reifes IL-1 β zukommt [185, 186]. Das etablierte Testsystem stellt somit ein wichtiges Werkzeug für die Grundlagenforschung dar, in dem es zum einen wertvolle Beiträge zu der Charakterisierung der Bindung exogener Antigene durch LRR-Proteine liefert, zum anderen aber auch für den Nachweis von

endogenen Interaktionen eingesetzt werden kann, die die Funktionalität von LRR-Proteinen modulieren.

5 Zusammenfassung

Die Hypertrophie des mesenterialen Fetts um entzündete Darmabschnitte bei Morbus Crohn ist ein oft beobachteter und zugleich unverstandener Befund. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des immunologischen Repertoires von Vorläuferzellen des mesenterialen Fetts und fokussierte sich auf die zytosolischen *Pattern Recognition-Rezeptoren Nucleotide Oligomerization-binding Domain* (NOD)-Proteine 1 und des mit der Pathogenese des Morbus Crohn assoziierten NOD2. Die basale Expression von NOD1 in murinen Präadipozyten war auf Transkriptebene mit der aus Vorläuferzellen generierten Makrophagen vergleichbar, während die Expression von NOD2 deutlich schwächer ausgeprägt war. Auf Proteinebene ließen sich sowohl NOD1 als auch NOD2 in Lysaten muriner Präadipozyten mittels Western Blot darstellen. Die Expression insbesondere von NOD2 konnte zum einen durch Nachahmung eines proinflammatorischen Milieus mit rekombinanten Zytokinen, zum anderen durch Stimulation mit bakteriellen Abbauprodukten, wie sie im Zuge der bakteriellen Translokation im mesenterialen Fett zu finden sind, moduliert werden.

Funktionelle Studien an murinen Präadipozyten zeigten eine signifikante Produktion von IL-6 in Reaktion auf den NOD1-spezifischen Liganden Laktyl-tetra-Diaminopimelinsäure (LT-DAP) und diese konnte als nukleärer Faktor (NF) κ B-abhängig charakterisiert werden. Die Transfektion von eukaryontischen Zellen stellte in der vorliegenden Arbeit eine unverzichtbare Methode für die funktionelle Studien dar, weswegen ein neuartiges Elektroporationssystem in Eigenregie geplant und gebaut wurde, das es dem Anwender erlaubt, für die physiologischen Eigenschaften der zu transfizierenden Zellen optimale elektrische Parameter wählen zu können. Mit dem ELPorator 1000-System war eine hocheffiziente Transfektion sowohl von adhären Zellen als auch von Suspensionszellen durch die unterbrechungsfreie Kombination eines kurzen (μ s) *High Voltage* (HV)-Impulses mit einem längeren (ms) *Low Voltage* (LV)-Impuls möglich. Während ein HV-Impuls hauptsächlich für die absolute Anzahl transfizierter Zellen verantwortlich war, ermöglichte ein nachfolgender LV-Impuls die Modulation der Expressionshöhe der eingeschleusten Nukleinsäure. Die Spezifität des NOD1-spezifischen Liganden LT-DAP wurde so anhand von NOD1-*Knock-down* Studien mittels spezifischer *Small Interfering* (si)RNA gezeigt.

Die direkte molekulare Interaktion von NOD2 mit MDP ist in der Literatur bis heute nicht gezeigt, weshalb ein Testsystem etabliert wurde, mit dem eine Charakterisierung dieser Interaktion anhand der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie möglich wurde. Hierfür erforderliches rekombinantes NOD2 wurde als Fusionsprotein mit *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP)-Tag in eukaryontischen Zellen exprimiert. Eine

Immobilisation auf dem Sensorchip erfolgte mittels eines anti-EGFP-Antikörpers. Die Ergebnisse dieser Studien bestätigten die postulierte Bindung von MDP durch NOD2. Es konnte ferner gezeigt werden, dass nicht nur MDP in seiner spiegelisomeren LD-Form gebunden wird, sondern auch in seiner unwirksamen DD-Form. Eine Bindung von NOD1-spezifischen Liganden an NOD2 konnten nicht beobachtet werden und unterstrich die Spezifität des angewandten Testsystems. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen eine Expression von NOD1 und NOD2 in murinen Präadipozyten und zeigen erstmals eine Interaktion von NOD2 mit MDP auf molekularer Ebene.

Summary

Hypertrophy of the mesenteric fat around inflamed areas of the intestine is a characteristic phenomenon observed in Crohn's disease. Aim of the present study was the characterisation of the immunological repertoire of progenitor cells derived from mesenteric fat and focussed on the recently discovered cytosolic pattern recognition receptors named *Nucleotide Oligomerization Domain* (NOD)-protein 1 and 2, the latter is associated with susceptibility to Crohn's disease. At transcript level, baseline expression of NOD1 in murine preadipocytes was similar to NOD1 expression in bone marrow-derived macrophages and more pronounced than the expression of NOD2. In Western blot analysis expression of both NOD1 and NOD2 in murine preadipocytes could be demonstrated. The expression of NOD2 specific mRNA in preadipocytes could be modulated by cytokines representing a proinflammatory milieu and by bacterial cell wall-derived compounds which can be found in mesenteric fat during chronic intestinal inflammation through bacterial translocation. Functional studies demonstrated a Nuclear Factor (NF) κ B-dependent production of IL-6 after stimulation of murine preadipocytes with the NOD1-specific ligand lactyl-tetra-diaminopimelic acid (LT-DAP).

Transfection of eukaryotic cells represented an essential method for functional studies resulting in the construction of a novel system for electroporation. This electroporation strategy, provided by the modular ELPorator 1000 device, applies continuous combined High Voltage (HV) and Low Voltage (LV) square pulses where the electric parameter of the effective field and the duration of each pulse can be defined individually. This method allows for highly efficient transfection of DNA or siRNA into isolated primary cell populations or within mixed cell suspensions as well as into other cell populations that are considered difficult to transfect. The initial HV pulse contributed to the number of transfected cells, while the longer LV pulse modulated the amount of transfected molecules. NOD1 specificity of LT-DAP was verified by NOD1 knockdown using specific Small Interfering (si)RNA.

At the molecular level, the interaction of NOD2 with its postulated ligand MDP has not been proven in the literature to date. Thus, a test system to evaluate this interaction was established applying surface plasmon resonance spectroscopy. Therefore recombinant NOD2 fused to a *Green Fluorescent Protein (EGFP)-Tag* was expressed in eukaryotic cells and immobilized on the sensor chip via EGFP-specific antibodies. Results of these studies verified an interaction of MDP with NOD2 at the molecular level in both LD and its stimulatory inactive DD configuration. No interaction of NOD1-specific ligands with NOD2 could be observed underlining the specificity of the test system established. Data of this work provide evidence that NOD1 and NOD2 are expressed in preadipocytes and

these receptors could be activated by bacterial translocation during intestinal inflammation and the interaction of NOD2 with MDP is shown for the first time at molecular level.

6 Literaturverzeichnis

1. Fruhbeck, G., *Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders*. Methods Mol Biol, 2008. **456**: p. 1-22.
2. Kubota, N., Y. Terauchi, H. Miki, H. Tamemoto, T. Yamauchi, K. Komeda, S. Satoh, R. Nakano, C. Ishii, T. Sugiyama, K. Eto, Y. Tsubamoto, A. Okuno, K. Murakami, H. Sekihara, G. Hasegawa, M. Naito, Y. Toyoshima, S. Tanaka, K. Shiota, T. Kitamura, T. Fujita, O. Ezaki, S. Aizawa, T. Kadowaki, and et al., *PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance*. Mol Cell, 1999. **4**(4): p. 597-609.
3. Brun, R.P. and B.M. Spiegelman, *PPAR gamma and the molecular control of adipogenesis*. J Endocrinol, 1997. **155**(2): p. 217-8.
4. Batra, A., J. Pietsch, I. Fedke, R. Glauben, B. Okur, T. Stroh, M. Zeitz, and B. Siegmund, *Leptin-dependent toll-like receptor expression and responsiveness in preadipocytes and adipocytes*. Am J Pathol, 2007. **170**(6): p. 1931-41.
5. Weisberg, S.P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel, and A.W. Ferrante, Jr., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
6. Batra, A., M. Zeitz, and B. Siegmund, *Adipokine signaling in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(12): p. 1897-1905.
7. Fried, S.K., B. Appel, and R. Zechner, *Interleukin 1 alpha decreases the synthesis and activity of lipoprotein lipase in human adipose tissue*. Horm Metab Res, 1993. **25**(2): p. 129-30.
8. Hoene, M. and C. Weigert, *The role of interleukin-6 in insulin resistance, body fat distribution and energy balance*. Obes Rev, 2008. **9**(1): p. 20-9.
9. Mudter, J. and M.F. Neurath, *Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(8): p. 1016-23.
10. Trayhurn, P. and I.S. Wood, *Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue*. Br J Nutr, 2004. **92**(3): p. 347-55.
11. Esposito, K., G. Giugliano, N. Scuderi, and D. Giugliano, *Role of adipokines in the obesity-inflammation relationship: the effect of fat removal*. Plast Reconstr Surg, 2006. **118**(4): p. 1048-57; discussion 1058-9.
12. Gustafson, B., A. Hammarstedt, C.X. Andersson, and U. Smith, *Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2276-83.
13. Rasouli, N. and P.A. Kern, *Adipocytokines and the metabolic complications of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(11 Suppl 1): p. S64-73.
14. Matarese, G. and A. La Cava, *The intricate interface between immune system and metabolism*. Trends Immunol, 2004. **25**(4): p. 193-200.
15. Masri, B., B. Knibiehler, and Y. Audigier, *Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology*. Cell Signal, 2005. **17**(4): p. 415-26.
16. Ding, Q., T. Mracek, P. Gonzalez-Muniesa, K. Kos, J. Wilding, P. Trayhurn, and C. Bing, *Identification of macrophage inhibitory cytokine-1 in adipose tissue and its secretion as an adipokine by human adipocytes*. Endocrinology, 2009. **150**(4): p. 1688-96.
17. Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J.M. Friedman, *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
18. Vaisse, C., J.L. Halaas, C.M. Horvath, J.E. Darnell, Jr., M. Stoffel, and J.M. Friedman, *Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice*. Nat Genet, 1996. **14**(1): p. 95-7.
19. Madej, T., M.S. Boguski, and S.H. Bryant, *Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine*. FEBS Lett, 1995. **373**(1): p. 13-8.

20. Fantuzzi, G., J.A. Sennello, A. Batra, I. Fedke, H.A. Lehr, M. Zeitz, and B. Siegmund, *Defining the role of T cell-derived leptin in the modulation of hepatic or intestinal inflammation in mice*. Clin Exp Immunol, 2005. **142**(1): p. 31-8.
21. Lord, G.M., G. Matarese, J.K. Howard, R.J. Baker, S.R. Bloom, and R.I. Lechler, *Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 897-901.
22. Batra, A., B. Okur, R. Glauben, U. Erben, J. Ihbe, T. Stroh, I. Fedke, H.D. Chang, M. Zeitz, and B. Siegmund, *Leptin: a critical regulator of CD4+ T-cell polarization in vitro and in vivo*. Endocrinology, 2010. **151**(1): p. 56-62.
23. Siegmund, B., H.A. Lehr, and G. Fantuzzi, *Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice*. Gastroenterology, 2002. **122**(7): p. 2011-25.
24. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. **17**(1): p. 1-14.
25. Peyrin-Biroulet, L., M. Chamaillard, F. Gonzalez, E. Beclin, C. Decourcelle, L. Antunes, J. Gay, C. Neut, J.F. Colombel, and P. Desreumaux, *Mesenteric fat in Crohn's disease: a pathogenetic hallmark or an innocent bystander?* Gut, 2007. **56**(4): p. 577-83.
26. Popko, K., E. Gorska, A. Stelmaszczyk-Emmel, R. Plywaczewski, A. Stoklosa, D. Gorecka, B. Pyrzak, and U. Demkow, *Proinflammatory cytokines Il-6 and TNF-alpha and the development of inflammation in obese subjects*. Eur J Med Res, 2010. **15 Suppl 2**: p. 120-2.
27. Evans, A.C., G.I. Papachristou, and D.C. Whitcomb, *Obesity and the risk of severe acute pancreatitis*. Minerva Gastroenterol Dietol, 2010. **56**(2): p. 169-79.
28. Ehling, A., A. Schaffler, H. Herfarth, I.H. Tarner, S. Anders, O. Distler, G. Paul, J. Distler, S. Gay, J. Scholmerich, E. Neumann, and U. Muller-Ladner, *The potential of adiponectin in driving arthritis*. J Immunol, 2006. **176**(7): p. 4468-78.
29. Magalhaes, J.G., D.J. Philpott, M.A. Nahori, M. Jehanno, J. Fritz, L.L. Bourhis, J. Viala, J.P. Hugot, M. Giovannini, J. Bertin, M. Lepoivre, D. Mengin-Lecreulx, P.J. Sansonetti, and S.E. Girardin, *Murine Nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin*. EMBO Rep, 2005. **6**(12): p. 1201-7.
30. Girardin, S.E., I.G. Boneca, L.A. Carneiro, A. Antignac, M. Jehanno, J. Viala, K. Tedin, M.K. Taha, A. Labigne, U. Zahringer, A.J. Coyle, P.S. DiStefano, J. Bertin, P.J. Sansonetti, and D.J. Philpott, *Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1584-7.
31. Girardin, S.E., I.G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D.J. Philpott, and P.J. Sansonetti, *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 8869-72.
32. Kim, J.G., S.J. Lee, and M.F. Kagnoff, *Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors*. Infect Immun, 2004. **72**(3): p. 1487-95.
33. Viala, J., C. Chaput, I.G. Boneca, A. Cardona, S.E. Girardin, A.P. Moran, R. Athman, S. Memet, M.R. Huerre, A.J. Coyle, P.S. DiStefano, P.J. Sansonetti, A. Labigne, J. Bertin, D.J. Philpott, and R.L. Ferrero, *Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island*. Nat Immunol, 2004. **5**(11): p. 1166-74.
34. Inohara, N. and G. Nunez, *NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 371-82.
35. Uehara, A., Y. Fujimoto, K. Fukase, and H. Takada, *Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines*. Mol Immunol, 2007. **44**(12): p. 3100-11.

36. Ogura, Y., N. Inohara, A. Benito, F.F. Chen, S. Yamaoka, and G. Nunez, *Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4812-8.
37. Girardin, S.E., R. Tournebise, M. Mavris, A.L. Page, X. Li, G.R. Stark, J. Bertin, P.S. DiStefano, M. Yaniv, P.J. Sansonetti, and D.J. Philpott, *CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive Shigella flexneri*. EMBO Rep, 2001. **2**(8): p. 736-42.
38. Kobayashi, K.S., M. Chamaillard, Y. Ogura, O. Henegariu, N. Inohara, G. Nunez, and R.A. Flavell, *Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract*. Science, 2005. **307**(5710): p. 731-4.
39. Abreu, M.T., L.S. Thomas, E.T. Arnold, K. Lukasek, K.S. Michelsen, and M. Arditi, *TLR signaling at the intestinal epithelial interface*. J Endotoxin Res, 2003. **9**(5): p. 322-30.
40. Melmed, G., L.S. Thomas, N. Lee, S.Y. Tesfay, K. Lukasek, K.S. Michelsen, Y. Zhou, B. Hu, M. Arditi, and M.T. Abreu, *Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1406-15.
41. Zilbauer, M., N. Dorrell, A. Elmi, K.J. Lindley, S. Schuller, H.E. Jones, N.J. Klein, G. Nunez, B.W. Wren, and M. Bajaj-Elliott, *A major role for intestinal epithelial nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) in eliciting host bactericidal immune responses to Campylobacter jejuni*. Cell Microbiol, 2007. **9**(10): p. 2404-16.
42. Hysi, P., M. Kabesch, M.F. Moffatt, M. Schedel, D. Carr, Y. Zhang, B. Boardman, E. von Mutius, S.K. Weiland, W. Leupold, C. Fritzsche, N. Klopp, A.W. Musk, A. James, G. Nunez, N. Inohara, and W.O. Cookson, *NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(7): p. 935-41.
43. McGovern, D.P., P. Hysi, T. Ahmad, D.A. van Heel, M.F. Moffatt, A. Carey, W.O. Cookson, and D.P. Jewell, *Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(10): p. 1245-50.
44. Hugot, J.P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J.P. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C.A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J.F. Colombel, M. Sahbatou, and G. Thomas, *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 599-603.
45. Miceli-Richard, C., S. Lesage, M. Rybojad, A.M. Prieur, S. Manouvrier-Hanu, R. Hafner, M. Chamaillard, H. Zouali, G. Thomas, and J.P. Hugot, *CARD15 mutations in Blau syndrome*. Nat Genet, 2001. **29**(1): p. 19-20.
46. Kanazawa, N., I. Okafuji, N. Kambe, R. Nishikomori, M. Nakata-Hizume, S. Nagai, A. Fujii, T. Yuasa, A. Manki, Y. Sakurai, M. Nakajima, H. Kobayashi, I. Fujiwara, H. Tsutsumi, A. Utani, C. Nishigori, T. Heike, T. Nakahata, and Y. Miyachi, *Early-onset sarcoidosis and CARD15 mutations with constitutive nuclear factor-kappaB activation: common genetic etiology with Blau syndrome*. Blood, 2005. **105**(3): p. 1195-7.
47. Bertin, J., W.J. Nir, C.M. Fischer, O.V. Tayber, P.R. Errada, J.R. Grant, J.J. Keilty, M.L. Gosselin, K.E. Robison, G.H. Wong, M.A. Glucksmann, and P.S. DiStefano, *Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB*. J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 12955-8.
48. Coussens, N.P., J.C. Mowers, C. McDonald, G. Nunez, and S. Ramaswamy, *Crystal structure of the Nod1 caspase activation and recruitment domain*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **353**(1): p. 1-5.
49. Manon, F., A. Favier, G. Nunez, J.P. Simorre, and S. Cusack, *Solution structure of NOD1 CARD and mutational analysis of its interaction with the CARD of downstream kinase RICK*. J Mol Biol, 2007. **365**(1): p. 160-74.

50. Hutchinson, E.G. and J.M. Thornton, *The Greek key motif: extraction, classification and analysis*. Protein Eng, 1993. **6**(3): p. 233-45.
51. Inohara, N., T. Koseki, L. del Peso, Y. Hu, C. Yee, S. Chen, R. Carrio, J. Merino, D. Liu, J. Ni, and G. Nunez, *Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB*. J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 14560-7.
52. Proell, M., S.J. Riedl, J.H. Fritz, A.M. Rojas, and R. Schwarzenbacher, *The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e2119.
53. Enkhbayar, P., M. Kamiya, M. Osaki, T. Matsumoto, and N. Matsushima, *Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins*. Proteins, 2004. **54**(3): p. 394-403.
54. Inohara, N., Y. Ogura, F.F. Chen, A. Muto, and G. Nunez, *Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2551-4.
55. Jin, M.S., S.E. Kim, J.Y. Heo, M.E. Lee, H.M. Kim, S.G. Paik, H. Lee, and J.O. Lee, *Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a triacylated lipopeptide*. Cell, 2007. **130**(6): p. 1071-82.
56. Tanabe, T., M. Chamaillard, Y. Ogura, L. Zhu, S. Qiu, J. Masumoto, P. Ghosh, A. Moran, M.M. Predergast, G. Tromp, C.J. Williams, N. Inohara, and G. Nunez, *Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition*. Embo J, 2004. **23**(7): p. 1587-97.
57. Inohara, N., T. Koseki, J. Lin, L. del Peso, P.C. Lucas, F.F. Chen, Y. Ogura, and G. Nunez, *An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways*. J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 27823-31.
58. Abbott, D.W., Y. Yang, J.E. Hutti, S. Madhavarapu, M.A. Kelliher, and L.C. Cantley, *Coordinated regulation of Toll-like receptor and NOD2 signaling by K63-linked polyubiquitin chains*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(17): p. 6012-25.
59. Blumberg, R.S., L.J. Saubermann, and W. Strober, *Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(6): p. 648-56.
60. Kingston, R.E., C.A. Chen, and H. Okayama, *Calcium phosphate transfection*. Curr Protoc Cell Biol, 2003. **Chapter 20**: p. Unit 20 3.
61. Paez-Cortez, J., R. Montano, J. Iacomini, and J. Cardier, *Liver sinusoidal endothelial cells as possible vehicles for gene therapy: a comparison between plasmid-based and lentiviral gene transfer techniques*. Endothelium, 2008. **15**(4): p. 165-73.
62. Watanabe, Y., H. Nomoto, R. Takezawa, N. Miyoshi, and T. Akaike, *Highly efficient transfection into primary cultured mouse hepatocytes by use of cation-liposomes: an application for immunization*. J Biochem, 1994. **116**(6): p. 1220-6.
63. Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, and P.H. Hofschneider, *Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields*. Embo J, 1982. **1**(7): p. 841-5.
64. Abidor, I.G., V.B. Arakelian, V.F. Pastushenko, M.R. Tarasevich, and L.V. Chernomordik, *[Electrical breakdown of lipid bilayer membranes]*. Dokl Akad Nauk SSSR, 1978. **240**(3): p. 733-6.
65. Chernomordik, L.V., S.I. Sukharev, S.V. Popov, V.F. Pastushenko, A.V. Sokirko, I.G. Abidor, and Y.A. Chizmadzhev, *The electrical breakdown of cell and lipid membranes: the similarity of phenomenologies*. Biochim Biophys Acta, 1987. **902**(3): p. 360-73.
66. Potter, H., *Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation*. Anal Biochem, 1988. **174**(2): p. 361-73.
67. Klenchin, V.A., S.I. Sukharev, S.M. Serov, L.V. Chernomordik, and A. Chizmadzhev Yu, *Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis*. Biophys J, 1991. **60**(4): p. 804-11.

68. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 417-29.
69. Crichton, D.N., A. Busuttill, and W.H. Price, *Splenic lipofuscinosis in mice*. J Pathol, 1978. **126**(2): p. 113-20.
70. Stroh, T., A. Batra, R. Glauben, I. Fedke, U. Erben, A. Kroesen, M.M. Heimesaat, S. Bereswill, S. Girardin, M. Zeitz, and B. Siegmund, *Nucleotide oligomerization domains 1 and 2: regulation of expression and function in preadipocytes*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3620-7.
71. Vicente, R., A. Escalada, C. Soler, M. Grande, A. Celada, M.M. Tamkun, C. Solsona, and A. Felipe, *Pattern of Kv beta subunit expression in macrophages depends upon proliferation and the mode of activation*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4736-44.
72. Green, H. and M. Meuth, *An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture*. Cell, 1974. **3**(2): p. 127-33.
73. Ralph, P., *Retention of lymphocyte characteristics by myelomas and theta + - lymphomas: sensitivity to cortisol and phytohemagglutinin*. J Immunol, 1973. **110**(6): p. 1470-5.
74. Lozzio, C.B. and B.B. Lozzio, *Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome*. Blood, 1975. **45**(3): p. 321-34.
75. Boyum, A., *Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 7.
76. Sundstrom, C. and K. Nilsson, *Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)*. Int J Cancer, 1976. **17**(5): p. 565-77.
77. Engelman, J.A., M.P. Lisanti, and P.E. Scherer, *Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis*. J Biol Chem, 1998. **273**(48): p. 32111-20.
78. Sasaki, T., M. Shintani, and K. Kihara, *Inhibition of growth of mammalian cell cultures by extracts of arginine-utilizing mycoplasmas*. In Vitro, 1984. **20**(5): p. 369-75.
79. You, X.X., Y.H. Zeng, and Y.M. Wu, *Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells*. J Zhejiang Univ Sci B, 2006. **7**(5): p. 342-50.
80. Raffael, A. and G. Valet, *Distinction of macrophage subpopulations: measurement of functional cell parameters by flow cytometry*. Adv Exp Med Biol, 1982. **155**: p. 453-9.
81. Chelly, J., J.C. Kaplan, P. Maire, S. Gautron, and A. Kahn, *Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue*. Nature, 1988. **333**(6176): p. 858-60.
82. Dina, D., I. Meza, and M. Crippa, *Relative positions of the "repetitive", "unique" and poly(A) fragments of mRNA*. Nature, 1974. **248**(448): p. 486-90.
83. Chen, Z., J. Ling, and D.R. Gallie, *RNase activity requires formation of disulfide bonds and is regulated by the redox state*. Plant Mol Biol, 2004. **55**(1): p. 83-96.
84. Helling, R.B., H.M. Goodman, and H.W. Boyer, *Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis*. J Virol, 1974. **14**(5): p. 1235-44.
85. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
86. Cohen, S.N. and A.C. Chang, *A method for selective cloning of eukaryotic DNA fragments in Escherichia coli by repeated transformation*. Mol Gen Genet, 1974. **134**(2): p. 133-41.
87. Sambrook J., F., E.F. and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989. **2nd ed.**
88. Nathans, D. and H.O. Smith, *Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules*. Annu Rev Biochem, 1975. **44**: p. 273-93.

89. Gumport, R.I. and O.C. Uhlenbeck, *T4 RNA ligase as a nucleic acid synthesis and modification reagent*. Gene Amplif Anal, 1981. **2**: p. 313-45.
90. Shuman, S., *Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in Escherichia coli is sequence specific*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(22): p. 10104-8.
91. Shuman, S., *Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase*. J Biol Chem, 1994. **269**(51): p. 32678-84.
92. Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich, *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
93. Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim, *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-4.
94. Rappolee, D.A., A. Wang, D. Mark, and Z. Werb, *Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells*. J Cell Biochem, 1989. **39**(1): p. 1-11.
95. Zipper, H., H. Brunner, J. Bernhagen, and F. Vitzthum, *Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(12): p. e103.
96. Winer, J., C.K. Jung, I. Shackel, and P.M. Williams, *Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro*. Anal Biochem, 1999. **270**(1): p. 41-9.
97. Tindall, K.R. and T.A. Kunkel, *Fidelity of DNA synthesis by the Thermus aquaticus DNA polymerase*. Biochemistry, 1988. **27**(16): p. 6008-13.
98. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
99. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
100. Renart, J., J. Reiser, and G.R. Stark, *Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(7): p. 3116-20.
101. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
102. Leong, M.M. and G.R. Fox, *Luminescent detection of immunodot and western blots*. Methods Enzymol, 1990. **184**: p. 442-51.
103. Whitehead, T.P., L.J. Kricka, T.J. Carter, and G.H. Thorpe, *Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory*. Clin Chem, 1979. **25**(9): p. 1531-46.
104. Pessara, U. and N. Koch, *Tumor necrosis factor alpha regulates expression of the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain by binding of an NF-kappa B-like factor to a promoter element*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(8): p. 4146-54.
105. Ow, D.W., D.E.W. JR, D.R. Helinski, S.H. Howell, K.V. Wood, and M. DeLuca, *Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants*. Science, 1986. **234**(4778): p. 856-9.
106. de Wet, J.R., K.V. Wood, M. DeLuca, D.R. Helinski, and S. Subramani, *Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(2): p. 725-37.
107. Wood, K.V., *Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status*, Stanley, P., and Kricka, L., eds., John Wiley and Sons, Chichester, New York, 543.

108. Turbadar, T., *Complete absorption of light by thin metal films*. Proc. Phys. Soc., 1959. **73**: p. 40-44.
109. Raether, H., *Surface plasma oscillations and their applications*. Phys. Thin Films, 1977. **9**: p. 145-261.
110. Welford, K., *Surface plasmon-polaritons and their uses*. Opt. Quan. Elec., 1991. **23**: p. 1-27.
111. Colbere-Garapin, F., F. Horodniceanu, P. Kourilsky, and A.C. Garapin, *A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells*. J Mol Biol, 1981. **150**(1): p. 1-14.
112. Ogura, Y., D.K. Bonen, N. Inohara, D.L. Nicolae, F.F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R.H. Duerr, J.P. Achkar, S.R. Brant, T.M. Bayless, B.S. Kirschner, S.B. Hanauer, G. Nunez, and J.H. Cho, *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 603-6.
113. Chamailard, M., M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, M.A. Valvano, S.J. Foster, T.W. Mak, G. Nunez, and N. Inohara, *An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid*. Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 702-7.
114. Chedid, L., *Muramyl peptides as possible endogenous immunopharmacological mediators*. Microbiol Immunol, 1983. **27**(9): p. 723-32.
115. Vidal, V.F., N. Casteran, C.J. Riendeau, H. Kornfeld, E.C. Darcissac, A. Capron, and G.M. Bahr, *Macrophage stimulation with Murabutide, an HIV-suppressive muramyl peptide derivative, selectively activates extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, C/EBPbeta and STAT1: role of CD14 and Toll-like receptors 2 and 4*. Eur J Immunol, 2001. **31**(7): p. 1962-71.
116. Ogura, Y., S. Lala, W. Xin, E. Smith, T.A. Dowds, F.F. Chen, E. Zimmermann, M. Tretiakova, J.H. Cho, J. Hart, J.K. Greenson, S. Keshav, and G. Nunez, *Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis*. Gut, 2003. **52**(11): p. 1591-7.
117. Lala, S., Y. Ogura, C. Osborne, S.Y. Hor, A. Bromfield, S. Davies, O. Ogunbiyi, G. Nunez, and S. Keshav, *Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells*. Gastroenterology, 2003. **125**(1): p. 47-57.
118. Hisamatsu, T., M. Suzuki, H.C. Reinecker, W.J. Nadeau, B.A. McCormick, and D.K. Podolsky, *CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2003. **124**(4): p. 993-1000.
119. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
120. Ginzinger, D.G., *Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream*. Exp Hematol, 2002. **30**(6): p. 503-12.
121. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 2000. **25**(2): p. 169-93.
122. Uehara, A., S. Yang, Y. Fujimoto, K. Fukase, S. Kusumoto, K. Shibata, S. Sugawara, and H. Takada, *Muramyl dipeptide and diaminopimelic 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. **7**(1): p. 53-61.
123. Hisamatsu, T., M. Suzuki, and D.K. Podolsky, *Interferon-gamma augments CARD4/NOD1 gene and protein expression through interferon regulatory factor-1 in intestinal epithelial cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 32962-8.
124. Abdollahi, A., K.A. Lord, B. Hoffman-Liebermann, and D.A. Liebermann, *Interferon regulatory factor 1 is a myeloid differentiation primary response gene*

- induced by interleukin 6 and leukemia inhibitory factor: role in growth inhibition.* Cell Growth Differ, 1991. **2**(8): p. 401-7.
125. Harada, H., E. Takahashi, S. Itoh, K. Harada, T.A. Hori, and T. Taniguchi, *Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(2): p. 1500-9.
126. Flodstrom, M. and D.L. Eizirik, *Interferon-gamma-induced interferon regulatory factor-1 (IRF-1) expression in rodent and human islet cells precedes nitric oxide production.* Endocrinology, 1997. **138**(7): p. 2747-53.
127. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.* Nature, 1997. **388**(6640): p. 394-7.
128. Negishi, H., Y. Fujita, H. Yanai, S. Sakaguchi, X. Ouyang, M. Shinohara, H. Takayanagi, Y. Ohba, T. Taniguchi, and K. Honda, *Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(41): p. 15136-41.
129. Leal, R.F., C.S. Coy, M.L. Ayrizono, J.J. Fagundes, M. Milanski, M.J. Saad, L.A. Velloso, and J.R. Goes, *Differential expression of pro-inflammatory cytokines and a pro-apoptotic protein in pelvic ileal pouches for ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis.* Tech Coloproctol, 2008. **12**(1): p. 33-8.
130. Fiocchi, C., *Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis.* Gastroenterology, 1998. **115**(1): p. 182-205.
131. Rosenstiel, P., M. Fantini, K. Brautigam, T. Kuhbacher, G.H. Waetzig, D. Seegert, and S. Schreiber, *TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells.* Gastroenterology, 2003. **124**(4): p. 1001-9.
132. Osborn, L., S. Kunkel, and G.J. Nabel, *Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2336-40.
133. Beg, A.A., T.S. Finco, P.V. Nantermet, and A.S. Baldwin, Jr., *Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation.* Mol Cell Biol, 1993. **13**(6): p. 3301-10.
134. Ross, J., *mRNA stability in mammalian cells.* Microbiol Rev, 1995. **59**(3): p. 423-50.
135. Medvedev, A.E., I. Sabroe, J.D. Hasday, and S.N. Vogel, *Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease.* J Endotoxin Res, 2006. **12**(3): p. 133-50.
136. Hoffmann, R., H.P. Henninger, A. Schulze-Specking, and K. Decker, *Regulation of interleukin-6 receptor expression in rat Kupffer cells: modulation by cytokines, dexamethasone and prostaglandin E2.* J Hepatol, 1994. **21**(4): p. 543-50.
137. Kishimoto, T., *Interleukin-6 and its receptor in autoimmunity.* J Autoimmun, 1992. **5 Suppl A**: p. 123-32.
138. Baumann, H. and J. Gauldie, *The acute phase response.* Immunol Today, 1994. **15**(2): p. 74-80.
139. Xing, Z., J. Gauldie, G. Cox, H. Baumann, M. Jordana, X.F. Lei, and M.K. Achong, *IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses.* J Clin Invest, 1998. **101**(2): p. 311-20.
140. Cotten, M., A. Baker, M. Saltik, E. Wagner, and M. Buschle, *Lipopolysaccharide is a frequent contaminant of plasmid DNA preparations and can be toxic to primary human cells in the presence of adenovirus.* Gene Ther, 1994. **1**(4): p. 239-46.
141. Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl, *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.* Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.

142. Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello, *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans**. *Nature*, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
143. Fritz, J.H., S.E. Girardin, C. Fitting, C. Werts, D. Mengin-Lecreulx, M. Caroff, J.M. Cavailon, D.J. Philpott, and M. Adib-Conquy, *Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists*. *Eur J Immunol*, 2005. **35**(8): p. 2459-70.
144. Takada, H., S. Yokoyama, and S. Yang, *Enhancement of endotoxin activity by muramyl dipeptide*. *J Endotoxin Res*, 2002. **8**(5): p. 337-42.
145. Weaver, J.C., *Electroporation: a general phenomenon for manipulating cells and tissues*. *J Cell Biochem*, 1993. **51**(4): p. 426-35.
146. Zimmermann, U.N., G.A., *Electromanipulation of Cells*. CRC Press LLC, 1996.
147. Chen, C., S.W. Smye, M.P. Robinson, and J.A. Evans, *Membrane electroporation theories: a review*. *Med Biol Eng Comput*, 2006. **44**(1-2): p. 5-14.
148. Freeman, S.A., M.A. Wang, and J.C. Weaver, *Theory of electroporation of planar bilayer membranes: predictions of the aqueous area, change in capacitance, and pore-pore separation*. *Biophys J*, 1994. **67**(1): p. 42-56.
149. Kanduser, M., D. Miklavcic, and M. Pavlin, *Mechanisms involved in gene electrotransfer using high- and low-voltage pulses--an in vitro study*. *Bioelectrochemistry*, 2009. **74**(2): p. 265-71.
150. Council, E.R., *European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation*. *Resuscitation*, 2005. **67**(S1): p. 1-146.
151. Khanna, V.K., *IGBT - Theory and Design*. Wiley & Sons, 2003(1).
152. Isakari, Y., Y. Harada, D. Ishikawa, K. Matsumura-Takeda, S. Sogo, T. Ishida, T. Taki, and H. Kiwada, *Efficient gene expression in megakaryocytic cell line using nucleofection*. *Int J Pharm*, 2007. **338**(1-2): p. 157-64.
153. Martinet, W., D.M. Schrijvers, and M.M. Kockx, *Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells*. *Biotechnol Lett*, 2003. **25**(13): p. 1025-9.
154. Schakowski, F., P. Buttgereit, M. Mazur, A. Marten, B. Schottker, M. Gorschluter, and I.G. Schmidt-Wolf, *Novel non-viral method for transfection of primary leukemia cells and cell lines*. *Genet Vaccines Ther*, 2004. **2**(1): p. 1.
155. Thiel, C. and M. Nix, *Efficient transfection of primary cells relevant for cardiovascular research by nucleofection*. *Methods Mol Med*, 2006. **129**: p. 255-66.
156. Tseng, W.C., F.R. Haselton, and T.D. Giorgio, *Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(41): p. 25641-7.
157. Tien, H., *The bilayer lipid membrane (BLM) under electrical fields*. *IEEE Trans Dielectr Electr Insul*, 1974. **10**: p. 717-727.
158. Tekle, E., R.D. Astumian, and P.B. Chock, *Selective and asymmetric molecular transport across electroporated cell membranes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(24): p. 11512-6.
159. Kobayashi, K., N. Inohara, L.D. Hernandez, J.E. Galan, G. Nunez, C.A. Janeway, R. Medzhitov, and R.A. Flavell, *RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems*. *Nature*, 2002. **416**(6877): p. 194-9.
160. Watanabe, T., N. Asano, S. Fichtner-Feigl, P.L. Gorelick, Y. Tsuji, Y. Matsumoto, T. Chiba, I.J. Fuss, A. Kitani, and W. Strober, *NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(5): p. 1645-62.
161. Katakura, K., J. Lee, D. Rachmilewitz, G. Li, L. Eckmann, and E. Raz, *Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(3): p. 695-702.

162. Qing, G., P. Yan, Z. Qu, H. Liu, and G. Xiao, *Hsp90 regulates processing of NF-kappa B2 p100 involving protection of NF-kappa B-inducing kinase (NIK) from autophagy-mediated degradation*. Cell Res, 2007. **17**(6): p. 520-30.
163. Maloney, A. and P. Workman, *HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds*. Expert Opin Biol Ther, 2002. **2**(1): p. 3-24.
164. Whitesell, L., E.G. Mimnaugh, B. De Costa, C.E. Myers, and L.M. Neckers, *Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(18): p. 8324-8.
165. Maeda, S., L.C. Hsu, H. Liu, L.A. Bankston, M. Iimura, M.F. Kagnoff, L. Eckmann, and M. Karin, *Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing*. Science, 2005. **307**(5710): p. 734-8.
166. Tsay, T.B., C.J. Chang, P.H. Chen, C.M. Hsu, and L.W. Chen, *Nod2 mutation enhances NF-kappa B activity and bacterial killing activity of macrophages*. Inflammation, 2009. **32**(6): p. 372-8.
167. Traub, S., S. von Aulock, T. Hartung, and C. Hermann, *MDP and other muropeptides--direct and synergistic effects on the immune system*. J Endotoxin Res, 2006. **12**(2): p. 69-85.
168. Watanabe, T., A. Kitani, P.J. Murray, and W. Strober, *NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(8): p. 800-8.
169. Inohara, N., Y. Ogura, A. Fontalba, O. Gutierrez, F. Pons, J. Crespo, K. Fukase, S. Inamura, S. Kusumoto, M. Hashimoto, S.J. Foster, A.P. Moran, J.L. Fernandez-Luna, and G. Nunez, *Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5509-12.
170. Wehkamp, J., J. Harder, M. Weichenthal, M. Schwab, E. Schaffeler, M. Schlee, K.R. Herrlinger, A. Stallmach, F. Noack, P. Fritz, J.M. Schroder, C.L. Bevins, K. Fellermann, and E.F. Stange, *NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression*. Gut, 2004. **53**(11): p. 1658-64.
171. Hollemans, H.J. and R.M. Bertina, *Scatchard plot and heterogeneity in binding affinity of labeled and unlabeled ligand*. Clin Chem, 1975. **21**(12): p. 1769-73.
172. Pattnaik, P., *Surface plasmon resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction*. Appl Biochem Biotechnol, 2005. **126**(2): p. 79-92.
173. Hutsell, S.Q., R.J. Kimple, D.P. Siderovski, F.S. Willard, and A.J. Kimple, *High-affinity immobilization of proteins using biotin- and GST-based coupling strategies*. Methods Mol Biol, 2010. **627**: p. 75-90.
174. Navratilova, I., M. Dioszegi, and D.G. Myszka, *Analyzing ligand and small molecule binding activity of solubilized GPCRs using biosensor technology*. Anal Biochem, 2006. **355**(1): p. 132-9.
175. Nordin, H., M. Jungnelius, R. Karlsson, and O.P. Karlsson, *Kinetic studies of small molecule interactions with protein kinases using biosensor technology*. Anal Biochem, 2005. **340**(2): p. 359-68.
176. Ohlson, S., C. Jungar, M. Strandh, and C.F. Mandenius, *Continuous weak-affinity immunosensing*. Trends Biotechnol, 2000. **18**(2): p. 49-52.
177. Haseley, S.R., P. Talaga, J.P. Kamerling, and J.F. Vliegthart, *Characterization of the carbohydrate binding specificity and kinetic parameters of lectins by using surface plasmon resonance*. Anal Biochem, 1999. **274**(2): p. 203-10.
178. Andersson, K., M. Hamalainen, and M. Malmqvist, *Identification and optimization of regeneration conditions for affinity-based biosensor assays. A multivariate cocktail approach*. Anal Chem, 1999. **71**(13): p. 2475-81.
179. Girardin, S.E., L.H. Travassos, M. Herve, D. Blanot, I.G. Boneca, D.J. Philpott, P.J. Sansonetti, and D. Mengin-Lecreux, *Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 41702-8.

180. Homer, C.R., A.L. Richmond, N.A. Rebert, J.P. Achkar, and C. McDonald, *ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis*. *Gastroenterology*, 2010. **139**(5): p. 1630-41, 1641 e1-2.
181. Travassos, L.H., L.A. Carneiro, M. Ramjeet, S. Hussey, Y.G. Kim, J.G. Magalhaes, L. Yuan, F. Soares, E. Chea, L. Le Bourhis, I.G. Boneca, A. Allaoui, N.L. Jones, G. Nunez, S.E. Girardin, and D.J. Philpott, *Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(1): p. 55-62.
182. Perez, L.H., M. Butler, T. Creasey, J. Dzink-Fox, J. Gounarides, S. Petit, A. Ropenga, N. Ryder, K. Smith, P. Smith, and S.J. Parkinson, *Direct bacterial killing in vitro by recombinant Nod2 is compromised by Crohn's disease-associated mutations*. *PLoS One*, 2010. **5**(6): p. e10915.
183. Barnich, N., T. Hisamatsu, J.E. Aguirre, R. Xavier, H.C. Reinecker, and D.K. Podolsky, *GRIM-19 interacts with nucleotide oligomerization domain 2 and serves as downstream effector of anti-bacterial function in intestinal epithelial cells*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(19): p. 19021-6.
184. McDonald, C., F.F. Chen, V. Ollendorff, Y. Ogura, S. Marchetto, P. Lecine, J.P. Borg, and G. Nunez, *A role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(48): p. 40301-9.
185. Agostini, L., F. Martinon, K. Burns, M.F. McDermott, P.N. Hawkins, and J. Tschopp, *NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder*. *Immunity*, 2004. **20**(3): p. 319-25.
186. Martinon, F., L. Agostini, E. Meylan, and J. Tschopp, *Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome*. *Curr Biol*, 2004. **14**(21): p. 1929-34.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Domänenstruktur von NOD1 und NOD2.....	6
Abb. 2:	Signaltransduktionsweg nach der Aktivierung von NOD2.....	7
Abb. 3:	Für die Elektroporation genutzte Impulsformen.	11
Abb. 4:	Optimale Impulsformen für die unterschiedlichen Prozesse während einer Elektroporation.....	45
Abb. 5:	Das modular aufgebaute Transfektionssystem ELPorator 1000.....	49
Abb. 6:	Schematische Aufbau eines Moduls des Transfektionssystems ELPorator 1000.....	50
Abb. 7:	Architektur und Wertigkeiten eines typischen 8-Bit-Registers.	51
Abb. 8:	Spannungsverlauf eines kombinierten HV/LV-Impulses.	52
Abb. 9:	Spannungsverlauf eines einzelnen HV-Impulses.....	52
Abb. 10:	Auftretende Stromstärken während eines kombinierten HV/LV-Impulses.....	53
Abb. 11:	Ausschnitt des Schaltplans der Ausgangsstufe von Modul I.....	54
Abb. 12:	Vergleich von Transfektionseffizienzen des ELPorator 1000-Systems mit der Nucleofection.	55
Abb. 13:	Einfluss der Impulsstrategie auf Transfektionseffizienz und Expressionshöhe transfizierter muriner Präadipozyten.....	56
Abb. 14:	Einfluss der Menge an zu transfizierender DNA auf Transfektionseffizienz und Expressionshöhe.....	58
Abb. 15:	Transfektion verschiedener Suspensionszelllinien unter Verwendung des ELPorator 1000-Systems.	59
Abb. 16:	Transfektion humaner PBMC unter Verwendung des ELPorator 1000-Systems und anschließender subpopulationsspezifischer Charakterisierung.....	61
Abb. 17:	Einfluss der Impulsstrategie auf die Menge an transfizierter siRNA und die Dauer des siRNA-vermittelten <i>Gen-Knock-downs</i>	63
Abb. 18:	Funktionalität mit siRNA transfizierter primärer muriner Präadipozyten. ...	64

Abb. 19:	Standardkurve und Amplifikationsblot einer quantitativen Real-Time-PCR mit einem NOD1-Plasmidstandard als Probe.....	66
Abb. 20:	Standardkurve und Amplifikationsblot einer quantitativen Real-Time-PCR mit einem NOD2-Plasmidstandard als Probe.....	67
Abb. 21:	Korrelation von Zellzahl und daraus präparierter Menge an Gesamt-RNA.....	68
Abb. 22:	Ausschluss von Verunreinigungen der generierten cDNA mit genomischer DNA.....	69
Abb. 23:	Basale Expression von NOD1 und NOD2 in murinen Präadipozyten.....	71
Abb. 24:	Western Blot zum Nachweis der NOD1 und NOD2 Protein-Expression in murinen Präadipozyten.	72
Abb. 25:	Relative Expressionshöhen von NOD2 in murinen Präadipozyten nach spezifischer und proinflammatorischer Stimulation.....	75
Abb. 26:	Induktion von IL-6 nach NOD-spezifischer Stimulation muriner Präadipozyten.	77
Abb. 27:	NOD1-Spezifität des Liganden Laktyl-tetra-Diaminopimelinsäure.....	80
Abb. 28:	HSP90-abhängige IL-6-Produktion nach NOD1-spezifischer Stimulation.	81
Abb. 29:	NF- κ B-Aktivierung durch NOD1- und NOD2-spezifische Stimulation.....	82
Abb. 30:	Effekt von MDP und LPS auf die IL-6-Produktion.....	83
Abb. 31:	Klonierung einer vollständigen NOD2-cDNA aus zwei Teilstücken.....	86
Abb. 32:	Erweiterung der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pEGFP-N2 um die Sequenz eines His- <i>Tags</i>	88
Abb. 33:	Schemata der erzeugten NOD2-Expressionsvektoren.....	89
Abb. 34:	Funktionalität der erzeugten NOD2-Expressionsvektoren.....	91
Abb. 35:	Charakterisierung der Expression von NOD2-EGFP auf Transkript- und Proteinebene durch stabil transfizierte Zellklone.....	92
Abb. 36:	Komplexbildung des NOD2-EGFP-Fusionsprotein in Abhängigkeit des pH.....	93

Abb. 37:	Nachweis der spezifischen Bindung von rekombinantem GFP und NOD2-EGFP durch einen immobilisierten EGFP-spezifischen Antikörper mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie.	95
Abb. 38:	Nachweis der Bindung von Muramyldipeptid durch NOD2 mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz.	96
Abb. 39:	Sensogramm der Interaktion zwischen NOD1-Liganden und NOD2-EGFP.	97
Abb. 40:	Sensogramm der Interaktion zwischen dem NOD1- und NOD2-spezifischen Liganden M-Tri _{DAP} und NOD2-EGFP.	98
Tabelle 1:	Das Fettgewebe als Quelle immunmodulierender Mediatoren (Auszug nach [6]).	2
Tabelle 2:	Verwendete Analyten in der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie.	44
Tabelle 3:	Relative Expressionshöhen von NOD1 in primären WT-Präadipozyten nach spezifischer und proinflammatorischer Stimulation.	73
Tabelle 4:	Erreichter NOD1- <i>Knock-down</i> mittels spezifischer siRNA in WT-Präadipozyten.	79

8 Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen in internationalen Fachzeitschriften veröffentlicht:

Stroh, T., A. Batra, R. Glauben, I. Fedke, U. Erben, A. Kroesen, M.M. Heimesaat, S. Bereswill, S. Girardin, M. Zeitz, and B. Siegmund, **Nucleotide oligomerization domains 1 and 2: regulation of expression and function in preadipocytes.** J Immunol, 2008. 181(5): p. 3620-7.

Stroh T, Erben U, Kuhl AA, Zeitz M, Siegmund B, **Combined pulse electroporation--a novel strategy for highly efficient transfection of human and mouse cells.** PLoS One 2010, 5(3):e9488.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Britta Siegmund für das interessante Thema und die unermüdliche Unterstützung bedanken. Ebenso gilt mein großer Dank den Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppe. Ohne die fachliche Hilfe von Arvind und Rainer und die helfenden Hände von Inka wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ein großes Dankeschön geht auch an Ulrike und all ihre Klone, von denen stets einer zwei offene Ohren und zwei helfende Hände für all meine Anliegen hatte. Thomas Blankenstein danke ich für die Betreuung und Begutachtung der vorliegenden Arbeit. Mein Dank gilt auch Walter Stöcklein vom Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik in Gollm für seine technische Expertise bezüglich der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie.

Danken möchte ich in diesem Zusammenhang auch Paramount Pictures für die TV-Serie rund um das Raumschiff Enterprise. Diese Serie hat wie kein anderes Ereignis in meinem bisherigen Leben das Interesse an allem Technischen geweckt und ohne diese es den in dieser Arbeit vorgestellten Elektroporator schlicht und ergreifend nicht geben würde.

Mein besonderer Dank gilt aber meinen Eltern, die mich bei all meinen Hobbys selbstlos unterstützt haben und mehr als einmal großes Verständnis für manch ein requiriertes Haushaltsgerät oder eine durchgebrannte Sicherung aufgebracht haben und auch bei der Anfertigen dieser Arbeit in jeder nur erdenklichen Form für mich da waren und sind. Unendlich danke ich auch meiner Frau Annika für all ihr Verständnis und ihre emotionale Unterstützung während aller Abschnitte beim Erstellen dieser Arbeit. Vielen Dank!

10 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten