

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie

# **Modulation der angeborenen Immunantwort durch bakterielle TIR-Proteine**

Anna Waldhuber

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Haller  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. Dr. R. F. Vogel  
2. Univ.- Prof. Dr. T. C. Miethke  
(Universität Heidelberg)  
3. Univ.- Prof. Dr. M. Heikenwälder

Die Dissertation wurde am 16.10.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 16.02.2015 angenommen.



**Meiner Familie, meinen Schwiegereltern & meinem Mann Markus**

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Waldhuber A.**, Puthia M., Wieser A., Cirl C., Dürr S., Neumann-Pfeifer S., Albrecht S., Römmler F., Müller T., Zheng Y., Schubert S., Gross O., Svanborg C. and Miethke T.: The uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 disrupts the inflammasome." Manuscript submitted

Snyder G., Deredge D., **Waldhuber A.**, Fresquez T., Wilkins D., Smith P., Dürr S., Cirl C., Jiang J., Jennings W., Luchetti T., Snyder N., Sundberg E., Wintrode P., Miethke T and Xiao T.: „Crystal structures of the Toll/Interleukin-1 receptor (TIR) domains from the Brucella protein TcpB and host adaptor TIRAP reveal mechanisms of molecular mimicry." *J Biol Chem.* (2014) 289 (2), 669-79

# Inhaltsverzeichnis

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem	1
1.2	Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems	2
1.3	Zytoplasmatische Mustererkennungsrezeptoren	3
1.3.1	RIG-I ähnliche Rezeptoren (RLRs)	3
1.3.2	NOD ähnliche Rezeptoren (NLRs)	4
1.4	Das Inflammasom und IL-1 $\beta$	6
1.4.1	NLRP1 Inflammasom	8
1.4.2	NLRC4 Inflammasom	8
1.4.3	AIM2 Inflammasom	9
1.4.4	NLRP3 Inflammasom	9
1.4.5	Inflammasom Regulierung	11
1.5	Toll-like Rezeptoren	12
1.5.1	Signaltransduktion durch TLRs	15
1.6	Modulation der angeborenen Immunantwort durch bakterielle TIR-Proteine	19
1.6.1	Bakterielle TIR-Proteine	19
1.6.2	TIR-Domänen Proteine aus CFT073 und <i>Brucella melitensis</i>	20
1.7	Aufgabenstellung	23
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1	Materialien	24
2.1.1	Geräte	24
2.1.2	Sonstiges Material	25
2.1.3	Reagenzien und Chemikalien	26
2.1.4	Zellkultur Reagenzien	27
2.1.5	Kit Systeme, Standards und Enzyme	27
2.1.6	Puffer und Lösungen	28
2.1.7	Kulturmedien	31
2.1.8	Vektoren	32
2.1.9	Antikörper und Antikörperkonjugate	33
2.1.10	Bakterienstämme	34

2.1.11 Zelllinien.....	34
2.1.12 Mäuse.....	34
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	35
2.2.1 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> Stämmen .....	35
2.2.2 DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> .....	35
2.2.3 Gelelektrophorese, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA .....	35
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von Genen.....	36
2.2.5 Restriktionsverdau und Ligation von DNA Fragmenten .....	36
2.2.6 Sequenzierung und Sequenzanalyse doppelsträngiger DNA .....	36
2.2.7 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	37
2.3 Proteinexpression in <i>E.coli</i> .....	37
2.4 Proteinchemische Methoden.....	38
2.4.1 Streptavidin-Affinitätschromatographie.....	38
2.4.2 Analytische Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration) .....	38
2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration und Konzentrierung von Proteinen .....	39
2.5 Immunchemische Methoden .....	40
2.5.1 Western Blot .....	40
2.5.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA .....	41
2.5.3 Immunfluoreszenzfärbung.....	41
2.6 Methoden zur Charakterisierung von Protein-Protein Interaktionen .....	42
2.6.1 Co-Immunopräzipitation .....	42
2.6.2 Pull-Down Assay .....	43
2.7 Zellbiologische Methoden .....	43
2.7.1 Kultivierung von Zelllinien.....	43
2.7.2 Transfektion von HEK 293 Zellen.....	44
2.7.3 NF- $\kappa$ B Reporterassay.....	44
2.7.4 Herstellung von M-CSF-haltigem Zellkulturüberstand .....	45
2.7.5 Herstellung von GM-CSF-haltigem Zellkulturüberstand.....	45
2.7.6 Gewinnung von murinen primären Knochenmarkszellen.....	45
2.7.7 Infektion mit uropathogenen <i>E. coli</i> Stämmen .....	46
2.7.7.1 Einstellung der MOI.....	46
2.7.7.2 Infektion von primären Zellen und Zelllinien.....	46

2.7.8	LDH Assay .....	47
2.8	Computerprogramme und Datenbanken .....	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
3.1	TcpC inhibiert die pro-inflammatorische Zytokin Freisetzung .....	48
3.1.1	TcpC inhibiert IL-1 $\beta$ Freisetzung und Caspase-1 Aktivierung in BMDMs .....	50
3.1.2	TcpC inhibiert IL-1 $\beta$ Freisetzung und Caspase-1 Aktivierung in BMDCs .....	54
3.1.3	TcpC inhibiert IL-1 $\beta$ Freisetzung in humanen Uroepithelzellen .....	55
3.1.4	Inflammasom Aktivierung benötigt direkten Erregerkontakt .....	56
3.1.5	IL-1 $\beta$ Freisetzung durch CFT073 ist Caspase-1, ASC und NLRP3 abhängig .....	57
3.2	Mechanismus der TcpC vermittelten Inflammasom-Inhibition .....	62
3.2.1	TcpC ko-lokalisiert mit Inflammasom Komponenten über seine TIR Domäne .....	62
3.2.2	TcpC interagiert mit Komponenten des Inflammasoms .....	64
3.2.3	Einfluss von TcpC auf Caspase-1 Aktivierung in HEK 293 Zellen .....	68
3.2.4	Einfluss von TcpC auf Inflammasom Bildung <i>in vivo</i> .....	70
3.3	<i>In Vitro</i> Charakterisierung von TcpB .....	76
3.3.1	Einfluss von TcpB auf die Co-Expression der Inflammasom Komponenten .....	76
3.3.2	TcpB und TcpB Serin Mutanten interagieren mit NLRP3 und NLRP3 $\Delta$ LRR .....	80
3.3.3	TcpB interagiert mit und moduliert TIRAP .....	84
3.3.4	TcpB inhibiert TIRAP induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierung .....	85
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>87</b>
4.1	TcpC inhibiert die pro-inflammatorische IL-1 $\beta$ Freisetzung .....	87
4.2	Mechanismus der TcpC vermittelten Inflammasom- Inhibition .....	92
4.3	Therapeutische Aspekte von TcpC .....	97
4.4	<i>In Vitro</i> Charakterisierung von TcpB .....	98
4.4.1	TcpB und TcpB Mutanten interagieren mit NLRP3 .....	98
4.4.2	TcpB und TcpB Mutanten interagieren mit TIRAP .....	100
4.4.3	TcpB und die TcpB Mutante S124AS127I inhibieren die TIRAP Signalweiterleitung .....	102
4.4.4	Kristallstruktur der TIR-Domäne von TcpB und TIRAP .....	103
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>112</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>124</b>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis:

Abb. 1: Domänenstruktur ausgewählter humaner und muriner NOD-like Rezeptoren .....	5
Abb. 2: Struktur ausgewählter Inflammasome .....	7
Abb. 3: Modell der NLRP3 Inflammasom Aktivierung.....	11
Abb. 4: TLR Signaltransduktion .....	18
Abb. 5: Sequenzvergleich der TIR-Domänen ausgewählter TIR-Proteine.....	21
Abb. 6: TcpC inhibiert NF- $\kappa$ B und Inflammasom Signaltransduktion .....	49
Abb. 7: Inhibition der IL-1 $\beta$ Freisetzung in BMDMs ist TcpC abhängig.....	51
Abb. 8: Wachstumsverhalten von CFT073 und Mutanten in LB und RPMI Medium .....	52
Abb. 9: TcpC reduziert Caspase-1 Aktivierung und IL-1 $\beta$ Freisetzung in BMDMs .....	53
Abb. 10: TcpC inhibiert Inflammasom Signaltransduktion in BMDCs .....	55
Abb. 11: TcpC reduziert IL-1 $\beta$ Freisetzung in humanen Uroepithelzellen.....	56
Abb. 12: Inflammasom Aktivierung benötigt physikalischen Erregerkontakt.....	57
Abb. 13: CFT-induzierte IL-1 $\beta$ -Produktion ist von Caspase-1/11 abhängig.....	59
Abb. 14: IL-1 $\beta$ Freisetzung ist von ASC und NLRP3 abhängig.....	60
Abb. 15: Die Bedeutung von NLRC4 für die IL-1 $\beta$ Produktion in BMDCs .....	61
Abb. 16: TcpC kolokalisiert mit Caspase-1 und NLRP3 .....	62
Abb. 17: TcpC vermittelt Kolokalisation mit Caspase-1 und NLRP3 über TIR-Domäne.....	64
Abb. 18: TcpC interagiert mit NLRP3 und Caspase-1 über seine TIR-Domäne .....	65
Abb. 19: TIR-TcpC interagiert nicht mit NLRP1 und Panx1 .....	66
Abb. 20: TIR-TcpC interagiert mit endogenem NLRP3 .....	67
Abb. 21: TIR-TcpC interagiert mit endogener Caspase-1 .....	68
Abb. 22: TcpC inhibiert Inflammasom vermittelte Caspase-1 Aktivierung .....	69
Abb. 23: TcpC inhibiert Caspase-1 Speck Bildung.....	72
Abb. 24: TcpC inhibiert Caspase-1 Speck Bildung.....	73
Abb. 25: TcpC inhibiert ASC Speck Bildung.....	74
Abb. 26: TcpC inhibiert ASC Speck Bildung.....	75
Abb. 27: Zelluläre Struktur von TcpB und TcpB Serin Mutanten.....	77
Abb. 28: Expression von TcpB und TcpB Serin Mutanten mit Inflammasom Komponenten .....	79
Abb. 29: TcpB und TcpB Serin Mutanten interagieren mit NLRP3 .....	81
Abb. 30: TcpB und TcpB Serin Mutanten interagieren mit NLRP3delta LRR .....	82
Abb. 31: TcpB interagiert mit NLRP3 und TIRAP jedoch nicht mit Panx1 und Card8 .....	83
Abb. 32: Interaktion von TcpB und TcpB Serin Mutanten mit TIRAP .....	84
Abb. 33: TcpB und TcpB S124AS127I inhibieren TIRAP vermittelte NF- $\kappa$ B Aktivierung.....	86
Abb. 34: Bedeutung von TcpC <i>in vivo</i> .....	88
Abb. 35: Vergleich der TIR-Domänen Dimere von TcpB <sup>S124AS127I</sup> und PdTLP.....	104
Abb. 36: Postulierte Modelldarstellung des molekularen Mechanismus von TcpC/TcpB .....	107

## **Tabellenverzeichnis:**

Tab. 1: Ausgewählte Toll-like Rezeptor Liganden .....	14
Tab. 2: Expressionskonstrukte .....	32
Tab. 3: Antikörper und Antikörperkonjugate .....	33
Tab. 4: Zelllinien .....	34



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Die zentrale Aufgabe des Vertebraten-Immunsystems besteht aus der Verteidigung des Körpers gegen eindringende Mikroorganismen, indem eine Immunantwort aufgebaut und das immunologische Gedächtnis entwickelt wird. Dabei kann zwischen der phylogenetisch wesentlich älteren, angeborenen Immunität und der entwicklungsgeschichtlich jüngeren, erworbenen (adaptiven) Immunität unterschieden werden. Beide Teile setzen sich aus humoralen und zellulären Bestandteilen zusammen.

Während das angeborene Immunsystem der schnellen Erkennung eingedrungener Mikroorganismen über keimbahnkodierte Rezeptoren dient, ist die adaptive Immunität durch den Aufbau eines spezifischen immunologischen Gedächtnisses charakterisiert, das bei einem sekundären Kontakt mit einem Antigen eine deutlich schnellere Reaktion ermöglicht. An der direkten Erregererkennung sind Zellen des angeborenen Immunsystems beteiligt, sowie lösliche Proteine des Komplementsystems, welche an der Oberfläche von Krankheitserregern binden, um sie so für phagozytierende Zellen zu markieren (Opsonisierung). Zu der heterogenen Familie der Phagozyten zählen in erste Linie Makrophagen und neutrophile Granulozyten sowie bestimmte Untergruppen der Dendritischen Zellen (DC) (Savina & Amigorena, 2007). Diese Zellen sind in der Lage pathogene Mikroorganismen durch Aufnahme zu eliminieren, und Botenstoffe zu sekretieren, welche erneut Phagozyten an den Ort des infizierten Gewebes rekrutieren. Nach Aufnahme von Pathogenen, infizierten oder sterbenden Zellen, prozessieren Antigen-präsentierende Zellen (APCs), insbesondere DCs, Bestandteile dieser Antigene in Peptiden und präsentieren diese über MHC (*major histocompatibility complex*) Moleküle an T-Lymphozyten, um eine Antigen-spezifische Immunreaktion zu induzieren. Dies führt zur Initiierung der spezifischen Bekämpfung (= adaptive Immunantwort) des Pathogenes über Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) und Bildung von sezernierten Antikörpern durch B-Zellen.

Entscheidend für eine effektive Immunantwort sind Rezeptoren, die mikrobielle Moleküle erkennen und daraufhin eine komplexe Signalkaskade einleiten. Während die Zellen des adaptiven Immunsystems (B- und T-Zellen) theoretisch die Möglichkeit besitzen gegen alle mikrobiellen Antigene Rezeptoren zu generieren, erkennen die Rezeptoren der Zellen des angeborenen Immunsystems hochkonservierte Strukturen von Mikroorganismen.

## 1.2 Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

Wie bereits beschrieben, beruht die angeborene Immunität auf Keimbahn kodiert angelegten Rezeptoren. Diese Rezeptoren werden unter dem Oberbegriff „Pattern Recognition“ Rezeptoren (PRRs) zusammengefasst. Gemäß ihrer zellulären Lokalisation können PRRs in drei Hauptklassen unterteilt werden: membranständige, lösliche/sekretorische sowie zytoplasmatische PRRs. Darunter Toll-like Rezeptoren, das Mannose bindende Lektin und die Familie der Nod-like Rezeptoren. Eine alternative Unterteilung erfolgt entsprechend ihrer Funktion in sekretierte, phagozytisch wirkende sowie Signal-transduzierende PRRs (Medzhitov & Janeway, 2000). Diese Rezeptoren erkennen jeweils hochkonservierte pathogen-assoziierte Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), wie z.B. den Zellwandbestandteil Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien, bakterielle Peptide oder Nukleinsäuren von Viren und Bakterien. Gemeinsame Merkmale von PAMPs sind Strukturen, die ausschließlich mikrobielle Pathogene tragen, unter verschiedenen bakteriellen Taxa weit verbreitet sind und essentiell für das Überleben der Krankheitserreger sind. Damit ist die Diskriminierung zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ möglich (Medzhitov & Janeway, 2002). Darüber hinaus werden endogene Moleküle von beschädigten oder sterbenden Zellen erkannt, sogenannte DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) wie z.B. Nukleotide (ATP) oder freigesetzte Proteine (Kono & Rock, 2008).

Zur Klasse der **sekretierten Rezeptoren** gehört das Plasmaprotein Mannose-bindendes Lektin (MBL), welches an die Monosaccharide Mannose oder N-Acetyl-Glukosamin auf der Pathogen Oberfläche bindet und die Aktivierung des Komplementsystems über den Lektin Weg zur Folge hat (Fraser *et al.*, 1998).

An der Internalisierung eines Erregers sind meist mehrere Rezeptoren beteiligt. Diese **phagozytotisch wirkenden PRRs** sind vor allem an Makrophagen untersucht worden, darunter die Klasse der Scavenger Rezeptoren, der Mannose-Rezeptor und weitere C-Typ Lektine wie Dectin-1 oder Dectin-2 (Stahl & Ezekowitz, 1998, Underhill & Ozinsky, 2002).

Zur Gruppe der **Signal-transduzierenden PRRs** gehören die membranständigen Toll-like Rezeptoren (TLRs) sowie die zytoplasmatischen NOD ähnlichen Rezeptoren (NLRs) und RIG-I ähnlichen Helikasen (*RIG-I-like receptor*). Sie sind dazu befähigt, Signal-transduktionskaskaden auszulösen, welche die Transkription von Genen für antimikrobielle Peptide und inflammatorische Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor (TNF $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Typ I Interferone induzieren (Medzhitov & Janeway, 2000). Das Zusammenspiel zwischen PAMPs und PRRs wurde vor allem durch die langjährige Forschung im Bereich der TLRs maßgeblich aufgeklärt (reviewed von O'Neill *et al.*, 2013). In den letzten Jahren gab es jedoch ebenso starke Belege auf die essentielle Bedeutung der NLRs, während der angeborenen Immunantwort auch im Zusammenspiel mit den TLRs.

In folgenden Abschnitten wird detaillierter sowohl auf die Rolle der zytoplasmatischen NLRs, als auch der membranständigen TLRs eingegangen.

### 1.3 Zytoplasmatische Mustererkennungsrezeptoren

Wie auch die Membran gebundenen TLRs, welche auf der Zelloberfläche oder in lysosomalen/endosomalen Kompartimenten PAMPs erkennen, nehmen die zytoplasmatischen Mustererkennungsrezeptoren mikrobielle Moleküle sowie DAMPs im Zytosol der Zelle wahr. Diese Rezeptoren lassen sich in drei Gruppen einteilen: RLRs (*RIG-I like receptors*), NLRs (*NOD-like receptors*) und die DNA Sensoren ALRs (*AIM2-like receptors*). Gemeinsam tragen sie mit den TLRs zur Eliminierung von pathogenen Eindringlingen wie Bakterien, Viren und Pilzen bei.

#### 1.3.1 RIG-I ähnliche Rezeptoren (RLRs)

Die Rezeptorfamilie der RIG-I ähnlichen Helikasen sind Sensoren viraler RNA und besteht aus drei Mitgliedern: RIG-I (*Retinoic acid-inducible gene 1*), MDA5 (*Melanoma differentiation-associated gene 5*) und LGP2 (*laboratory of physiology-2*) (Yoneyama *et al.*, 2004, Kato *et al.*, 2008). RIG-I und MDA5 setzen sich aus zwei N-terminalen CARD Domänen (*caspase-recruitment domains*), einer DExD/H Box RNA Helikase Domäne sowie einer C-terminalen Repressor Domäne (RD) zusammen.

Die Rezeptoren RIG-I und MDA5 verwenden zur Weiterleitung des Signals den Adaptor MAVS (*mitochondrial antiviral-signaling protein*) auch IPS-1 (*Interferon promoter stimulator 1*) genannt. Dies geschieht über Interaktion mit der gemeinsamen CARD Domäne. MAVS führt das Signal an die Transkriptionsfaktoren IRF3, IRF7 sowie NF- $\kappa$ B weiter und induziert auf diesem Weg die Produktion von Typ I Interferonen und inflammatorischen Zytokinen (Kawai *et al.*, 2005). Hou *et al.* konnten anhand von rekombinantem MAVS Protein die Bildung hochmolekularer, Protease stabiler Polymerstrukturen zeigen, welche zur Aktivierung von IRF3 in der Lage waren. Diese fibrillären Strukturen wiesen eine deutliche Ähnlichkeit zu Prionen auf („prion like“). Korrelierend damit besitzen sie auch die Fähigkeit durch Polymerisation Signalweiterleitung zu induzieren sowie die Polymerisation von inaktivem MAVS zu starten. Die Prion Domäne liegt innerhalb der CARD Domäne (Hou *et al.*, 2011, Zeng *et al.*, 2010, Cai *et al.*, 2014).

Da LGP2 keine CARD Domäne trägt, wurde es zunächst als negativ Regulator von RIG-I und MDA5 eingeordnet (Rothenfusser *et al.*, 2005). In neueren Studien wird LGP2 jedoch als positiver Regulator beschrieben, da im Tiermodell gezeigt werden konnte, dass eine

Mutation im LGP2 Protein bzw. das Fehlen von LGP2 die antivirale Immunantwort durch MDA5 oder RIG-I verhindert (Venkataraman *et al.*, 2007, Satoh *et al.*, 2010).

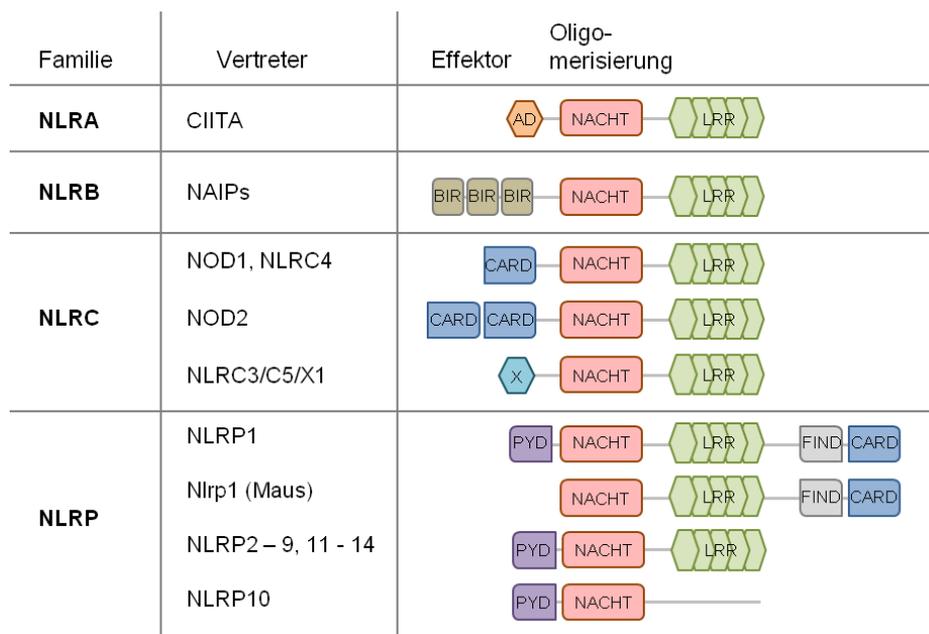
RIG-I erkennt typischerweise virale RNA mit Triphosphatgruppe am 5' Ende (Hornung *et al.*, 2006, Pichlmair *et al.*, 2006), kann aber auch durch Liganden ohne 5' Triphosphat aktiviert werden, wenn diese eine bestimmte Länge besitzen. So erkennt RIG-I dsRNAs bis zu einer Länge von 1kb, während größere Nukleinsäurefragmente typischerweise durch MDA5 detektiert werden (Kato *et al.*, 2008).

### 1.3.2 NOD ähnliche Rezeptoren (NLRs)

Obwohl TLRs und NOD-ähnliche Rezeptoren (*Nucleotide-binding oligomerization domain - like-receptors*, NLRs) an unterschiedlichen Orten der Zelle verfügbar sind, erkennen beide Rezeptorfamilien hauptsächlich Bakterien, im Gegensatz zu den bereits besprochenen RLRs, welche eine antivirale Immunantwort induzieren.

Die Familie der zytosolischen NLRs besteht derzeit aus 23 humanen und aus 34 murinen Vertretern (Chen & Sun, 2013) welche einen gemeinsamen Aufbau aus drei unterschiedlichen Domänen teilen: einer zentralen Nukleotid-bindenden Domäne (NACHT, NOD oder NBD – *nucleotide-binding domain*), einer C-terminalen Leucin-reichen Domäne (*leucine rich domain*, LRR) und der N-terminalen Effektor-domäne. Anhand der Effektor-domäne wurden die NLRs in vier Unterfamilien eingeteilt: die **NLRA Familie** mit einer azidischen Transaktivator Domäne, die **NLRB Familie** mit einer BIR (*baculoviral inhibitory repeat*) Domäne, die **NLRC Familie** mit CARD Domäne sowie die **NLRP Familie** mit Pyrin Domäne (siehe Abbildung 1) (Ting *et al.*, 2008, Schroder & Tschopp, 2010). Eine weitere Einteilungsmöglichkeit basiert auf der phylogenetischen Verwandtschaft der NLRs zueinander und führt zu 3 Unterfamilien: NODs, NLRPs und IPAF (Schroder & Tschopp, 2010). Die einzige gemeinsame Domäne aller NLRs ist die NACHT Domäne welche ATPase Aktivität besitzt und zur Oligomerisierung beiträgt (Latz *et al.*, 2013).

Nur für die wenigsten NLRs konnte die für TLRs charakteristische und gut untersuchte Liganden Erkennung über die LRR Domäne gezeigt werden (Akira, 2003, Ting *et al.*, 2010). Beispiele hierfür sind NOD1 und NOD2 welche beide die bakteriellen Peptidoglykan Moleküle  $\gamma$ -D-glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure (iE-DAP) bzw. Muramyl Dipeptid (MDP) erkennen. Die Wahrnehmung der Liganden führt zur Oligomerisierung von NOD1 und NOD2 und schließlich zur Rekrutierung der Kinase RIPK2 (*Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2*) die für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) und MAPK (*mitogen activated protein kinase*) essentiell ist (Inohara *et al.*, 2000; Chamaillard *et al.*, 2003, Girardin *et al.*, 2003, Girardin *et al.*, 2003).



**Abbildung 1: Domänenstruktur ausgewählter humaner und muriner NOD-like Rezeptoren**

Die allgemeine Struktur der NOD-like Rezeptor Familie besteht aus einer zentralen NACHT Domäne, einer C-terminalen LRR Domäne und der N-terminalen Effektor Domäne. Die Familie der NLRs wurde anhand der Effektor Domäne in vier Unterfamilien eingeteilt: die **NLRA Familie** mit einer azidischen Transaktivator Domäne, die **NLRB Familie** mit einer BIR Domäne, die **NLRC Familie** mit CARD Domäne sowie die **NLRP Familie** mit Pyrin Domäne.

Abkürzungen: AD: *acidic domain*; BIR: *baculovirus inhibitor of apoptosis repeat*; CARD: *caspase activation and recruitment domain*; CIITA: *class II, major histocompatibility complex transactivator*; FIIND: *function to find*; LRR: *leucine-rich repeat*; NACHT: *NAIP, CIITA, HET-E and TP1 domain*, PYD: *pyrin domain* (modifiziert nach Zhong *et al.*, 2013)

Bislang wurde eine Vielzahl verschiedener PAMPs und DAMPs beschrieben, welche zur NLR Aktivierung führen. Hierbei scheint es statt einer direkten Interaktion alternative Aktivierungsmechanismen zu geben. Die große Bandbreite der Moleküle führt zu diversen zellulären Reaktionen, wie der Aktivierung von NF-κB und MAPK durch NOD1 und NOD2 (Chamaillard *et al.*, 2003, Girardin *et al.*, 2003, Girardin *et al.*, 2003), der Transkription von MHC Molekülen durch CIITA und NLRC5 (LeibundGut-Landmann *et al.*, 2004, Kobayashi & van den Elsen, 2012) sowie zur Bildung von Inflammasomen z.B. über NLRP3, NLRP1 und NLRC4. Das sogenannte Inflammasom ist eine Caspase-1 aktivierende Signal Plattform und führt unter anderem zur Reifung von IL-1β (Martinon *et al.*, 2002). Im folgenden Abschnitt (1.4) wird auf die molekulare Struktur des Inflammasoms, die Aktivierung der Caspase-1 sowie der daraus resultierenden IL-1β Sekretion genauer eingegangen.

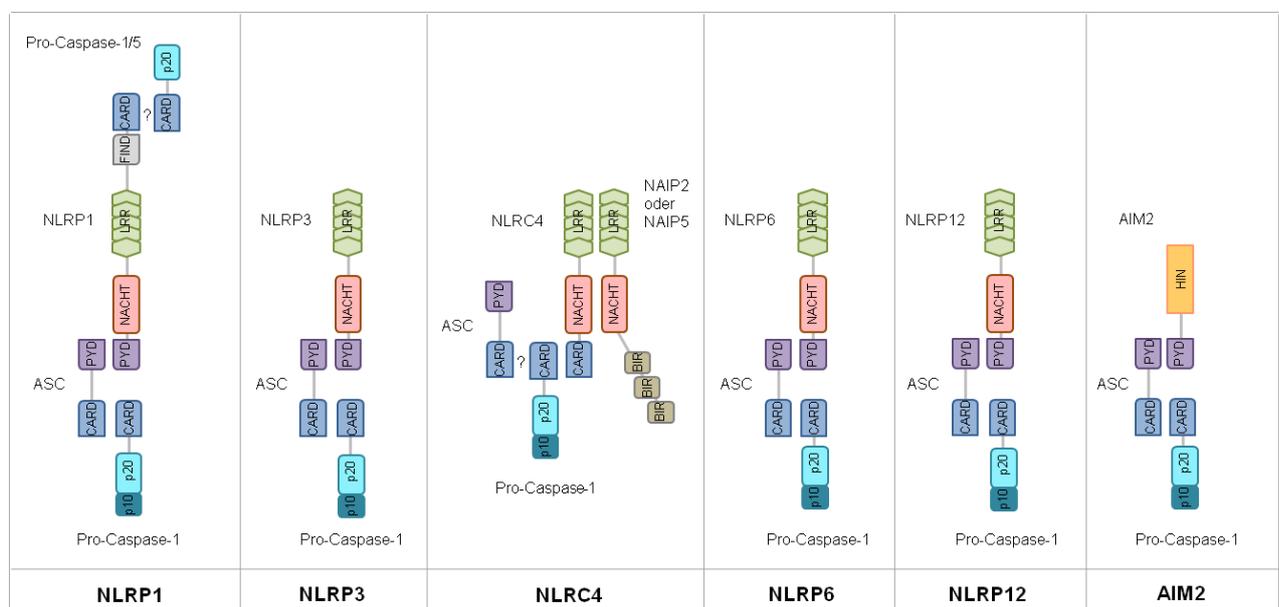
## 1.4 Das Inflammasom und IL-1 $\beta$

Das Inflammasom ist ein hochmolekularer Signalkomplex, bestehend aus einem NLR Protein oder dem PYHIN (*PYRIN and HIN domain-containing*) Protein AIM2 (*absent in melanoma 2*), dem Adapter Protein ASC (*apoptotic speck-containing protein containing a CARD*, auch PYCARD genannt) und Pro-Caspase-1. Die Funktion der Inflammasome besteht aus der Rekrutierung und Aktivierung der Cystein Protease Pro-Caspase-1, welche anschließend IL-1 $\beta$  und IL-18 spaltet. Im Allgemeinen oligomerisieren die NLRs über ihre NACHT (auch NOD oder NBD genannt) Domänen und rekrutieren Pro-Caspase-1 über direkte Interaktion mittels CARD Domäne. Die meisten NLRs, wie z.B. NLRP3, besitzen jedoch keine eigene CARD Domäne und benötigen daher die Hilfe des Adapters ASC, der N-terminal über die PYD Domäne den NLR bindet und C-terminal über seine CARD Domäne an Pro-Caspase-1 binden kann (Bauernfeind *et al.*, 2011). Bemerkenswerterweise oligomerisiert ASC nach Aktivierung über die PYD Domänen zu einem zytoplasmatischem Proteinaggregat ("ASC Speck" genannt), welches als Gerüst zur Caspase-1 Rekrutierung dient (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2007). Die Bildung des vollständigen Inflammasoms führt vermutlich allein durch räumliche Nähe zur auto-katalytischen Spaltung der als Zymogen vorliegenden, 45 kDa großen Pro-Caspase-1. Zunächst spaltet sich Pro-Caspase-1 in ein 35 kDa (p35) großes Fragment und die Untereinheit p10. Anschließend wird p35 in p20 und die CARD Domäne prozessiert. Die nun aktiven Caspase-1-p10 und -p20 Untereinheiten bilden das Hetero-Tetramer p20<sub>2</sub>-p10<sub>2</sub> und spalten ihre Substrate pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL18 in die bioaktiven Formen IL-1 $\beta$  und IL-18. Darauf folgend werden p10, p20 sowie matures IL-1 $\beta$  und IL-18 aus der Zelle sekretiert (Martinon *et al.*, 2002, Rathinam *et al.*, 2012). Das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  wird von Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen, NK-Zellen und B-Lymphozyten gebildet und ist als zentraler Mediator an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt, insbesondere an der Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen, Freisetzung von Zytokinen und Regulation der Körpertemperatur (Dinarello, 2009). Die Signal-Weiterleitung erfolgt nach Bindung des Zytokins an IL-1 Rezeptor, Typ 1 (IL-1RI) über die Bildung eines membranständigen heterodimeren Rezeptorkomplexes aus IL-1RI und dem Ko-Rezeptor IL-1RAcP (*IL-1 receptor accessory protein*), welcher zur Induktion IL-1 abhängiger Gene führt (Dinarello, 1996). Normalerweise liegt das Vorläuferprotein pro-IL-1 $\beta$  nur in geringen Mengen im Zytosol der Zelle vor, erst durch Aktivierung von NF- $\kappa$ B über das TLR System wird die weitere Produktion von pro-IL-1 $\beta$  und Komponenten des Inflammasoms induziert. Dies geschieht zum Beispiel durch Anwesenheit des PAMPs LPS welches TLR4 aktiviert und somit als primäres Signal („priming“) die Inflammasom Aktivierung induziert (Burns *et al.*, 2003, Mariathasan *et al.*, 2004; Bauernfeind *et al.*, 2009, Kahlenberg *et al.*, 2005). Auf die Signaltransduktionskaskade der TLRs wird im Abschnitt 1.5 genauer eingegangen. Um die Bildung des Inflammasoms („Assemblierung“)

final zu induzieren bedarf es jedoch noch eines zweiten Signals, welches verschiedenste Quellen haben kann, z.B. Harnsäurekristalle, extrazelluläres ATP oder dsRNA. In den folgenden Abschnitten wird auf die Signaltransduktion detaillierter eingegangen.

Zusätzlich zur Prozessierung von pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL18 führt aktivierte Caspase-1 zu einer besonderen Form des programmierten Zelltods, der Pyroptose (Brennan & Cookson, 2000, Monack *et al.*, 2001; Fink & Cookson, 2006). Pyroptose ist ein wichtiger Mechanismus zur Bekämpfung mikrobieller Infektionen. Während der Pyroptose kommt es zur Freisetzung antimikrobieller Moleküle und desweiteren zur Exposition intrazellulärer Pathogene an Neutrophile, welche diese dann durch Produktion von reaktiven Sauerstoff Spezies (*reactive oxygen species*, ROS) eliminieren können (Miao *et al.*, 2010, Bergsbaken *et al.*, 2011). Im Gegensatz zur Apoptose wirkt Pyroptose pro-inflammatorisch, es kommt zu keiner kontrollierten Degradation von zellulären Bestandteilen in Form von Vesikeln und dieser Prozess ist von Caspase-1 oder -11 abhängig, anstatt der Effektor Caspasen Caspase-3, -6 und -7 (Bergsbaken *et al.*, 2009, Kayagaki *et al.*, 2011).

In den letzten Jahren wurden verschiedene Inflammasome inklusive unterschiedlichster Stimuli und Mechanismen der Caspase-1 Aktivierung beschrieben. Die meisten von ihnen enthalten ein NLR Protein, wie z. B. NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12 oder NLRC4 (IPAF). Zusätzlich wurden auch Inflammasome mit AIM2, IFI16 (IFN $\gamma$ -induzierbares Protein 16) und RIG-I identifiziert (Hornung & Latz, 2010, Poeck *et al.*, 2010). In Abbildung 2 ist der Aufbau ausgewählter Inflammasome in der Übersicht dargestellt.



**Abbildung 2: Struktur ausgewählter Inflammasome**

Die Aktivierung der NLR Proteine NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRP6, NLRP12 und des Pyrin Proteins AIM2 führt zur Rekrutierung des Adapter Moleküls ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) und Pro-Caspase-1. Abkürzungen: AD, *acidic domain*; BIR, *baculovirus inhibitor of apoptosis repeat*; CARD, *caspase activation and recruitment domain*; FIIND, *function to find*; LRR, *leucine-rich repeat*; PYD, *Pyrin domain*; (modifiziert nach Bauernfeind & Hornung, 2013).

### 1.4.1 NLRP1 Inflammasom

Das NLRP1 Inflammasom wurde 2002 von Martinon et. al. als erste Caspase-1 aktivierende Plattform beschrieben. NLRP1 ist der einzige Vertreter der NLRs, der über eine C-terminale CARD Domäne verfügt (siehe Abbildung 1) und pro-Caspase-1 oder -5 auch ohne die Hilfe von ASC in den Proteinkomplex rekrutiert (Martinon *et al.*, 2002). Die Rekrutierung von ASC an die N-terminale PYD Domäne trägt jedoch zur Verstärkung der NLRP1 induzierten Caspase-1 Induktion bei, da über die CARD Domäne von ASC weitere Pro-Caspase-1 Moleküle gebunden werden können. Für das humane NLRP1 und das murine Homolog Nlrp1b konnte mit MDP der erste Ligand zugewiesen werden (Faustin *et al.*, 2007, Bruey *et al.*, 2007). Zusätzlich wird das murine Nlrp1b-Inflammasom durch die Protease Anthrax Lethal Toxin von *Bacillus anthracis* durch direkte Spaltung aktiviert und führt zu Pyroptose der infizierten Zelle (Boyden & Dietrich, 2006, Levinsohn *et al.*, 2012, Hellmich *et al.*, 2012). Aufgrund der fehlenden PYD Domäne in Nlrp1b ist ASC kein Bestandteil des murinen Nlrp1b-Inflammasoms (Nour *et al.*, 2009).

### 1.4.2 NLRC4 Inflammasom

Das NLRC4 Inflammasom (früher bekannt als IPAF) wird durch Flagellin und Komponenten des Typ III Sekretionsapparates (T3SS) zum Beispiel von *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* und *Legionella pneumophila* aktiviert (Franchi *et al.*, 2006, Miao *et al.*, 2006, Zamboni *et al.*, 2006, Miao *et al.*, 2010). NLRC4 besitzt eine N-terminale CARD Domäne und ist so in der Lage mit der CARD Domäne von Pro-Caspase-1 zu interagieren (Poyet *et al.*, 2001). Nichtsdestotrotz benötigt NLRC4 den Adapter ASC für die Aktivierung von Caspase-1 und der daraus resultierenden Prozessierung und Freisetzung von IL-1 $\beta$ . NLRC4 induziert außerdem die Caspase-1 abhängige Pyroptose der infizierten Zelle unabhängig von ASC (Broz *et al.*, 2010). Da keine direkte Bindung von Flagellin an NLRC4 nachgewiesen werden konnte (Franchi *et al.*, 2006), wurde nach anderen möglichen Mechanismen der Flagellin Erkennung geforscht. NLRC4 verwendet dazu die Hilfe von NAIP Proteinen (*NLR family, apoptosis inhibitory protein*). Es konnte gezeigt werden, dass NAIP5 den C-Terminus des Flagellins von *Salmonella typhimurium* bindet und dass NAIP2 mit dem T3SS von *Salmonella typhimurium* und *Burkholderia thailandensis* interagiert. NAIP2 und NAIP5 können so das Signal an NLRC4 über Bindung an die NACHT Domäne weiterleiten (Kofoed & Vance, 2011, Zhao *et al.*, 2011).

### 1.4.3 AIM2 Inflammasom

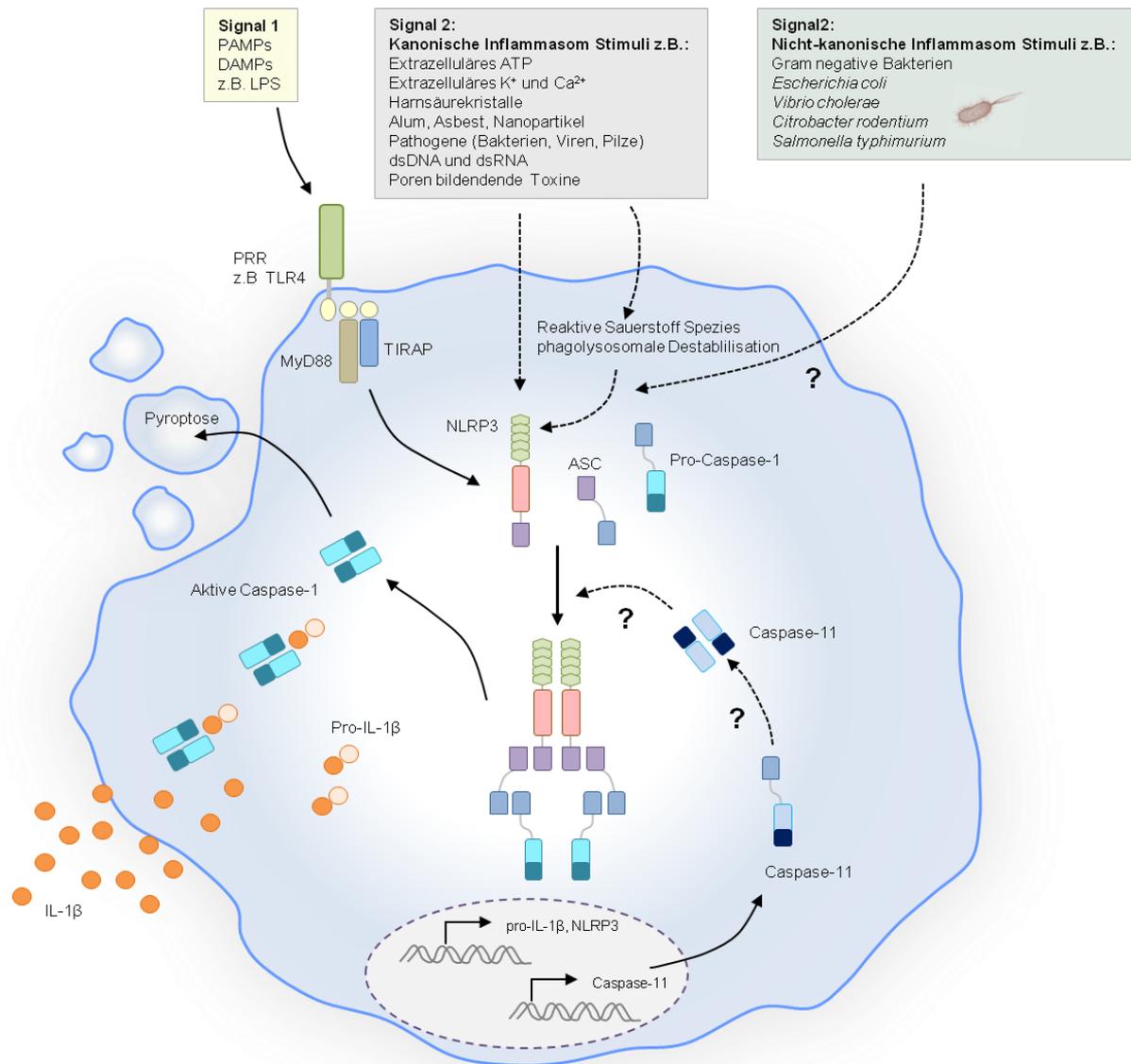
Als bislang jüngstes Caspase-1 aktivierendes Inflammasom wurde der Rezeptor AIM2 entdeckt. AIM2 gehört zur Familie der PYHIN-Proteine und besitzt eine N-terminale PYD sowie eine C-terminale HIN Domäne. (Hornung *et al.*, 2009, Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009, Burckstummer *et al.*, 2009, Roberts *et al.*, 2009). AIM2 ist ein zytoplasmatischer Rezeptor für dsDNA und benötigt ASC zur Rekrutierung der Pro-Caspase-1. Das AIM2 Inflammasom wird durch bakterielle dsDNA von *Francisella tularensis* (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009, Rathinam *et al.*, 2010), *Listeria monocytogenes* (Kim *et al.*, 2010) und bestimmte *Legionella pneumophila* Stämme (Ge *et al.*, 2012) aktiviert. Auch Virus dsDNA von Vaccinia Virus und murinem Cytomegalo Virus (Rathinam *et al.*, 2010) wird von AIM2 erkannt. Durch die erst kürzlich aufgeklärte Kristallstruktur der HIN Domäne konnte die direkte Bindung von dsDNA über elektrostatische Anziehung an die positiv geladene HIN Domäne gezeigt werden (Jin *et al.*, 2012).

### 1.4.4 NLRP3 Inflammasom

Das NLRP3 Inflammasom ist derzeit der am besten beschriebene Vertreter der Inflammasome. Sein Aufbau besteht aus NLRP3, ASC und Pro-Caspase-1 (Agostini *et al.*, 2004). Die Dysregulation des NLRP3 Inflammasoms und Mutationen im *nlrp3* Gen werden mit einer Vielzahl von Krankheiten in Verbindung gebracht, unter anderem mit Autoimmunerkrankungen wie dem Muckle-Wells-Syndrom (Agostini *et al.*, 2004), Arteriosklerose (Düwell *et al.*, 2010), Typ-2 Diabetes (Masters *et al.*, 2010) und Gicht (Martinon *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wird der Erforschung der Regulation und der aktivierenden Signale des NLRP3 Inflammasoms große Aufmerksamkeit geschenkt. Es wurden bislang eine Reihe chemisch und strukturell unterschiedlicher Stimuli, sowohl mikrobiellen als auch wirtseigenem Ursprungs zur Induktion dieses Inflammasoms beschrieben. Beispiele hierfür sind Pathogene wie *Staphylococcus aureus* (Rathinam *et al.*, 2012), Influenza A Virus (Allen *et al.*, 2009), der Pilz *Candida albicans* (Gross *et al.*, 2009) als auch der Parasit *Schistosoma mansoni* (Ritter *et al.*, 2010). Darüber hinaus sind bakterielle porenbildende Proteine und bakterielle mRNA als Aktivatoren des NLRP3 Inflammasoms entdeckt worden (Mariathasan *et al.*, 2006, Harder *et al.*, 2009, Sander *et al.*, 2011). Auch endogene DAMPs wie Harnsäurekristalle, dem Verursacher von Gicht (Martinon *et al.*, 2006), sowie Substanzen aus der Umwelt zu denen Nanopartikel und Siliciumdioxid Kristalle zählen, wurden als NLRP3 aktivierend beschrieben (Yazdi *et al.*, 2010, Hornung *et al.*, 2008). Auf Grund der unterschiedlichen Strukturen der Stimuli wird daher vermutet, dass die beschriebenen Induktoren nicht durch direkte Bindung an NLRP3, sondern über einen bislang unbekanntem Mechanismus zur Aktivierung des Inflammasoms führen. Derzeit

werden dazu unterschiedliche Modelle diskutiert. Darunter die phagolysosomale Destabilisation, die zur Freisetzung von Proteasen wie Cathepsin B führt (Hornung *et al.*, 2008), die Produktion von ROS (Cruz *et al.*, 2007) und das Ausströmen von Kalium (Petrilli *et al.*, 2007) und Calcium (Murakami *et al.*, 2012) aus der Zelle. Die Reaktion auf extrazelluläres ATP als endogenes Signal verläuft z.B. über den Rezeptor P2X7R und vermutlich dem Halbkanal Protein Pannexin-1 und führt zum Ausstrom von Kalium (Pelegriin & Surprenant, 2006, Mariathasan *et al.*, 2006).

Wie die genannten Mechanismen die Bildung des Inflammasoms und so die Caspase-1 aktivieren, ist bislang noch nicht im Detail geklärt. Im Gegensatz dazu wurde kürzlich ein weiterer Signalweg beschrieben, in dem murine Caspase-11 (humane Orthologe sind Caspase-4 und Caspase-5) zusammen mit dem NLRP3 Inflammasom die Aktivierung der Caspase-1 nach Infektion mit *E. coli*, *Citrobacter rodentium* und *Vibrio cholerae* verstärkt. Dieser alternative Weg wird „non-canonical“ genannt und speziell durch gramnegative Bakterien und isoliertes LPS induziert. Darüber hinaus scheint in diesem Signalweg die Aktivierung durch intrazelluläres LPS unabhängig von TLR4 zu geschehen (Kayagaki *et al.*, 2013). Der nicht-kanonische Weg über Caspase-11 führt demnach entweder Caspase-1 abhängig oder unabhängig zur Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-18 und IL-1 $\alpha$ . Es wurde gezeigt, dass die Entstehung der Pyroptose nach Infektion mit gramnegativen Bakterien vollständig von Caspase-11 abhängt und Caspase-1 nicht benötigt wird (Kayagaki *et al.*, 2011). Der nicht-kanonische Weg gilt jedoch nicht für grampositive Bakterien und klassischen Aktivatoren des kanonischen Inflammasom Signalweges, wie ATP oder Harnsäurekristalle, (Kayagaki *et al.*, 2011, Rathinam *et al.*, 2012). Wie die Expression von Pro-Caspase-11 induziert wird, konnte bislang nicht vollständig geklärt werden. Als ein möglicher Induktor wurden Typ I INFs diskutiert, welche über den TLR4- und TRIF abhängigen Signalweg durch Stimulation mit bakteriellen LPS sekretiert werden (Rathinam *et al.*, 2012).



**Abbildung 3: Modell der NLRP3 Inflammation Aktivierung**

Die Stimulation eines Mustererkennungszepreptors (PRR) durch Anwesenheit eines PAMPs oder DAMPs führt über Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B zur Induktion der pro-IL-1 $\beta$  und NLRP3 mRNA (= Signal 1). Ein zweites Signal, über den kanonischen oder nicht-kanonischen Signalweg, führt zur Bildung des Multiproteinkomplexes bestehend aus dem NLR Protein NLRP3, dem Adapter Molekül ASC und Pro-Caspase-1. Die dadurch ausgelöste autokatalytische Spaltung der Caspase-1 führt zur Prozessierung von Pro-IL-1 $\beta$  zu IL-1 $\beta$ , sowie zu Caspase-1 abhängigen Pyroptose der Zelle. Der nicht-kanonische Signalweg benötigt zur Caspase-1 Aktivierung zusätzlich noch Caspase-11. (modifiziert nach Bauernfeind & Hornung, 2013)

**1.4.5 Inflammation Regulierung**

Die Regulierung und Kontrolle des Inflammation ist von großer Bedeutung, da durch zu hohe Levels an IL-1 $\beta$ , IL-18 und Pyroptose enorme Gewebeschäden auftreten können. Um dies zu verhindern, besitzt die Zelle auf verschiedenen Ebenen der Inflammation Aktivierung Mechanismen, die Signaltransduktion zu stoppen. Zum einem können Inflammation Proteine und Inflammation-stimulierende Substanzen wie ROS durch Autophagie beseitigt werden

(Saitoh *et al.*, 2008, Zhou *et al.*, 2011). Zum anderen kann die Inflammasom Assemblierung durch wirtseigene Proteine, die entweder eine CARD oder PYD Domäne enthalten, verhindert werden. Dafür liefert ASC, als zentraler Adapter, eine geeignete „Angriffsfläche“. Zu den PYD-enthaltenden Regulatoren zählt die Familie der POP Proteine (*Pyrin domain only proteins*). POP1 und POP2 stören die Inflammasom Aktivierung durch Bindung an ASC und verhindern so die Interaktion mit dem NLR (Dorfleutner *et al.*, 2007). Caspase-1 wird durch den Proteinase Inhibitor 9 (PI-9) über direkte Interaktion inhibiert (Young *et al.*, 2000). Zusätzlich kann auch NLRP1 durch Mitglieder der anti-apoptischen Bcl (*B-cell lymphoma*) Familie inhibiert werden. Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> binden direkt an NLRP1, umso die Aktivierung des Inflammasoms und die darauf folgenden IL-1 $\beta$  Prozessierung zu hemmen (Bruey *et al.*, 2007).

Auch Pathogene weisen bemerkenswerte Strategien zur Inflammasom Inhibierung auf. Dies ist nicht verwunderlich, da IL-1 $\beta$  ein höchst potentes Zytokin während der Erregerabwehr ist (Dinarello, 2009) und das Inflammasom als Caspase-1 aktivierende Plattform eine essentielle Rolle dabei spielt. Ein Beispiel dafür stellen virale Homologe der POP Proteine dar. Sie binden die PYD Domäne von ASC und reprimieren so die Inflammasom vermittelte IL-1  $\beta$  Freisetzung (Johnston *et al.*, 2005, Dorfleutner *et al.*, 2007). Auch *Yersinia* species können mit ihren T3SS Effektor Moleküle, den Yops (*Yersinia outer proteins*), die Aktivierung des Inflammasoms über verschiedene Mechanismen inhibieren (Schotte *et al.*, 2004, Brodsky *et al.*, 2010).

## 1.5 Toll-like Rezeptoren

Die angeborene Immunität basiert wie bereits erwähnt auf verschiedenen Klassen von PRRs, darunter die Klasse der membranständigen Toll-like Rezeptoren. Diese Rezeptoren spielen während der zweistufigen Inflammasom Aktivierung eine entscheidende Rolle, da über die TLR-Signaltransduktionskaskade die Produktion von pro-IL-1 $\beta$ , Pro-Caspase-1 und NLRP3 induziert wird („priming“). Dies ist Voraussetzung für die Bildung des Inflammasoms und der daraus resultierenden IL-1 $\beta$  Freisetzung (Burns *et al.*, 2003, Mariathasan *et al.*, 2004; Bauernfeind *et al.*, 2009). Die Verknüpfung der membranständigen TLRs und der zytoplasmatischen NLRs verdeutlicht, wie stark die Abwehr gegen eindringende Pathogene aufgebaut ist und zeigt beispielhaft das zusammenarbeitende Konzept verschiedener PRRs für eine erfolgreiche Immunantwort.

Die Entdeckung der Toll-like Rezeptoren (TLRs) war ein außerordentlich bedeutendes Ereignis der immunologischen Forschung. TLRs gehören zu den wichtigsten Proteinen der angeborenen Immunität, da sie als primäre Sensoren eine elementare Rolle bei der

Initiierung der wirksamen Immunabwehr gegen Pathogene spielen (Iwasaki & Medzhitov, 2004; Kaisho & Akira, 2003).

TLRs wurden ursprünglich in *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo das erste Mitglied dieser Proteinfamilie, genannt „Toll“, bei der Etablierung der dorso-ventralen Polarität während der Embryogenese eine wichtige Aufgabe trägt (Anderson *et al.*, 1985, Hashimoto *et al.*, 1988). Spätere Versuche zeigten, dass dieses Protein eine zusätzliche Funktion in der Ausbildung einer effektiven Immunreaktion gegen Pilzinfektionen durch Aktivierung von antimikrobiellen Peptiden besitzt (Lemaitre *et al.*, 1996, Ferrandon *et al.*, 2007). Datenbankanalysen ermöglichten die Identifizierung und Klonierung von weiteren fünf homologen (*Toll-like*) Proteinen in Vertebraten (Rock *et al.*, 1998). Vor der Entdeckung der immunologischen Funktion von Toll, wurde 1991 ein Protein mit einer intrazellulären Domäne homolog zur intrazellulären Domäne von Toll beschrieben. Dabei handelte es sich um den humanen Interleukin-1 (IL-1) Rezeptor für den bereits eine Rolle an der Immunantwort beschrieben war (Gay & Keith, 1991). Diese gemeinsame Domäne wird seitdem Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne genannt (Bowie & O'Neill, 2000). Im Jahr 1997 konnten Charles Janeway und Ruslan Medzhitov für einen Vertreter der Toll-like Rezeptor Familie, heute als TLR4 bekannt, die Induktion des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zeigen (Medzhitov *et al.*, 1997). Zu diesem Zeitpunkt war die genaue Funktion der TLRs noch unbekannt, diese Befunde bestätigten jedoch die Vermutung, dass eine Beteiligung an der Immunantwort möglich sein könnte. Erst durch Identifikation spezifischer Liganden der TLRs konnte ihre Bedeutung während der angeborenen Immunantwort aufgeklärt werden.

Bislang wurden 10 TLRs (TLR 1–10) im Menschen und 12 funktionelle TLRs (TLR 1-9, 11-13) in der Maus entdeckt (Beutler, 2004). Das murine Homolog zu TLR10 ist aufgrund einer retroviralen Insertion nicht mehr funktional (Hasan *et al.*, 2005). TLRs werden überwiegend auf Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert, jedoch auch auf nicht-myeloiden Zellen wie auf Epithelzellen und Fibroblasten. Als membranständige Rezeptoren sind TLRs sowohl an der Zelloberfläche lokalisiert (TLR 1, 2, 4, 5 und 6) wie auch in intrazellulären Vesikeln (TLR 3,7,8 und 9), zum Beispiel dem Endosom. Für die unterschiedlichen TLRs wurden bislang zahlreiche exogene Liganden wie bakterielle Zellwand Komponenten (z.B. LPS, (Poltorak *et al.*, 1998)), bakterielle und virale Nukleinsäuren z.B. virale doppelsträngige RNA, (Alexopoulou *et al.*, 2001) als auch endogene Liganden z.B. Hitzeschockprotein Hsp60, *heat shock protein*, (Vabulas *et al.*, 2002) entdeckt und analysiert. Eine Übersicht über aktuell charakterisierte Liganden findet sich in Tabelle 1.

Die Ligandenbindung durch TLRs initiiert Signaltransduktionskaskaden, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und schließlich zur Produktion von proinflammatorischen Molekülen, wie z.B. TNF, Interferon (IFN) und/oder pro-IL-1 $\beta$  führen (siehe Kapitel 1.5.1).

**Tabelle 1: Ausgewählte Toll-like Rezeptor Liganden**

Rezeptor	Ligand	Ursprung des Liganden
<b>TLR1</b>	Triacylierte Lipopeptide Lösliche Faktoren	Bakterien und Mykobakterien <i>Neisseria meningitidis</i>
<b>TLR2</b>	Lipoprotein/Lipopeptide Peptidoglykan Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Zymosan Hitzeschockprotein 60 Hitzeschockprotein 70	unterschiedliche Pathogene grampositive Bakterien grampositive Bakterien Mykobakterien Pilze Wirt Wirt
<b>TLR3</b>	Doppelstrang-RNA (dsRNA)	Viren
<b>TLR4</b>	Lipopolysaccharide, Mannan Taxol Heat-shock Protein 60 Heat-shock Protein 70 Fibrinogen Heparansulfate Hyaluronsäure	gramnegative Bakterien Pilze Pflanzen <i>Chlamydia pneumoniae</i> Wirt Wirt Wirt Wirt
<b>TLR5</b>	Flagellin	gramnegative Bakterien
<b>TLR6</b>	Diacylierte Lipopeptide Lipoteichonsäure Zymosan	Mycobakterien grampositive Bakterien Pilze
<b>TLR7/TLR8</b>	Einzelstrang-RNA (ssRNA) Imidazoquinoline	RNA Viren synthetisch
<b>TLR9</b>	Bakterielle DNA	Bakterien
<b>TLR10</b>	Unbekannter Ligand	<i>Listeria monocytogenes</i>
<b>TLR11</b> nur in Maus	Profilin Unbekannter Ligand	<i>Toxoplasma gondii</i> uropathogene <i>Escherichia coli</i>
<b>TLR12</b> nur in Maus	Profilin	<i>Toxoplasma gondii</i>
<b>TLR13</b> nur in Maus	Bakterielle ribosomale RNA Sequenz (CGGAAAGACC)	Bakterien

Quelle: Kawai & Akira, 2010, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol, 11(5), 373-384, Raetz *et al.*, 2013, Oldenburg *et al.*, 2012, Regan *et al.*, 2013

### 1.5.1 Signaltransduktion durch TLRs

Toll-like Rezeptoren gehören zur Klasse der Typ 1 Transmembran-Rezeptoren. Sie teilen drei gemeinsame Domänen: eine extrazelluläre, N-terminale Leucin-reiche Sequenz (*leucine rich repeats*, LRR), die Zellmembran durchspannende Transmembran-Domäne und die konservierte intrazelluläre TIR-Domäne (*Toll/IL-1R homology domain*), welche eine Schlüsselrolle in der TLR Signalgebung spielt und auf dessen Struktur im Abschnitt 1.6.1 genauer eingegangen wird.

Nach Erkennung der unterschiedlichen PAMPs durch die LRR-Domäne (Akira, 2003), dimerisieren die Rezeptoren zu Homo- bzw. Heterodimeren und eine Signalkaskade wird ausgelöst. Hierbei werden Adapter Moleküle an die intrazelluläre TIR-Domäne rekrutiert und durch die gemeinsame TIR-Domäne kommt es zu einer Interaktion zwischen TLR und dem Adapter Protein (Kenny & O'Neill, 2008). Derzeit sind fünf verschiedene Adapter beschrieben (O'Neill *et al.*, 2003, Carty *et al.*, 2006). Der erste charakterisierte Adapter war Myd88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), danach folgten MAL (*MyD88 adaptor-like*), auch TIRAP (*TIR-domain containing adaptor protein*) genannt, TRIF (*TIR-domain containing adaptor inducing INF $\beta$* ) sowie TRAM (*Trif-related adaptor molecule*). Im Jahr 2006 wurde ein fünftes Mitglied der TIR-Adapter Familie beschrieben. Es handelt sich um SARM (*sterile-alpha and Armadillo motif-containing protein*), einem negativen Regulator des TRIF-abhängigen TLR Signalweges (Carty *et al.*, 2006). Die einzelnen Adaptermoleküle sind charakteristisch für individuelle TLRs, sie induzieren jedoch gemeinsam die Aktivierung und Translokation der beiden wichtigen Transkriptionsfaktor Familien NF- $\kappa$ B und Interferonregulatorischen Faktoren (IRFs) in den Zellkern. Dies führt zur Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen (wie TNF und pro-IL1 $\beta$ ) und im Fall von endosomalen TLRs, zur Induktion von Typ I Interferonen (IFN) (Akira, 2003).

In der TLR-Signaltransduktion unterscheidet man zwischen MyD88 abhängigen und MyD88 unabhängigen/TRIF abhängigen Signaltransduktionswegen.

#### Myd88 abhängiger Signalweg:

Mit Ausnahme von TLR3, spielt MyD88 in der Signalübermittlung bei allen TLRs eine zentrale Rolle (Kawai *et al.*, 1999). Neben der C-terminalen TIR-Domäne enthält MyD88 auch eine N-terminale Todesdomäne (*death domain*, DD). Nach Stimulation der TLRs bindet MyD88 über die TIR-Domäne an den dimerisierten Rezeptorkomplex und es bilden sich dort MyD88 Homodimere. Dies führt zur Rekrutierung und Aktivierung mehrerer Mitglieder der IRAK- (IL-1R-assoziierte Kinase) Familie, welche auch eine Todesdomäne besitzen und mit Myd88 interagieren können. Der entstandene DD-Komplex von Myd88-IRAK-4-IRAK-2 wird als Myddosom bezeichnet (Motshwene *et al.*, 2009, Lin *et al.*, 2010). Durch Interaktion mit Myd88 werden die IRAKs aktiviert (Muzio *et al.*, 1997) und führen das Signal durch

Rekrutierung von TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor associated factor 6*) weiter. TRAF6 und IRAK-1 dissoziieren aus diesem Komplex und interagieren mit den E2-Ligasen Ubc13 (*ubiquitin-conjugating enzyme 13*) und Uev1A (*ubiquitin conjugating enzyme E2 variant 1*). Ubiquityliertes TRAF6 bindet an die Kinase TAK1 (*transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1*) sowie deren Bindeproteine TAB1 (*TAK1-binding protein 1*) und TAB2 oder TAB3 (Deng *et al.*, 2000). Dies führt zur Phosphorylierung von TAK1, TAB2 und TAB3 durch TRAF6. Daraufhin wird TAK1 aktiviert und tritt in Wechselwirkung mit dem IKK-Komplex (IkB Kinase), bestehend aus IKK- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$ . Dieser wiederum phosphoryliert I $\kappa$ B $\alpha$  (Inhibitor von NF- $\kappa$ B) und setzt damit NF- $\kappa$ B frei (Ghosh *et al.*, 1998). TAK1 aktiviert zudem JNK (Jun N-terminale Kinase) ein Mitglied der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) und induziert darüber die Aktivierung des Transkriptionsfaktor AP-1 (*activator protein 1*) (Sato *et al.*, 2005). Die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B translokieren in den Nukleus und induzieren die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8 und pro-IL-1 $\beta$  (vgl. Abbildung 4) (Karin & Ben-Neriah, 2000, Kawai & Akira, 2010).

Die meisten Plasmamembran und Endosom assoziierten TLRs benötigen das Adapter Protein TIRAP/MAL, um Myd88 in die Nähe der membranständigen TLRs zu rekrutieren (Fitzgerald *et al.*, 2001; Horng *et al.*, 2002; Kagan & Medzhitov, 2006; Yamamoto *et al.*, 2002, Bonham *et al.*, 2014). TIRAP/MAL fungiert über seine N-terminale Phospholipid-Bindedomäne als „Rekrutierungs Adaptor“ zwischen Myd88 und den membranständigen TLRs (Kagan & Medzhitov, 2006). Die wichtige Bedeutung von TIRAP/MAL wurde durch Versuche mit TIRAP/MAL-defizienten Mäusen bestätigt, welche analog zu MyD88-defizienten Mäusen, auf LPS Stimulation hin eine deutlich verzögerte Aktivierung von NF- $\kappa$ B und MAPK aufweisen (Horng *et al.*, 2002).

### Myd88 unabhängiger/TRIF abhängiger Signalweg

Im Gegensatz zum Myd88 abhängigen Signalweg, wird der Adaptor TRIF nur von TLR3 und TLR4 verwendet und führt über die Induktion der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und IRF3 zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine sowie zusätzlich zu Typ I Interferonen. Dies wurde durch Analysen von TRIF-defizienten Mäusen gezeigt, welche nach Stimulation von TLR3 bzw. TLR4 keine Induktion Interferon- $\beta$ -abhängiger Gene aufwiesen (Yamamoto *et al.*, 2003).

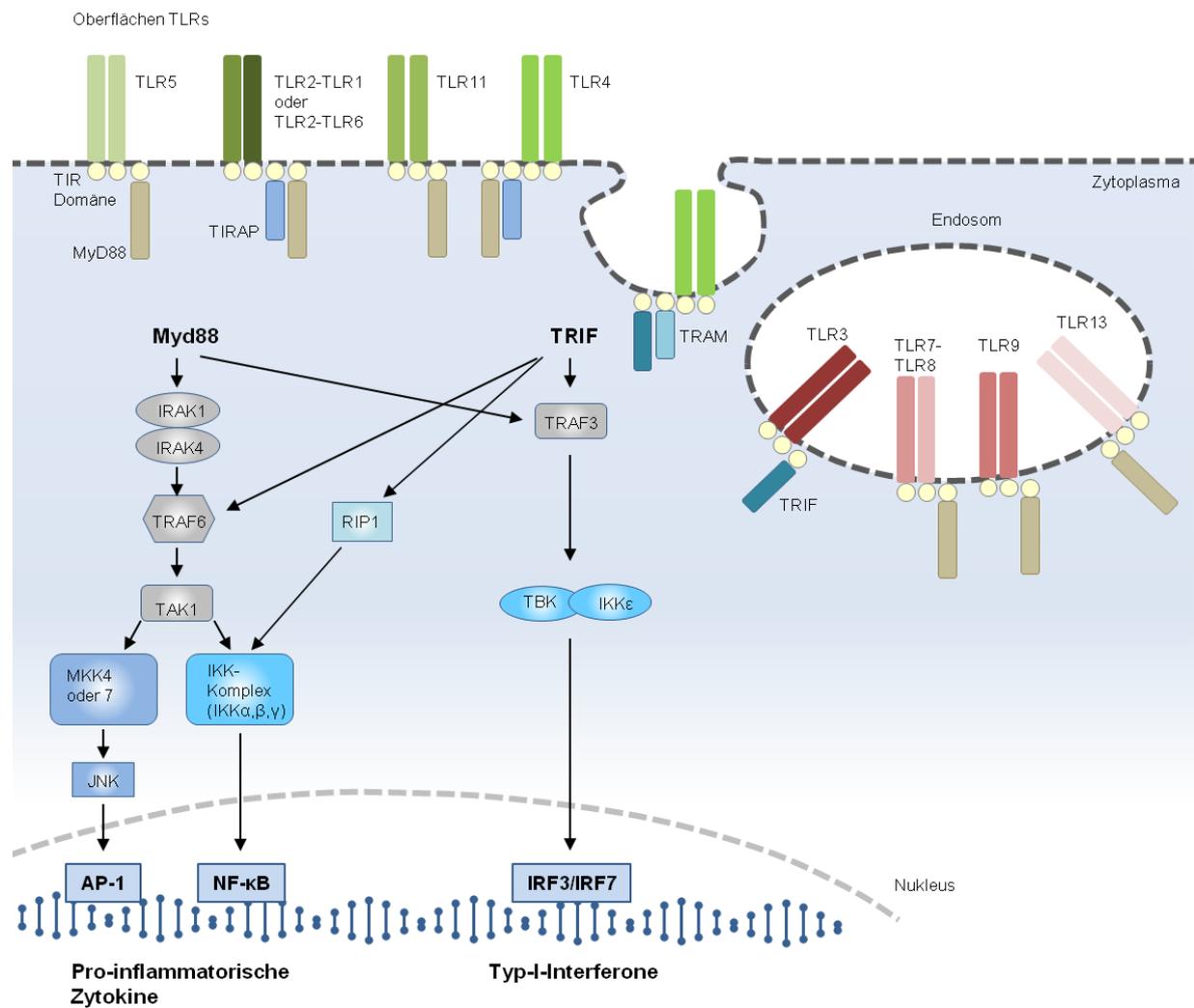
Die TRIF vermittelte Induktion von NF- $\kappa$ B erfolgt über zwei getrennte Signalwege, zum einen über Rekrutierung von TRAF6 und Aktivierung von TAK1, analog zum Myd88 Signalweg (Sato *et al.*, 2003). Zum anderen führt die Bindung von TRIF an das Adaptor Protein RIP1 (*receptor interacting protein 1*) über ein RIP homotypisches Interaktionsmotif zur NF- $\kappa$ B Aktivierung im TLR3- und TLR4 Signalweg (Cusson-Hermance *et al.*, 2005). Der TRIF abhängige Signalweg induziert ebenfalls den Transkriptionsfaktor IRF3 durch Rekrutierung

von TBK-1 (*TANK-binding kinase-1*) und IKKi (*inducible I $\kappa$ B kinase*) welche die Aktivierung und Translokation von IRF3 katalysieren (Fitzgerald *et al.*, 2003). TRIF benötigt zur Aktivierung beider Transkriptionsfaktoren nach TLR4 Stimulation die Hilfe des TIR Adapters TRAM der wie TIRAP/MAL eine Brückenfunktion zu TLR4 erfüllt (Yamamoto *et al.*, 2003, Oshiumi *et al.*, 2003) (vgl. Abbildung 4).

#### Negative Regulation der TLR Signalgebung

Obwohl TLRs für eine effektive Immunabwehr gegen Bakterien und Viren von großer Bedeutung sind, führt eine unkontrollierte TLR Antwort ebenso wie eine ungehemmte Inflammation Aktivierung (vgl. 1.4.5) zu einer Reihe von Autoimmunkrankheiten oder chronischer Entzündungen. Daher sind wirkungsvolle Kontrollmechanismen nötig, um eine Überstimulation zu verhindern. Bislang sind negative Regulatoren zur Inhibierung der TLR Signalkaskade auf verschiedenen Ebenen beschrieben worden. Dazu zählen unter anderem eine Splice Variante von Myd88 (Myd88short), der die Fähigkeit zur Bindung von IRAK4 fehlt und somit als kompetitiver Inhibitor wirkt (Burns *et al.*, 2003) sowie eine Splice Variante von TRAM (Palsson-McDermott *et al.*, 2009). Zudem fungiert das katalytisch inaktive IRAK-M als negativer Regulator, indem es die Dissoziation des IRAK4-IRAK1-Komplexes verhindert und so die NF- $\kappa$ B Aktivierung inhibiert (Kobayashi *et al.*, 2002).

Ein weiterer Mechanismus ist die direkte Interaktion mit essentiellen Domänen der Signalmoleküle innerhalb der TLR Kaskade. Zum Beispiel können TIR-Domänen enthaltende Transmembranproteine ebenfalls zur negativen Regulation führen, indem sie mit der TIR-Domäne der Adaptor Moleküle wechselwirken (Brint *et al.*, 2004; Wald *et al.*, 2003). Dies gilt auch für den bislang zuletzt entdeckten TLR Adapter SARM (Carty *et al.*, 2006). So führt die Expression von SARM zur spezifischen Blockade TRIF vermittelter Transkriptionsfaktoraktivierung, während Myd88 abhängige Signalwege nicht beeinflusst sind.



**Abbildung 4: TLR Signaltransduktion**

Toll-like Rezeptoren sind in der Plasmamembran oder endosomalen Kompartimenten von myeloiden und nicht myeloiden Zellen lokalisiert. In der TLR-Signaltransduktion unterscheidet man zwischen MyD88-abhängigen und TRIF-abhängigen Signaltransduktionswegen:

Beim MyD88-abhängigen Signalweg werden je nach TLR, außer für TLR3, verschiedene Adaptermoleküle (MyD88, TIRAP, TRAM) rekrutiert. Dies führt zur Aktivierung einer Signalkaskade von Kinasen und zur Translokation der Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP1 in den Zellkern. Dort induzieren sie die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-6 und pro-IL-1β.

Beim TRIF-abhängigen Signalweg wird die Signalkaskade durch das Adaptermolekül TRIF vermittelt. Auch dieser Signalweg mündet in der Aktivierung von NF-κB, kann alternativ auch die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 aktivieren und damit die Produktion von Typ-I-Interferonen induzieren.

(Modifiziert nach O'Neill *et al.*, 2013)

## 1.6 Modulation der angeborenen Immunantwort durch bakterielle TIR-Proteine

### 1.6.1 Bakterielle TIR-Proteine

Die TIR-Domäne ist die zentrale Domäne der Toll-like Rezeptoren, ihren Adapter Molekülen und dem IL-1 Rezeptor Typ I und ist essentiell für die Signaltransduktion der TLRs (siehe 1.5.1). Sie umfasst ca. 200 Aminosäuren und besteht aus drei hoch konservierten Bereichen, der Box 1, Box 2 und der Box 3 (Poltorak *et al.*, 1998, Akira & Takeda, 2004). Anhand von kristallographischen Analysen einiger Vertreter konnte eine gemeinsame Sekundärstruktur der TIR Domänen von je fünf alternierenden  $\alpha$ -Helices ( $\alpha A - \alpha E$ ) und fünf  $\beta$ -Faltblatt Strängen ( $\beta A - \beta E$ ) bestimmt werden, welche durch Loop/Schlaufen Strukturen verbunden sind (Xu *et al.*, 2000, Nyman *et al.*, 2008, Ohnishi *et al.*, 2009, Snyder *et al.*, 2013). Die homologen Sequenzen unterschiedlicher TIR-Domänen betragen jedoch nur einen Anteil von 20-30%, und erlauben dadurch Raum für deren funktionelle Diversität (Xu *et al.*, 2000). Besondere Bedeutung gilt dem BB Loop, der  $\beta B$ -Faltblatt und  $\alpha B$ -Helix miteinander verbindet. Dieser BB Loop besitzt einen bestimmten Prolin Rest welcher für die Signalweiterleitung von TLR2 (Underhill *et al.*, 1999), TLR4 (Poltorak *et al.*, 1998), TIRAP/MAL (Horng *et al.*, 2001) und TRAM (Fitzgerald *et al.*, 2003) essentiell ist. Ein Beispiel zur enormen Bedeutung des BB Loops liefert die Punktmutation im *tlr4* Gen von C3H/HeJ Mäusen. Hier befindet sich im BB Loop anstelle eines Prolins an Position 712 ein Histidin und dies führt zu einer ausbleibenden Antwort auf LPS Stimulation (Poltorak *et al.*, 1998).

Interessanterweise sind TIR-Proteine nicht nur im Immunsystem der Eukaryoten vorhanden, sie wurden über *in silico* Analysen auch in Bakterien, Pilzen, Archaeen und Viren gefunden (Newman *et al.*, 2006; Cirl *et al.*, 2008; Spear *et al.*, 2009). Innerhalb bakterieller Pathogene wurden bislang einige bedeutsame TIR-Domänen enthaltende Proteine (*TIR domain containing proteins*, Tcps) identifiziert. Diese bakteriellen Tcps nutzen ihre TIR-Domäne um mit TIR-Proteinen der Wirtszelle zu interagieren um so die Immunantwort des Wirts zu modulieren. Solche immunmodulierenden Tcps wurden unter anderem in *Salmonella enterica*, in *Paracoccus denitrificans*, in *Yersinia pestis*, *Enterococcus faecalis* sowie in uropathogenen *E. coli*s und *Brucella melitensis* untersucht. Das "*TIR-like protein A*" (TlpA) aus *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis inhibiert die NF- $\kappa$ B abhängige Aktivierung durch TLR4, Myd88 und IL-1R (Newman *et al.*, 2006). Auch für das „*TIR-like protein F*“ (TcpF) aus *Enterococcus faecalis* wurde kürzlich die Inhibition der TLR2-abhängigen NF- $\kappa$ B Aktivierung in Reporter Assays demonstriert (Kraemer *et al.*, 2014). Für das „*Yersinia pestis TIR-containing protein*“ YdTdp konnte eine Interaktion mit Myd88 gezeigt werden, sowie eine inhibitorische Wirkung von YdTdp auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Reporter Assays (Spear

et al., 2012). Auch für das „*TIR containing protein C*“ (TcpC) des uropathogenem Stammes *E. coli* CFT073 und dem „*TIR containing protein B*“ (TcpB) aus *Brucella melitensis* konnte ein inhibitorischer Effekt auf NF- $\kappa$ B abhängige Signalwege demonstriert werden (Cirl et al., 2008). Die erste Kristallstruktur eines bakteriellen Tcps wurde für das „*Paracoccus denitrificans TIR-like protein*“ PdTlp isoliert und lieferte wichtige Hinweise auf die molekularen Mechanismen der Immunmodulation über Bindung an Myd88 und TLR4 (Chan et al., 2009, Low et al., 2007). Die intensivste Forschung galt bislang TcpC und TcpB (Cirl et al., 2008, Salcedo et al., 2008; Yadav et al., 2010, Sengupta et al., 2010) und im nachfolgenden Abschnitt soll auf diese beiden Vertreter mikrobieller TIR-Proteine genauer eingegangen werden.

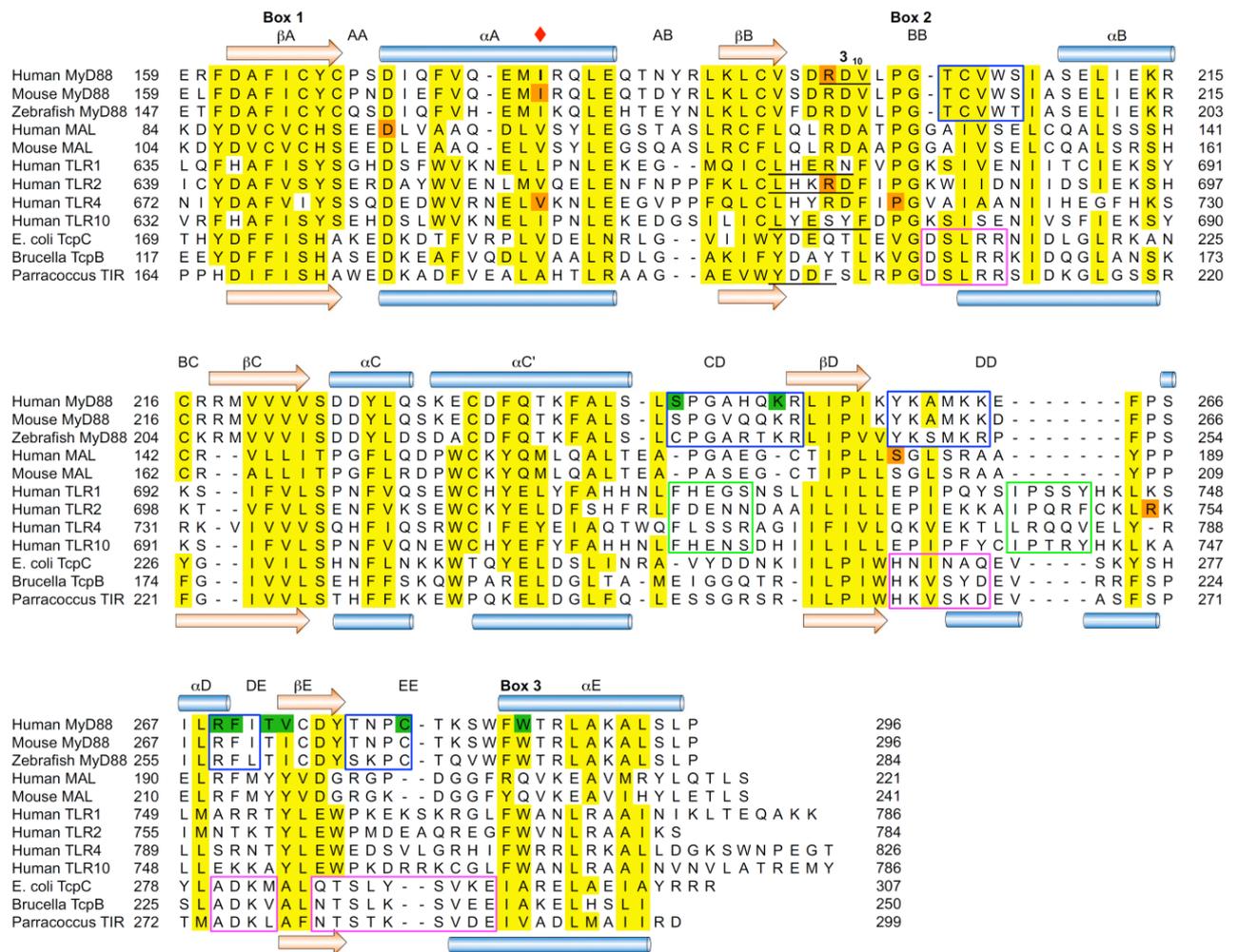
### 1.6.2 TIR-Domänen Proteine aus CFT073 und *Brucella melitensis*

Mikrobielle TIR-Proteine stellen durch ihre Fähigkeit, mit Komponenten des TLR Systems zu interagieren, eine neue Taktik zur Immunevasion von Pathogenen dar. Dazu zählen die bakteriellen TIR-Domänen Proteine TcpC von *E. coli* CFT073 und TcpB von *Brucella melitensis*. Die Aminosäuresequenz beider Proteine weist am C-Terminus eine TIR-Domäne mit Homologie zu humanen und murinen TIR-Proteinen, sowie zu PdTlp aus *Paracoccus denitrificans* auf. Vor allem innerhalb von Box 1 und zum Teil im Box 2 Motiv ist die Homologie stark ausgeprägt (s. Abbildung 5).

CFT073 gehört als Vertreter uropathogener *E. coli* (UPEC) zur Gruppe der extraintestinal pathogenen *E. coli*s (ExPECs), welche als Auslöser für 80% der Urogenitaltrakt Infektionen gelten (Zhang & Foxman, 2003). Ursprünglich wurde CFT073 aus dem Blut einer Patientin mit akuter Pyelonephritis isoliert (Mobley et al., 1990). Das vollständig sequenzierte Genom ist mit 5,2 MB bedeutend größer als das des apathogenen Stammes *E. coli* MG1655. Es codiert für 247 CFT073-spezifische genomische Inseln auf denen sich Gene einer Vielzahl UPEC charakteristischer Virulenzfaktoren zur Besiedelung des urogenitalen Gewebes befinden (Erstannotierung Welch et al., 2002, Reannotierung Luo et al., 2009). Darunter Gene für sekretierte Autotransporter Proteine wie Sat, einer Serinprotease (Guyer et al., 2000), Siderophore wie IroN (Feldmann et al., 2007), Toxine wie Hämolysin sowie Adhäsionsmoleküle wie Fimbrien und Pili (Welch et al., 2002). Um sich im Urogenitaltrakt erfolgreich festzusetzen, bilden UPECs mit Hilfe der Typ 1 Pili innerhalb der infizierten Blasenepithelzellen sogenannte „*intracellular bacterial communities*“ (IBC) (Anderson et al., 2004).

Auch das *tcpC* Gen (c2398) liegt auf solch einer Pathogenitätsinsel, der *serU* Insel (c2392–c2416). Epidemiologische Studien von klinischen Patientenisolaten zeigten deutlich mehr *tcpC* positive *E. coli* Stämme in den Fällen mit schweren Nierenentzündungen als in anderen

Formen von Harnwegsinfekten. Im murinen Harnwegsinfektionsmodell führte die Präsenz von *tcpC* zu deutlich höheren Erregerlasten im Urin sowie zu schweren Nierenabszessen. Es konnte gezeigt werden, dass CFT073 TcpC sekretiert und das Protein die Membran der Wirtszelle durchdringen kann. Damit gilt TcpC als Virulenzfaktor (Cirl *et al.*, 2008, Yadav *et al.*, 2010).



**Abbildung 5: Sequenzvergleich der TIR-Domänen ausgewählter TIR-Proteine**

Konservierte Reste innerhalb ausgewählter TIR-Domänen von eu- und prokaryotischen Organismen wurden gelb schattiert und die homologen Motive der Box 1 bis 3 sind entsprechend eingezeichnet. Oberhalb der Sequenzfolge wurde die typische Sekundärstruktur der TIR-Domänen bestehend aus fünf alternierenden α-Helices (αA – αE), dargestellt als Zylinder und fünf β-Faltblatt Strängen (βA – βE), dargestellt durch Pfeile, markiert. Loop/ Strukturen wie den BB Loop zwischen ββ-Faltblatt und αβ-Helix mit dem essentiellen Prolinrest in TLR4 (orange markiert) sind ebenfalls gekennzeichnet. (entnommen aus Snyder *et al.*, 2013)

*Brucella species* sind hochinfektiöse intrazelluläre Pathogene die über eine lange Zeit persistieren und zur chronischen Krankheit der Brucellose in Säugetieren inklusive dem Menschen führen können (Corbel, 1997). TcpB Protein (auch Btp1 bzw. BtpA genannt) wird durch Chromosom 1 in *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, und *Brucella ovis* codiert. Ein Fehlen von TcpB führt zur verzögerten Entstehung der Brucellose (Salcedo *et al.*, 2008).

TcpC und TcpB sind beide in der Lage, die TLR-vermittelte NFκB-Antwort zu inhibieren, während der TRIF-abhängige TLR3-Signalweg unbeeinflusst bleibt (Cirl *et al.*, 2008). Cirl *et al.* konnten die Bindung von TcpB und der isolierten TIR-Domäne von TcpC an MyD88 nachweisen, sowie für TIR-TcpC Interaktion mit weiteren Proteinen wie TLR2, IRAK1, IRAK4 und TRIF ausschließen (Cirl *et al.*, 2008). Für TIR-TcpC konnten, in Zusammenarbeit mit Greg Snyder und Sam Xiao, kürzlich sogar die präzisen Bindungsstellen an der TIR-Domäne von Myd88 definiert werden. Es scheint, dass der CD, DE und EE Loop von Myd88 zur Interaktion benötigt werden. Zusätzlich konnte auch die Bindung von TIR-TcpC über den BB Loop an TLR4 gezeigt werden (Snyder *et al.*, 2013).

Ein weiteres Angriffsziel von TcpB ist der MyD88-Brückenadapter TIRAP/MAL. TcpB interagiert mit TIRAP und kann ebenso wie TIRAP über die N-terminale Phospholipid-Bindedomäne an die Membran binden. Die Bindung von TcpB an TIRAP führt zur Ubiquitylierung und somit Degradierung der phosphorylierten, aktiven Form von TIRAP (Radhakrishnan *et al.*, 2009, Sengupta *et al.*, 2010). Durch die aktuellen Kristallstrukturen der TIR-Domänen von TcpB und des Wirtproteins TIRAP konnten durch Kooperation mit Greg Snyder und Sam Xiao detaillierte Einblicke in die molekularen Mechanismen gewonnen und während dieser Arbeit mit funktionellen Daten erweitert werden (Snyder *et al.*, 2014). Interne Arbeiten an der Charakterisierung von TcpB lieferten desweiteren Hinweise auf eine mögliche proteolytische Funktion, die durch potentiell katalytisch aktive Serine innerhalb der TIR-Domäne vermittelt wird. Auch für TcpC wurde eine mögliche proteolytische Funktion diskutiert (unveröffentlichte Daten), es bedarf jedoch weiterer Analysen der potentiell proteolytischen Eigenschaft der beiden Tcps.

Anhand der bisherigen Daten spielen die Tcps aus *E. coli* CFT073 und *Brucella melitensis* eine bedeutende Rolle bei der Modulation der angeborenen Immunantwort durch die direkte Beeinflussung der TLR-Signaltransduktion.

## 1.7 Aufgabenstellung

Die bakteriellen TIR-Proteine TcpC und TcpB sind in der Lage, das angeborene Immunsystem durch Modulation der TLR-Signaltransduktionskaskade über direkte Interaktion mit Schlüsselmolekülen zu inhibieren und dabei die Freisetzung NF- $\kappa$ B abhängiger Zytokine (TNF, IL-6, KC) zu reduzieren. Ein weiteres wichtiges, und höchst pro-inflammatorisches Zytokin ist IL-1 $\beta$ , welches über die Aktivierung sogenannter Inflammasome und der Caspase-1 einer komplexen Regulation unterliegt und eine zentrale Rolle u.a. während der Abwehr gegen eingedrungene Mikroorganismen spielt.

Ziel der Arbeit war es, zu überprüfen, ob es durch TcpC zu einer Beeinflussung der IL-1 $\beta$  Freisetzung kommen kann. Dabei sollte die Rolle von TcpC innerhalb des zugrunde liegenden Signalwegs der IL-1 $\beta$  Prozessierung näher charakterisiert werden. Mit Hilfe des TcpC defizienten CFT073 Stammes (CFT073 *tcpC::kan*) und des komplementierten *tcpC::kan* Stammes (*tcpC::kan* + pTcpC) sollte der Einfluss von TcpC auf die IL-1 $\beta$  Freisetzung in primären murinen Zellen sowie einer humanen Urothelzelllinie untersucht werden. Durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren und knockout Mäuse, sollte *in vitro* detailliert geprüft werden, welche Rolle die Inflammasom Komponenten NLRP3, ASC und Caspase-1 bei der CFT073 vermittelten IL-1 $\beta$  Induktion spielen.

Durch biochemische Interaktions- und Ko-Lokalisationsstudien zwischen TcpC und Inflammasom Komponenten sollten weitere Einblicke auf die funktionellen Mechanismen einer möglichen IL-1 $\beta$  Modulation gewonnen werden.

Parallel sollten auch für das homologe Protein TcpB aus *Brucella melitensis* biochemische Untersuchungen in Bezug auf einen theoretisch möglichen Einfluss während der Inflammasom Aktivierung durchgeführt werden. Zusätzlich galt es zu klären, ob zwei spezifische Serin Reste eines potentiell katalytischen aktiven Zentrums einer Serinprotease innerhalb der TIR-Domäne von TcpB, Auswirkung auf dessen inhibitorische Funktion innerhalb des TLR Systems zeigen. Hierbei galt es zu überprüfen, ob der Austausch der Serine Einfluss auf die Interaktion zwischen TcpB und TIRAP besitzt. In Kooperation mit Sam Xiao und Greg Snyder (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) sollten neue Einblicke auf die strukturellen und funktionelle Eigenschaften von TcpB und TIRAP erarbeitet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Agarose Gel Dokumentation	BioRad
Agarose Gel Elektrophorese System PerfectBlue™	PEQLAB Biotechnologie
Agfa Curix 60	AGFA
Äkta™ Purifier 10 System	GE Healthcare
Einfrierhilfe (Nalgene® Mr. Frosty)	Sigma®
Eismaschine MF36	Scotsman
ELISA microplate reader (Sunrise™)	Tecan
ELISA Washer	Skatron
Feinwaage CP124S	Sartorius GmbH
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific®
Heizblock Dri-Block DB 2D	Techne
Inkubator HeraCell 240	Heraeus
Kühlschrank	Liebherr
Mikroskop (Axiovert)	Zeiss
Mikroskop Leica DMRBE	Leica
Mikrowelle	Privileg
Milli-Q Integral System	Millipore™
Multikanalpipetten	ThermoLabsystems
Multipette® plus	Eppendorf
Inkubationsschüttler Multitron	INFORS
Nanodrop®ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie
Netzgerät Power Pac 200	Amersham/Bio-Rad
Orion Microplate Luminometer	Berthold
PCR-Gerät Thermocycler T 3000	Biometra
pH-Elektrode (Typ 465)	Ingold Messtechnik
pH-meter (MultiCal®)	WTW
Pipetboy acu	Integra Biosciences
Pipetten	Gilson
Rollenmischer IDL TRM-V	Kühn & Bayer
Semi-dry Blotting Apparatur	BioRad
Sterilbank Hera Safe 240	Thermo Fisher Scientific
Magnetrührer IKAMAG® REO	IKA
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Ultrospec 3000pro	GE Healthcare

Vertikale Doppelgel-Elektrophoresesystem	PerfectBlue™	PEQLAB Biotechnologie
Vortexer Genie 2		Scientific Industries
Waage U5000D		Sartorius GmbH
Wasserbad		Lauda
Wipptisch WT12		Biometra
Zentrifuge 5415 c		Eppendorf
Zentrifuge Biofuge fresco		Heraeus
Zentrifuge MegaFuge 1 RS		Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3 SR		Heraeus
Zentrifuge Sorvall RC 6 Plus		Thermo Fisher Scientific

### 2.1.2 Sonstiges Material

Cellstar® PP-Röhrchen, 15 und 50 ml		Greiner Labortechnik
Deckgläschen		Carl Roth
Einweg-Spritzen 5, 10 und 25 ml		VWR International
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml		Eppendorf
Filterpapier 1,3 mm		Hartenstein
Glasdouncer – Tissue Grind Tube 15 ml		Kleinfeld Labortechnik
Glasplatten und Zubehör für SDS-PAGE		PEQLAB Biotechnologie
Glasswaren		Schott
Halb-Mikro-Küvetten		Sarstedt
Konzentrator Amicon® Ultra		Millipore
Konzentrator Nanosep™ 3K Omega		Pall GmbH
Membransterilfilter (0,22 µm; ø 5 cm)		Schleicher & Schuell
Millex® HV (0,45 µm)		Millipore
Neubauer Zählkammer		Carl Roth
Objektträger		Carl Roth
Pipetten-Spitzen		Starlab
Protran® Nitrocellulose Transfermembran (0.45µm)		Whatman
Quarzglas-SUPRASIL® Küvette		Hellma
Röntgenfilme Fuji Super RX		FujiFilm
Serologische Pipetten (5-25 ml)		Greiner
Spectra/Por®cut-off 3,5 MW		Carl Roth
Stericup® Filter		Millipore
Strep-Tactin® MacroPrep® 5 ml		IBA Lifesciences
Superdex 75 HR 10/300		GE Healthcare
ThinCert™ cell culture inserts 0,4 µm		Greiner Bio-One
Zellkulturplatten Falcon		BD Biosciences
Zellsieb 100µm Nylon		BD Biosciences

### 2.1.3 Reagenzien und Chemikalien

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Sigma
2-Mercaptoethanol	Sigma
Aceton	Apotheke des MRI
Acrylamid-Stammlösung 30%ig / Bis	BIO-RAD
Adenosin-5'-triphosphat Dinatrium Salz (ATP)	Sigma
Agarose, ultra pure	Invitrogen
Aluminium hydroxide	Sigma
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma
Ampicillin, Natrium-Salz (Amp)	Carl Roth
Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc)	IBA Lifesciences
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid	Sigma
Coomassie Brilliantblau R-250	Sigma
D(+)-Saccharose	Carl Roth
D-Desthiobiotin	IBA Lifesciences
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth
Dimethylsulfid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roche Diagnostics
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Sigma
EGTA	Sigma
Entellan	E. Merck KGaA
Entwickler / Fixierlösung	Adefo-Chemie
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol absolut 99,8% (v/v)	Apotheke des MRI
Ethidiumbromid	Roth
Formaldehyd (37% Lösung)	Sigma
Glycerin	Sigma
HEPES	Sigma
Igepal® CA-630 (NP-40)	Sigma
Immersionsöl	Carl Roth
Isopropanol	Apotheke des MRI
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Kanamycin	Sigma
LPS E. coli O111:B4	Sigma
LPS ultrapure O111:B5	InvivoGen
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma
Magnesiumchlorid	Carl Roth

Magnesiumsulfat	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumfluorid (NaF)	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth
Natriumhydroxid	Carl Roth
N-Lauroylsarcosin	Sigma
N-Octyl $\alpha$ -D Glucopyranosid	Carl Roth
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) Pulver	Biochrom
Protease-Inhibitor Tabletten	Roche Diagnostics
Roti®-Mount FluorCare	Carl Roth
Salzsäure	Carl Roth
SlowFade® Gold	Invitrogen
Trichloressigsäure	Carl Roth
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Sigma

#### 2.1.4 Zellkultur Reagenzien

Accutase	Sigma
DMEM high Glucose mit L-Glutamin Medium	PAA
FCS	PAA
Gentamycin	Sigma
Opti-MEM GlutaMAX Medium	Gibco
Penicillin/Streptomycin 100X	PAA
Phosphat gepufferte Salzlösung (Dulbeccos PBS)	PAA
RPMI 1640 mit L-Glutamin Medium	PAA
Trypsin-EDTA 1x	PAA

#### 2.1.5 Kit Systeme, Standards und Enzyme

##### Kit Systeme:

CytoTox 96® (Non-radioactive cytotoxicity assay)	Promega
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega
ELISA-Kits Duo Set	R&D Systems
Endofree® Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
OptEIA™ TMB Substrat-Set	BD Biosciences
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	PEQLAB Biotechnologie

## Material und Methoden

---

peqGOLD Tissue DNA Mini Kit	PEQLAB Biotechnologie
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN
WesternBlot Chemoluminescence Reagent ECL	Perkin Elmer

### Standards:

1 kb DNA Leiter	Thermo Scientific
peqGOLD Protein-Marker IV	PEQLAB
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific

### Enzyme:

DNaseI	Sigma
GoTaq	Promega
PfuUltra™ Fusion HS DNA Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas

### **2.1.6 Puffer und Lösungen**

Alle Puffer und Lösungen wurden soweit nicht anders beschrieben, mit Millipore Q destilliertem Wasser hergestellt.

#### Antibiotika-Stammlösungen 1000x

Chloramphenicol (Cm)	34 mg/ml	in 100% EtOH
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml	in H <sub>2</sub> O
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml	in H <sub>2</sub> O

#### Induktor-Stammlösung: 100.000x

Anhydrotetracyclin (aTc)	2 mg/ml	in Dimethylformamid
--------------------------	---------	---------------------

#### Agarose-Gelelektrophorese:

TAE-Puffer:	40 mM 1 mM	Tris-Acetat pH 8,3 EDTA
10x Auftragspuffer für Agarose-Gele:	40 mM 1 mg/ml 20 mM 1 mg/ml 1 mM 50% v/v	Tris Bromphenolblau Essigsäure Xylencyanol EDTA Glycerin

Puffer für SDS-PAGE und Western Blotting:

1x Laufpuffer:	50 mM 190 mM 1 g/l pH 8,8 stellt sich ein	Tris Glycin SDS
Trenngelpuffer:	3 M 4 g/l	Tris/HCl pH 8,8 SDS
Sammelgelpuffer:	0,5 M 4 g/l	Tris/HCl pH 6,8 SDS
4x Auftragspuffer (Lämmli):	250 mM 7,5% w/v 25% v/v 0,25 mg/ml 100 mM	Tris/HCl pH 6,8 SDS Glycerin Bromphenolblau DTT
Färbelösung:	10% v/v 40% v/v 0,25% w/v	Essigsäure Methanol Coomassie Brilliantblau R-250
Entfärbelösung:	10% v/v 40% v/v	Essigsäure Methanol
Semidry Transferpuffer:	0,5 M 40 mM 0,375% v/v 20% v/v Mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen	Tris Ultra Glycin SDS 10% Methanol
TBS und TBS-T 10 fach:	1 M 1,5 M pH 7,6 mit HCl einstellen für TBS-T Puffer: 1x TBS Puffer mit 0,05% (v/v) Tween 20 versetzen.	Tris Ultra NaCl
Blockierpuffer Westernblot:	5% Milchpulver in TBS-T	
Avidin Blockierpuffer:	300 µg/ml Avidin in PBS	

## Material und Methoden

---

### Calcium Phosphat Transfektion:

2X HBS:	10 g/l	HEPES
	16 g/l	NaCl
	0,74 g/l	KCl
	0,21 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	pH 7,1 (mit NaOH einstellen)	

CaCl <sub>2</sub> Lösung:	2 M	CaCl <sub>2</sub>
---------------------------	-----	-------------------

### Puffer für Zellyse, Co-Immunopräzipitation, Pulldown:

NP40 Lyse Puffer:	50 mM	HEPES pH 7,6
	150 mM	NaCl
	1 mM	DTT
	1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	1 mM	EGTA
	0,5% (v/v)	Nonident P-40
	10% (v/v)	Glycerol
	20 mM	b-Glycerolphosphat
	1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
	0,4 mM	PMSF
	1 mM	NaF
	1 Tablette	Protease Inhibitor Cocktail (EDTA frei)
	Gesamtvolumen 100 ml	

RIPA Lysepuffer:	20 mM	Tris HCl pH 7.4
	150 mM	NaCl
	1%	Triton X-100
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	CaCl <sub>2</sub>

Lysepuffer für zytoplasmatische Proteine:	50 mM	Tris HCl pH 8.0
	100 mM	NaCl
	1%	Triton X-100
	0,20%	N-Laurylsarcosine
	1 mM	EDTA
	0,13%	N-Octylglucopyranosid

Elutionspuffer:	100 mM Natriumcitrat
	100 mM Glycin
	3 mM EDTA
	pH 2,8

Puffer für Streptavidin Affinitätschromatographie:

SAC Puffer :	100 mM	Tris HCl pH 8,0
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA

Puffer für ELISA:

Reagenzpuffer:	1x	PBS (pH 7.2-7.4)
	1%	BSA
Waschpuffer:	1x	PBS (pH 7.2-7.4)
	0.05%	Tween 20
Stopplösung:	2 M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

### 2.1.7 Kulturmedien

Zellkulturmedien:

HEK 293 Medium	1 x DMEM 10% FCS 1% Penicillin-Streptomycin
HCV29 Medium	1 x RPMI 10% FCS 1% Penicillin-Streptomycin
BMDM Medium	1 x DMEM 10% FCS 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin 0,05% β-Mercaptoethanol Zusatz von 10–15% L- Zellüberstand
BMDM Infektionsmedium	1 x DMEM mit 2-5% FCS
BMDC Medium	1 x RPMI 10% FCS 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin 0,05% b-Mercaptoethanol Zusatz von 10-15% GMCSF
BMDC Infektionsmedium	1 x RPMI mit 2-5% FCS

## 2.1.8 Vektoren

Tabelle 2 enthält die verwendeten Expressionskonstrukte für Transfektionsstudien und Proteinexpressionen.

**Tabelle 2: Expressionskonstrukte**

<b>Vektor</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Referenz</b>
pBEN20-DsRed EGFP	Leervektor DsRed N-terminal und EGFP C-terminal	S. Dürr
pBEN20-EGFP	Leervektor EGFP N-terminal	Dr. F. Schmitz
pBEN20-Myc	Leervektor Myc N-terminal	Dr. F. Schmitz
pBEN20-Flag	Leervektor Flag N-terminal	Dr. F. Schmitz
pBEN20-Flag-NLRP3	Enthält die Sequenz von hNLRP3	S. Dürr
pBEN20-Myc-NLRP3	Enthält die Sequenz von hNLRP3	S. Dürr
pBEN20-Flag-NLRP3 $\Delta$ LRR	Enthält die verkürzte Sequenz von hNLRP3 AA 1-717	S. Dürr
pBEN20-Myc-NLRP3 $\Delta$ LRR	Enthält die verkürzte Sequenz von hNLRP3 AA 1-717	S. Dürr
pBEN20-Flag-ASC	Enthält die Sequenz von hASC	S. Dürr
pBEN20-Myc-ASC	Enthält die Sequenz von hASC	S. Dürr
pBEN20-Myc-Caspase-1	Enthält die Sequenz von hCasp1	S. Dürr
pBEN20-Flag-Caspase-1	Enthält die Sequenz von hCasp1	S. Dürr
pBEN20-Myc-Panx1	Enthält die Sequenz von hPanx1	A. Waldhuber
pBEN20-Flag-Panx1	Enthält die Sequenz von hPanx1	S. Dürr
pCDNA3-Myc-NLRP1	Enthält die Sequenz von hNLRP1	Dr. S. Dreher
pBEN20-Myc-Card8	Enthält die Sequenz von hCard8	S. Dürr
pBEN20-Myc-TIRAP	Enthält die Sequenz von hTIRAP	S. Dürr
pBEN20-Flag-TcpB	Enthält die Sequenz von TcpB	S. Dürr
pBEN20-Flag-S127I-TcpB	Enthält die Sequenz von TcpB mit Mutation S127I	A. Minsinger
pBEN20-Flag-S124A/S127I-TcpB	Enthält die Sequenz von TcpB mit Mutation S124A und S127I	A. Minsinger
pBEN20-DsRedEGFP-TcpC	Enthält die Sequenz von TcpC	S. Dürr
pBEN20-Flag-TIR-TcpC	Enthält die verkürzte Sequenz von TcpC AA 170-306	S. Dürr
pBEN20-EGFP-TIR-TcpC	Enthält die verkürzte Sequenz von TcpC AA 170-306	S. Dürr
pBEN20-EGFP-TIR $\Delta$ tat-TcpC	Enthält die verkürzte Sequenz von TcpC AA 170-292	S. Dürr
pASK-IBA3+ TIR-TcpC	Enthält die verkürzte Sequenz von TcpC AA 170-306	Dr. C. Cirl
phRL-null	Enthält das Co-Reportergeren Renilla Luciferase	Promega
p6 NF-kB-TK-Luc	Enthält das Reportergeren für Firefly Luciferase (plus 6 NF-kB Bindungsstellen)	Dr. S. Dreher
pRK5	Leervektor	Dr. S. Dreher

### 2.1.9 Antikörper und Antikörperkonjugate

Tabelle 3 enthält die verwendeten Antikörper und Antikörperkonjugate für Western Blot und Immunfluoreszenz Analysen sowie Antikörper beladene Agarose Beads für Ko-Immunopräzipitations Assays.

**Tabelle 3: Antikörper und Antikörperkonjugate**

Name	Spezies	Verdünnung	Hersteller
<b>Primäre Antikörper:</b>			
monoclonal anti-Flag	Maus	1:1000	Sigma
polyclonal anti-Flag	Kanninchen	1:1000	Sigma
monoclonal anti-Myc	Maus	1:1000	Invitrogen
polyclonal anti-Myc	Kanninchen	1:1000	Sigma
polyclonal anti-GFP	Ziege	1:500	Santa Cruz
monoclonal anti-GFP	Kanninchen	1:1000	Cell Signalling
Strep-Tactin HRP-Konjugat		1:10000	IBA Life Science
polyclonal anti-mIL-1beta/IL-1F2	goat	1:1000	R&D Systems
polyclonal anti-ASC (für IF)	Kanninchen	1:400	Adipogen
monoclonal ASC (für WB)	Maus	1:1000	Millipore
monoclonal NLRP3	Maus	1:1000	Adipogen
polyclonal murin Caspase-1 p10 (für IF)	Kanninchen	1:100	Santa Cruz
monoclonal murin Caspase-1 p20 (für WB)	Maus	1:1000	Adipogen
monoclonal human Caspase-1 p20	Maus	1:1000	Adipogen
monoclonal Actin	Maus	1:10000	Millipore
<b>Sekundäre Antikörper:</b>			
anti-rabbit IgG-HRP	Ziege	1:5000	Jackson Immunoresearch
anti-mouse (goat F(ab') <sub>2</sub> -HRP	Ziege	1:5000	Jackson Immunoresearch
anti-goat IgG-HRP	Esel	1:2500	Promega
anti-rabbit IgG-Alexa488	Ziege	1:400	Molecular Probes
Hoechst 33342		1:10.000	Molecular Probes
<b>Beads:</b>			
anti-flag-M2-Agarose	Maus		Sigma Chemie
anti-c-myc-Agarose Affinity Gel	Hase		Sigma Chemie
Strep-Tactin MacroPrep 50% Suspension			IBA Life Science

### 2.1.10 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> BL21-Codon Plus®-RIL:	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
<i>E.coli</i> CFT073:	ATCC® 700928™
<i>E.coli</i> CFT073 <i>tcpC::kan</i> :	zur Verfügung gestellt von Andreas Wieser, Max von Pettenkofer-Institut, LMU München
<i>E.coli</i> CFT073 <i>tcpC::kan</i> + pT <sub>tcpC</sub> :	CFT073 <i>tcpC::kan</i> komplementiert mit pACYC184 T <sub>tcpC</sub> Operon
<i>E.coli</i> OneShot® TOP10:	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### 2.1.11 Zelllinien

Tabelle 4 enthält die verwendeten Zelllinien für Transfektionsstudien, Infektionsstudien und zur Gewinnung von konditionierten Überständen.

**Tabelle 4: Zelllinien**

Bezeichnung	Art	Eigenschaften	Quelle
HEK 293	menschliche embryonale Nierenzellen	adhärent, mit Trypsin ablösbar	ATCC® CRL-11268™
HCV29	humane Uroepithel-Zelllinie	adhärent, mit Trypsin ablösbar	Zur Verfügung gestellt von Dr. Sören Schubert, Max von Pettenkofer Institut, LMU München (Bean <i>et al.</i> , 1974)
L929	murines M-CSF produzierende Maus Fibroblasten	adhärent, mit Trypsin ablösbar	ATCC® CCL-1™
X63-GMCSF	murines GM-CSF produzierende Maus Myeloma Zellen	adhärent, mit Trypsin ablösbar	freundliche Gabe von Ton Rolink (Karasuyama & Melchers, 1988)
Knochenmarksmakrophagen	Makrophagen	adhärent, mit Accutase ablösbar	
Dendritische Zellen aus Knochenmark	Makrophagen	Semiadhärent, durch Spülen ablösbar	

### 2.1.12 Mäuse

C57BL/6	Harlan Laboratories, Rossdorf, Deutschland
C57BL/6 ASC <sup>-/-</sup>	zur Verfügung gestellt von Jurg Tschopp (Lausanne, Schweiz) und Vishva Dixit (Genentech, South San Francisco, USA)
C57BL/6 NLRP3 <sup>-/-</sup>	zur Verfügung gestellt von Prof. Jurg Tschopp (Lausanne, Schweiz)
C57BL/6 NLRC4 <sup>-/-</sup>	zur Verfügung gestellt von Florian Greten (Klinikum rechts der Isar der TU München, Deutschland)

C57BL/6 Caspase-1/11<sup>-/-</sup> zur Verfügung gestellt von AG Olaf Gross über Richard Flavell (Yale University School of Medicine, New Haven, USA)

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli* Stämmen

Die Kultivierung der verwendeten *E. coli* Stämme erfolgte aerob bei 37°C. Als Standardmedium wurde Luria-Bertani-Medium verwendet und gegebenenfalls Antibiotika zugesetzt. Zur Herstellung von Festmedien wurden LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar versehen. Das Wachstum der verwendeten *E. coli* Stämme wurde anhand der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) photometrisch bestimmt.

Zur Konservierung der Stämme wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden 0,5 ml einer sich in der stationären Phase befindenden Übernachtskultur mit 50% (v/v) Glycerin PBS versetzt und bei -80°C gelagert.

### 2.2.2 DNA-Isolierung aus *E. coli*

Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab wurden aus 5 ml Übernachtskultur mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I der Firma peqLab nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in jeweils 50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert um Kontamination mit Ionen zu vermeiden und anschließend bei -20°C gelagert.

Für Maxipräparationen wurden Klone von Plattenkulturen oder Glycerolstocks in 250 ml LB Amp oder LB Kan Medium gelöst und über Nacht bei 37°C unter konstantem Schütteln (180 rpm) inkubiert. Die Plasmidaufreinigung erfolgte mittels des Endofree® Plasmid Maxi Kit von QIAGEN gemäß den Angaben des Herstellers. Die gefällte Plasmid-DNA wurde in 200 – 400 µl TE-Puffer gelöst und auf eine DNA Konzentration von 1 µg/µl mit TE-Puffer eingestellt.

Isolierung genomischer DNA erfolgte über den peqGOLD Tissue DNA Mini Kit von PEQLAB wie für Gram-negative Bakterien beschrieben.

### 2.2.3 Gelelektrophorese, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA

Die analytische bzw. präparative Auftrennung von DNA erfolgte über 1% Agarosegele bzw. 1,5% Agarosegele für RNA und DNA-Fragmente unter 200 bp, in TAE-Puffer und 0,2 µg/ml Ethidiumbromid bei 100 V in einer Agarosegel-Laufkammer (PEQLAB Biotechnologie). Die Proben wurden mit 10x Probenpuffer versetzt und die Fragmentgrößen anhand des DNA-Längenstandards abgeschätzt. Die Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte auf einem

UV-Transilluminator bei 304 nm und die Dokumentation der Gele mit einer Fotodokumentationsanlage (BioRad).

DNA-Fragmente wurden mittels des „QIAquick GEL Extraction“-Kits von QIAGEN (Hilden) nach Angaben des Herstellers aus Agarosegelen extrahiert.

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden über Absorption bei 260 nm im NanoDrop Spectrophotometer (PEQLAB Biotechnologie) bestimmt. Die Qualität der Nukleinsäurelösungen wurde durch ein Absorptionsverhältnis von 260 nm zu 280 nm bestimmt.

### **2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von Genen**

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion nach Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.* Molecular cloning, a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989) und Mullis *et al.* (Mullis *et al.*, 1986) amplifiziert. Zur analytischen Amplifikation von Fragmenten wurde die Taq-DNA-Polymerase ohne *proofreading* Aktivität, in präparativen Ansätzen die Phusion-DNA-Polymerase mit 3'→5'-Exonuclease-Aktivität eingesetzt. Die Reaktionen wurden im TGradient Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die PCR-Standardbedingungen wurden gemäß Sambrook *et al.* gewählt und nach eingesetzten Primern und Länge des Amplifikationsproduktes modifiziert.

### **2.2.5 Restriktionsverdau und Ligation von DNA Fragmenten**

Restriktionen für präparative und analytische Zwecke wurden nach den Angaben der Hersteller der Restriktionsenzyme durchgeführt. Die Inkubationsdauer betrug zwei Stunden bei enzymabhängiger Temperatur.

Bei der Ligation von Vektoren mit dsDNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase nach Herstellerangaben eingesetzt. Zur Verhinderung einer Religation wurden linearisierte Vektoren mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die Ligrationsreaktion erfolgte über Nacht bei 16°C.

### **2.2.6 Sequenzierung und Sequenzanalyse doppelsträngiger DNA**

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch die Firma GATC, Konstanz. Bioinformatische Sequenzanalysen wurden mit Hilfe des Programms Vektor-NTI (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt.

### 2.2.7 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Zur Transformation wurden 100 µl chemisch kompetente *E. coli*- TOP10 Zellen mit 1 µl Plasmid-DNA bzw. dem gesamten Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 45 s bei 42° C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 1000 µl LB-Medium unter Schütteln bei 37°C für 1h inkubiert und anschließend auf Selektivmedien ausplattiert. Bei Plasmidtransformation wurden 100 µl des Transformationsansatzes, bei Transformation mit Ligationsansätzen wurde der gesamte Ansatz in einem Volumen von 100 µl ausplattiert. Es folgte eine Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C.

## 2.3 Proteinexpression in *E.coli*

Zur Expression rekombinanter Proteine (4 Liter Expressionsvolumen) wurde eine 200 ml Vorkultur (LB Medium mit AMP, CM) im 500 ml Erlmeyerkolben des Stammes *E. coli* BL21 - Codon Plus®-RIL mit dem zytoplasmatischen Expressionsplasmids pASK-IBA3-TIR-TcpC inokuliert und bei 30°C und 170 rpm über Nacht geschüttelt. Je 35 ml der stationären Übernachtkultur wurden auf vier 2-Liter Schikanekolben mit je einem Liter LB Medium mit AMP, CM und 1:20 DMEM Medium überführt und bei 30°C und 170 rpm geschüttelt. Das Wachstum wurde durch stündliche Probenentnahme über die Messung der OD<sub>600</sub> verfolgt. Bei Erreichen der OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 wurde 1 ml der Bakteriensuspension zur Kontrolle des tet-Promotors für einen Gesamtzellaufschluss entnommen. Dieser erfolgte nach Zentrifugation (5000 rpm, 5 min, RT) durch Inkubation mit 80 µl Ripa Lysepuffer für 30 min auf Eis und anschließender Zugabe von 20 µl 4x Auftragspuffer. Die Proben wurden bis zur Analyse durch SDS-PAGE (vgl. 2.4.3) bei -20°C eingefroren gelagert. Die Induktion des tet-Promotors wurde mit einer Anhydrotetracyclinlösung (2 mg/ml) induziert (Endkonzentration: 200 µg/l) und die Temperatur auf 22°C erniedrigt. Die Induktionsdauer betrug 2,5 h. Während der Induktion und unmittelbar vor der Zellernte wurden erneut 1 ml Proben für den Gesamtzellaufschluss zur Expressionskontrolle der Proteine entnommen. Die Gewinnung der Zytoplasmafraktionen erfolgte durch Zentrifugation (4°C, 15 min, 5.000 rpm) und anschließender Resuspension der pelletierten Zellen durch Zugabe von ca. 10 ml Lysepuffer für zytoplasmatische Proteine und frischem Protease Inhibitor (1/8 Tablette pro Kolben). Während der Inkubation wurden 1 mg/ml einer frischen Lysozymlösung (100 mg/ml Stammlösung in ddH<sub>2</sub>O) und DNaseI (50µg/ml) zugesetzt. Der Lyse folgte eine Ultraschallbehandlung (je 20 sec Puls, 100% Intensität, 20 sec auf Eis) und ein abschließender Zentrifugationsschritt (13.000 rpm, 4°C, 15 min) bevor der zytoplasmatische Extrakt gegen das 100-fache Volumen an Streptavidin-Affinitätschromatographie-Puffer (SAC Puffer) dialysiert wurde. Die Dialyse erfolgte in Dialyseschläuchen (cut-off 3,5 MW)

plus Protease Inhibitor ü.N. bei 4°C für die am nächsten Tag folgende Streptavidin-Affinitätschromatographie (siehe 2.4.1).

## 2.4 Proteinchemische Methoden

### 2.4.1 Streptavidin-Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie zählt zu den säulenchromatographischen Verfahren und dient der Isolierung und Anreicherung von Proteinen aus komplexen Gemischen. Das Prinzip der Streptavidin-Affinitätschromatographie (Schmidt & Skerra, 1993) beruht auf Wechselwirkungen zwischen zwei zueinander gehörigen Reaktionspartnern, in diesem Fall dem *Strep*-tag II (Voss & Skerra, 1997) und *Strep*-Tactin welches an das Säulenmaterial kovalent gebunden ist. Durch Klonierung des gewünschten Proteins in den induzierbaren, zytoplasmatischen Expressionsvektor pASK-IBA3 entsteht ein Fusionsprotein mit Carboxy-terminalen *Strep*-tag II.

Bei Anreicherung des rekombinanten Proteins TIR-TcpC wurden filtrierte (0,45 µm Porengröße) und dialysierte Zytoplasmaextrakte (siehe 2.3). auf äquilibrierte Gravity Flow *Strep*-Tactin® MacroPrep® Säulen (5 ml Säulenvolumen = *column volume*, CV, Polymethylacrylatmatrix) geladen. Nach vollständiger Bindung des Proteinlysats folgte ein Waschschrift mit 4 CV SAC Puffer und das über *Strep*-Tactin gebundene rekombinante Protein wurde mit einer 4 mM Lösung an D-Desthiobiotin in 17,5 ml SAC-Puffer plus 300 mM NaCl eluiert und mit Protease Inhibitor versetzt. Fraktionen wurden zur Expressionskontrolle mittels Western Blot analysiert (vgl. 2.5.1).

Zur Regenerierung des Säulenbetts wurde mit 2 CV SAC-Puffer gewaschen und das gebundene D-Desthiobiotin anschließend durch 4 CV 2 mM HABA in SAC-Puffer kompetitiv verdrängt. Die Lagerung der Säulen erfolgte bei 4°C in 2 mM HABA plus 0,05% Natriumazid. Für die weitere Proteinaufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie wurde das Eluat per Ultrafiltration (2.4.4) auf ein Volumen von 500 – 2000 µl eingengt und simultan in PBS umgepuffert. Der Konzentrator wurde im Vorfeld mit PBS äquilibriert. Die Proteinfractionen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.4.2 Analytische Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

Die Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration) dient der Trennung von Proteinen und Biomolekülen nach ihrer Größe und Form. Die verwendeten Säulenmatrizes bestehen aus kugelförmigen Partikeln aus Dextran oder Agarose mit definierter Größe und bilden eine poröse Struktur. Große Moleküle können sich in die Poren nicht so gut einlagern wie kleinere

Moleküle und eluieren folglich früher von der Säule. Dies ermöglicht die Auftrennung eines heterogenen Proteingemisches gemäß dem hydrodynamischen Radius.

Die Chromatographie sowie die Absorptionsmessung wurde an einem Äkta™ Purifier System mit einer Superdex 75 HR 10/300-Gelfiltrationssäule (CV 24 ml) von Amersham Biosciences durchgeführt. Die Säule wurde zunächst bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit 2 CV entgastem H<sub>2</sub>O und anschließend mit 2 CV PBS äquilibriert. Vor dem Auftrag der affinitätschromatographisch gereinigten Proteine wurden beim Aufkonzentrieren (siehe 2.4.4) eventuell entstandene Aggregate durch Zentrifugation (15 min, 4°C, 13.000 rpm) abgetrennt und die Auftrennung bei einer Flussrate von 0,2 ml/min durchgeführt. Fraktionen von 1 ml wurden gesammelt und anschließend durch Coomassie Färbung (vgl. 2.4.3) auf ihren Reinheitsgrad hin untersucht. Zur Regenerierung wurde die Säule mit 2 CV H<sub>2</sub>O gespült und dauerhaft in 20% (v/v) Ethanol gelagert.

### 2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) unter Verwendung des Puffersystems von Fling & Gregerson (Fling & Gregerson, 1986). Proteine wurden nach 5 min Denaturierung bei 95°C je nach ihrer Größe in 10% bis 15%igen SDS-Polyacrylamid-Trenngelen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Standard wurde der PageRuler™ Prestained Protein Marker eingesetzt. Die aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss an die Elektrophorese durch Färbung mit Coomassie Brilliantblau R-250 sichtbar gemacht, oder wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben immunochemisch analysiert

### 2.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration und Konzentrierung von Proteinen

Die Bestimmung der Konzentration (c) [mol/l] gereinigter Proteinlösungen wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm (A) in einer Quarzküvette mit der Schichtdicke d = 1 cm unter Berücksichtigung der Absorption des Puffers mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt.

$$A = \epsilon * c * d$$

Der dazu notwendige jeweilige molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) [cm<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>] des Proteins wurde mit Hilfe des Programms ExpASy ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) ermittelt. Dabei werden die Absorptionsbeiträge der aromatischen Aminosäuren für eine vollständig entfaltete Polypeptidkette summiert (Gill & von Hippel, 1989).

Gering konzentrierte Proteinlösungen wurden mit Hilfe von Ultrafiltration für verschiedene Anwendungen, insbesondere für die Gelfiltration (2.4.2), aufkonzentriert. Dabei wurden

Zentrifugen-Filtereinheiten (Amicon® Ultra-15 oder Nanosep™ Omega Membran) mit passender nomineller Molekulargewichtsgrenze verwendet und die Lösungen bis zum Erreichen des gewünschten Volumens durch Zentrifugation eingengt (für 0,5 ml Filtereinheiten 10.000 rpm 4°C, für 15 ml Filtereinheiten 2000 rpm und 4°C).

Proteinlösungen die mittels SDS-PAGE (vgl. 2.4.3) analysiert werden sollten, wurden durch denaturierende Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) einkonzentriert. Dabei wurde die Proteinlösung mit demselben Volumen einer 20%igen TCA Lösung versetzt und 30 min auf Eis denaturiert. Durch anschließende Zentrifugation (13.000 rpm 4°C) wurde das gefällte Protein präzipitiert und einmal mit 500 µl Aceton gewaschen. Das gewaschene Proteinpellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 20 – 50 µl PBS sowie 4x Auftragspuffer resuspendiert.

## 2.5 Immunchemische Methoden

### 2.5.1 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blot Verfahrens können Proteine in einem Proteingemisch (z.B. Zelllysat) immunchemisch nachgewiesen werden. Im ersten Schritt wird das Proteingemisch mittels SDS-PAGE (vgl. 2.4.3) entsprechend der Proteingröße aufgetrennt und im zweiten Schritt des Semidry Western Blots durch ein vertikal zum Gel angelegten elektrischen Feld auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Für den Transfer wurde das Gel, die Membran und 4 Whatman-Filterpapiere für 2 min in Transferpuffer äquilibriert und anschließend die Blotapparatur nach folgendem Schema aufgebaut: Anode, 2 Filterpapiere, Membran, Gel, 2 Filterpapiere, Kathode. Der Transfer erfolgte bei 2 mA pro cm<sup>2</sup> für 60 bis 100 min. Im Anschluss erfolgte der Nachweis der übertragenen Proteine durch die spezifische Antigen-Antikörper Reaktion. Hierfür wurde die Membran zunächst in TBST gewaschen und für mindestens 1 h in Blockierungspuffer (5% Milchpulver in TBST) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran mit verdünnten Primärantikörper (1:500 bis 1:2000) in Blockierungspuffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit TBST wurde der passende Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelt) mit der Membran für 1 h bei RT inkubiert und anschließend erneut mehrmals mit TBST und TBS gewaschen. Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch ein Chemilumineszenz-Substrat (ECL-Lösung) welches durch die am Sekundärantikörper gekoppelten Peroxidase unter Emittierung von Licht umgesetzt wird. Die emittierten Lichtstrahlen führen dabei zur Belichtung eines Röntgenfilms. Die Dauer der Filmexposition richtete sich nach der Stärke des Signals.

Rekombinante Proteine wurden direkt über ihren *strep*-tag mit Hilfe eines *Strep*-Tactin-HRP Konjugats detektiert. Die Membran wurde hierfür in Avidin Blockierungspuffer für 20 min bei RT

geschwenkt und die Inkubation mit Antikörperkonjugat (1:10000 in PBST) erfolgte ohne Waschschrift für weitere 45 min. Im Anschluss wurde die Membran mehrfach mit PBST und PBS gewaschen und mit Chemilumineszenz Substrat entwickelt.

## 2.5.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA

Zur quantitativen Bestimmung von Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen wurden ELISA-Kits (Duoset, R&D Systems, Minneapolis, MN) nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Substratlösung diente TMB Substrat (BD OptEIA™). Nach Abstoppen der Reaktion wurde die optische Dichte mit einem TECAN-Reader bestimmt (Anregung: 450 nm, Emission: 570 nm). Die Werte wurden anhand der Standardkurve mit Hilfe des Programms SigmaPlot quantifiziert und graphisch dargestellt.

## 2.5.3 Immunfluoreszenzfärbung

### HEK 293 Überexpressionssystem

Um Protein-Protein Wechselwirkungen der transient transfizierten HEK 293 Zellen zu visualisieren, wurden die entweder Epitop-markierten Fusionsproteine mit einem Fluoreszenz markierten Antikörper gefärbt oder bereits fluoreszenzmarkierte Fusionskonstrukte verwendet und mittels Konfokalmikroskopie analysiert. Alle in dieser Arbeit verwendender Konfokalmikroskopie Daten wurden von Susi Dürr zur Verfügung gestellt.

Für die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen wurden HEK 293 Zellen direkt auf Glasplättchen in 24 well Platten ausgesät und wie unter 2.7.2 beschrieben transfiziert.

Nach 48 Stunden wurden die Zellen 15 min mit einer 4%-igen Paraformaldehydlösung fixiert und durch Inkubation mit 0,1% Triton X-100 oder 0,1% Saponin permeabilisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper für 60 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem Zweitantikörper (1:400) in Kombination mit Hoechst 33342 (1:10000) für 30 min gefärbt. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und mit Eindeckmedium auf dem Objektträger fixiert und bei 4° bzw. -20°C gelagert. Die Auswertung der Präparate erfolgte am Konfokalmikroskop.

### Inflammasom Speck Bildung BMDCs

Für die Analyse der Caspase-1 Speck Bildung wurden  $0,2 \times 10^6$  BMDCs in 100  $\mu$ l Infektionsmedium mit 10  $\mu$ M Caspase-1 Inhibitor (Z-YVAD-FMK) in Chamber Slides ausgesät. Nach einer Stunde Inkubation mit dem Inhibitor wurden die Zellen mit einer MOI von 0,002 für weitere 3,5 Stunden mit den CFT073 Stämmen infiziert. Als Positivkontrolle diente 20 ng/ml LPS und ein ATP-Puls (5 mM) 30 min vor Experimentende. Für die Analyse

der ASC Speck Bildung wurden  $0,2 \times 10^6$  BMDCs in 100  $\mu$ l Infektionsmedium mit 20 ng/ml LPS in Chamber Slides ausgesät und nach 2 Stunden mit den CFT073 Stämmen für weitere 3,5 h infiziert. 30 min vor Experimentende wurde die Positivkontrolle mit 5  $\mu$ M Nigericin hinzugeben.

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde, nach einem Waschschrift mit PBS, einer 15 minütigen Fixierung in 4% PFA, einem weiteren Waschschrift mit PBS und der Permeabilisierung der Zellen mit 0,1% Triton-X100 für 10 min, durchgeführt. Die Inkubation der Primärantikörper (rabbit-anti-Caspase-1p10 1:100 und rabbit-anti-ASC 1:400) erfolgte ÜN bei 4°C in PBS mit 1% BSA. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (anti-rabbit-Alexa 488, 1:400) zusammen mit dem DNA Farbstoff HOECHST 33342 (1:10000) in PBS 1% BSA für 45 min inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und mit Eindeckmedium auf dem Objektträger fixiert. Die Proben wurden bei 4° gelagert. Die Auswertung der Präparate erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

## 2.6 Methoden zur Charakterisierung von Protein-Protein Interaktionen

### 2.6.1 Co-Immunopräzipitation

Mithilfe der Co-Immunpräzipitation können Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* untersucht werden. Zu diesem Zweck wird ein Protein durch Bindung an Antikörper aus einer Proteingemisch Lösung konzentriert und die an das Protein gebundenen Interaktionspartner durch SDS-PAGE und Western Blot (2.5.1) visualisiert.

HEK293-Zellen wurden, wie unter 2.7.2 beschrieben, transient transfiziert und 48 h nach Transfektion durch Zugabe von kalten PBS geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Die Lyse erfolgte durch Inkubation mit 300-500  $\mu$ l NP40- oder RIPA-Lysepuffer mit Protease Inhibitor für 30 min auf Eis. Anschließend wurden durch Zentrifugation (13000 rpm, 4°C, 15 min) Zelltrümmer abgetrennt, ein Aliquot von 30-50  $\mu$ l zur Expressionskontrolle der Proteine entnommen und bis zur späteren Analyse bei -20°C gelagert. Das verbleibende Proteinlysate wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 20  $\mu$ l Antikörper-gekoppelten Agarose-beads (anti-flag-M2-Agarose bzw. anti-c-myc-Agarose Affinity Gel) unter Rotation über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurden die an die Agarose-beads gebundenen Moleküle durch Zentrifugation (13000 rpm, 20 s, 4°C) sedimentiert, der Überstand verworfen und die Präzipitate drei Mal mit 1 ml PBS 0,5M NaCl gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Präzipitate in 50  $\mu$ l PBS 0,5M NaCl aufgenommen und bei -20°C bis zur Analyse per Western Blot (2.5.1) gelagert. Durch Zugabe von Auftragspuffer mit DTT und Hitze-denaturierung (95°C, 5 min) wurden die gebundenen Proteinkomplexe von den Beads eluiert.

## 2.6.2 Pull-Down Assay

Für die Interaktionsanalyse endogener Proteine mit TIR-TcpC *strep*Tag II Fusionsprotein wurden Pull-Down Assays mit *Strep*-Tactin Macrorep Beads durchgeführt.

Zunächst wurden 80 µl der *Strep*-Tactin Beads vorsichtig resuspendiert und auf filterbesetzte Säulen (PIERCE Spin Columns) geladen. Alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte wurden bei 4500 rpm (1-2 min) in einer Eppendorf-Zentrifuge durchgeführt. Die Beads wurden dreimal mit Binding Buffer gewaschen (25 mM Tris/HCl, pH 7,2, 150 mM NaCl) und anschließend mit 60-80 µg rekombinatem TIR-TcpC als Bait Protein in 300 µl in PBS für 1,5 h bei 4°C inkubiert. Als Kontrolle wurde jeweils eine Säule mit 300 µl PBS Puffer alleine beladen, um unspezifischer Bindung des Prey Proteins an das Säulenmaterial auszuschließen. Nach Bindung des *Strep*-Tag II Fusionsproteins an die *Strep*-Tactin Beads wurde nicht gebundenes Protein durch Zentrifugation eluiert und mit 300 µg/ml Avidin Blockierungsreagenz ungebundene „Stellen“ blockiert (15 min auf Eis). Es folgten nochmals drei Waschschriffe mit Binding Buffer, bevor die Säulen mit 300-500 µl der zu analysierenden BMDM- bzw HCV-Zelllysate in PBS (500 µg-100 mg Totalprotein, ggf. in PBS mit Protease-Inhibitor) beladen werden konnten. Nach 1,5-stündiger Inkubation bei 4°C und 30 min bei 37°C (rotierende Plattform) wurden nicht gebundene Proteine eluiert. In drei nachfolgenden Waschschriffen mit PBS bzw. mit Acetat-Puffer (0,025-0,5 M NaCl) wurden nicht gebundene Proteine entfernt und anschließend die Elution der spezifisch gebundenen Proteine mit 200 µl Elutions Buffer (pH 2,8) durchgeführt. Der saure pH Wert wurde unmittelbar danach durch Zugabe von 50 µl 2 M Tris/HCl pH 8,0 umgepuffert. Die Eluate wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, um spezifische Interaktionspartner zu identifizieren.

## 2.7 Zellbiologische Methoden

### 2.7.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten wurden an Sterilbänken durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Falls nicht anders beschrieben wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort in Medium aufgenommen. Nach 1x waschen (1.200 rpm, 5 min) mit Medium wurden die Zellen auf einer 10 cm Zellkulturschale mit 10 ml Medium ausgesät.

Die Ablösung adhärenter Zellen (HEK 293 und HCV29) erfolgte durch 10 minütige Behandlung mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (PAA, Parsching, Österreich) bei 37°C im Brutschrank. Knochenmarksmakrophagen wurden mit Accutase 1:4 verdünnt in PBS abgelöst. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von frischem Zellkulturmedium.

Zum Einfrieren wurden die Zellen anschließend gezählt und das Pellet in 1 ml Einfriermedium (DMSO:FCS, 1:10) resuspendiert. Der Ansatz wurde in Kryoröhrchen pipettiert und in einer Einfrierhilfe bei -80°C eingefroren.

### **2.7.2 Transfektion von HEK 293 Zellen**

#### Transfektion mit Calciumphosphat

Für die Untersuchung überexprimierter Proteine mittels Co-Immunpräzipitation (2.6.1) wurden  $1,5 \times 10^6$  HEK 293 Zellen in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und mit der Calciumphosphat-Methode transient transfiziert. Pro Ansatz wurde die Plasmid DNA (10 bis max. 20 µg) in einem Gesamtvolumen von 500 µl mit 250 mM Calciumchlorid und H<sub>2</sub>O zusammengegeben und pro Ansatz in einem separaten Eppendorf-Gefäß 500 µl einer phosphathaltigen Pufferlösung (2X HBS) vorgelegt. Während HBS kontinuierlich gevortexet wurde, wurde die DNA-CaCl<sub>2</sub>-Lösung tröpfchenweise hinzugegeben und anschließend tröpfchenweise auf die HEK 293 Zellen pipettiert. Die Transfektion von Zellen in kleineren Zellkulturschalen für die Analyse mittels Konfokalmikroskopie erfolgte analog nach entsprechender Reduktion des Transfektionsansatzes. Die Inkubation der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen, nach 24 h wurde das Medium gewechselt bzw. frisches Medium hinzugegeben.

#### Transfektion mit Lipofektamin

Die Transfektion mit Lipofektamin (Lipofectamine® 2000) erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers Invitrogen. Diese Methode beruht auf der Komplexierung der positiv geladenen verzweigten Polymere mit der zu transfizierenden DNA. Die so gebildeten Aggregate werden von den Zielzellen aufgenommen.

### **2.7.3 NF-κB Reporterassay**

Mit Hilfe des Luciferase-Reporterassay kann die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors oder eines Promotors in Abhängigkeit von Ko-exprimierten Signalmolekülen untersucht werden. Im hier verwendeten System ist das Gen für die Firefly-Luciferase unter der Kontrolle des NF-κB-Promotors eingebracht. Wird dieser aktiviert, kommt es zur Expression des Enzyms. Firefly-Luciferase oxidiert das Substrat Luciferin zu Oxyluciferin. Dabei wird chemische Energie frei, die Lichtblitze erzeugt. Die Anzahl an Lichtblitzen spiegelt die Aktivität des Promotors wieder. Zur Normalisierung der unterschiedlichen Bedingungen wird ein zweites Plasmidkonstrukt mit dem Gen einer anderen Luciferase Spezies transfiziert. Die Renilla-Luciferase befindet sich hinter einem konstitutiv-aktiven CMV-Promotor. Sie setzt nur das Substrat Coelenterazin um. Zur Durchführung von Luciferase-Assays wurden HEK 293-

Zellen ( $2 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l/well in 96-well-Platten) mit je 50 ng Plasmid-DNA für Firefly-Luciferase und 1 ng Renilla-Luciferase transfiziert. Entsprechend der Fragestellung wurde Plasmid-DNA für verschiedene Konstrukte ko-transfiziert und die DNA Menge mit Plasmid-DNA des Leervektors auf eine konstante Gesamt-DNA Menge aufgefüllt. Zur Transfektion wurden 0,5  $\mu$ l Lipofectamine® 2000/well nach Herstellerangaben verwendet.

Die Messung erfolgte unter Verwendung des „Dual-Luciferase® Reporter Assay System“ von Promega nach Angaben des Herstellers.

#### **2.7.4 Herstellung von M-CSF-haltigem Zellkulturüberstand**

Für die Ausdifferenzierung von Knochenmarksmakrophagen wurden die Zellen mit M-CSF stimuliert. Dafür wurden L929 Zellen (adhärente Maus Fibroblasten) in RPMI Medium in Kultur genommen und alle zwei bis drei Tage der Überstand gesammelt. Der gesammelte Überstand wurde durch eine 0,2  $\mu$ M Sterilfiltermembran filtriert und in Aliquots zu 50 ml bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Zur Ausdifferenzierung der Makrophagen wurde DMEM mit 10-15% L929 Überstand frisch angesetzt.

#### **2.7.5 Herstellung von GM-CSF-haltigem Zellkulturüberstand**

Für die Ausdifferenzierung von dendritischen Zellen aus murinen Knochenmark wurden die Zellen mit GM-CSF stimuliert. Dafür wurden X63-GM-CSF Zellen (stabil mit GM-CSF transfizierte Maus Myeloma Zellen) in RPMI Medium in Kultur genommen und alle zwei bis drei Tage der Überstand gesammelt. Der gesammelte Überstand wurde durch eine 0,2  $\mu$ M Sterilfiltermembran filtriert und in Aliquots zu 50 ml bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Zur Ausdifferenzierung der Dendriten wurde RPMI mit 10-15% GM-CSF Überstand frisch angesetzt.

#### **2.7.6 Gewinnung von murinen primären Knochenmarkszellen**

Für die Gewinnung von murinen Knochenmarkstammzellen wurden Mäuse im Alter von 8-18 Wochen verwendet. Die Tötung erfolgte durch zervikale Dislokation. Anschließend wurde das Tier mit Ethanol desinfiziert bevor die unteren Extremitäten frei präpariert wurden. Das Muskelgewebe wurde mit Hilfe einer Schere gründlich von den Knochen entfernt. Die gesäuberten Knochen wurden in eine Petrischale mit PBS überführt. Vor der Öffnung der Knochenmarkhöhle wurden die Knochen unter sterilen Bedingungen kurz in Ethanol gelegt und anschließend in sterilem PBS gewaschen. Die Knochen wurden an beiden Seiten eröffnet und das Knochenmark durch mehrmaliges Spülen (DMEM für Makrophagen, RPMI für DCs) über ein 70  $\mu$ m Sieb in eine Einzelzellsuspension überführt. Die isolierten Zellen

wurden durch Zentrifugation (1200 rpm, 5 min) pelletiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 10 ml Differenzierungsmedium (DMEM mit M-CSF für Makrophagen, RPMI mit GM-CSF für DCs) resuspendiert und auf unbeschichteten 10 cm Platten ausgesät. Die Zellen wurden ü. N. bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert, bevor am Folgetag die nicht-adhärennten Zellen zu je 5-8 x 10<sup>6</sup> Zellen / 10 cm Platte ausgesät wurden (10 ml Endvolumen). Nach drei und fünf Tagen wurden die Zellen mit 10 und 5 ml Medium gefüttert. Makrophagen wurden am sechsten oder siebten Tag nach Entnahme mit Accutase (1:4 verdünnt in PBS) von den Platten gelöst, gewaschen und gezählt. DCs wurden an Tag sechs oder sieben durch Resuspendieren mit RPMI von den Platten gespült, gewaschen und gezählt. Die Zellen wurden für Versuche am gleichen Tag oder am Folgetag eingesetzt.

### **2.7.7 Infektion mit uropathogenen *E. coli* Stämmen**

#### **2.7.7.1 Einstellung der MOI**

Die Infektionsdosis (MOI = *multiplicity of infection*) beschreibt die Anzahl der Bakterien pro Wirtszelle. Alle Bakterienstämme wurden ü.N. als Vorkultur bei 37°C und 90 rpm in entsprechenden Antibiotika kultiviert. Vor Infektion der Wirtszellen wurde die optische Dichte (OD) der Bakteriensuspension photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen LB Medium gemessen und auf 0,5 eingestellt. Als Richtlinie für die OD Einstellung für CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pT<sub>tcpC</sub> galt die Annahme das eine OD<sub>600</sub> von 0,5 etwa 4 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml entspricht (Dr. Arbeit, C. Cirl, 2009). Zur Überprüfung der Infektionsdosis wurde eine Dosiskontrolle angefertigt. Die Keimzahl der Bakteriensuspension wurde durch Doppelbestimmung einer geeigneten Verdünnung auf LB-Agarplatten ermittelt. Nur wenn die Keimzahl aller verwendeten Stämme weniger als 10% Varianz zeigte, wurden die Ergebnisse der Infektion ausgewertet.

#### **2.7.7.2 Infektion von primären Zellen und Zelllinien**

Primäre murine Knochenmarkszellen oder humane HCV29 Zellen wurden zur Infektion in 6, 12 oder 96-well Platten in einer Anzahl zwischen 0,2 und 2,0 x 10<sup>6</sup>/well in DMEM (BMDMs) oder RPMI-1640 (BMDCs, HCV29) mit 2-5% FCS ohne die Zugabe von Antibiotika ausgesät. Zur physikalischen Separierung der Zellen von den Bakterien wurden in speziellen Fällen Transwell-Einsätze (ThinCert™ cell culture inserts) mit einer Porengröße von 0,4 µm eingesetzt. Die Zellen konnten dann mit MOIs von 0,001-1 für 3-4 h infiziert werden.

### 2.7.8 LDH Assay

Mit Hilfe des LDH-Assays wird die Freisetzung des Enzyms Laktat-Dehydrogenase aus Zellen mit zerstörter Zellmembran gemessen. Auf diese Weise konnte die Vitalität von Knochenmarkmakrophagen im Verlauf der Stimulation bzw. Infektion überprüft werden und Rückschlüsse auf den Caspase-1 spezifischen Zelltod Pyroptose geschlossen werden (Rayamajhi *et al.*, 2013).

Die Messung der LDH-Freisetzung erfolgte unter Verwendung des „CytoTox96®-Non-Radioactive Cytotoxicity Assay“ von Promega nach Angaben des Herstellers.

## 2.8 Computerprogramme und Datenbanken

Sequenz- und Strukturdaten von Genen und Proteinen wurden aus den frei zugänglichen Internet-Datenbanken NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und der Protein Data Bank™ (<http://www.rcsb.org/pdb>) erhalten. Auf Grundlage dieser Daten wurden Klonierungen mit dem Programm Vector NTI (Invitrogen) geplant. Entwickelte Röntgenfilme und SDS Polyacrylamidgele aus Coomassie-Färbungen wurden mit einer Auflösung von 300 dpi eingescannt und mit dem Programm Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems Inc.) bearbeitet. Die graphische Auswertung von Daten erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc., Abelbeck). Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Programms Prism Software (GraphPad) bestimmt. Die Aufnahme der Fluoreszenzmikroskop Bilder erfolgte an einem Leica DMRBE Mikroskop mit einer Zeiss Kamera durch die Software AxioVision LE (Carl Zeiss). Die Steuerung des Leica Konfokal Mikroskops sowie die Erstellung damit erzeugter Bilder erfolgte durch die herstellereigene Software Leica LAS AF.

### 3 Ergebnisse

Aus bereits publizierten Studien unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass die TIR-Proteine TcpC des uropathogenen *E. coli* CFT073 und TcpB aus *Brucella melitensis* inhibitorische Wirkung auf den MyD88-abhängigen TLR Signaltransduktionsweg durch direkte Interaktion mit Proteinen des TLR Systems besitzen. Damit kann die Aktivierung von NF- $\kappa$ B verhindert und die pro-inflammatorische Immunantwort gegen eingedrungene Mikroorganismen gedämpft werden. Es ist anzunehmen, dass CFT073 sowie intrazelluläre Erreger wie *Brucella melitensis* im Zytosol der Wirtszelle nicht nur exklusiv durch das TLR System erkannt werden, sondern vor allem durch zytosolische Mustererkennungsrezeptoren wie den NLRs wahrgenommen werden.

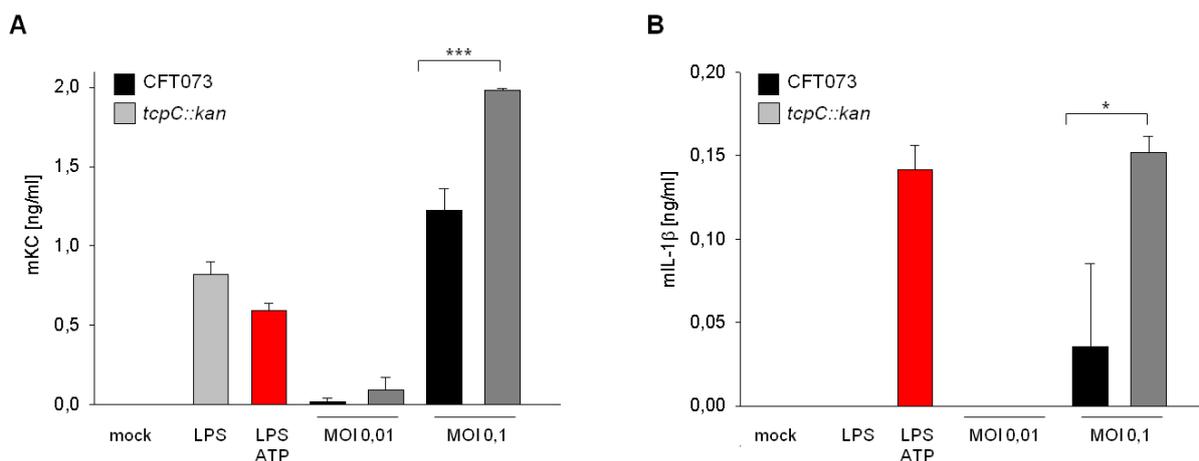
In dieser Arbeit wurde aus diesem Grund eine mögliche Wirkung von TcpC und TcpB auf die Signaltransduktion des NLR Systems untersucht. Dazu wurde der bislang am besten erforschte Vertreter der NLR Proteinfamilie NLRP3 „als Modell“ ausgewählt. Die Stimulation des NLRP3 Inflammasom Multiproteinkomplexes mündet in der Prozessierung der Pro-Caspase-1 in ihre aktive Form, welche final die Maturation von IL-1 $\beta$  zur Folge hat. Im Speziellen wurde der Effekt von TcpC während einer *in vitro* Infektion mit CFT073 auf die IL-1 $\beta$  Freisetzung auf immunologischer und biochemischer Ebene näher charakterisiert. Für TcpB konnten aufgrund der benötigten Sicherheitsstandards (Biologische Schutzstufe S3) keine Infektionsstudien durchgeführt werden, die Analyse musste folglich auf biochemische Methoden beschränkt werden.

#### 3.1 TcpC inhibiert die pro-inflammatorische Zytokin Freisetzung

Zunächst wurde die pro-inflammatorische Zytokin Antwort sowie die Inflammasom Aktivierung von primären Knochenmarksmakrophagen (*bone marrow derived macrophages*, BMDMs) in Abhängigkeit des Virulenzfaktors TcpC untersucht. Klassische Inflammasom-Versuche setzen die Notwendigkeit der Kombination zweier unabhängiger Signale voraus. Ein erster, TLR vermittelter Stimulus, wie z.B. das Endotoxin LPS, führt zur Transkription der pro-IL-1 $\beta$ - und NLRP3-mRNA und Akkumulation von pro-IL-1 $\beta$  und NLRP3 im Zytosol. Ein zweiter Stimulus wie z.B. extrazelluläres ATP oder Nigericin führen zur Inflammasom Aktivierung und anschließend zur Prozessierung von pro-IL-1 $\beta$  zur bioaktiven Form IL-1 $\beta$  durch Caspase-1 (Kahlenberg *et al.*, 2005). Diese beiden Stimuli werden hier als Positivkontrollen zur Überprüfung der TLR- und NLR-Aktivierung eingesetzt. Im *in vitro* Infektionsmodell sind Immunzellen dem direktem Kontakt mit den Erregern ausgesetzt und können so die Situation während einer realen Infektion des Körpers darstellen. Typischerweise werden verschiedene Infektionsdosen des Erregers (*multiplicity of infection* =

Bakterien pro Zelle, MOI) verwendet und können so die Dosis-abhängige Reaktion der infizierten Zellen simulieren. Um die Auswirkung von TpcC auf dieses Geschehen zu analysieren, wurde zusätzlich zum Wildtypstamm CFT073 die chromosomale *tcpC*-Deletionsmutante, welche statt des *tcpC*-Gens (c2398) eine Kanamycin (Kan) Resistenzkassette trägt, verwendet (= CFT073 *tcpC::kan*).

Nach der *in vitro* Infektion von BMDMs mit CFT073 zeigte sich eine geringere Produktion von KC (CXCL1), einem durch LPS, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induziertem Chemokin (Ohmori & Hamilton, 1994, Introna *et al.*, 1987), als nach Infektion mit CFT073 *tcpC::kan* in beiden Infektionsdosen. Auch die sekretierte Menge an IL-1 $\beta$  war durch Infektion mit CFT073 im Gegensatz zu CFT073 *tcpC::kan* sehr deutlich reduziert. Es konnte jedoch nur in der höheren Infektionsdosis (MOI 0,1) IL-1 $\beta$  detektiert werden. Die Positivkontrolle LPS führt zur Freisetzung des NF- $\kappa$ B abhängigen Chemokins KC, jedoch nicht zur Freisetzung von IL-1 $\beta$ . Erst die Kombination von LPS und ATP regt die Zellen wie erwartet zur IL-1 $\beta$  Sekretion an (Abbildung 6).



**Abbildung 6: TpcC inhibiert NF- $\kappa$ B und Inflammasom Signaltransduktion**

Murine BMDMs wurden mit CFT073 und CFT073 *tcpC::kan* mit einer MOI von 0,01 und 0,1 infiziert. Als Kontrolle wurden BMDMs mit LPS sowie LPS in Kombination mit ATP stimuliert bzw. unstimuliert belassen (mock). Die Produktion von KC (A) und IL-1 $\beta$  (B) wurde in den zellfreien Überständen nach dreistündiger Infektion mittels ELISA bestimmt. Sowohl die KC Sekretion (A) als auch die IL-1 $\beta$  (B) Sekretion von BMDMs ist nach Infektion mit CFT073 im Vergleich zur Infektion mit CFT073 *tcpC::kan* erniedrigt. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen. Die Signifikanzen (\* $p < 0,05$ ) wurden mit ANOVA bestimmt.

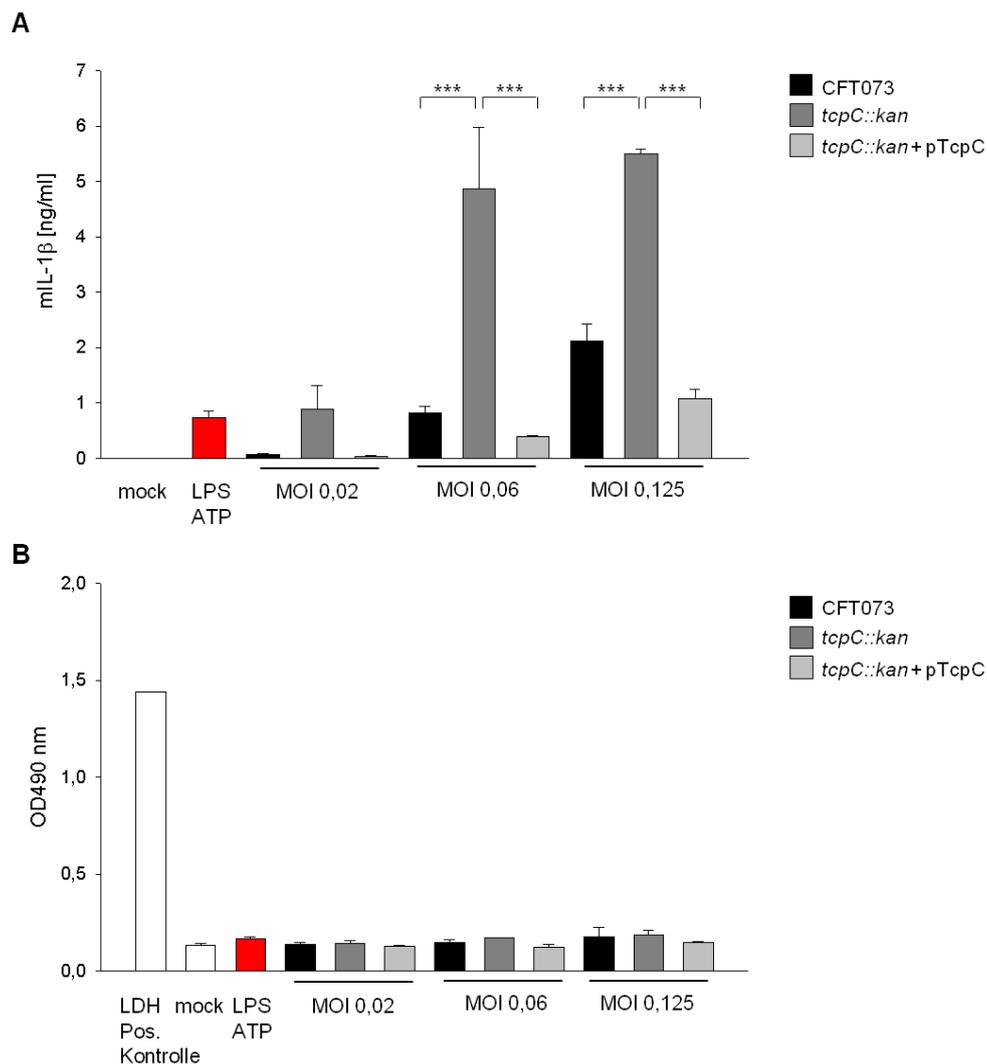
### 3.1.1 TcpC inhibiert IL-1 $\beta$ Freisetzung und Caspase-1 Aktivierung in BMDMs

Um den beobachteten Effekt von TcpC auf die Reduktion der IL-1 $\beta$  Freisetzung zu überprüfen, wurden analog weitere Infektionsexperimente mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und zusätzlich mit dem komplementierten Stamm CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC durchgeführt. Dieser Stamm exprimiert das *tcpC*-Operon inklusive des endogenen Promotors sowie die Strukturgene *c2397* und *c2398*.

Nach Infektion von BMDMs wurde IL-1 $\beta$  und die Inflammasom spezifische Form des Zelltods, welche als „Pyroptose“ bezeichnet wird, mittels Messung des Enzyms Laktat Dehydrogenase (LDH) im Überstand der Zellen bestimmt.

Wie in Abbildung 7 A gezeigt, führt die Infektion mit CFT073 *tcpC::kan* wie zuvor zu einer deutlich höheren IL-1 $\beta$  Freisetzung in BMDMs als die Infektion mit dem CFT073 Wildtypstamm. Der komplementierte Stamm CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC verhält sich jeweils wie der Wildtypstamm und reduziert die Menge an sekretiertem IL-1 $\beta$  eindeutig um bis zu 80%. Die detektierte Menge an IL-1 $\beta$  korreliert zudem relativ zur steigenden Infektionsdosis und nimmt im Verhältnis zu. Im Vergleich zum vorherigen Experiment wurde die Infektionsdauer von 3 h auf 4 h erhöht, um dadurch größere Mengen an freigesetztem Zytokin zu induzieren und so den inhibitorischen Effekt von TcpC zu verdeutlichen. Bereits bei niedriger MOI (MOI 0,02) induzierten die UPEC Stämme nun IL-1 $\beta$ . Wie erwartet sekretierten die BMDMs mehr IL-1 $\beta$  als nach 3h, da das logarithmische Wachstum der Bakterien bei einer längeren Infektionsdauer zu einer deutlich höheren Keimzahl führt. Auch das Ausmaß der TcpC vermittelten IL-1 $\beta$  Inhibition verstärkt sich eindeutig im Vergleich zur 3-stündigen Infektionsdauer (Abbildung 6). Dies liegt vermutlich an der korrelierenden Menge an sekretiertem TcpC, welche somit zu einer stärkeren Inhibition der IL-1 $\beta$  Freisetzung führen kann. Hierfür wäre es wichtig, die Präsenz und die Anhäufung des Virulenzfaktors per Western Blot Analyse im Infektionskontext zu analysieren.

Um zu Überprüfen, ob es durch die UPEC-Infektion zu einer Störung der Zellintegrität kommt, wurde die Konzentration von LDH im Zellüberstand gemessen. Dieses Enzym kommt unter physiologischen Bedingungen nur intrazellulär vor und wird bei dem für Caspase-1 spezifischen Zelltod (Pyroptose) in den Überstand freigesetzt (Rayamajhi *et al.*, 2013). In den Überständen von infizierten, stimulierten und unstimulierten BMDMs können einheitlich jedoch nur geringe Mengen dieses Enzyms nachgewiesen werden und die Mengen zwischen den CFT073 Stämmen waren sehr ähnlich (Abbildung 7 B). Es wird demnach keine Pyroptose nach 4-stündiger Infektion mit UPEC Stämmen oder der LPS und ATP Stimulation in BMDMs induziert. Folglich zeigt TcpC keinen Einfluss auf die Entstehung der Pyroptose. Die eingesetzte Positivkontrolle demonstriert die LDH Freisetzung von lysierten Zellen nach Inkubation mit Lysepuffer.

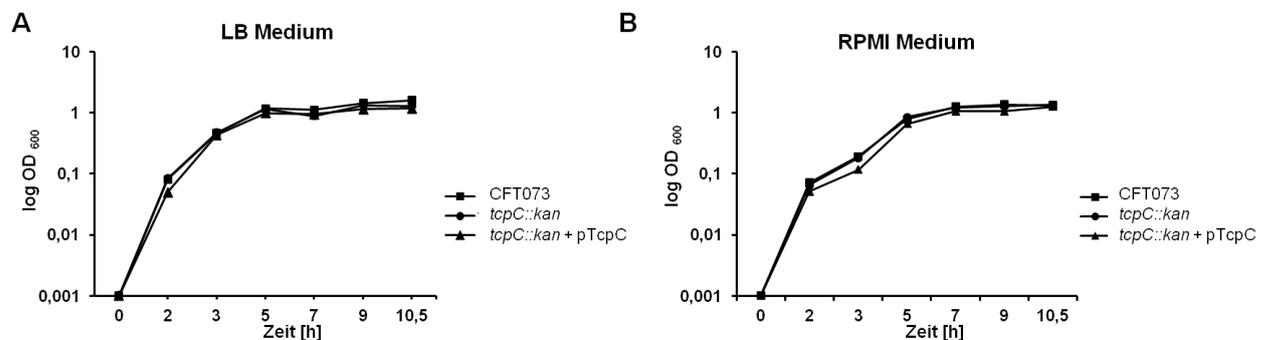


### Abbildung 7: Inhibition der IL-1β Freisetzung in BMDMs ist TcpC abhängig

(A) Murine BMDMs wurden mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC mit einer MOI von 0,02, 0,06 und 0,125 infiziert. Als Kontrolle wurden BMDMs nicht stimuliert (mock) bzw. mit LPS in Kombination mit ATP stimuliert. Die Mengen an IL-1β wurde mittels ELISA in den zellfreien Überständen nach 4h bestimmt. Die Sekretion von IL-1β wird durch Infektion mit CFT073 und CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC im Vergleich zur Infektion mit CFT073 *tcpC::kan* sehr stark reduziert. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

(B) Die Produktion von LDH als Marker für Pyroptose wurde in den zellfreien Überständen nach 4h mittels LDH Assay (Promega) über die Messung der Optischen Dichte bei 490 nm (OD<sub>490 nm</sub>) bestimmt. Lysierte BMDMs dienten als Positivkontrolle. In den analysierten Überständen der stimulierten und infizierten Zellen befindet sich analog zu unstimulierten Zellen kaum LDH. Demnach hat durch die Infektion der Zellen keine Pyroptose stattgefunden. Repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Versuchen. Die Signifikanzen (\*p < 0,05) wurden mit ANOVA bestimmt.

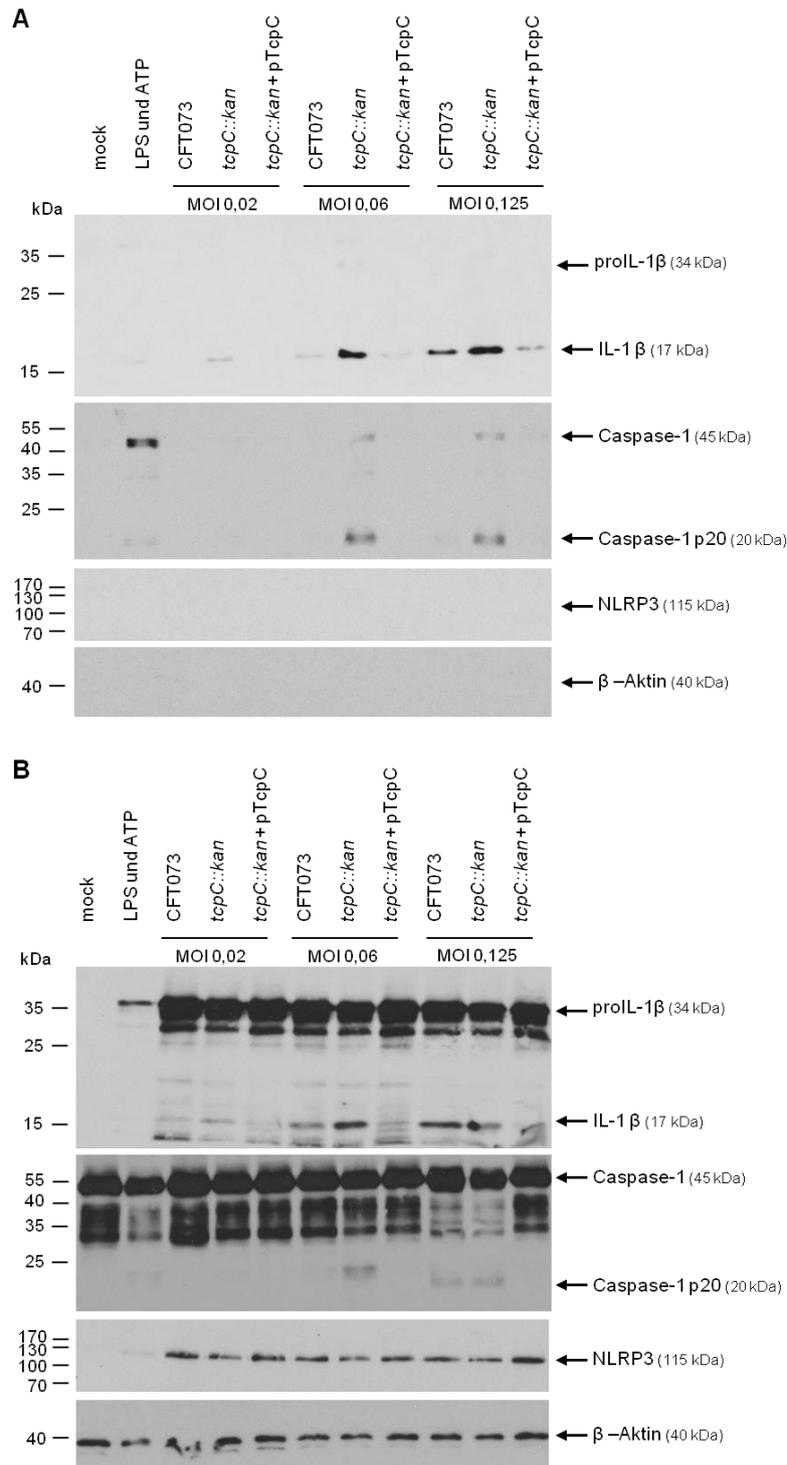
Um auszuschließen, dass die Deletion von *tcpC* und die Insertion der Kanamycin Resistenzkassette, sowie die gleichzeitige Expression des Plasmids *pTcpC* über den Chloramphenicol Resistenzdruck, Einfluss auf das Wachstumsverhalten von CFT073 ausübt, wurden Wachstumskurven in komplexen LB-Medium und nährstoffarmen RPMI Medium erstellt. RPMI Medium wird für die murine und humane Zellkultur eingesetzt und diente während der Ko-Infektion den *E. coli* Stämmen als Nährmedium. Die Messung der Optischen Dichte bei 600 nm konnte zeigen, dass weder in LB-Medium noch in nährstoffarmen RPMI Medium ein signifikanter Unterschied im Wachstum zwischen Wildtyp CFT073 und den Mutanten CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + *pTcpC* auftritt. Die beobachtete IL-1 $\beta$  Inhibition durch *TcpC* (Abbildung 7) ist demnach nicht auf einen Wachstumsunterschied zwischen Wildtyp CFT073 und der Mutante CFT073 *tcpC::kan* zurückzuführen.



**Abbildung 8: Wachstumsverhalten von CFT073 und Mutanten in LB und RPMI Medium**

Kultivierung von CFT073 und Mutanten CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + *pTcpC* in LB Medium (A) bzw. RPMI Medium (B) bei 37°C und 120 rpm für eine Dauer von 10,5 h. Repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen.

Die Prozessierung von pro-IL-1 $\beta$  erfolgt durch aktivierte Caspase-1. Dies geschieht durch autokatalytische Spaltung von Pro-Caspase-1 (45 kDa) in ihre Untereinheiten p10 (10 kDa) und p20 (20 kDa) nach erfolgter Aktivierung des Inflammasoms, wie z.B. des NLRP3 Inflammasoms. Folglich werden die Caspase-1-p10 und -p20 Untereinheiten freigesetzt und spalten pro-IL-1 $\beta$  (34 kDa) zu aktivem IL-1 $\beta$  (17 kDa) (Thornberry *et al.*, 1992, Gu *et al.*, 1997). Biologisch aktives IL-1 $\beta$  wird zusammen mit den Caspase-1 Untereinheiten aus der Zelle über einen noch unbekanntes Mechanismus sezerniert. Es galt zu überprüfen, ob die IL-1 $\beta$  Freisetzung in BMDMs durch Infektion mit dem UPEC Stämmen mit der Spaltung der Caspase-1 einhergeht, da für die IL-1 $\beta$  Aktivierung auch ein alternativer Weg über Caspase-8 beschrieben wurde (Guma *et al.*, 2009, Antonopoulos *et al.*, 2013). Dafür wurden im Anschluss an die zuvor gezeigte *in vitro* Infektion (Abbildung 7) die Überstände sowie der Zellinhalt mittels Western Blot Analyse auf die Präsenz von Caspase-1 p20 und IL-1 $\beta$  untersucht.



### Abbildung 9: TcpC reduziert Caspase-1 Aktivierung und IL-1 $\beta$ Freisetzung in BMDMs

Murine BMDMs wurden mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC mit einer MOI von 0,02, 0,06 und 0,125 infiziert. Als Kontrolle wurden BMDMs nicht stimuliert (mock) und mit LPS in Kombination mit ATP stimuliert. Der Nachweis von IL-1 $\beta$ , Caspase-1, NLRP3 und  $\beta$ -Aktin wurde in den zellfreien Überständen (A) und Zelllysaten (B) nach 4h mittels spezifischer Antikörper bestimmt. Im Zelllysat und im Überstand wird die Spaltung der Caspase-1 zur aktiven Untereinheit Caspase-1 p20, sowie die daraus resultierende pro-IL-1 $\beta$  Prozessierung zur biologisch aktiven Form IL-1 $\beta$ , durch TcpC reduziert. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

Im Überstand der infizierten BMDMs (Abbildung 9 A) lassen sich die prozessierten Formen IL-1 $\beta$  (17 kDa) und Caspase-1 p20 (20 kDa) deutlich sichtbar nachweisen. Die durch TcpC reduzierte IL-1 $\beta$  Freisetzung kann auch im Immunoblot innerhalb der CFT073 Proben und des komplementierten Stamms CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC beobachtet werden. Dementsprechend korreliert die IL-1 $\beta$  Inhibition ebenfalls mit einer eindeutig verminderten Freisetzung von aktivierter Caspase-1 p20. Der inhibitorische Effekt von TcpC auf die Spaltung von Caspase-1 p20 und die IL-1 $\beta$  Freisetzung kann in den MOIs 0,06 und 0,125 am stärksten beobachtet werden. Die gesteigerte IL-1 $\beta$  Freisetzung des CFT073 *tcpC::kan* Stamms führt parallel wie erwartet ebenfalls zu einer erhöhten Menge an gespaltener Caspase-1 p20.

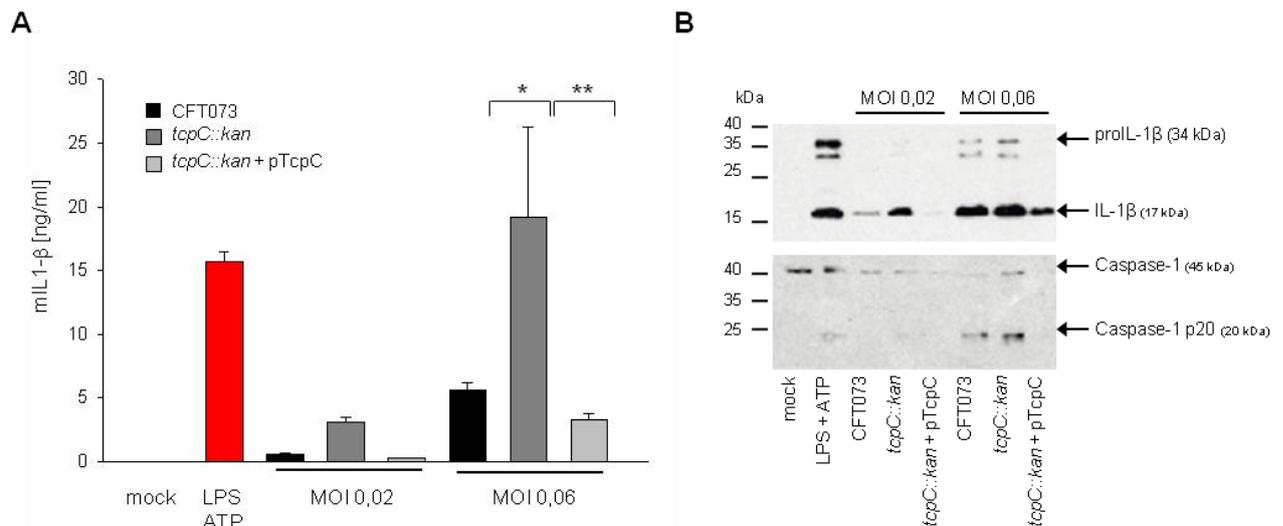
Im analysierten Zelllysate ist der TcpC-spezifische Phänotyp der reduzierten IL-1 $\beta$  und p20 Mengen ebenso sichtbar (Abbildung 9 B). Zusätzlich lassen sich die Vorläuferproteine pro-IL-1 $\beta$  und Pro-Caspase-1 im Zelllysate identifizieren. Pro-IL-1 $\beta$  wird durch Infektion und LPS/ATP-Stimulation im Vergleich zu den unstimulierten Zellen stark induziert. Dies wird durch Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalweges über die LPS Stimulation von TLR4 erreicht, (Mariathasan *et al.*, 2004) da normalerweise nur geringe Mengen von pro-IL-1 $\beta$  in der Zelle vorliegen. Es wurde zudem überprüft, ob es durch TcpC auch zu einer Beeinflussung der Proteinmenge an NLRP3 kommt. Wie in Abbildung 9 B zu sehen ist, wird die Expression von NLRP3 durch Infektion gleichermaßen induziert und es sind keine Unterschiede zwischen CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC zu beobachten. Die LPS/ATP-Stimulation führt im Vergleich zur Infektion nur zu einer leichten Induktion von NLRP3. Die Mengen an Pro-Caspase-1 wurden durch Infektion/Stimulation nicht beeinflusst.  $\beta$ -Aktin diente zur Gewährleistung gleicher aufgetragener Proteinmengen. Im Überstand der BMDMs können NLRP3 und  $\beta$ -Aktin nicht nachgewiesen werden. Dies spricht für die intakte Zellintegrität nach Infektion (Abbildung 9 A) und bestätigt parallel die LDH-Messung der gleichen Proben (Abbildung 7 B).

### 3.1.2 TcpC inhibiert IL-1 $\beta$ Freisetzung und Caspase-1 Aktivierung in BMDCs

Ein weiterer wichtiger Zelltyp während einer bakteriellen Infektion sind die Dendritischen Zellen. Zusammen mit Makrophagen und Monozyten sind DCs für die Phagozytose von eingedrungenen Pathogenen zuständig und vermitteln durch Antigenpräsentation und Zytokin Freisetzung die Aktivierung von T-Zellen (Dinarello, 2009).

Entsprechend zu den Infektionen der BMDMs wurden hier BMDCs mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC infiziert oder mit LPS plus ATP stimuliert. Auch im Überstand der DCs konnten durch TcpC deutlich reduzierte Mengen an IL-1 $\beta$  detektiert werden (Abbildung 10 A). Die Analyse des Überstands mittels Western Blot konnte dies bestätigen (Abbildung 10 B). Hier sind ebenfalls reduzierte Mengen an IL-1 $\beta$  und gespaltener

Caspase-1 p20 zu beobachten. Auffallend war, dass DCs nach Stimulation mit ATP und LPS sowie nach Infektion mit CFT073 Stämmen im Vergleich zu BMDMs eine vielfach höhere Menge an IL-1 $\beta$  sekretierten. Die Western Blot Analyse der zellfreien Überstände weist zudem teilweise auch die Vorläuferproteine pro-IL-1 $\beta$  und Caspase-1 nach Stimulation sowie Infektion auf (Abbildung 10 B). Dies spricht vermutlich für eine gestörte Zellintegrität der Dendritischen Zellen und sollte noch über die Messung der LDH im Überstand überprüft werden um weitere Hinweise auf den Caspase-1 spezifischen Zelltod Pyroptose zu erhalten.



**Abbildung 10: TpcC inhibiert Inflammasom Signaltransduktion in BMDCs**

(A) Murine BMDCs wurden mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pTpcC mit einer MOI von 0,02 und 0,06 infiziert. Als Kontrolle wurden BMDMs nicht stimuliert (mock) oder mit LPS in Kombination mit ATP stimuliert. Die Produktion von IL-1 $\beta$  wurde in den zellfreien Überständen nach 4h mittels ELISA bestimmt und zeigt, dass TpcC die IL-1 $\beta$  Mengen im Vergleich zu CFT073 *tcpC::kan* deutlich reduziert. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen

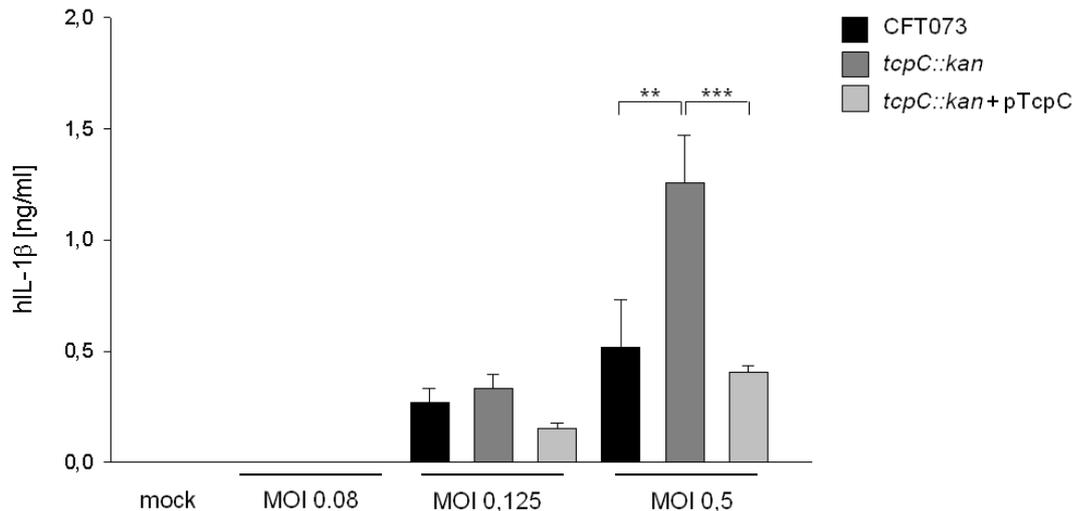
(B) Der Nachweis von IL-1 $\beta$  und Caspase-1 wurden in den zellfreien Überständen mittels Verwendung spezifischer Antikörper durchgeführt. Repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Versuchen. Die Signifikanzen (\* $p < 0,05$ ) wurden mit ANOVA bestimmt.

### 3.1.3 TpcC inhibiert IL-1 $\beta$ Freisetzung in humanen Uroepithelzellen

Da CFT073 zu der Gruppe der uropathogenen *E. colis* (UPECs) zählt, wurde die humane Urothelzelllinie HCV29, ursprünglich aus Blasenepithel gewonnen, als weiteres Modell zur Analyse des inhibitorischen Effekts von TpcC gewählt (Bean *et al.*, 1974, Masters *et al.*, 1986).

Analog zu murinen Knochenmarkszellen wurden die HCVs mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pTpcC infiziert und die Mengen an humanen IL-1 $\beta$  im Überstand mittels ELISA bestimmt. Wie für Makrophagen und DCs beobachtet, zeigt sich auch für die HCV29 Zelllinie der inhibitorische Phänotyp von TpcC auf die Sekretion von humanen IL-1 $\beta$  (Abbildung 11). Die gemessenen IL-1 $\beta$  Mengen sind jedoch im Vergleich zu murinen

Immunzellen gering und der inhibitorische Phänotyp von TcpC ist erst ab einer MOI von 0,5 deutlich zu beobachten. Möglicherweise bedarf es für diese Zelllinie einer längeren Infektionsdauer und/oder einer initial höheren Erregermenge. Das Experiment liefert dennoch einen wichtigen Hinweis darauf, dass TcpC auch im humanen Infektionskontext in der Lage ist, die Freisetzung von IL-1 $\beta$  zu modulieren.



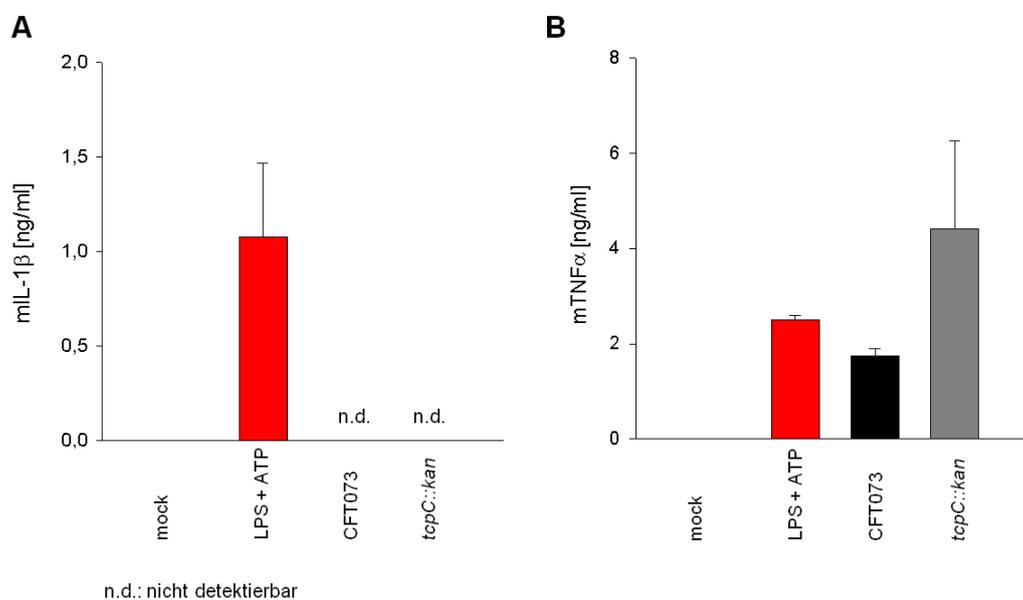
**Abbildung 11: TcpC reduziert IL-1 $\beta$  Freisetzung in humanen Uroepithelzellen**

Humane HCV29 Zellen wurden mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan + pTcpC* mit einer MOI von 0,08, 0,125 und 0,5 infiziert. Die Produktion von humanen IL-1 $\beta$  wurde in den zellfreien Überständen nach 4h mittels ELISA bestimmt. Die IL-1 $\beta$  Sekretion humaner HCV29 Zellen ist nach Infektion mit CFT073 als auch mit der TcpC-komplementierten Mutante CFT073 *tcpC::kan + pTcpC* im Vergleich zur Infektion mit CFT073 *tcpC::kan* erniedrigt. Repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Versuchen. Die Signifikanzen (\*p < 0,05) wurden mit ANOVA bestimmt.

### 3.1.4 Inflammasom Aktivierung benötigt direkten Erregerkontakt

In vergangenen Arbeiten konnte für TcpC gezeigt werden, dass das Protein sekretiert wird und die Zellmembran der Wirtszelle durchdringen kann. Dies wurde mit Hilfe eines „Transwell Systems“ demonstriert, in dem der Erreger physikalisch von der Wirtszelle getrennt war und der NF- $\kappa$ B-inhibierende Effekt von TcpC dennoch gezeigt werden konnte (Cirl *et al.*, 2008). Um zu überprüfen ob sekretiertes TcpC auch während der Aktivierung des Inflammasoms einen Effekt auf die Freisetzung von IL-1 $\beta$  besitzt, wurden erneut Transwell Experimente durchgeführt. Hierfür wurden BMDMs zusammen mit CFT073 und CFT073 *tcpC::kan* im Transwell Einsatz mit einer Porengröße von 0,4  $\mu$ m für 5 h inkubiert. Wie in Abbildung 12 A zu sehen ist, wird durch räumliche Trennung von Bakterium und Wirtszelle keinerlei IL-1 $\beta$  freigesetzt. Die TNF Sekretion ist davon jedoch nicht beeinträchtigt. Es konnte bestätigt werden, dass TcpC in der Lage ist, die TNF Freisetzung auch ohne direkten Kontakt mit der Wirtszelle zu reduzieren (Abbildung 12 B) um so als sekretiertes Protein die

Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu blockieren. Da die Aktivierung des Inflammasoms zwei unabhängige Signale voraussetzt, war es daher sinnvoll das Experiment in Kombination mit einem ATP Stimulus während der Transwell Infektion zu wiederholen. Hierbei kann das Endotoxin der Bakterien die Transwell Membran passagieren und so als erstes Signal die Induktion von pro-IL-1 $\beta$  durch Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalweges über einen bestimmten Zeitraum bewirken. Der ATP Stimulus zum Ende des Experimentes sollte die benötigte Bildung des Inflammasomkomplexes und so die Prozessierung von pro-IL-1 $\beta$  bewirken. Nun könnte die potentielle Wirkung von TpcC auf die Aktivierung der Inflammasom Kaskade untersucht werden. Ein initiales Experiment mit diesem Versuchsaufbau führte jedoch erneut zu keiner IL-1 $\beta$  Freisetzung. Möglicherweise durch zu geringe Mengen an wirksamen Endotoxin oder einer allgemein zu kurzen Inkubationszeit.



**Abbildung 12: Inflammasom Aktivierung benötigt physikalischen Erregerkontakt**

TNF und IL-1 $\beta$  Sekretion von BMDMs nach Koinkubation im Transwellssystem (0,4  $\mu$ m Porengröße) mit CFT073 und CFT073 *tcpC::kan* (MOI 0,04) und Stimulation mit LPS und ATP. Die Produktion von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  wurde in den zellfreien Überständen nach 5h mittels ELISA bestimmt. IL-1 $\beta$  wird nur durch die Positivkontrolle freigesetzt, jedoch nicht durch die CFT073 Stämme im Transwell Kompartiment. Die TNF Sekretion wird durch TpcC deutlich inhibiert. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen für die Messung von IL-1 $\beta$  bzw. aus 2 unabhängigen Versuchen für die Messung von TNF.

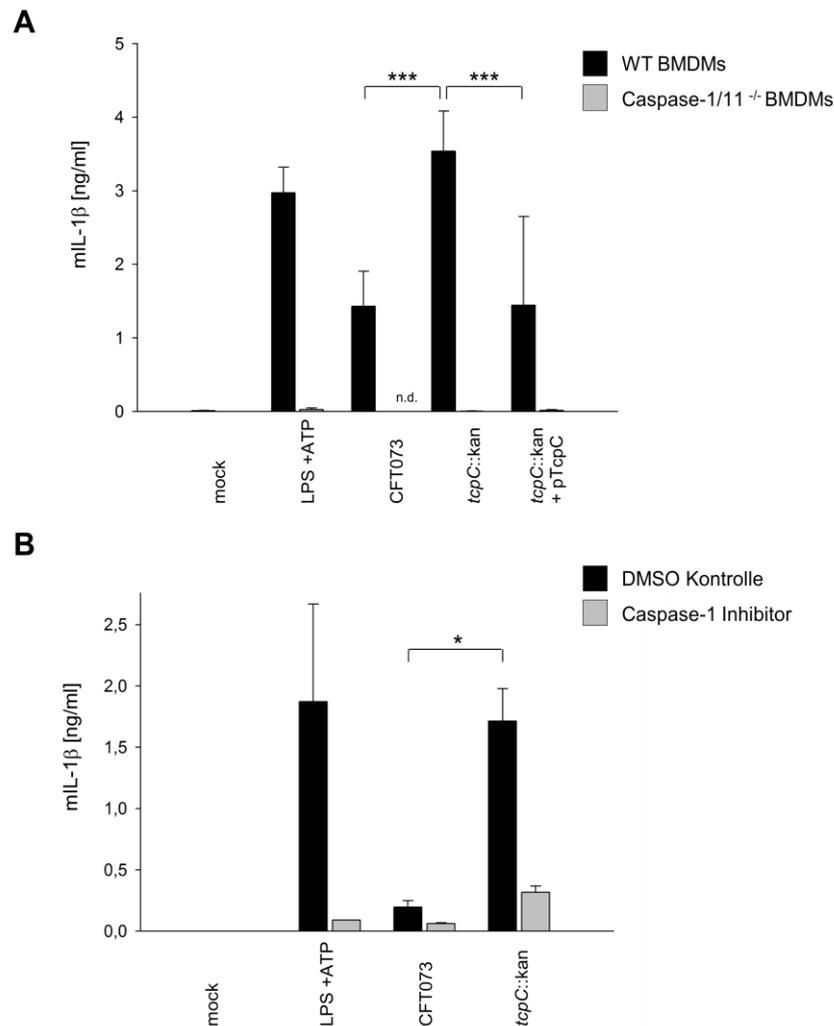
### 3.1.5 IL-1 $\beta$ Freisetzung durch CFT073 ist Caspase-1, ASC und NLRP3 abhängig

Um die Rolle von Caspase-1 während der Inflammasom-induzierten IL-1 $\beta$  Sekretion zu untersuchen, wurden zum einen BMDMs aus Caspase-1/11 defizienten Mäusen analysiert und zum anderen ein für Caspase-1 spezifischer Inhibitor eingesetzt. Es galt zu überprüfen ob Caspase-1 selektiv für die Freisetzung von IL-1 $\beta$  in murinen Knochenmarkszellen

verantwortlich ist, da auch für andere Caspasen wie Caspase-8 diese Funktion beschrieben wurde (Guma *et al.*, 2009, Antonopoulos *et al.*, 2013). Wie kürzlich in der Literatur bekannt wurde, handelt es sich bei allen bestehenden Caspase-1 defizienten Mäusen um Caspase-1/Caspase-11 Doppelknockout Tiere. Die Gründe hierfür liegen einerseits in den verwendeten embryonischen Stammzellen (Mausstamm 129), die für den Caspase-1 Knockout eingesetzt wurden und bereits eine Mutation innerhalb des *Caspase11* Gens trugen. Andererseits konnten die beiden Gene aufgrund ihrer lokalen Nähe während des Rekombinationsereignisses nicht voneinander getrennt werden (Kayagaki *et al.*, 2011).

Knochenmarksmakrophagen von WT und Caspase-1/11 defizienten ( $^{-/-}$ ) Mäusen wurden mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pTcpc infiziert oder mit LPS und extrazellulärem ATP als Positivkontrolle stimuliert. Wie aus Abbildung 13 A hervorgeht, induzieren alle geprüften CFT073 Stämme sowie die Positivkontrolle lediglich in WT, jedoch nicht in Caspase-1/11  $^{-/-}$  BMDMs die Sekretion von IL-1 $\beta$ . Diese wird wiederholt durch die Präsenz von *tcpC* inhibiert.

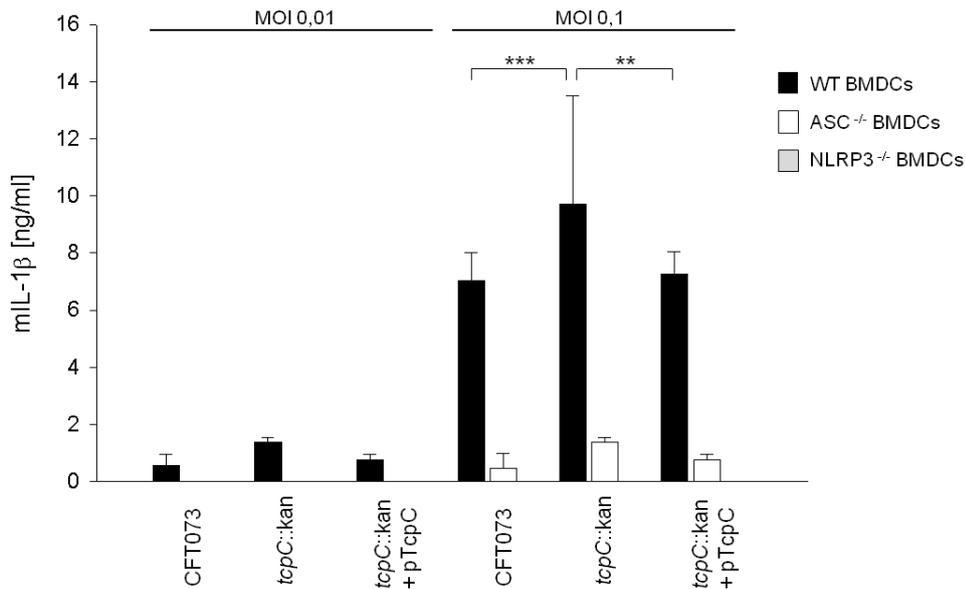
Zusätzlich wurden WT BMDMs mit dem Caspase-1 Inhibitor (Z-YVAD-FMK) 1 h vor der Infektion mit den CFT073 Stämmen behandelt. Dieser Inhibitor hemmt spezifisch Caspase-1 durch irreversible Bindung welche zur Inaktivierung der Caspase führt. Der Einsatz des Inhibitors blockiert die IL-1 $\beta$  Freisetzung in allen Proben nahezu vollständig verglichen mit der Lösungsmittel Kontrolle DMSO. Die minimalen IL-1 $\beta$  Mengen während der streng Caspase-1 abhängigen LPS/ATP Stimulation sind vermutlich durch unvollständige Blockade des Enzyms entstanden. In den nicht inhibierten BMDMs verursacht Tcpc erneut die Reduktion von IL-1 $\beta$  (Abbildung 13 B). Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass Caspase-1 und möglicherweise auch Caspase-11 für die Prozessierung von IL-1 $\beta$  im *in vitro* Infektionsmodell essentiell sind.



**Abbildung 13: CFT-induzierte IL-1 $\beta$ -Produktion ist von Caspase-1/11 abhängig**

(A) Murine WT und Caspase 1/11<sup>-/-</sup> BMDMs wurden mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pTpcC mit einer MOI von 0,02 infiziert. (B) Murine WT BMDMs wurden mit dem Caspase-1 Inhibitor Z-YVAD-FMK bzw. der Lösungsmittelkontrolle DMSO 60 min vor Infektion mit CFT073 und CFT073 *tcpC::kan* (MOI 0,1) behandelt. Als Kontrolle wurden BMDMs nicht stimuliert (mock) oder mit LPS in Kombination mit ATP stimuliert. Die Produktion von IL-1 $\beta$  wurde in den zellfreien Überständen nach 4h mittels ELISA bestimmt. Repräsentatives Ergebnis (B) aus 3 unabhängigen Versuchen. Die Signifikanzen (\*p < 0,05) wurden mit ANOVA bestimmt.

Um zu klären, ob die Aktivierung der Caspase-1 während der Infektion mit den *E. coli* Stämmen tatsächlich durch das NLRP3 Inflammasom vermittelt wird, wurden weitere Infektionsexperimente mit NLRP3<sup>-/-</sup> BMDCs durchgeführt. Zusätzlich wurden ASC defiziente BMDCs verwendet, da ASC als Adapter von allen NLRs verwendet wird (siehe Abbildung 2). Wie in Abbildung 14 gezeigt, ist die IL-1 $\beta$  Sekretion der Dendritischen Zellen stark von ASC und NLRP3 abhängig, das Fehlen des NOD-Rezeptors führt zu keiner messbaren IL-1 $\beta$  Freisetzung, das Fehlen des Adapters zeigt minimale IL-1 $\beta$  Restmengen. Demnach ist der NLRP3 Inflammasom Komplex für die CFT073 induzierte Sekretion von IL-1 $\beta$  verantwortlich und TpcC kann somit nur in WT BMDMs die Reduktion von IL-1 $\beta$  vermitteln.

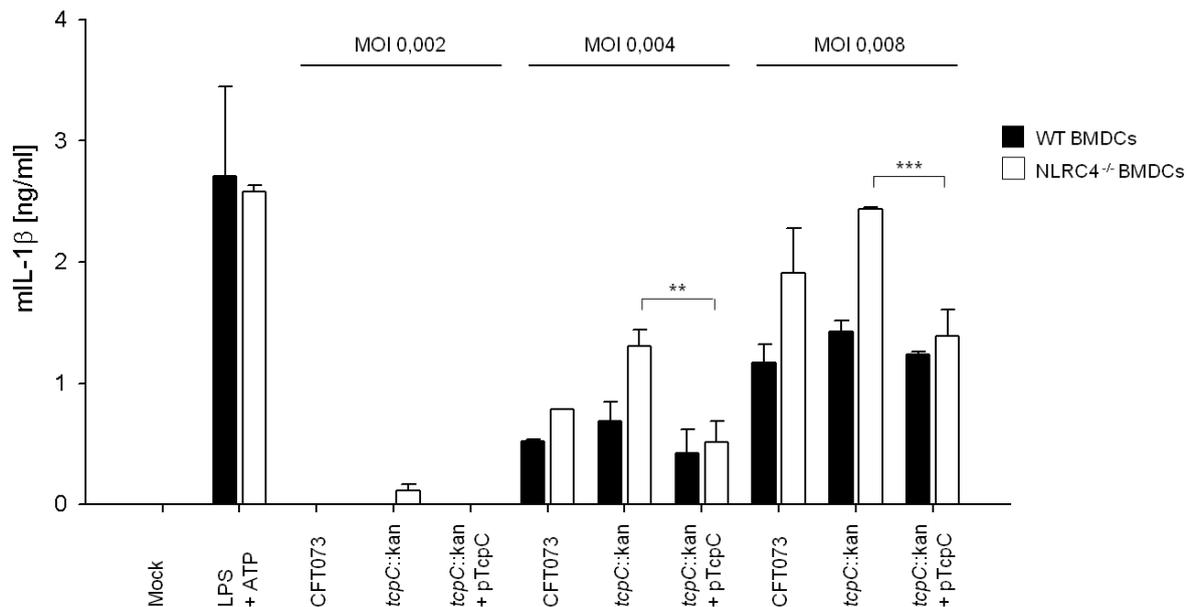


**Abbildung 14: IL-1β Freisetzung ist von ASC und NLRP3 abhängig**

Infektion von murinen WT, ASC<sup>-/-</sup> und NLRP3<sup>-/-</sup> BMDCs mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC mit einer MOI von 0,01 und 0,1. Die Produktion von IL-1β wurde in den zellfreien Überständen nach 4h mittels ELISA bestimmt. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen. Die Signifikanzen (\*p < 0,05) wurden mit ANOVA bestimmt.

Viele Bakterien aktivieren gleichzeitig zwei oder mehrere verschiedene Inflammasome. Für *Listeria monocytogenes* und *Burkholderia pseudomallei* ist zum Beispiel zusätzlich zur Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms auch eine Aktivierung des NLRC4 und AIM2 Inflammasoms beschrieben worden (Wu *et al.*, 2010, Ceballos-Olvera *et al.*, 2011). Das NLRC4 Inflammasom wird durch zytosolisches Flagellin oder Komponenten des Typ III Sekretionssystems aktiviert. NLRC4 verwendet dafür die Hilfe von NAIP Proteinen (Franchi *et al.*, 2006, Miao *et al.*, 2010) und benötigt den Adapter ASC (Proell *et al.*, 2013). Nun stellt sich die Frage, ob CFT073 zusätzlich zum NLRP3 Inflammasom auch in der Lage ist das NLRC4 Inflammasom zu aktivieren und durch seinen Virulenzfaktor TcpC zu modulieren. Hierfür wurden in einem preliminären Experiment NLRC4 defiziente und WT BMDCs mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC mit verschiedenen MOIs infiziert bzw. mit LPS und ATP stimuliert. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist scheint NLRC4 für die Freisetzung von IL-1β keine Rolle zu spielen. In den NLRC4 defizienten BMDCs kommt es zu einer deutlich erhöhten IL-1β Sekretion nach Infektion mit *E. coli*. Im Gegensatz dazu resultiert die Stimulation mit LPS und ATP in NLRC4 defizienten und WT BMDCs in sehr ähnlichen IL-1β Mengen. Der inhibitorische Phänotyp von TcpC in Bezug auf die IL-1β Sekretion ist auch bei NLRC4 Abwesenheit zu beobachten. Es kommt durch TcpC vermutlich zu einer NLRC4 unabhängigen Modulation der IL-1β Prozessierung.

Das preliminäre Experiment sollte auf jeden Fall wiederholt werden. Wichtig wäre auch die Verwendung einer passenden Positivkontrolle zur Bestätigung der NLRC4 Aktivierung. Hierfür könnten die Infektion mit *S. typhimurium* bzw. die Stimulation mit Flagellin in Frage kommen. Ebenso sollten weitere Kandidaten für die Bildung eines Inflammasoms wie NLRP1, NLRP6, NLRP12 und AIM2 auf eine potentielle Funktion während einer CFT073-Infektion untersucht werden.



**Abbildung 15: Die Bedeutung von NLRC4 für die IL-1β Produktion in BMDCs**

Infektion von murinen WT und NLRC4<sup>-/-</sup> BMDCs mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pTpcC mit einer MOI von 0,002, 0,004 und 0,008. Als Kontrolle wurden BMDMs nicht stimuliert (mock) oder mit LPS in Kombination mit ATP stimuliert. Die Produktion von IL-1β wurde in den zellfreien Überständen nach 4 h mittels ELISA bestimmt. Die Signifikanzen (\*p < 0,05) wurden mit ANOVA bestimmt.

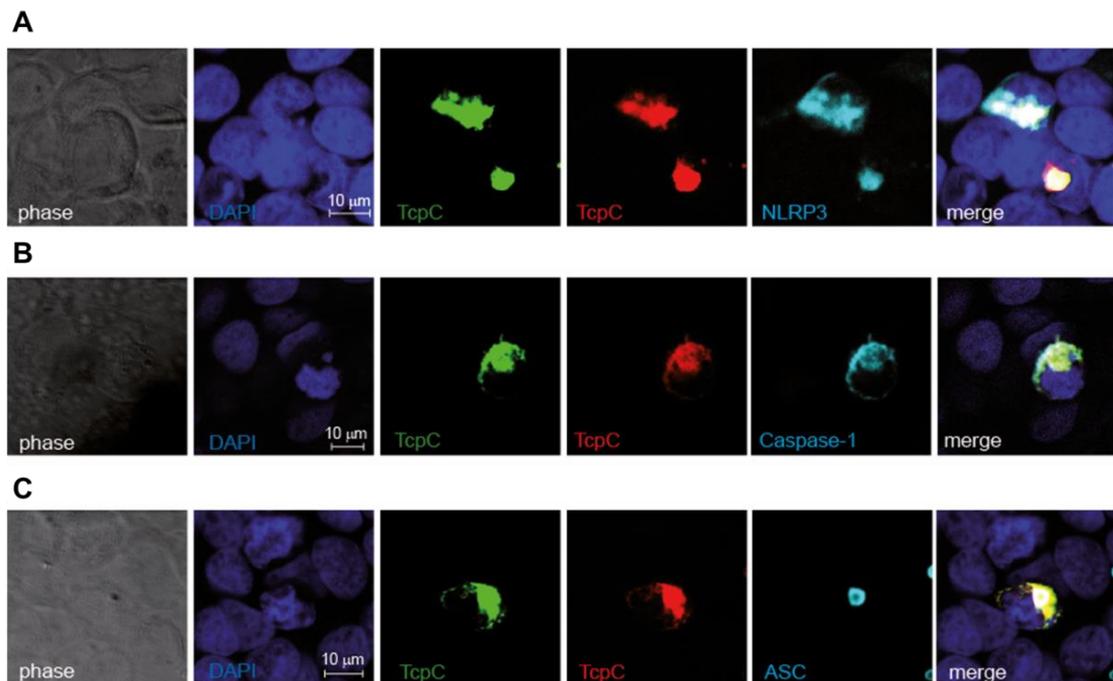
Zusammenfassend zeigen die Daten, dass der Stamm *E. coli* CFT073 in der Lage ist, das NLRP3 Inflammasom zur IL-1β Sekretion zu stimulieren, aber gleichzeitig mit Hilfe des Virulenzfaktors TpcC die Fähigkeit besitzt, die Aktivierung der Caspase-1 und so die Freisetzung von IL-1β zu reduzieren. Damit beeinflusst der uropathogene Erreger zusätzlich zur NF-κB Aktivierung, einen weiteren essentiellen Signalweg der angeborenen Immunantwort.

## 3.2 Mechanismus der TcpC vermittelten Inflammasom-Inhibition

### 3.2.1 TcpC ko-lokalisiert mit Inflammasom Komponenten über seine TIR Domäne

Nachdem gezeigt wurde, dass TcpC die Caspase-1-abhängige Aktivierung von IL-1 $\beta$  blockiert, sollte der Mechanismus auf molekularer Ebene untersucht werden. Ein weit verbreitetes Prinzip der Modulation von Signalkaskaden stellt die direkte Interaktion des Inhibitors mit einem oder mehreren Schlüsselmolekülen im Signalweg dar. Ob TcpC die IL-1 $\beta$  Inhibition durch direkte Interaktion vermittelt, sollte nun mit verschiedenen Methoden untersucht werden.

Dafür wurde zunächst die Lokalisation der Inflammasom Proteine NLRP3, ASC und Caspase-1 in Kombination mit TcpC im Überexpressionssystem in HEK 293 Zellen analysiert. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Susi Dürr aus unserer Arbeitsgruppe generiert. Da die Expression von TcpC zu Beginn der Studien aufgrund seiner Instabilität in den Zellen nicht nachweisbar war, wurde ein neuer Expressionsvektor konstruiert. In diesem trägt TcpC an seinem N-terminalen Ende das eGFP-Epitop und am C-terminalen Ende das DsRed-Epitop und ist als Fusionsprotein wesentlich stabiler. Dieses Doppel-Konstrukt erlaubte des Weiteren die Visualisierung einer potentiellen Selbst-Spaltung von TcpC mittels Fluoreszenz Analyse.

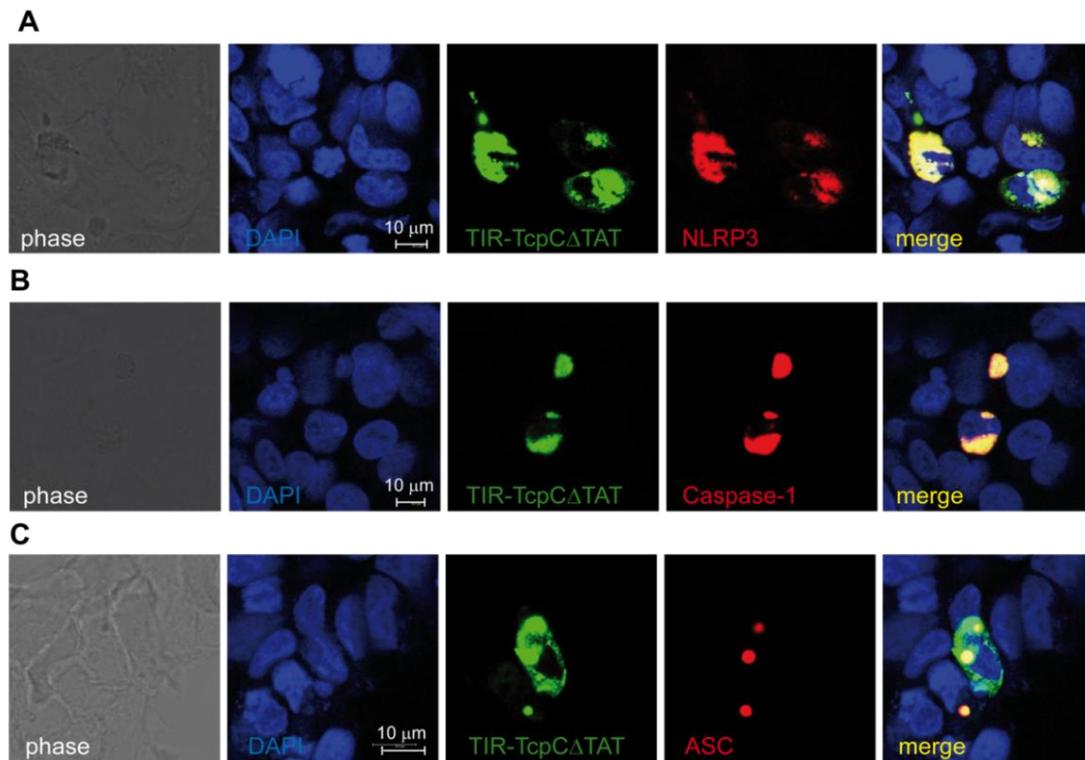


**Abbildung 16: TcpC kolokalisiert mit Caspase-1 und NLRP3**

HEK 293 Zellen wurden mit Expressionsvektoren für eGFP und DsRed doppelt-markiertem TcpC zusammen mit NLRP3 (A), Caspase-1 (B) oder ASC (C) als Flag markierte Proteine, dargestellt in türkis, transient für 48 h transfiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Hoechst gefärbt (blau). TcpC erscheint als grünes und rotes Fusionsprotein und kolokalisiert mit NLRP3 und Caspase-1 (A und B), jedoch nicht mit ASC (C).

Wie anhand von Abbildung 16 deutlich wird, verteilt sich TcpC im Zytoplasma und kann über beide Fluorophore in grün und rot nachgewiesen werden. Die Signale von eGFP und DsRed scheinen im direkten Vergleich der beiden Fluoreszenzkanäle an der gleichen Stelle im Zytoplasma zu liegen. Demnach existiert TcpC als vollständiges Fusionsprotein bzw. potentielle Spaltprodukte befinden sich in direkter räumlicher Nähe zueinander. NLRP3 (A), Caspase-1 (B) und ASC (C) sind ebenso zytoplasmatisch verteilt, dargestellt in türkis. In Kombination mit TcpC wird jedoch nur für NLRP3 (A) und Caspase-1 (B) eine Kolokalisation im Zytoplasma der Zellen beobachtet. ASC bildet ein, für seine Überexpression charakteristisches Aggregat (auch „Speck“ genannt) (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2007; Proell *et al.*, 2013) und scheint keine Kolokalisation mit TcpC einzugehen (C).

Um aufzuklären, inwieweit die TIR-Domäne von TcpC an der Kolokalisation mit NLRP3 und Caspase-1 beteiligt ist, wurde die Konfokal Analyse mit der isolierten TIR-Domäne als eGFP-markiertes Protein wiederholt. Überraschenderweise war dieses Konstrukt im Nukleus der Zelle zu finden (Daten nicht gezeigt). Die Ursache hierfür könnte in der Aminosäure Sequenz der TIR-Domäne von TcpC liegen. Dort befinden sich drei aufeinander folgende Arginin Reste mit basischen pH-Wert und Homologie zum viralen TAT Protein des Humanen Immundefizienz Virus (HIV). Die Minimalsequenz des TAT Proteins trägt ebenfalls hauptsächlich Arginine und Lysine, besitzt einen basischen pH Wert und kann über einen Phospholipid-vermittelten Mechanismus und durch Diffusion die Plasma- und Nukleusmembran passagieren (Debaisieux *et al.*, 2012). Die Theorie der TAT-ähnlichen Sequenz zur Erklärung der nukleären Lokalisation von TIR-TcpC konnte durch die Klonierung eines TAT defizienten Expressionskonstrukts unterstützt werden. Die verkürzte Form TIR-TcpC $\Delta$ TAT, dargestellt in grün, verbleibt im Gegensatz zur vollständigen TIR-Domäne von TcpC im Zytosol der Zelle (Abbildung 17). Dort ist es nun theoretisch möglich mit Ko-transfizierten Inflammasom Proteinen zu kolokalisieren. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, ist auch die verkürzte Form von TIR-TcpC in der Lage mit NLRP3 und Caspase-1, dargestellt in rot, zu kolokalisieren. Ähnlich zur vorherigen Analyse bildet ASC eine Aggregat-ähnliche Struktur und kolokalisiert nicht mit TIR-TcpC $\Delta$ TAT. Diese Daten bestätigen die Kolokalisation von TcpC mit NLRP3 und Caspase-1 und führen zu der Schlussfolgerung, dass die TIR-Domäne von TcpC an dieser Kolokalisation beteiligt ist.



**Abbildung 17: TcpC vermittelt Kolokalisation mit Caspase-1 und NLRP3 über TIR-Domäne**

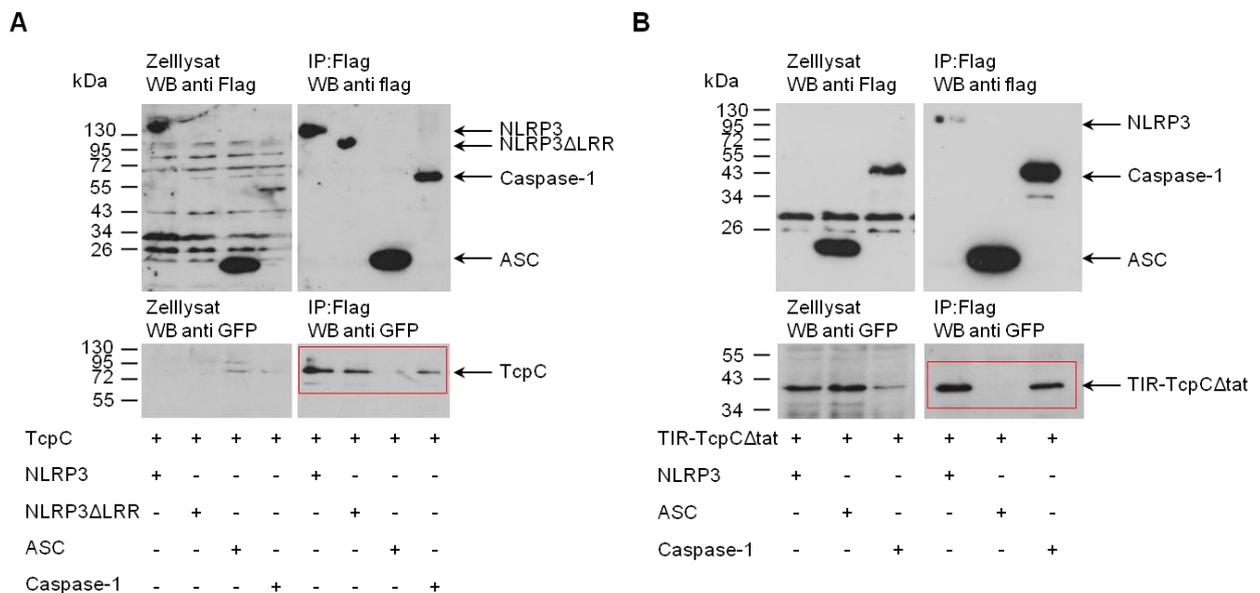
HEK 293 Zellen wurden mit Expressionsvektoren für eGFP-markiertes TIR-TcpC $\Delta$ TAT zusammen mit DsRed markiertem NLRP3 (A), Caspase-1 (B) oder ASC (C) transient für 48 h transfiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Hoechst gefärbt (blau). TIR-TcpC $\Delta$ TAT erscheint im Zytoplasma als grünes Fusionsprotein und kolokalisiert mit NLRP3 (A) und Caspase-1 (B), jedoch nicht mit ASC (C).

### 3.2.2 TcpC interagiert mit Komponenten des Inflammasoms

Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob neben der Kolokalisation von TcpC mit NLRP3 und Caspase-1 auch eine direkte Assoziation der Proteine stattfindet.

Eine potentielle Interaktion von TcpC mit dem Inflammasom Komplex wurde mittels Co-Immunpräzipitation (Co-IP) untersucht. Zunächst wurden die drei Komponenten des NLRP3 Inflammasoms: NLRP3, ASC und Caspase-1 als Flag-Epitop markierte Version jeweils einzeln zusammen mit dem eGFP- und DsRed doppelmarkiertem TcpC in HEK 293 Zellen überexprimiert. Zusätzlich wurde NLRP3 $\Delta$ LRR, eine trunkierte Form ohne der LRR Domäne, mit Flag-Epitop zusammen mit TcpC exprimiert. Die LRR Domäne ist dafür bekannt, für die Erkennung von Liganden wie PAMPs im NLR- sowie im TLR-System wichtig zu sein (Akira, 2003). Demnach könnte die LRR Domäne auch für die Bindung von TcpC eine Rolle spielen. Flag Proteine und daran potentiell gebundenes TcpC wurden mit anti-Flag-Antikörper beladenen Beads (anti-Flag-Beads) aus den Zelllysaten präzipitiert und im Western Blot mit einem anti-Flag-Antikörper und einen anti-GFP-Antikörper analysiert. TcpC kopräzipitierte mit NLRP3, NLRP3 $\Delta$ LRR und Caspase-1, jedoch nicht mit ASC (IP:Flag; Abbildung 18 A).

Dies bestätigt die beobachtete Kolokalisation der Proteine in der mikroskopischen Analyse (Abbildung 16). Die LRR Domäne scheint demnach für die Bindung an NLRP3 nicht wichtig zu sein. Da in den vorangegangenen Konfokalmikroskopie Analysen gezeigt wurde, dass die TIR-Domäne von TcpC an der Kolokalisation mit NLRP3 und Caspase-1 beteiligt war (Abbildung 17), wurde die Co-IP mit TIR-TcpC $\Delta$ TAT als eGFP-markiertes Protein und NLRP3, ASC und Caspase-1 wiederholt. Wie in Abbildung 18 B zu sehen ist, besteht die Interaktion von TcpC mit NLRP3 und Caspase-1 auch mit der isolierten TIR-Domäne. Folglich ist die TIR-Domäne von TcpC für die Interaktion als auch für die Kolokalisation mit NLRP3 und Caspase-1 ausreichend.



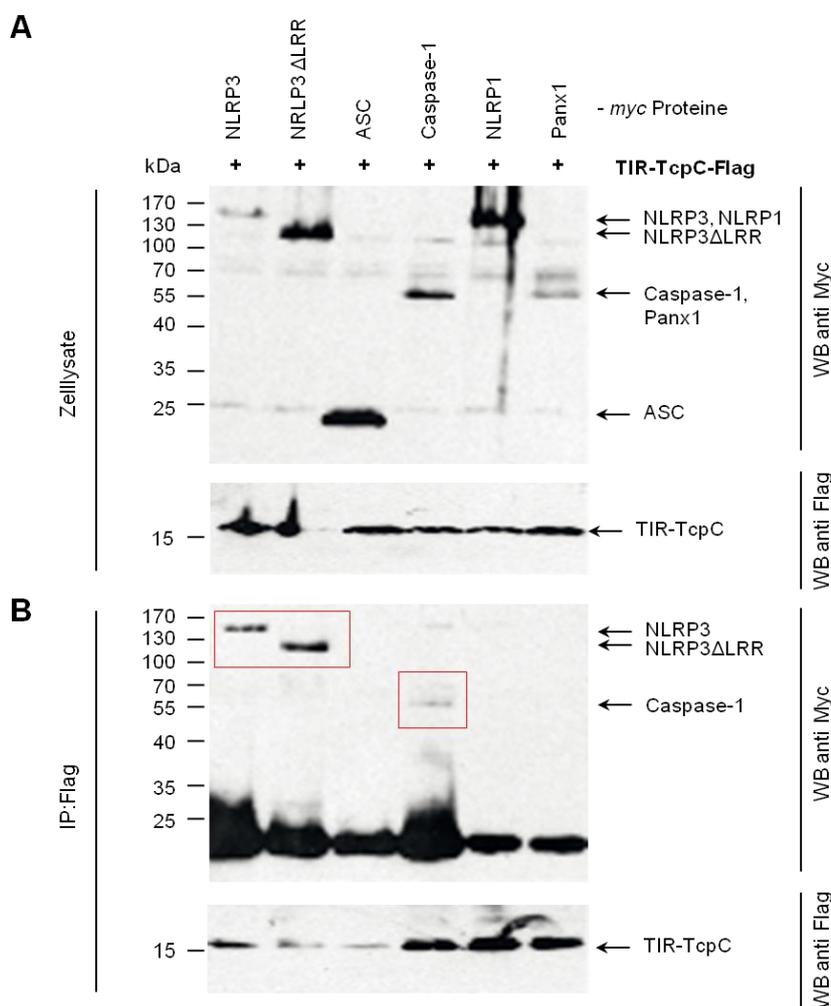
**Abbildung 18: TcpC interagiert mit NLRP3 und Caspase-1 über seine TIR-Domäne**

(A) Expressionsvektoren für eGFP- und DsRed-markiertes TcpC wurden zusammen mit Expressionsvektoren für Flag-markiertes NLRP3, NLRP3 $\Delta$ LRR, ASC oder Caspase-1 wie angegeben in HEK 293 Zellen transfiziert. 48 h später wurden die Zellen lysiert und einer Immunpräzipitation mit anti-Flag-Antikörper beladenen Beads unterzogen (IP:Flag). Die Expression der Konstrukte wurde in den Zellysaten unter Verwendung von Antikörpern gegen das Flag- bzw. GFP-Epitop überprüft. TcpC interagiert mit NLRP3, NLRP3 $\Delta$ LRR, und Caspase-1 jedoch nicht mit ASC (IP:Flag, WB anti GFP).

(B) Expressionsvektoren für eGFP- und DsRed-markiertes TIR-TcpC $\Delta$ TAT wurden zusammen mit Flag-markierten NLRP3, ASC und Caspase-1 in HEK 293 Zellen transfiziert. Die Immunpräzipitation erfolgte nach 48 h analog zu (A). TIR-TcpC $\Delta$ TAT interagiert mit NLRP3 und Caspase-1, jedoch nicht mit ASC (IP:Flag, WB anti GFP). Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

Um die Spezifität der Interaktion der TIR-Domäne von TcpC mit NLRP3 und Caspase-1 zu verifizieren wurden auch Inflammasom-assoziierte Proteine wie Pannexin-1 und NLRP1 mittels Co-IP analysiert. Hierbei wurden die Variante TIR-TcpC mit Flag-Epitop transfiziert und die Inflammasom Komponenten jeweils als Myc-Fusionsprotein. Die Präzipitation erfolgte mit anti-Flag-Beads welche Flag markiertes TIR-TcpC aus dem Zellysat anreicherten (IP:Flag). Die Western Blot Analyse der Präzipitate zeigt nur zwischen TIR-TcpC und NLRP3, NLRP3 $\Delta$ LRR und Caspase-1 eine spezifische Interaktion (Abbildung 19). NLRP1

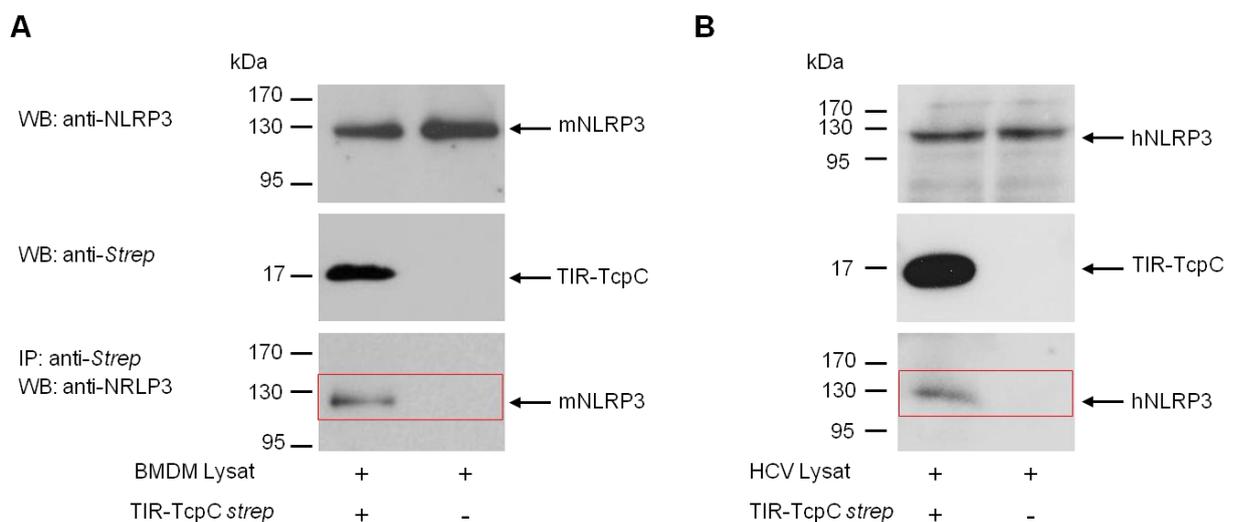
und Panx1 werden von TIR-TcpC nicht gebunden. Innerhalb der spezifisch gebundenen Proteine fällt die unterschiedliche Intensität zwischen den Western Blot Banden auf. Ein starkes Signal wurde für kopräzipitiertes NLRP3 bzw. NLRP3 $\Delta$ LRR beobachtet. Die Signale für kopräzipitierte Caspase-1 waren im Vergleich dazu schwach. Die Ursache hierfür lag wahrscheinlich nicht in einer ungleichen Expression der Konstrukte, da in den Zelllysaten vergleichbare Proteinmengen detektiert wurden. Die Unterschiede deuteten vielmehr darauf hin, dass TcpC mit NLRP3 interagiert, die Bindung an Caspase-1 dagegen eventuell auch zum Abbau dieses Proteins führt. Diese Fragestellung wird im Abschnitt 3.2.3 detaillierter behandelt.



**Abbildung 19: TIR-TcpC interagiert nicht mit NLRP1 und Panx1**

Flag-markiertes TIR-TcpC wurde zusammen mit Expressionsvektoren für Myc-markiertes NLRP3, NLRP3 $\Delta$ LRR, ASC, Caspase-1, NLRP1 oder Pannexin-1 (Panx1) wie angegeben in HEK 293-Zellen transfiziert. 48 h später wurden die Zellen lysiert (A) und eine Immunpräzipitation (B) mit anti-Flag-Antikörper beladenen Beads durchgeführt (IP:Flag). Die Expression der Konstrukte wurde in den Zelllysaten unter Verwendung von Antikörpern gegen das Flag- bzw. Myc-Epitop überprüft (A). TcpC interagiert mit NLRP3, NLRP3 $\Delta$ LRR, und Caspase-1 jedoch nicht mit ASC, NLRP1 und Panx-1 (B, IP:Flag, WB anti Myc). Repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Versuchen.

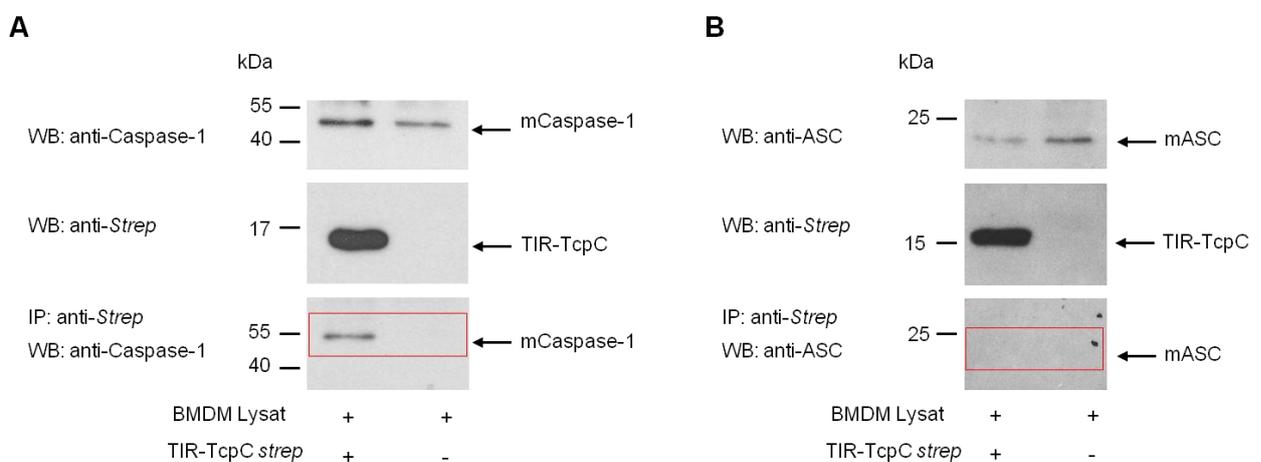
Die bisherigen Nachweise der TcpC-Interaktion mit NLRP3 und Caspase-1 erfolgten nach Überexpression beider Proteine in transfizierten Zellen. Als nächstes sollte die Interaktion unter physiologischeren Bedingungen untersucht werden. Hierfür wurde die gereinigte, isolierte TIR-Domäne von TcpC mit *Strep-tag*<sup>®</sup> II Epitop an *Strep-Tactin*<sup>®</sup>-Bead immobilisiert und diente als „Fänger“-Protein. Anschließend wurden die TIR-TcpC beladenen Beads (+) und als Kontrolle unbeladene Beads (-) mit Zelllysaten aus LPS stimulierten BMDMs oder der humanen Uroepithelzelllinie HCV29 inkubiert. Diese beiden Zelltypen wurden ausgewählt, da dort der inhibitorische Phänotyp von TcpC auf die IL-1 $\beta$  Freisetzung während einer *in vitro* Infektion mit CFT073 Stämmen beobachtet werden konnte (vgl. 3.1.1, 3.1.3). Das LPS „Priming“ der Zellen sollte über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zur Induktion der NLRP3 mRNA und der zytosolischen Anreicherung von NLRP3 führen. Die Präzipitate wurden unter Hochsalz Bedingungen mehrmals gewaschen und durch sauren pH-Wert von den Beads eluiert. Die Anfärbung des Western Blots mit einem NLRP3-spezifischen Antikörper zeigt, dass endogenes murines und humanes NLRP3 in den Zelllysaten vorhanden war (WB: anti-NLRP3) und mit TIR-TcpC kopräzipitiert (IP: anti-*Strep*, WB: anti-NLRP3). Es ist keine unspezifische Bindung der Proteine an die unbeladene *Strep-Tactin*<sup>®</sup>-Bead Matrix (-) zu beobachten (Abbildung 20).



**Abbildung 20: TIR-TcpC interagiert mit endogenem NLRP3**

Lysate aus LPS stimulierten BMDMs (A) oder HCV29 Zellen (B) wurden zusammen mit TIR-TcpC beladenen Beads (+) bzw. nicht-beladenen Beads (-) inkubiert. Nach Inkubation wurden ungebundene Proteine durch mehrmaliges Waschen entfernt und die gebundenen Proteine durch sauren pH Wert von den Beads eluiert. Die Western Blot Analyse erfolgte durch Verwendung eines NLRP3-spezifischen Antikörpers bzw. eines *Strep-Tactin*<sup>®</sup>HRP Konjugats. Endogenes NLRP3 interagiert spezifisch mit TIR-TcpC (IP: anti-*Strep*, WB: anti-NLRP3). Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

Der endogene Pull-Down Assay mit TIR-TcpC beladenen Beads (+), unbeladenen Beads (-) und BMDM Lysat wurde ebenfalls mit Caspase-1 und ASC-spezifischen Antikörpern wiederholt. Die Proteine ASC und Caspase-1 sind im Zelllysate präsent (WB:anti-Caspase-1 bzw. WB: anti-ASC) und es kann in diesem Assay ebenfalls eine spezifische Assoziation von TIR-TcpC und Caspase-1 beobachtet werden (IP: anti-Strep, WB:anti-Caspase-1). Für ASC ist keine Interaktion mit TIR-TcpC nachweisbar (IP: anti-Strep, WB: anti-ASC). Ferner ist auf unbeladenen *Strep-Tactin*<sup>®</sup>-Beads (-) keine unspezifische Bindung von Caspase-1 bzw. ASC nachzuweisen (Abbildung 21). Diese Daten der endogenen Vertretern von NLRP3, Caspase-1 und ASC bestätigen die Ergebnisse der Co-IP mit TcpC, TIR-TcpC und TIR-TcpCΔTAT im Überexpressionssystem.



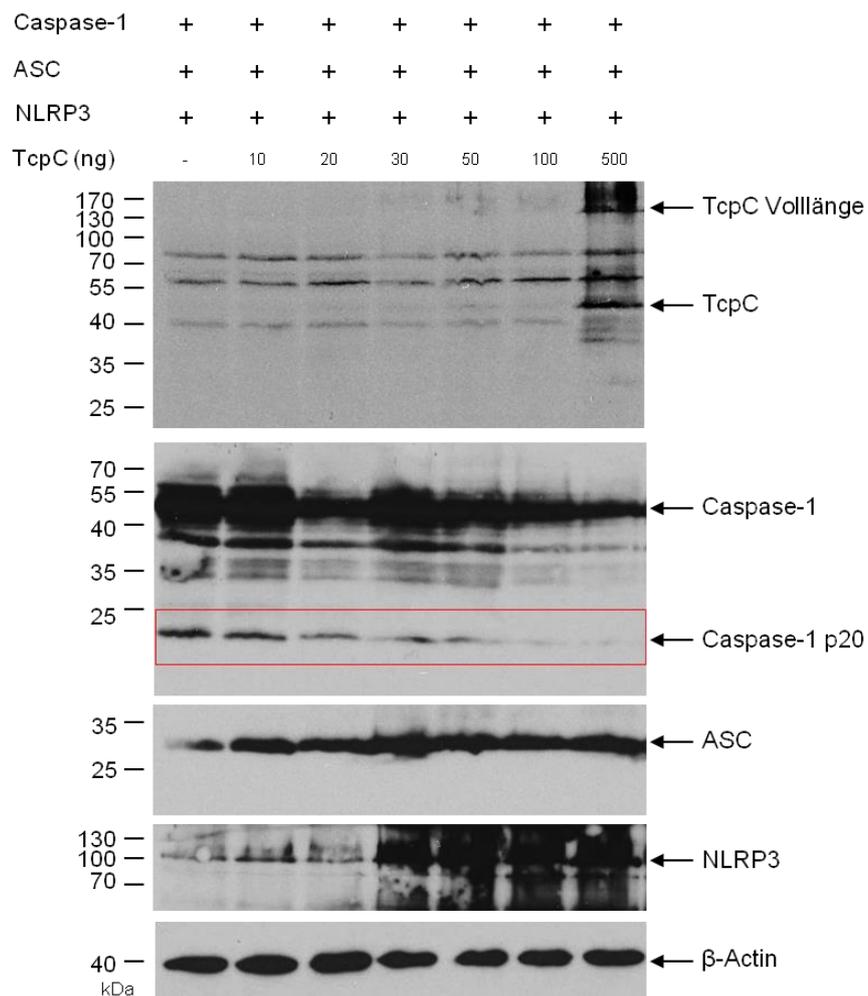
**Abbildung 21: TIR-TcpC interagiert mit endogener Caspase-1**

Lysate aus LPS geprimten BMDMs wurden zusammen mit TIR-TcpC beladenen Beads (+) bzw. nicht-beladenen Beads (-) inkubiert. Nach Inkubation wurden ungebundene Proteine durch mehrmaliges Waschen entfernt und die gebundenen Proteine durch sauren pH Wert von den Beads eluiert. Die Western Blot Analyse erfolgte durch Verwendung eines Caspase-1-spezifischen Antikörpers (A) oder eines ASC- spezifischen Antikörpers (B) und eines *Strep-Tactin*<sup>®</sup>-HRP Konjugats. Endogene Caspase.1 interagiert spezifisch mit TIR-TcpC (IP: anti-*Strep*, WB: anti-Caspase-1). Repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Versuchen

### 3.2.3 Einfluss von TcpC auf Caspase-1 Aktivierung in HEK 293 Zellen

Wie die durchgeführten Interaktionsstudien demonstrieren, bindet TcpC an NLRP3 und Caspase-1 um auf dieser Ebene inhibitorisch auf die Aktivierung von IL-1 $\beta$  einzuwirken. Der molekulare Mechanismus der Caspase-1 Aktivierung wird in der Literatur bislang über homotypische Bindung des Adapter Moleküls ASC an die CARD-Domäne von Caspase-1 und an die PYD-Domäne von NLRP3 beschrieben (Agostini *et al.*, 2004). Die Aktivierung von Caspase-1 führt anschließend zur autokatalytischen Spaltung des Enzyms in die

Untereinheiten p10 und p20. Inwieweit TcpC durch Bindung an Caspase-1 die Aktivierung dieser beeinflusst, wurde in weiteren Überexpressionsstudien in HEK 293 Zellen untersucht. Durch gemeinsame Transfektion von Caspase-1, ASC und NLRP3 wurde das vollständige NLRP3 Inflammasom in HEK 293 Zellen rekonstituiert. Die alleinige Überexpression der drei Proteine führt wie in Abbildung 22 gezeigt zur Spaltung der Caspase-1 in die p20 Untereinheit. Der verwendete Antikörper erkennt spezifisch aktivierte Caspase-1 p20 sowie auch die pro-Caspase-1 (45 kDa). Durch Koexpression des rekonstituierten Inflammasoms zusammen mit dem Expressionsvektor für TcpC in steigenden Mengen (0,1 bis 5 ng) sollte untersucht werden, ob TcpC in der Lage ist, die Aktivierung der Caspase-1 zu modulieren.



**Abbildung 22: TcpC inhibiert Inflammasom vermittelte Caspase-1 Aktivierung**

HEK 293 Zellen wurden pro Ansatz mit Expressionsvektoren für Myc-markiertes NLRP3 (1,5  $\mu$ g), Flag-markiertes ASC (0,2  $\mu$ g), und Flag-markierte Caspase-1 (1,5  $\mu$ g) und steigenden Mengen an eGFP/DsRed-markiertes TcpC (10 bis 500 ng) transient transfiziert. 48 h später wurden die Zellen lysiert und die Western Blot Analyse durchgeführt. Die Expression der Konstrukte wurde in den Zelllysaten unter Verwendung von Antikörpern gegen das Flag-, Myc- und GFP-Epitop sowie Caspase-1 p20 überprüft.  $\beta$ -Aktin diente zur Gewährleistung gleicher aufgetragener Proteilmengen. Repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Versuchen.

Wie in Abbildung 22 deutlich zu sehen ist, wird die Aktivierung der Caspase-1 (erkennbar als p20 Untereinheit) Dosis-abhängig durch die Co-Transfektion von TcpC reduziert. Es kommt zu einer sichtbaren Verminderung der Caspase-1p20 Bande sowie der Pro-Caspase-1 selbst. TcpC führt in den höchsten Mengen von 0,1 und 5 ng zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Caspase-1 Aktivierung. Die anderen Inflammasom Komponenten NLRP3 und ASC werden durch TcpC nicht reduziert. Im Fall von NLRP3 wird sogar eine Steigerung der Proteinmenge beobachtet. Dies könnte mit einem stabilisierenden Effekt der zuvor gezeigten Bindung von TcpC an NLRP3 erklärt werden. Aufgrund der sehr geringen Mengen an transfiziertem TcpC kann dieses Protein nur in der höchsten Menge von 5 ng in der Western Blot Analyse nachgewiesen werden. Interessanterweise liefert der Western Blot Nachweis des eGFP/DsRed markierten TcpC drei unterschiedlich große Proteinsignale, wobei das größte Protein als TcpC Volllänge zugeordnet werden kann. Die kleineren Proteine sind vermutlich Spaltprodukte, welche durch das N-terminale eGFP Epitop nachgewiesen werden können.

Übereinstimmend mit der Western Blot Analyse der infizierten BMDMs (Abbildung 9) und BMDCs (Abbildung 10) wird die Menge an aktivierter Caspase-1 p20 Dosis-abhängig durch die Präsenz von TcpC reduziert. Dies hat in primären Knochenmarkszellen die verminderte Spaltung des Caspase-1 Substrats pro-IL-1 $\beta$  zu Folge. Dementsprechend kommt es zur Senkung der IL-1 $\beta$  Sekretion und damit zur gedämpften Immunabwehr der Zelle gegen CFT073. Diese Daten demonstrieren bereits einen möglichen molekularen Mechanismus wie das bakterielle TIR-Protein die pro-inflammatorische Immunantwort im Zytosol der Wirtszelle moduliert.

### **3.2.4 Einfluss von TcpC auf Inflammasom Bildung *in vivo***

Während der Inflammasom Aktivierung nach Erkennung von PAMPs oder DAMPs, bildet sich ein hochmolekularer Multiproteinkomplex bestehend aus einem NLR Protein, dem Adapter ASC und Caspase-1 (Rathinam *et al.*, 2012). Dieser Multiproteinkomplex führt wie bereits beschrieben zur Prozessierung von IL-1 $\beta$  und IL-18. *In vivo* können diese Multiproteinkomplexe mittels Immunfluoreszenzfärbung visualisiert werden und dienen als sicherer Anhaltspunkt der Inflammasom und Caspase-1 Aktivierung. Der Komplex zeigt sich als distinktes Aggregat („Fokus“ oder „Speck“) im Zytoplasma der Zelle und kann jeweils über eines der darin eingebundenen Proteine immunologisch angefärbt werden (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2007; Fink *et al.*, 2008, Man *et al.*, 2014).

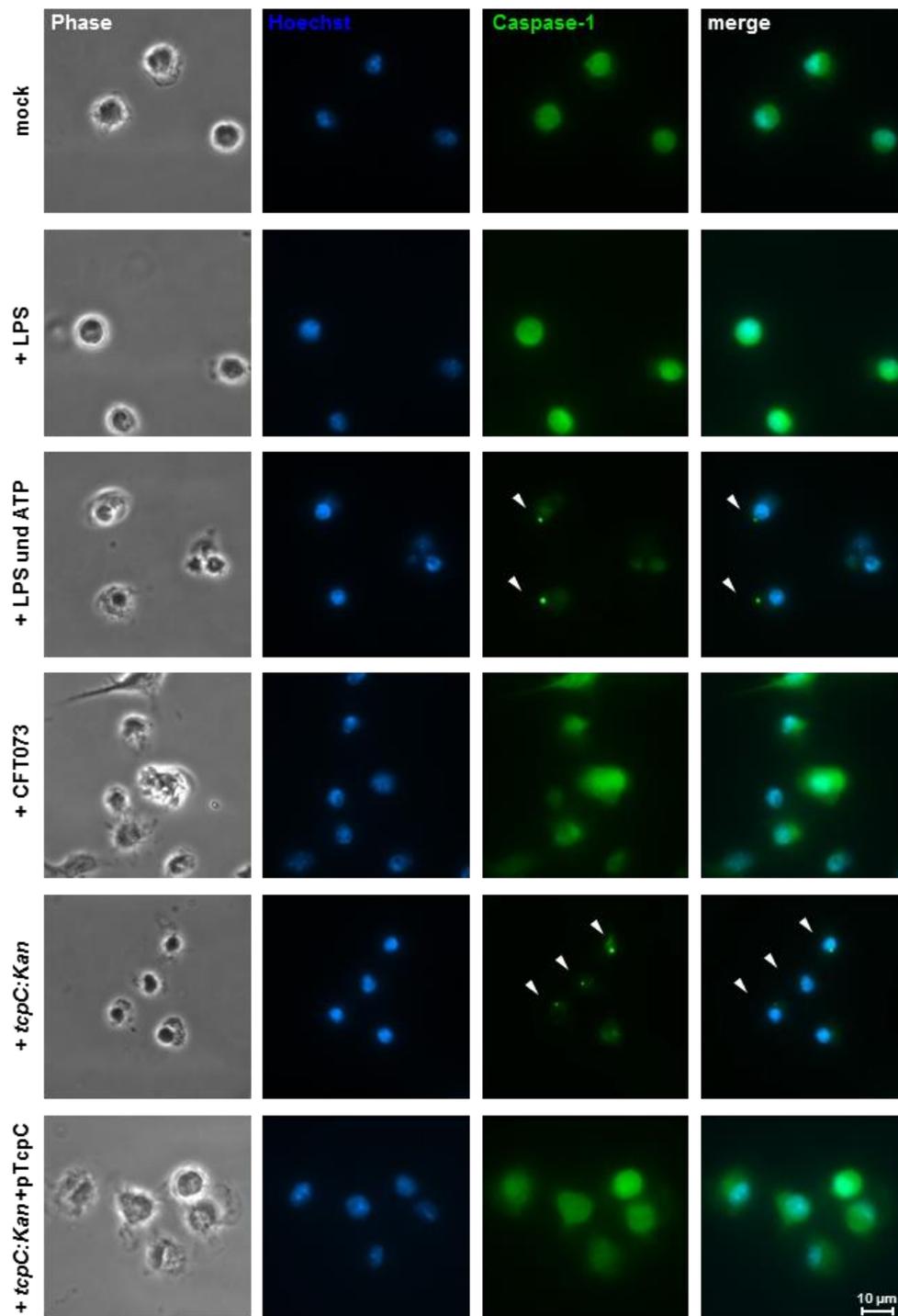
Um zu überprüfen, ob TcpC im Rahmen einer Infektion durch die biochemisch nachgewiesene Bindung an Caspase-1 und NLRP3 auch Einfluss auf die Assoziation des Inflammasom Komplexes trägt, wurden weitere *in vitro* Infektionsstudien mit *tcpC* positiven Stämmen und anschließender Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Als Modell für die

Visualisierung einer natürlichen Inflammasom Bildung wurden die Zellen vor Infektion mit dem Caspase-1 Inhibitor (Z-YVAD-FMK) behandelt. Dieser verhindert die auto-katalytische Spaltung der Caspase-1 und so die Dissoziation aus dem Inflammasom Komplex. Damit wird die Anfärbung des gebildeten Inflammasom Aggregats über einen Caspase-1 Antikörper möglich und ein potentieller Effekt von TcpC analysierbar.

Wie für die Zytokin Analysen (vgl. 3.1.1) wurden BMDCs mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC mit einer MOI von 0,02 infiziert oder mit LPS bzw. LPS und extrazellulärem ATP als Positivkontrolle stimuliert. Anschließend wurde die intrazelluläre Caspase-1 Färbung und parallel die Zellkern Färbung durchgeführt. Wie in

Abbildung 23 gezeigt, führt die Stimulation mit LPS und ATP zur Umverteilung der zytosolischen Caspase-1 und zur Bildung von Caspase-1 Specks (dargestellt in grün). Typischerweise ist jeweils ein Caspase-1 Speck pro Zelle zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigt Caspase-1 während der alleinigen Stimulation mit LPS eine diffuse zytoplasmatische Verteilung parallel zu unstimulierten Zellen. Nach Infektion mit den CFT073 Stämmen konnte die Caspase-1 Speck Bildung nur bei CFT073 *tcpC::kan* beobachtet werden. Der Wildtyp Stamm CFT073 sowie der rekomplementierte CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC Stamm induzieren keine Caspase-1 Speck Bildung in BMDCs.

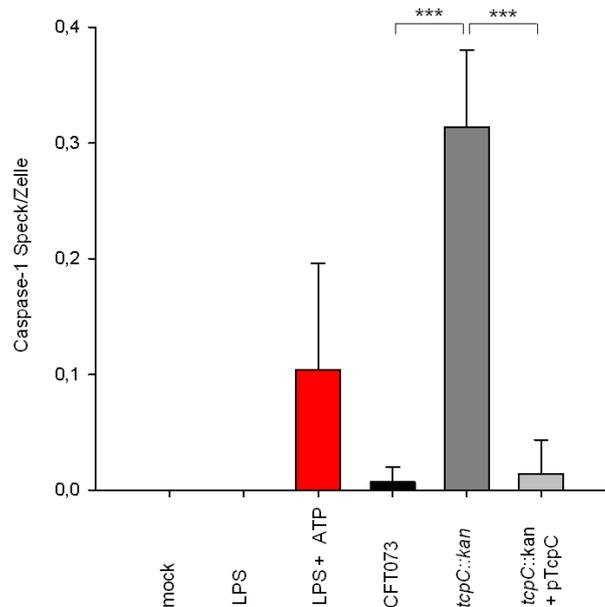
Bei näherer Betrachtung der Caspase-1 aktivierten Zellen (= Speck positiv) fallen morphologische Veränderungen auf. Die Phasenkontrast Aufnahme zeigt bei LPS und ATP stimulierten Zellen sowie bei den CFT073 *tcpC::kan* infizierten Zellen deutlich rundere, kleinere Zellen im Vergleich zu unstimulierten oder mit *tcpC* + Stämmen infizierte Zellen. Ob es auch zur Ruptur der Zellmembran und zur Freisetzung von zytosolischen Bestandteilen kommt, kann hier nur spekuliert werden, erscheint jedoch als sehr wahrscheinlich. In den vorangegangenen Western Blot Analysen der infizierten und LPS/ATP stimulierten BMDCs (Abbildung 10 B) konnten die Vorläuferproteine von Caspase-1 und IL-1 $\beta$  in den zellfreien Überständen nachgewiesen werden, welche sonst nur intrazellulär präsent sein dürften. Dies spricht bereits für eine gestörte Zellintegrität. Zusätzlich kann über die Zellkernfärbung die Kondensation der DNA detektiert werden. Die ist ein klassisches Merkmale der Caspase-1 abhängigen Pyroptose, die morphologische Kennzeichen von Apoptose als auch Nekrose aufweist (Brennan & Cookson, 2000, Bergsbaken & Cookson, 2007).



**Abbildung 23: TcpC inhibiert Caspase-1 Speck Bildung**

BMDCs wurden auf Objektträger ausgesät und 1 h vor Infektion mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC (MOI 0,02) mit dem Caspase-1 Inhibitor (Z-YVAD-FMK) behandelt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit LPS und ATP ebenfalls nach Inkubation mit dem Caspase-1 Inhibitor stimuliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit einem Antikörper spezifisch für Caspase-1 gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Caspase-1 verändert nach Stimulation mit LPS und ATP sowie nach Infektion von CFT073 *tcpC::kan* ihre Verteilung und bildet distinkte Aggregate (=Specks). Im Gegensatz dazu führt die Infektion von CFT073 und CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC, sowie die Stimulation mit LPS zu keiner Caspase-1 Speck Bildung. Repräsentative Mikroskop Aufnahmen mit 100-facher Vergrößerung zeigen Zellkerne in blau und Speck Bildung durch Pfeile. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

Die Anzahl der gebildeten Caspase-1 Specks/Zelle wurde durch Quantifizierung der Zellkerne ermittelt und ist in Abbildung 24 graphisch dargestellt. Die Positivkontrolle LPS plus ATP induziert durchschnittlich 0,1 Speck pro Zelle, die Infektion mit CFT073 *tcpC::kan* induziert mit durchschnittlich 0,3 Speck pro Zelle die Caspase-1 Speck Bildung deutlich stärker. CFT073 sowie CFT073 *tcpC::kan* +pTpcC induzieren die Caspase-1 Aggregate jedoch kaum. Es wird deutlich, dass TcpC die Bildung der Caspase-1 Specks/Zelle inhibiert.

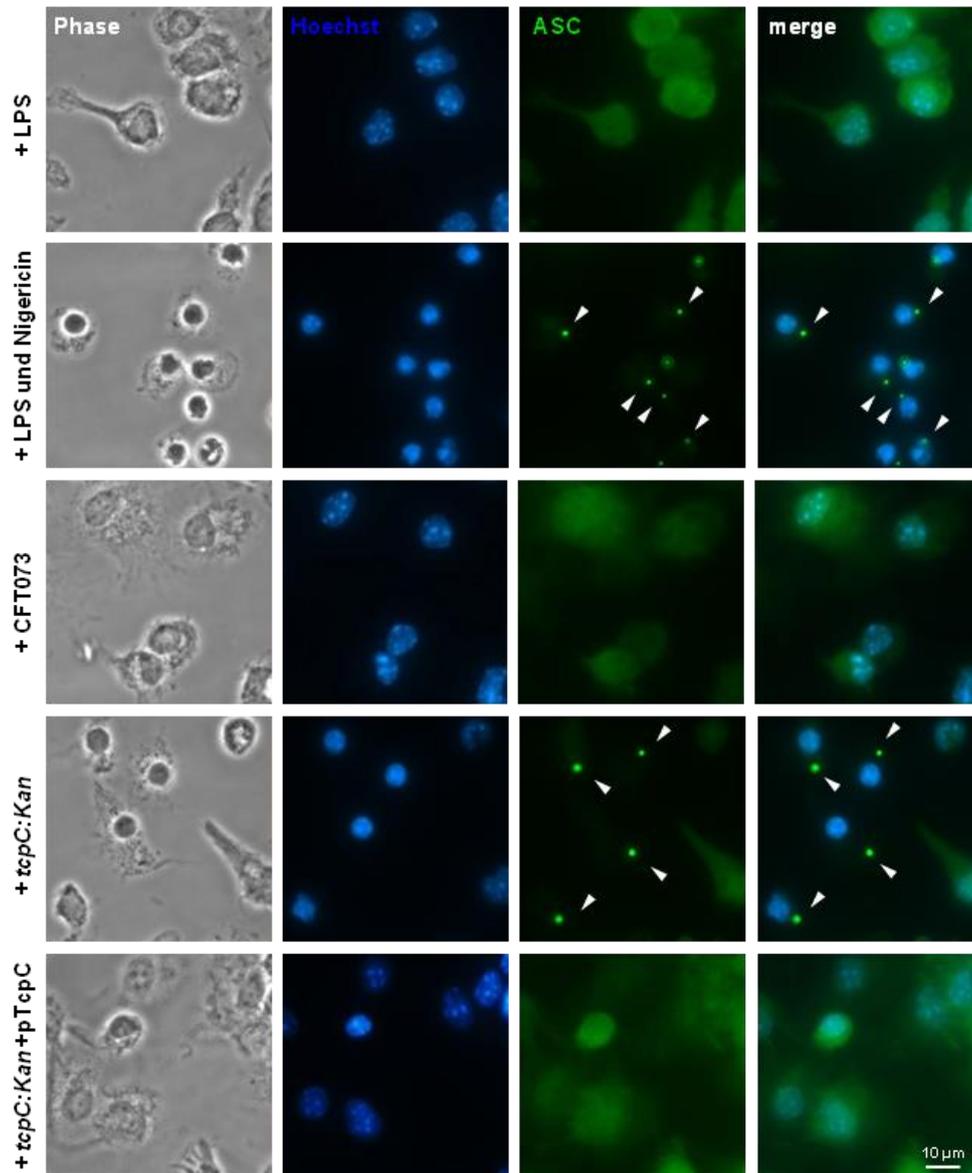


**Abbildung 24: TcpC inhibiert Caspase-1 Speck Bildung**

Die Quantifizierung der Caspase-1 Speck Bildung nach Infektion mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pTpcC (MOI 0,02) bzw. Stimulation von LPS, LPS und ATP von BMDCs wurde durch Auszählen von Mikroskop Aufnahmen mit 40- und 100-facher Vergrößerung durchgeführt. Es wurden für die infizierten Zellen mindestens 1000 Zellen ausgezählt, für die stimulierten Zellen mindestens 250 Zellen. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen. Die Signifikanzen (\* $p < 0,05$ ) wurden mit ANOVA bestimmt.

Da Caspase-1 innerhalb des Inflammasoms Komplexes über die CARD Domäne an ASC bindet, wurde überprüft, ob TcpC parallel auch ASC Speck Bildung beeinflussen kann. Dafür wurden LPS vorstimulierte BMDCs mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pTpcC mit einer MOI von 0,02 infiziert oder mit Nigericin als Positivkontrolle stimuliert. Nigericin ist ein porenbildendes Toxin aus *Streptomyces hygroscopicus* und induziert durch Kalium Ausstrom NLRP3 abhängig die Aktivierung von Caspase-1 und die Freisetzung von IL-1 $\beta$  (Mariathasan *et al.*, 2006, Pelegrin & Surprenant, 2007). Für die Visualisierung der ASC Aggregate ist die Verwendung eines Inhibitors nicht nötig, da ASC im Gegensatz zu Caspase-1 keiner Spaltung unterläuft. Die Immunfluoreszenzfärbung für ASC (dargestellt in grün) in Abbildung 25 zeigt deutlich, dass die Stimulation mit LPS und Nigericin zur Bildung von ASC spezifischen Aggregaten führt. Wie für Caspase-1 Specks beobachtet, entsteht jeweils ein ASC Speck pro Zelle.

Übereinstimmend mit der Aktivierung von Caspase-1 wird auch die ASC Speckbildung exklusiv nur bei Infektion mit CFT073 *tcpC::kan* beobachtet. Die Infektion mit den *tcpC* positiven Stämmen CFT073 und CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC sowie die Stimulation mit LPS alleine führen zu keiner ASC Speck Bildung in BMDCs. Auch hier können im Phasenkontrast die veränderte Zellmorphologie sowie die kondensierten Nuklei während der Inflammasom Bildung beobachtet werden.

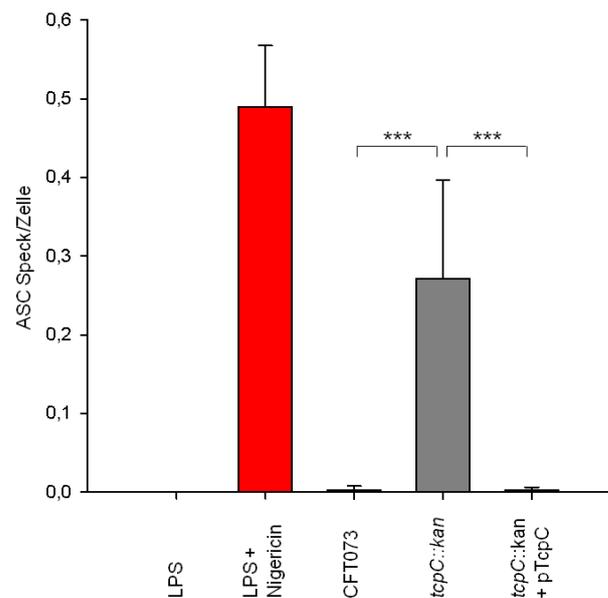


**Abbildung 25: TcpC inhibiert ASC Speck Bildung**

BMDCs wurden auf Objektträger ausgesät vor Infektion mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC (MOI 0,02) für 1 h mit LPS stimuliert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit LPS und Nigericin stimuliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit einem Antikörper spezifisch für ASC gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. ASC bildet nach Stimulation mit LPS und Nigericin sowie nach Infektion von CFT073 *tcpC::kan* distinkte Specks. Im Gegensatz dazu führt die Infektion von CFT073 und CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC, sowie die Stimulation mit LPS zu keiner ASC Speck Bildung. Repräsentative Mikroskop Aufnahmen mit 100-facher Vergrößerung zeigen Zellkerne in blau und Speck Bildung durch Pfeile.

Durch Quantifizierung der Zellkerne wurde auch hier die Anzahl der gebildeten ASC Specks/Zelle ermittelt (Abbildung 26). Die Infektion mit CFT073 *tcpC::kan* induziert mit ca. 0,3 ASC Specks/Zelle einen nahezu gleich großen Anteil an Aggregaten wie für Caspase-1 Specks beobachtet werden konnte. Die Positivkontrolle LPS und Nigericin induziert mit 0,5 Speck/Zelle im Vergleich zur Positivkontrolle LPS und ATP einen deutlich höheren Anteil an Inflammasomkomplexen pro Zelle. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Nigericin durch die Porenbildung der Zellmembran zu einem deutlich schnellerem Kalium Ausstrom führt wie ATP und demnach ein stärkeres Signal liefert. CFT073 sowie CFT073 *tcpC::kan* +pTpcC führen zu keinerlei ASC Aggregat Bildung und bestätigen demnach die Analyse der Caspase-1 Aktivierung.

Zusammenfassend lässt sich zeigen, dass TcpC die Bildung des Inflammasomkomplexes inhibiert und so zur Störung der Inflammasom Aktivierung führt. Vermutlich geschieht dies durch die direkte Bindung an Caspase-1 und NLRP3 über die TIR Domäne von TcpC. Mit diesen Daten konnte ein weiterer Hinweis auf die molekularen Mechanismen der TcpC vermittelten Inhibierung der IL-1 $\beta$  Maturierung gewonnen werden.



#### Abbildung 26: TcpC inhibiert ASC Speck Bildung

Die Quantifizierung der ASC Speck Bildung nach Infektion mit CFT073, *tcpC::kan* und *tcpC::kan* + pTpcC (MOI 0,02) bzw. Stimulation von LPS, LPS und Nigericin von BMDCs wurde durch Auszählen von Mikroskop Aufnahmen mit 40-facher Vergrößerung durchgeführt. Es wurden jeweils mindestens 550 Zellen ausgezählt. Die Signifikanzen (\* $p < 0,05$ ) wurden mit ANOVA bestimmt.

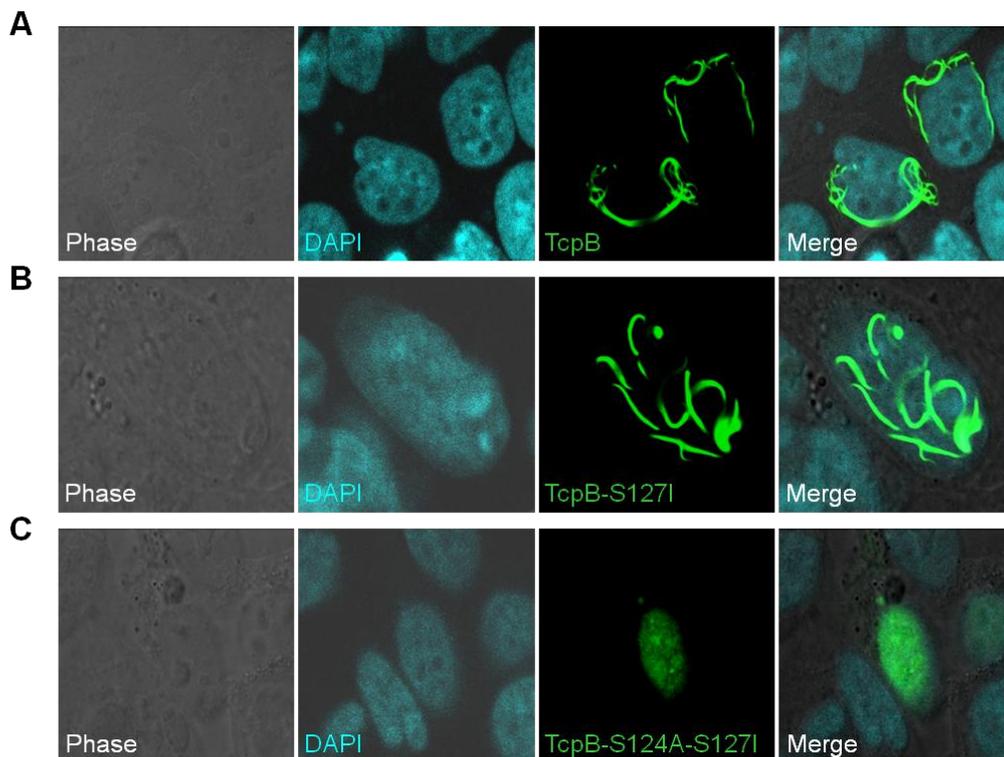
### **3.3 *In Vitro* Charakterisierung von TcpB**

Seit der Entdeckung bakterieller TIR-Proteine als neue Strategie der Immunevasion von Pathogenen, konnten einige der molekularen Ziele der Tcps näher charakterisiert werden. Durch direkte Bindung an Schlüsselmoleküle des angeborenen Immunsystems sind Tcps wie TcpC und TcpB in der Lage, die Signaltransduktion zu modulieren, um so die Abwehr des Wirtes zu reduzieren. In dieser Arbeit wurde für TcpC die Modulation des Inflammasoms, einen für die Immunabwehr essentiellen, Signalweges demonstriert. Durch direkte Interaktion mit dem IL-1 $\beta$  aktivierenden Enzym Caspase-1 sowie dem Inflammasom bildenden Rezeptor NLRP3 wird die Freisetzung von pro-inflammatorischen IL-1 $\beta$  inhibiert. Nun stellt sich die Frage ob das TIR-Protein TcpB aufgrund der signifikanten Sequenzhomologie zu TcpC (vgl. Abbildung 5) diese Eigenschaften teilt und ebenso in der Lage ist das NLRP3 Inflammasom durch direkte Interaktion zu beeinflussen.

#### **3.3.1 Einfluss von TcpB auf die Co-Expression der Inflammasom Komponenten**

Zunächst galt es, die zelluläre Lokalisation von TcpB zusammen mit Inflammasom Komponenten im Transfektionssystem in HEK 293 Zellen zu analysieren. Mit Hilfe der zellulären Verteilung der Proteine sollten weitere Anhaltspunkte einer möglichen direkten Assoziation zwischen TcpB und dem Inflammasom geschaffen werden. In vergangenen Studien von C. Cirl und S. Dürr aus unserer Arbeitsgruppe wurden erste Hinweise auf eine proteolytische Eigenschaft von TcpB erhalten. Durch Co-Inkubation von rekombinantem TcpB zusammen mit den TLR-Proteinen IRAK-1, IRAK-4 und Myd88 wurden nach Inkubation reduzierte Mengen an IRAK-1 und Myd88 jedoch nicht an IRAK4 festgestellt (Dr. Arbeit C. Cirl, 2009). Als mögliche Ursache hierfür wurden zwei Serin Reste (124 und 127) innerhalb der Box 1 der TIR-Domäne identifiziert, welche das katalytische Zentrum einer potentiellen Serin-Protease bilden könnten. Um dies zu überprüfen, wurden im Rahmen der Masterarbeit von A. Minsinger die Serin Austausch Mutanten TcpB-S127I und TcpB-S124AS127I in Form von Expressionsvektoren erstellt und in Bezug auf Protease Aktivität untersucht. Bislang gibt es Einzelbeobachtungen, die auf proteolytische Funktion, vermittelt durch die Serin Reste 124 und 127, deuten. Daher sollten auch die Serin Mutanten TcpB-S127I und TcpB-S124AS127I in die folgenden Untersuchungen mit einbezogen werden, um zusätzliche Erkenntnisse über die funktionelle Bedeutung dieser Serine zu erhalten. Zunächst wurde die Lokalisation von TcpB und den TcpB Serin Mutanten als eGFP Fusionsproteine im Überexpressionssystem in HEK 293 Zellen analysiert. Die Konfokalmikroskopie wurde von S. Dürr durchgeführt.

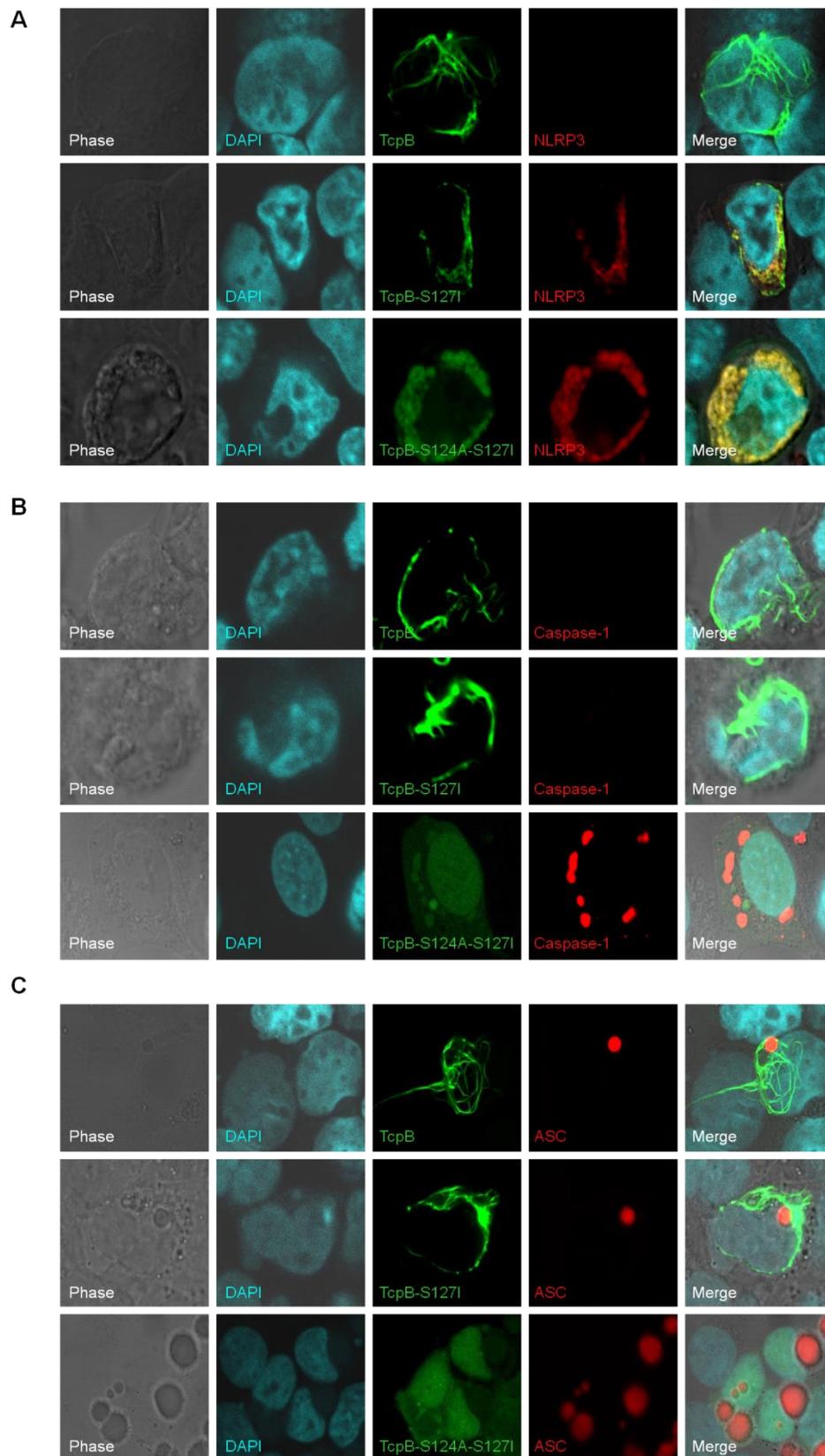
Wie anhand der Abbildung 27 deutlich wird, beeinflusst der Austausch der Serine 124 und 127 die zytosolische Verteilung von TcpB. Die Wildtypform von TcpB (A) zeigt eine tubuläre Struktur im Zytoplasma, TcpB mit Punktmutation S127I (B) verhält sich ähnlich zur Wildtypform und bildet ebenfalls tubuläre Strukturen aus. Der Austausch beider Serine S124 und S127 (C) führt hingegen zu einer grundsätzlich unterschiedlichen zellulären Verteilung von TcpB. Es kommt statt der tubulären Verteilung zu einer diffusen Lokalisation im gesamten Zytoplasma der HEK 293 Zelle.



**Abbildung 27: Zelluläre Struktur von TcpB und TcpB Serin Mutanten**

HEK 293 Zellen wurden mit Expressionsvektoren für eGFP-markiertes TcpB, TcpB-S127I und TcpB-S124A-S127I (dargestellt in grün) transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Hoechst gefärbt (türkis) und im Konfokal Mikroskop analysiert. Der Austausch der Serine S124 und S127 verändert die tubuläre Verteilung von TcpB in ein gleichmäßig diffuses Verteilungsmuster.

Nun wurden die TcpB Varianten als eGFP Fusionsproteine zusammen mit den Inflammasom Komponenten NLRP3, ASC und Caspase-1 als DsRed Fusionsproteine in HEK 293 Zellen transfiziert. Die Konfokalmikroskopie Analyse der Co-Transfektion ist in Abbildung 28 zusammengefasst. Es wurde jeweils eine der drei TcpB Varianten mit einem der Inflammasom Proteine zusammen transfiziert und die zelluläre Lokalisation beider Proteine analysiert. Auch in Kombination mit den Proteinen des Inflammasoms zeigt sich der starke Einfluss der Serin Punktmutationen auf die Verteilung von TcpB. Die Doppelmutante S124A-S127I verteilt sich erneut diffus im gesamten Zytoplasma und scheint exklusiv mit NLRP3 zu kolokalisieren (Abbildung 28 A). Bemerkenswert ist die Bedeutung der beiden Serine von TcpB wenn NLRP3 (A) und Caspase-1 (B) zusammen mit Wildtyp TcpB exprimiert wurden. Die Anwesenheit des tubulär verteilten TcpB verhindert die Expression von NLRP3 (A) und Caspase-1 (B) vollständig. Abhängig von der Anzahl der ausgetauschten Serine wird dieser Effekt reduziert und es scheint, als ob die Serin Mutante TcpB S124A-S127I die Expression von NLRP3 und Caspase-1 im Gegensatz dazu nicht mehr beeinflussen kann. Dies könnte ein Hinweis auf die vermutete Funktion der beiden Serine als katalytisches Zentrum einer potentiellen Serin-Protease sein, müsste jedoch noch weiter charakterisiert werden. Die Expression von ASC hingegen bleibt mit allen TcpB Varianten unbeeinflusst und ist in der typischen aggregierten Form sichtbar. Im Unterschied zu TcpC wird für TcpB S124A-S127I nur eine Kolokalisation mit NLRP3 beobachtet, jedoch nicht für Caspase-1. In Bezug auf den Adapter ASC verhalten sich TcpB und TcpC gleich, beide TIR-Proteine kolokalisieren nicht mit ASC.

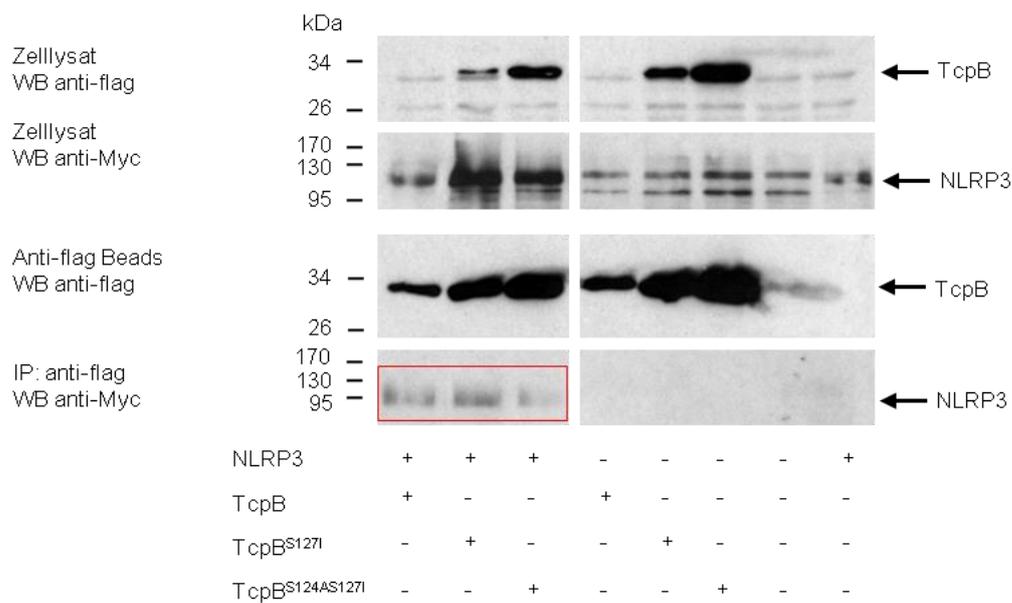


**Abbildung 28: Expression von TcpB und TcpB Serin Mutanten mit Inflammasom Komponenten**

HEK 293 Zellen wurden mit Expressionsvektoren für eGFP-markiertes TcpB, TcpB-S127I oder TcpB-S124A-S127I zusammen mit Ds-Red markiertem NLRP3 (A), Ds-Red markierter Caspase-1 (B) und Ds-Red markiertem ASC (C) transient für 48 h transfiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Hoechst gefärbt (türkis) und im Konfokal Mikroskop analysiert.

### 3.3.2 TcpB und TcpB Serin Mutanten interagieren mit NLRP3 und NLRP3 $\Delta$ LRR

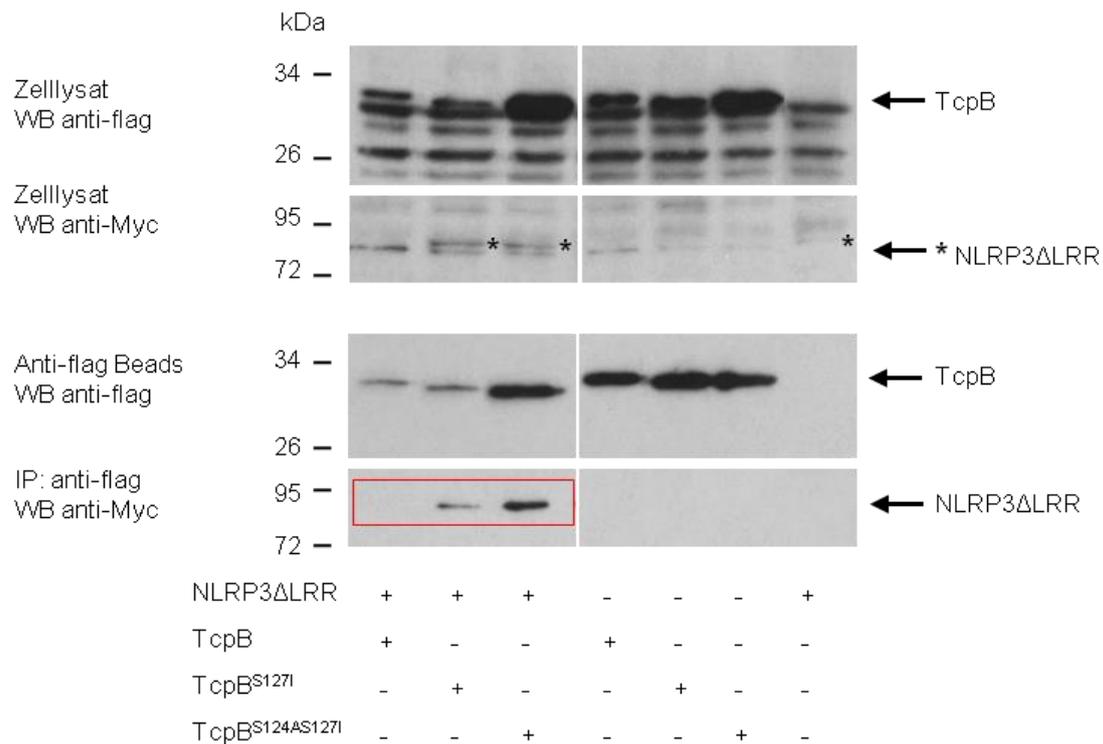
Nachdem durch konfokalmikroskopische Analysen die Kollokalisierung einer TcpB Variante (TcpB-S124AS127I) mit NLRP3 beobachtet werden konnte, sollte nun auch die direkte Interaktion der Proteine mittels Co-IP überprüft werden. Hierfür wurden Wildtyp TcpB, TcpB-S127I und TcpB-S124AS127I als Flag-Epitop markierte Proteine zusammen mit Myc-markiertem NLRP3 in HEK 293-Zellen überexprimiert. Flag Proteine und daran potentiell gebundenes NLRP3 wurden mit Hilfe von anti-Flag-Beads aus den gewonnenen Zelllysaten präzipitiert und im Western Blot über anti-Flag-Antikörper und anti-Myc-Antikörper analysiert. Zunächst lässt sich im Zelllysate, als auch innerhalb der angereicherten Proben, eine unterschiedlich hohe Proteinmenge von TcpB und den TcpB Serin Mutanten beobachten (Abbildung 29). Der Austausch der Serine begünstigt demnach die Expression der flag-markierten Konstrukte, möglicherweise durch Verhinderung eines autoproteolytischen Abbaus von Wildtyp TcpB. Dieser Serin-abhängige Effekt zeigt sich im Zelllysate außerdem für die Ko-Expression von NLRP3. Auch hier kommt es, trotz des Einsatzes von Protease Inhibitoren im Aufschlusspuffer, möglicherweise aufgrund der postulierten proteolytischen Funktion von TcpB, zu einer Reduktion der NLRP3 Menge. NLRP3 wurde als Kontrolle auch ohne Kombination mit einer TcpB Variante transfiziert und ist einzeln ungewöhnlich schwach exprimiert. Dies konnte bereits für in den Transfektionsexperimenten mit TcpC beobachtet werden (vgl. 3.2.1). Die Ko-Expression mit den TcpB Varianten scheint die Expression von NLRP3 ähnlich zu TcpC zu unterstützen. In Kombination mit TcpB und den TcpB Mutanten sieht man eine deutliche Ko-Präzipitation von NLRP3 mit allen drei TcpB Varianten.



**Abbildung 29: TcpB und TcpB Serin Mutanten interagieren mit NLRP3**

Myc-markiertes NLRP3 wurde zusammen mit Flag-markiertem TcpB, TcpB-S127I oder TcpB-S124AS127I wie angegeben in HEK 293 Zellen transfiziert. 48 h später wurden die Zellen lysiert und eine Immunpräzipitation mit anti-Flag-Beads durchgeführt (IP:anti-flag). Die Expression der Konstrukte wurde in den Zelllysaten unter Verwendung von Antikörpern gegen das Flag- bzw. Myc-Epitop überprüft. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen

Zusätzlich wurde die Co-IP von TcpB und den TcpB Serin Mutanten mit NLRP3 $\Delta$ LRR, der trunktierten Form ohne der LRR Domäne, wiederholt. Auch in dieser Kombination zeigt sich der Serin-abhängige Effekt auf die Expression von TcpB selbst und auf die Ko-Expression von NLRP3 $\Delta$ LRR. Es kommt durch die Anwesenheit des Serins 127 zu einer deutlichen Reduktion der Proteinmengen. Dennoch lässt sich eine Interaktion von NLRP3 $\Delta$ LRR mit den beiden TcpB Serin Mutanten beobachten. Im Unterschied zu NLRP3 kommt es im Zelllysate zu keiner Interaktion von NLRP3 $\Delta$ LRR und Wildtyp TcpB. Möglicherweise beeinflusst das Fehlen der LRR Domäne die Proteinstruktur von NLRP3 und damit auch die verfügbaren Interaktionspunkte für das tubulär verteilte Wildtyp TcpB. Die TcpB Serinmutanten zeigen sich davon nicht beeinflusst, da auch sie durch den Austausch der Serine eine andere Konformation im Vergleich zu Wildtyp TcpB einnehmen (vgl. Konfokalmikroskopie Analyse Abbildung 27).

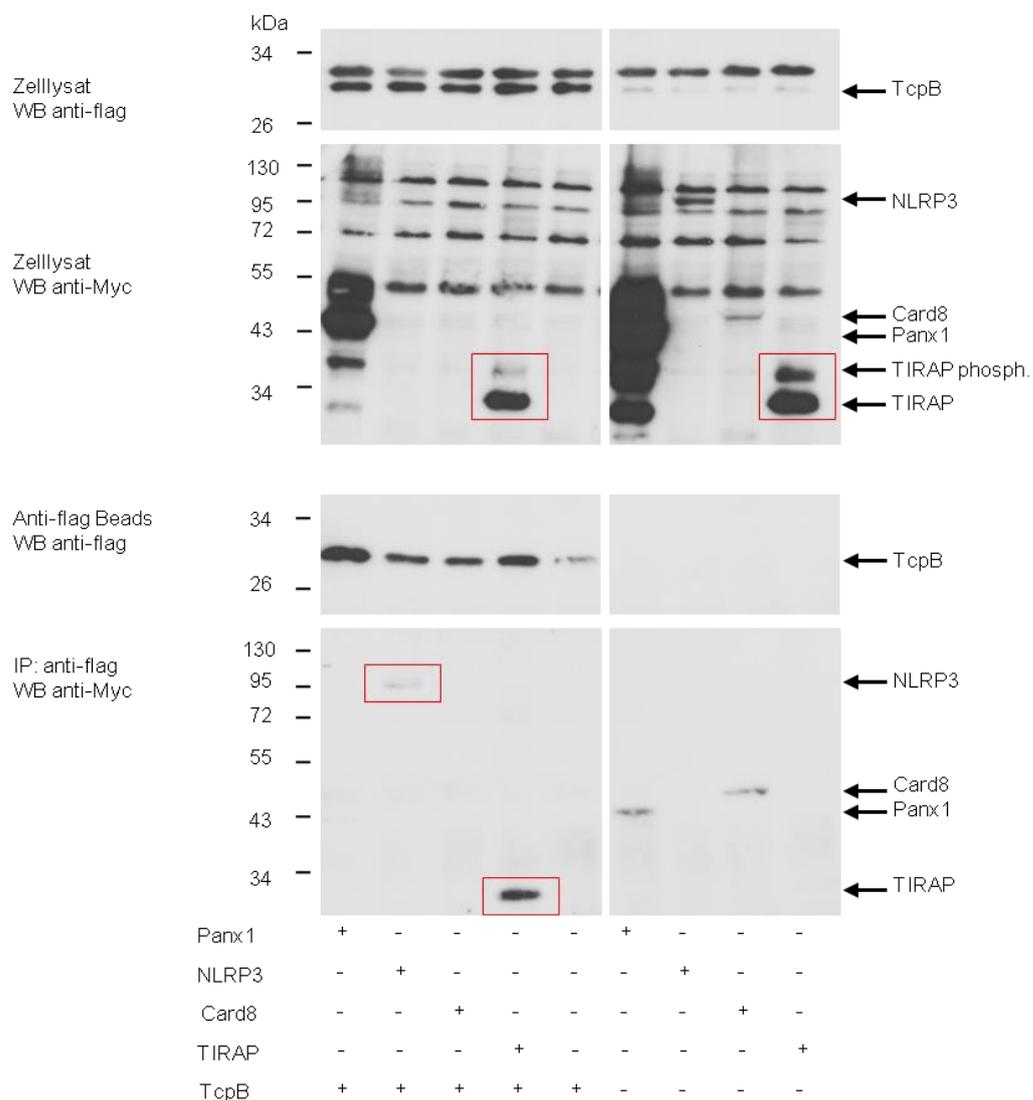


**Abbildung 30: TcpB und TcpB Serin Mutanten interagieren mit NLRP3delta LRR**

Myc-markiertes NLRP3ΔLRR wurde zusammen mit Flag-markiertem TcpB, TcpB-S127I oder TcpB-S124AS127I wie angegeben in HEK 293 Zellen transfiziert. 48 h später wurden die Zellen lysiert und eine Immunpräzipitation mit anti-Flag-Beads durchgeführt (IP:anti-flag). Die Expression der Konstrukte wurde in den Zellysaten unter Verwendung von Antikörpern gegen das Flag- bzw. Myc-Epitop überprüft, NLRP3ΔLRR ist zur Visualisierung mit einem Stern (\*) markiert. Repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Versuchen

Um die Spezifität der Interaktion zwischen TcpB und NLRP3/NLRP3ΔLRR zu bestätigen, wurden auch die Inflammasom-assoziierten Proteine Pannexin-1 und Card8 (*Caspase recruitment domain-protein 8*) mittels Co-IP analysiert. Zusätzlich sollte die bereits beschriebene Interaktion von TcpB mit dem TLR Adapter TIRAP bestätigt werden (Radhakrishnan *et al.*, 2009; Sengupta *et al.*, 2010). Zunächst wurde Wildtyp TcpB als flag-markierte Variante zusammen mit Pannexin-1, NLRP3, Card8 oder TIRAP als myc-markierte Variante in HEK 293 Zellen transfiziert und anschließend eine Flag-IP durchgeführt. Die mögliche proteolytische Eigenschaft von TcpB zeigt sich abermals durch Reduktion aller ko-exprimierten Proteine im Zellysat (Abbildung 31). Hier sind NLRP3 und Card8 in Kombination mit Wildtyp TcpB im Zellysat nicht mehr nachweisbar, Pannexin-1 und TIRAP sind deutlich schwächer exprimiert. TcpB Wildtyp interagiert wie zuvor gezeigt mit NLRP3 und auch die Interaktion mit TIRAP kann bestätigt werden. Es kommt jedoch zu keiner spezifischen Interaktion von TcpB mit Card8 oder Panx1, die beiden Myc-markierten Proteine binden lediglich unspezifisch an den Flag-Beads.

Im Vergleich zu der Interaktion zwischen TcpB und NLRP3 scheint Bindung zwischen TcpB und TIRAP deutlich stärker ausgeprägt zu sein. Dies könnte an den unterschiedlich hohen Mengen von verfügbarem TIRAP und NLRP3 im Zelllysat liegen bzw. am proteolytischen Abbau von NLRP3 durch TcpB. Desweiteren können auf dem Immunoblot für TIRAP zwei spezifische Banden bei ca. 30 und 34 kDa detektiert werden, wobei die größere Variante vermutlich der phosphorylierten Form von TIRAP (TIRAP-P) zu geordnet werden kann (Kenny & O'Neill, 2008).

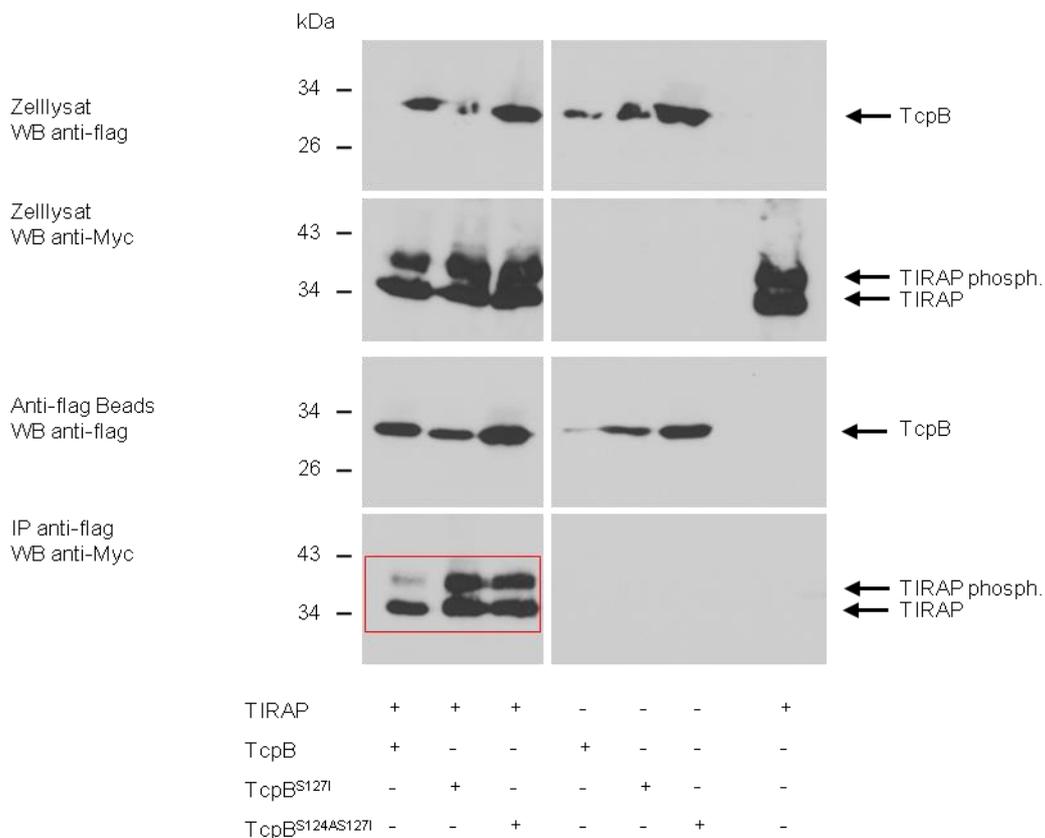


**Abbildung 31: TcpB interagiert mit NLRP3 und TIRAP jedoch nicht mit Panx1 und Card8**

Flag-markiertes TcpB wurde zusammen mit myc-markiertem Pannexin-1 (Panx1), NLRP3, Card8 oder TIRAP in HEK 293 Zellen co-transfiziert. 48 h später wurden die Zelllysate gewonnen und eine Immunpräzipitation mit anti-Flag-Beads durchgeführt (IP:anti-flag). Die Expression der Konstrukte wurde in den Zelllysaten unter Verwendung von Antikörpern gegen das Flag- bzw. Myc-Epitop überprüft. Repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Versuchen.

### 3.3.3 TcpB interagiert mit und moduliert TIRAP

Basierend auf der bestätigten Interaktion von TIRAP und TcpB sollte nun überprüft werden, ob der Austausch der Serin Reste Einfluss auf die Interaktion mit TIRAP besitzt. Hierfür wurde die Co-IP mit TcpB Wildtyp und den Serin Mutanten TcpB-S127I und TcpB-S124AS127I als Flag-Epitop markierte Versionen zusammen mit Myc-markiertem TIRAP wiederholt. Wie in Abbildung 32 zu sehen ist, können auch die beiden TcpB Serin Mutanten S127I und S124AS127I mit TIRAP interagieren, die Serine sind demnach für die Bindung an TIRAP nicht essentiell. Interessanterweise zeigt die IP zwischen Wildtyp TcpB und TIRAP eine deutliche Verminderung der phosphorylierten Form von TIRAP (obere Bande). Die Serin Mutanten zeigen hingegen keinen Einfluss auf die Expression der phosphorylierten TIRAP Isoform.



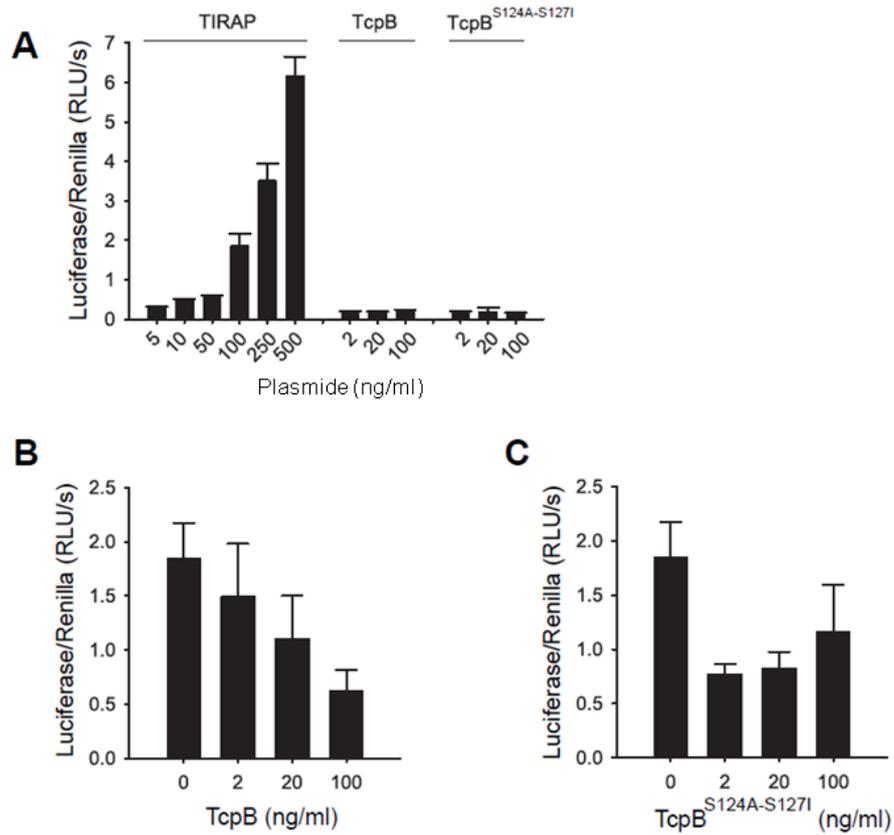
**Abbildung 32: Interaktion von TcpB und TcpB Serin Mutanten mit TIRAP**

Myc-markiertes TIRAP wurde zusammen mit Flag-markiertem TcpB, TcpB-S127I oder TcpB-S124AS127I wie angegeben in HEK 293-Zellen transfiziert. 48 h später wurden die Zellen lysiert und eine Immunpräzipitation mit anti-Flag-Beads durchgeführt (IP:anti-flag). Die Expression der Konstrukte wurde in den Zelllysaten unter Verwendung von Antikörpern gegen das Flag- bzw. Myc-Epitop überprüft. Repräsentatives Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

### 3.3.4 TcpB inhibiert TIRAP induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierung

Wie zuvor gezeigt interagiert TcpB unabhängig seiner Serine 124 und 127 mit dem TLR Adapter TIRAP. Frühere Studien konnten bereits belegen, dass die Bindung von TcpB an TIRAP zur Ubiquitylierung und somit Degradierung der phosphorylierten Form von TIRAP führt (Radhakrishnan *et al.*, 2009; Sengupta *et al.*, 2010). Desweiteren wurde von Radhakrishnan *et al.* ein inhibitorischer Effekt von TcpB auf die TIRAP Signaltransduktion mittels NF- $\kappa$ B Reporter Assay demonstriert (Radhakrishnan *et al.*, 2009). Nun stellt sich die Frage, ob der Austausch beider Serine innerhalb der TIR-Domäne die inhibitorische Fähigkeit von TcpB beeinträchtigt. Zu diesem Zweck wurden mit TIRAP ebenfalls NF- $\kappa$ B Reporter Assays in Kombination mit TcpB und der Doppel-Serin Mutante S124IS127A in HEK 293 Zellen durchgeführt.

Zunächst wurde überprüft ob die alleinige Überexpression von TIRAP zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B Reportervektors führt. Hierfür wurden aufsteigende Mengen an TIRAP zusammen mit konstanten Mengen an Luciferase Reportervektor in HEK 293 Zellen transfiziert. Wie in Abbildung 33 A gezeigt, aktiviert TIRAP ab einer Menge von 100 ng/ml den NF- $\kappa$ B Promotor und führt abhängig der transfizierten DNA Menge zur Detektion des Luciferase Signals. TcpB und TcpB S124IS127A jeweils einzeln transfiziert aktivieren den NF- $\kappa$ B Reporter wie erwartet nicht. Die Menge von 100 ng/ml TIRAP wurde anschließend zusammen mit steigenden Dosen an TcpB (Abbildung 33 B) bzw. TcpB S124IS127A (Abbildung 33 C) in HEK 293 Zellen transfiziert. Die NF- $\kappa$ B Aktivierung wird durch TcpB als auch durch die Serin Mutante Dosis-abhängig um bis zu 70% inhibiert. Die Mutante zeigt im direkten Vergleich der Titrationsstufen interessanterweise unterschiedliche Inhibitionsstärken, kann das TIRAP Signal jedoch ebenfalls um bis zu 70% inhibieren. Daher besitzt der Austausch der beiden Serine keinen Effekt auf die Kapazität der TIRAP Inhibition. In Kooperation mit Greg Snyder und Sam Xiao konnten anhand kristallographischer Studien weitere Hinweise über die molekularen Mechanismen der TcpB vermittelten TIRAP Inhibition gewonnen werden. Darauf wird im Abschnitt der Diskussion näher eingegangen.



**Abbildung 33: TcpB und TcpB S124AS127I inhibieren TIRAP vermittelte NF-κB Aktivierung**

(A) HEK 293 Zellen wurden transient mit den angegebenen Expressionsplasmiden TIRAP, TcpB, oder TcpBS124A/S127I sowie einem NF-κB-abhängigen-Firefly-Luciferase bzw. konstitutiv aktiven Renilla-Luciferase Reporterplasmid transfiziert. (B und C) HEK 293 Zellen wurden transient mit 100 ng/ml TIRAP Expressionsplasmid und steigenden Mengen an TcpB (B) oder TcpBS124A/S127I (C) transfiziert. Die Luciferaseaktivitäten wurden 48 h nach Transfektion in Relativen Lichteinheiten pro Sekunde [*relative light units*, RLU] gemessen. Repräsentatives Ergebnis aus 2 unabhängigen Versuchen.

## 4 Diskussion

Die Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  wird durch die Bildung sogenannter Inflammasome induziert. Diese zytosolischen Multiproteinkomplexe bestehen in der Regel aus einem Nod-like-Rezeptor Protein und dem Adapter Protein ASC, und dienen der Rekrutierung und Aktivierung der Pro-Caspase-1 (Martinon *et al.*, 2002). Erst die aktive Form der Caspase-1 prozessiert die Vorläuferproteine pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL18 zu ihren biologisch aktiven Formen IL-1 $\beta$  und IL-18 (Thornberry *et al.*, 1992, Gu *et al.*, 1997). IL-1 $\beta$  und Mitglieder der IL-1 Proteinfamilie spielen eine essentielle Rolle während der Abwehr einer Anzahl von Bakterien und Viren durch Aktivierung von weiteren Immunzellen am Infektionsherd (Dinarello, 2009). Daher ist es nicht verwunderlich, dass Pathogene Möglichkeiten entwickelt haben, diesen Signalweg zu modulieren, um so ihr Überleben zu sichern.

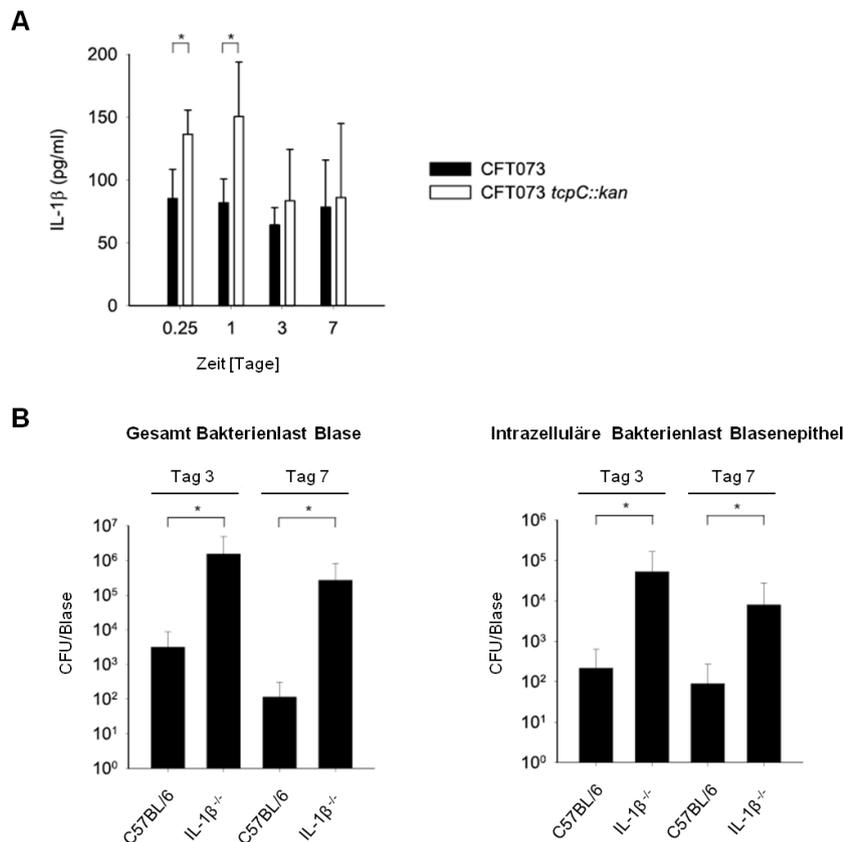
### 4.1 TcpC inhibiert die pro-inflammatorische IL-1 $\beta$ Freisetzung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch den Virulenzfaktor TcpC des uropathogenen *E. coli* Stamms CFT073 zu einer Inhibition der Inflammasom vermittelten IL-1 $\beta$  Freisetzung kommt. Mit Hilfe des TcpC defizienten CFT073 Stamms *tcpC::kan* und des komplementierten *tcpC::kan* Stamms (CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC) konnte die inhibitorische Wirkung von TcpC auf die IL-1 $\beta$  Sekretion *in vitro* in primären murinen Zellen sowie der humanen Urothelzelllinie HCV29 demonstriert werden (3.1.1, 3.1.2, 3.1.3). Für gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli*, *Citrobacter rodentium* oder *Vibrio cholera* wurde kürzlich eine alternative Aktivierung („non-canonical“) des Inflammasoms über Caspase-11 und Caspase-1 gezeigt (Kayagaki *et al.*, 2011). Diese Form der Aktivierung der IL-1 $\beta$  Sekretion verläuft durch die Präsenz von intrazellulärem LPS unabhängig von TLR4, dient also zur gezielten Abwehr von intrazellulären gramnegativen Pathogenen (Kayagaki *et al.*, 2013). Auch der uropathogene Stamm *E. coli* CFT073 aktiviert in Form von IBCs nach Kolonisierung der Wirtszelle als intrazellulärer Erreger dieses Abwehrsystem (Anderson *et al.*, 2004). Daher stellt die Inhibition des nicht kanonischen Inflammasom Komplexes eine neue Strategie zur Dämpfung der Immunabwehr dar.

Gleichzeitig mit der TcpC vermittelten Inhibition der IL-1 $\beta$  Sekretion wurde eine deutlich erhöhte intrazelluläre Erregerlast sowie ein Anstieg der Gesamterregermenge der *tcpC* positiven Stämme in infizierten BMDCs beobachtet (Daten nicht gezeigt).

In Kooperation mit Catharina Svanborg (Institute of Laboratory Medicine, Lund University, Lund, Schweden) konnte die IL-1 $\beta$  Inhibition durch TcpC parallel auch in einem murinen Harnwegsinfektionsmodell *in vivo* bestätigt werden. Die akute Infektion mit CFT073 führte im

Gegensatz zu CFT073 *tcpC::kan* zu reduzierten Mengen an IL-1 $\beta$  und bestätigt die *in vitro* Daten. Die Reduktion der IL-1 $\beta$  Freisetzung wurde vor allem innerhalb der ersten 24h post Infektion beobachtet (siehe Abbildung 34 A), der Erreger scheint den Virulenzfaktor TpcC also zu Beginn der Kolonisierung des Wirtes einzusetzen. Übereinstimmend konnte nun *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass die Präsenz des Virulenzfaktors *tcpC* zur Reduktion der Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  führte.



**Abbildung 34: Bedeutung von TcpC *in vivo***

(A) Wildtyp Mäuse (C57BL/6) wurden mit CFT073 und CFT073 *tcpC::kan* mit Hilfe eines Blasenkatheters infiziert ( $10^9$  CFUs/Maus) und Urin Proben über den Zeitraum von 7 Tagen gesammelt. Die Messung der enthaltenen IL-1 $\beta$  Menge erfolgte mittels ELISA (n=5/Zeitpunkt bzw. n=4 für CFT073 Infektion Tag 7). \*p< 0.01, t-Test

(B und C) Wildtyp (C57BL/6) oder IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup> Mäuse wurden analog zu (A) mit CFT073 ( $10^6$  CFUs/Maus) infiziert und an den Tagen 3 und 7 post Infektion die Bakterienlast in der gesamten Blase (B) bzw. intrazellulär in den Blasenepithelzellen (C) bestimmt (n= 7-10). \*p<0.05, t-Test

Unabhängig zu diesen Daten wurde in Kooperation mit Andreas Wieser (Max-von-Pettenkofer Institut, Ludwig Maximilians Universität, München) der förderliche Einfluss einer IL-1 $\beta$  Senkung auf die Ausbreitung des Erregers ebenfalls *in vivo* bestätigt. Durch Infektion von IL-1 $\beta$  defizienten Mäusen (IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup>) konnte demonstriert werden, dass die Abwesenheit des pro-inflammatorischen Zytokins zu deutlich höheren Keimlasten innerhalb des gesamten Organs und des Blasenepithels führte (vgl. Abbildung 34 B). Die Interaktion zwischen UPECs und dem Blasenepithels stellt eine kritische Komponente während der Etablierung

einer Harnwegsinfektion dar (Wright *et al.*, 2007). Damit wird deutlich, dass es für den Erreger von großem Vorteil ist, IL-1 $\beta$  als wichtiges Zytokin der Immunabwehr zu dämpfen, um so eine erfolgreiche Besiedelung (IBC Bildung) des Wirtes zu etablieren.

Da die Prozessierung von IL-1 $\beta$  normalerweise über aktivierte Caspase-1 erfolgt, wurde die Aktivierung der entsprechenden Moleküle biochemisch genauer charakterisiert. In Western Blot Analysen von infizierten Makrophagen und Dendritischen Zellen konnte eine deutliche Inhibition der Caspase-1 Spaltung in die aktive Untereinheit p20 durch TcpC festgestellt werden. Dies hatte konsequenterweise auch die verminderte Prozessierung und Freisetzung von biologisch aktiven IL-1 $\beta$  nach Infektion mit *tcpC* positiven Stämmen zur Folge (3.1.1, 3.1.2). Die Expression von pro-IL-1 $\beta$  wurde hingegen nicht durch TcpC inhibiert, obwohl TcpC durch Bindung an Myd88 und TLR4 die Weiterleitung des NF- $\kappa$ B abhängigen TLR Signalweges modulieren kann (Cirl *et al.*, 2008, Snyder *et al.*, 2013). Die Expression des IL1B Gens wird jedoch nicht alleinig durch NF- $\kappa$ B induziert, auch andere Transkriptionsfaktoren wie IRF8 und Stat1 sind an der Regulation beteiligt (Greten *et al.*, 2007, Unlu *et al.*, 2007).

Caspase-1 Aktivierung führt zu zwei unterschiedlichen Resultaten: einerseits vermittelt Caspase-1 über lysosomale Exozytose die Pyroptose der Zelle und andererseits stimuliert sie die Zytokin Freisetzung (Bergsbaken *et al.*, 2011). Ob während der *in vitro* Infektion mit CFT073 auch eine Beeinflussung der Pyroptose möglich ist, konnte innerhalb dieser Studien nicht vollständig aufgeklärt werden. Nach maximal 4-stündiger Infektion der Makrophagen, zeigte sich mit allen eingesetzten UPEC Stämmen keinerlei Freisetzung von Laktat-Dehydrogenase (LDH) als Marker für gestörte Zellintegrität (3.1.1). Erste Hinweise darauf lieferte jedoch die makroskopische Untersuchung infizierter Dendritischer Zellen, welche morphologische Anzeichen von Pyroptose nach Infektion mit CFT073 *tcpC::kan* im Vergleich zur Infektion der *tcpC* positiven Stämmen zeigten (Abbildung 24 und Abbildung 25). Durch längere Infektionszeiten bzw. durch eine initial höhere Erregermenge könnte Pyroptose sicherlich induziert werden und so ein potentieller Einfluss von TcpC mittels Messung der extrazellulären LDH Konzentration auf diese analysiert werden. Pyroptose wird entweder durch Aktivierung von Caspase-1 und Caspase-11 über den kanonischen und nicht kanonischen Signalweg induziert (Bergsbaken *et al.*, 2011, Kayagaki *et al.*, 2011). Daher könnte die TcpC vermittelte Inhibition der Caspase-1 Aktivierung gleichzeitig auch zu einer Verminderung der Pyroptose führen und damit einen weiteren Abwehrmechanismus der Zelle gegen Pathogene beeinflussen.

In vergangenen Arbeiten konnte für TcpC gezeigt werden, dass das Protein von CFT073 sekretiert wird und in der Lage ist, die Zellmembran der Wirtszelle zu durchdringen. Mit Hilfe eines „Transwell Systems“ konnten Cirl *et. al* den NF- $\kappa$ B-inhibierenden Effekt von TcpC

demonstrieren, obwohl der Erreger physikalisch von der Wirtszelle getrennt war (Cirl *et al.*, 2008). Die Frage, ob auch die Freisetzung von IL-1 $\beta$  durch das sekretierte Protein ohne direkten Erregerkontakt beeinflusst wird, konnte in dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Während der Infektion im klassischen „Transwell System“ kam es erwartungsgemäß zu keiner IL-1 $\beta$  Freisetzung (3.1.4). Im Fall der räumlichen Trennung zwischen CFT073 und der Wirtszelle konnte zwar Endotoxin als erstes Signal durch die Transwell Membran auf die Zelle wirken und die Produktion von TNF $\alpha$  (und vermutlich pro-IL-1 $\beta$ ) stimulieren, ein zweites Signal zur finalen Aktivierung des Inflammasoms war dagegen offensichtlich nicht verfügbar. Hierfür wären z.B. porenbildende Toxine wie  $\alpha$ -Hemolysin von CFT073 in Frage gekommen (Welch *et al.*, 2002). Hinweise darauf liefert *Staphylococcus aureus* für dessen  $\alpha$ -Hemolysin bereits gezeigt werden konnte, dass es in humanen und murinen Monozyten NLRP3, Caspase-1 und in Folge Zelltod aktivieren kann (Craven *et al.*, 2009).

Das Protein TcpC war in diesem System vermutlich dennoch präsent, da die TNF $\alpha$  Sekretion im Wildtyp Stamm im Vergleich zu CFT073 *tcpC::kan* deutlich reduziert war. Um die inhibitorische Funktion von TcpC ohne den gesamten Erreger isoliert betrachten zu können, sollten weitere Studien durchgeführt werden. Zum einen könnten die Wirtszellen im Transwell System mit Hilfe von LPS und ATP künstlich aktiviert werden, um so die potentiell inhibitorischen Effekte des sekretierten Virulenzfaktors aus CFT073 zu detektieren. Oder alternativ durch den Einsatz von rekombinant produzierten TIR-TcpC, welches in Stimulierungsassays bereits seine inhibitorische Kapazität auf mit TLR Liganden stimulierten Makrophagen bewiesen hat und zur Reduktion von TNF $\alpha$  führte (Cirl *et al.*, 2008). Analog dazu könnte versucht werden, ob rekombinantes TcpC auch auf Inflammasom aktivierte Makrophagen inhibitorisch wirken kann. Somit können andere mögliche Effekte des Erregers ausgeschlossen werden.

Um die Rolle von Caspase-1 während der CFT073-induzierten IL-1 $\beta$  Sekretion zu belegen, wurden einerseits BMDMs aus Caspase-1/11 defizienten Mäusen infiziert und zum anderen ein für Caspase-1 spezifischer Inhibitor eingesetzt. Sowohl in Caspase-1/11 defizienten als auch in Caspase-1 inhibierten BMDMs kam es durch Infektion mit CFT073 Stämmen sowie durch die Inflammasom Positivkontrolle LPS und ATP zu keinerlei IL-1 $\beta$  Freisetzung (3.1.5). Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass Caspase-1 und 11 für die IL-1 $\beta$  Prozessierung im *in vitro* Infektionsmodell mit CFT073 essentiell sind. Da in der Literatur auch alternative Caspasen wie Caspase-8 zur Spaltung von pro-IL-1 $\beta$  zu IL-1 $\beta$  beschrieben wurden, war diese Erkenntnis für die Wirkungsweise von TcpC von großer Bedeutung. Demnach kann indirekt geschlossen werden, dass kein anderer Mechanismus wie z.B. die Spaltung durch Caspase-8 für die Maturation von IL-1 $\beta$  verantwortlich ist (Guma *et al.*, 2009, Antonopoulos *et al.*, 2013). Über die Rolle von Caspase-11 während einer Infektion mit den UPEC Stämmen kann hier keine gesonderte Aussage getroffen werden. Wie kürzlich

bekannt wurde, handelt es sich bei allen Caspase-1 knockout Mäusen um einen Caspase-1/-11 Doppelknockout (Kayagaki *et al.*, 2011). Um eine mögliche Beteiligung von Caspase-11 nach Infektion mit den UPEC Stämmen aufzuklären, sollte deren Aktivierung zusätzlich mittels Western Blot untersucht werden. Vermutlich spielt Caspase-11 bei der Aktivierung des Inflammasoms durch UPECs auch eine zentrale Bedeutung, da für gramnegative Bakterien bereits ein alternativer Weg („non-canonical“) der Inflammasom Aktivierung über Caspase-11 und Caspase-1 gezeigt werden konnte (Kayagaki *et al.*, 2011). Diese Fragestellung könnte durch Infektion von Caspase-11 defizienten Mäusen beantwortet werden.

Die Aktivierung der Caspase-1 wird über die Bildung des sogenannten Inflammasoms induziert, welches aus einem NLR Protein, dem Adapter Protein ASC und der Pro-Caspase-1 besteht (Martinon *et al.*, 2002). Das NLRP3 Inflammasom ist derzeit der am besten beschriebene Vertreter der Inflammasome und kann durch eine Reihe chemisch und strukturell unterschiedlicher Stimuli, sowohl mikrobiellen als auch wirtseigenem Ursprungs, induziert werden (Kanneganti *et al.*, 2006, Mariathasan *et al.*, 2006). Durch die Verwendung von Knochenmarkszellen transgener knockout Mäuse sollte *in vitro* detailliert geprüft werden, welche Rolle die Inflammasom Komponenten NLRP3 und ASC bei der CFT073 vermittelten IL-1 $\beta$  Induktion spielen. Die Infektion von NLRP3 und ASC defizienten Dendritischen Zellen führt zu keiner messbaren bzw. stark reduzierten IL-1 $\beta$  Freisetzung, demnach sind die beiden Komponenten für die Caspase-1 induzierte IL-1 $\beta$  Freisetzung durch CFT073 essentiell (3.1.5). Ob auch andere NLR Proteine zusätzlich zu NLRP3 eine Rolle spielen, konnte in einem preliminären Experiment mit NLRC4 defizienten DCs getestet werden. Das NLRC4 Inflammasom wird ASC abhängig durch zytosolisches Flagellin oder Komponenten des Typ III Sekretionssystems aktiviert und verwendet dafür die Hilfe von NAIP Proteinen (Franchi *et al.*, 2006, Miao *et al.*, 2010, Proell *et al.*, 2013). In den NLRC4 defizienten BMDCs kam es im Vergleich zu den WT BMDCs zu höheren IL-1 $\beta$  Levels nach Infektion aller UPEC Stämme, NLRC4 ist demnach für die IL-1 $\beta$  Freisetzung durch UPEC nicht nötig. Der inhibitorische Phänotyp von TcpC in Bezug auf die IL-1 $\beta$  Sekretion war in den NLRC4<sup>-/-</sup> DCs ebenfalls zu beobachten. Es kommt durch TcpC vermutlich zu einer NLRC4 unabhängigen Modulation der IL-1 $\beta$  Prozessierung. Um diese preliminären Daten zu bestätigen, sollte das Experiment in Folgestudien wiederholt werden und zusätzlich weitere potentielle Kandidaten für die Bildung eines Inflammasoms wie NLRP1, NLRP6, NLRP12 und AIM2 untersucht werden. In unveröffentlichten Studien von C. Svanborg *et al.* konnten erste Hinweise auf die Rolle von ASC und NLRP3 im murinen Harnwegsinfektionsmodell *in vivo* generiert werden. Mäuse defizient für ASC oder NLRP3, zeigten sich durch drastische pathologische Veränderungen der Blase stärker von der Infektion mit CFT073 betroffen als Wildtyp Tiere (unveröffentlichte Daten). Die Rolle von TcpC konnte in diesen Tieren bisher

jedoch bislang nicht untersucht werden, ist aber für die Zukunft vorgesehen. Damit könnten weitere Einblicke in die TcpC modulierte IL-1 $\beta$  Inhibition gewonnen werden.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass der Virulenzfaktor TcpC aus CFT073 in der Lage ist, die Aktivierung der Caspase-1 und damit auch die davon abhängige Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  zu inhibieren. Für CFT073 als Vertreter der UPECs ist es von großem Vorteil, die Immunantwort des Wirts zu dämpfen, um damit das Blasenepithel durch Bildung von IBCs („*intracellular bacterial communities*“) über Typ 1 Fimbrien erfolgreich zu besiedeln (Anderson *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2007). Sobald UPECs innerhalb der Blasenepithelzellen lokalisiert sind, werden sie als intrazelluläre Pathogene nicht mehr durch das TLR-System sondern vermutlich von zytoplasmatischen NOD-like Rezeptoren erkannt. Als verantwortlicher Sensor für die CFT073-induzierte Aktivierung von Caspase-1 wurde in dieser Arbeit der NOD-like Rezeptor NLRP3 identifiziert. Auch der Inflammasom Adapter ASC spielt eine essentielle Rolle und es konnte gezeigt werden, dass Caspase-1 zur Prozessierung von pro-IL-1 $\beta$  nötig ist. Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit deuten folglich daraufhin, dass Caspase-1 gezielt durch TcpC inhibiert wird. Nun stellte sich die Frage, durch welchen molekularen Mechanismus TcpC in der Lage ist, diese Inhibition zu vermitteln.

## 4.2 Mechanismus der TcpC vermittelten Inflammasom- Inhibition

Durch die Entdeckung einer direkten Interaktion der gereinigten TIR-Domäne von TcpC mit dem zentralen TLR-Adapter Myd88 sowie TLR4 konnte der molekulare Mechanismus der TcpC vermittelten TLR-Inhibition aufgeklärt werden (Cirl *et al.*, 2008, Snyder *et al.*, 2013). Ob auch im Fall der IL-1 $\beta$  Inhibition eine direkte Interaktion zwischen TcpC und den Inflammasom Molekülen besteht, wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von Immunopräzipitations- und Pull-Down Assays sowie konfokaler Mikroskopie (durchgeführt von S. Dürr) analysiert. Zunächst wurde im HEK 293 basierten Überexpressionssystem die zelluläre Verteilung von TcpC zusammen mit den Inflammasom Molekülen NLRP3, ASC und Caspase-1 visualisiert. Dabei wurde beobachtet, dass TcpC zum einen als Volllängenprotein nicht detektierbar war und zum anderen, dass die isoliert exprimierte TIR-Domäne von TcpC erstaunlicherweise im Nukleus lokalisiert war. Um dennoch Co-Transfektionsstudien mit TcpC und den Inflammasom Molekülen durchführen zu können, wurde TcpC an beiden Enden mit Fluorophoren stabilisiert. Dieses doppelt-markierte Fusionsprotein wurde von HEK 293 vollständig exprimiert und zeigte eine zytoplasmatische Verteilung analog zu den Inflammasom Komponenten. In Kombination mit TcpC konnte spezifisch nur für NLRP3 und Caspase-1 eine Kolokalisation festgestellt werden. ASC bildet im Zytosol ein für die

Überexpression charakteristisches Aggregat (auch „Speck“ genannt) (Proell *et al.*, 2013) und geht keine Kolo-kalisation mit TcpC ein.

Die Tatsache, dass die überexprimierte TIR-Domäne von TcpC im Zellkern nachgewiesen wurde, konnte anhand der Aminosäure Sequenz begründet werden. Dort befinden sich drei aufeinander folgende Arginin Reste mit basischen pH-Wert und Homologie-Motiv zum viralen TAT Protein von HIV-1, dessen Minimalsequenz ebenfalls hauptsächlich Arginine und Lysine aufweist und einen basischen pH Wert besitzt. TAT kann über einen Phospholipid-vermittelten Mechanismus und durch Diffusion die Plasma- und Nukleusmembran passagieren (Debaisieux *et al.*, 2012). Studien mit TAT abgeleiteten Peptiden konnten zeigen, dass die Fusion der TAT Peptide anderen Proteinen den Durchtritt der Plasmamembran und eine nukleare Lokalisation ermöglicht (Ruben *et al.*, 1989, Potocky *et al.*, 2003).

Ob die homologe TAT Sequenz von TcpC anderen Proteinen bzw. Peptiden ebenfalls den Durchtritt der Plasmamembran ermöglicht, wurde innerhalb dieser Arbeit als Seitenprojekt in Kooperation mit C. Cirl und G. Snyder (University of Maryland, Baltimore, USA) analysiert und publiziert (Snyder *et al.*, 2013). Um genauere Einblicke in die molekularen Mechanismen der Interaktion von TIR-TcpC zu Myd88 und TLR4 zu gewinnen, wurden unter anderem zwei 15 AA lange Peptide der vorhergesagten Loop Regionen von TIR-TcpC abgeleitet (BB und DD Loop). An diese beiden Peptide wurde die TAT-Sequenz von TcpC fusioniert und in funktionellen Assays die inhibitorische Kapazität von BB-TAT und DD-TAT untersucht. Beide TAT-Peptide waren in der Lage die LPS vermittelte TNF $\alpha$  Sekretion in BMDMs zu inhibieren. Auf indirektem Weg konnte hier gezeigt werden, dass die Peptide den Myd88 und TLR4 abhängigen Signalweg blockieren können und damit intrazellulär wirksam sind. Das TAT Peptid alleine zeigte keine Beeinflussung der TNF $\alpha$  Sekretion. Weiterhin konnten Pull-Down Assays die direkte Interaktion zwischen DD-Peptid und Myd88 und zusätzlich eine Bindung des BB-Peptids an TLR4 demonstrieren (Snyder *et al.*, 2013). Damit wird klar, dass es TcpC strukturell möglich ist, unterschiedliche Moleküle zu binden und damit auch verschiedene Signalwege des Wirtes zu modulieren.

In dieser Arbeit wurde für die molekulare Analyse der TcpC vermittelten IL-1 $\beta$  Inhibition eine mögliche Kolo-kalisation und Interaktion zwischen TcpC und den Inflammasom Molekülen im HEK 293 System überprüft. Wie bereits beschrieben, war durch die nukleare Lokalisation der überexprimierten TIR Domäne von TcpC die Analyse einer Assoziation nicht möglich und es wurde vermutet, dass dies an der TAT ähnlichen Sequenz liegen könnte. Diese Theorie konnte durch ein TAT defizientes Expressionskonstrukt bestätigt werden. TIR-TcpC $\Delta$ TAT lag im Gegensatz zu TIR-TcpC ausschließlich im Zytosol der Zelle vor. Nun war die Analyse einer Beteiligung der TIR-Domäne an der Kolo-kalisation mit NLRP3, Caspase-1 und ASC möglich. Die TAT defiziente Variante der TIR-Domäne konnte wie das Voll-längenprotein

TcpC mit NLRP3 und Caspase-1, jedoch nicht mit ASC kolokalisieren (3.2.1). Schlussfolgernd ist die TIR-Domäne für die Kolokalisation ausreichend. Eine direkte Protein:Protein Wechselwirkung wurde mit Hilfe der Co-Immunopräzipitation (Co-IP) unter Verwendung derselben Konstrukte ebenfalls in HEK 293 Zellen untersucht. Die Co-IP konnte zeigen, dass zwischen TcpC und NLRP3 sowie Caspase-1 eine Interaktion besteht und dass diese über die TIR-Domäne von TcpC vermittelt wird (3.2.2). Zusätzlich wurde NLRP3 $\Delta$ LRR, eine trunke Form ohne der LRR Domäne, auf eine Interaktion mit TcpC überprüft. Die LRR Domäne ist für die Erkennung von Liganden wie PAMPs im NLR- sowie im TLR-System wichtig (Akira, 2003), scheint jedoch für die Bindung von TcpC an NLRP3 nicht essentiell zu sein. Dementsprechend wird die Interaktion mit TIR-TcpC über den N-terminalen Bereich von NLRP3 vermittelt. Über weitere Interaktionsstudien mit den verbleibenden Domänen von NLRP3 (NACHT und CARD) könnte zukünftig der spezifische Teil des Proteins für die Bindung an TIR-TcpC ermittelt werden. Das gleiche gilt auch für die Interaktion zwischen Caspase-1 und TIR-TcpC. Auch hier wäre es wichtig, genauere Informationen über die beteiligten Domänen zu erhalten. Höchstwahrscheinlich bindet TIR-TcpC bereits an die Pro-Form von Caspase-1 und verhindert so deren Spaltung zur aktiven Form. Da ASC von TcpC nicht gebunden wurde, scheint die Interaktion mit großer Wahrscheinlichkeit nicht über die CARD-Domäne bzw. über die PYD-Domäne zu bestehen. Diese beiden Domänen sind in ASC ebenfalls vorhanden und tragen über homotypische Interaktionen mit anderen PYD- und CARD-tragenden Proteinen zur Assemblierung des Inflammasoms bei (Bauernfeind *et al.*, 2011). Im Fall von NLRP3 wäre die zentrale NACHT-Domäne wahrscheinlicher, welche ATPase Aktivität besitzt und zur Oligomerisierung des Inflammasoms beiträgt (Latz *et al.*, 2013). Obwohl die NACHT-Domäne die einzige gemeinsame Domäne aller NLRs ist, wurde NLRP1 von TcpC nicht gebunden. Somit wird deutlich, dass die Interaktion zwischen TcpC und Komponenten des NLRP3 Inflammasoms spezifisch ist (vgl. Abbildung 19).

Um die Ergebnisse der Interaktionsstudien weiter zu unterstützen, wurden zusätzlich Pull-Down Assays mit endogenen Inflammasom Komponenten aus LPS stimulierten Makrophagen bzw. HCV29 Zellen und rekombinant exprimierten TIR-TcpC durchgeführt. Unter physiologischen Bedingungen konnten die Interaktionen zwischen TIR-TcpC und NLRP3 und Caspase-1 ebenfalls mit endogenen Proteinen aus Gesamtzelllysat bestätigt werden. ASC war wiederum an keiner Interaktion mit TIR-TcpC beteiligt (vgl. Abbildung 20, Abbildung 21). Wie die Interaktionsexperimente demonstrieren, ist TcpC in der Lage über seine TIR-Domäne an NLRP3 und Caspase-1 zu binden. Analog dazu wurde erst kürzlich für den Virulenzfaktor YopM aus *Yersinia pestis* eine Interaktion mit Caspase-1 gezeigt. Das über das Typ III Sekretionssystem translozierte Effektorprotein inhibiert ebenso die Caspase-1 Aktivierung und die IL-1 $\beta$  Sekretion (LaRock & Cookson, 2012).

Ob es durch die direkte Interaktion von TcpC und Caspase-1 auch zur Inhibition der Caspase-1 Aktivierung analog zu YopM kommen kann, wurde in weiteren Transfektionsstudien in HEK 293 Zellen analysiert. Wie bereits in Kapitel 1.4.4 beschrieben, führt die Aktivierung des Rezeptors NLRP3 durch zahlreiche PAMPs und DAMPs zur Bildung des NLRP3 Inflammasoms und weiter zur auto-katalytischen Spaltung von Pro-Caspase-1 in ihre Untereinheiten p10 und p20. Experimentell konnte dies durch Rekonstitution des vollständigen NLRP3 Inflammasoms in HEK 293 Zellen demonstriert werden. Durch alleinige Überexpression der Komponenten NLRP3, ASC wurde die Caspase-1 künstlich aktiviert. Dies ging mit der Spaltung der Caspase-1 in die p20 Untereinheit einher. Die Ko-Expression mit TcpC zeigte, dass TcpC in der Lage ist, die Aktivierung der Caspase-1 Dosis abhängig zu modulieren. In diesem Modellsystem reduziert TcpC die Caspase-1 Spaltung in die p20 Untereinheit nahezu vollständig, auch die Menge an Pro-Caspase-1 nimmt durch TcpC ab. Die Expression der Proteine NLRP3 und ASC wird durch TcpC hingegen nicht verringert. Im Falle von NLRP3 kommt es sogar zu einer verstärkten Expression, möglicherweise durch die stabilisierende Wirkung der TcpC Bindung. Um detaillierte Einblicke in dieses System zu erhalten, wäre es von Vorteil diesen *in vitro* Assay ebenfalls mit TIR-TcpC als potentiellen Inhibitor zu wiederholen.

LaRock und Cookson konnten zeigen, dass YopM zusätzlich zur Inhibierung der Caspase-1 auch die Assemblierung des NLRP3 Inflammasoms in Makrophagen blockiert (LaRock & Cookson, 2012). Diese Beobachtung wurde unabhängig zu dieser Publikation auch für TcpC gemacht. Inflammasom Aktivierung kann mittels Immunfluoreszenzfärbung nach Bildung des Multiproteinkomplexes in Form von distinkten Aggregaten („Fokus“ oder „Speck“ genannt) im Zytoplasma der Zelle visualisiert werden (Fernandes-Alnemri *et al.*, 2007; Fink *et al.*, 2008, Man *et al.*, 2014). Diese makromolekularen Strukturen lassen sich für aktivierte Caspase-1, NLRP3 und ASC beobachten, treten in Kombination mit IL-1 $\beta$  Freisetzung und Pyroptose auf und gelten als sicheres Merkmal der Inflammasom Aktivierung (Broz *et al.*, 2010, Huang *et al.*, 2009, Stutz *et al.*, 2013). Im *in vitro* Infektionsmodell wurde überprüft, ob TcpC Einfluss auf die Assoziation des Inflammasom Komplexes trägt. Dafür wurden Dendritische Zellen mit CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und CFT073 *tcpC::kan* + pTcpC infiziert und anschließend Caspase-1 und ASC mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Aktivierte Caspase-1 kann durch den Einsatz des Caspase-1 spezifischen Inhibitors (Z-YVAD-FMK) detektiert werden, da dieser die Spaltung und damit die Dissoziation der aktivierten Caspase-1 aus dem Inflammasom Komplex verhindert. Als Positivkontrolle der Caspase-1-Speck Bildung wurden LPS und ATP gewählt, als Kontrolle für ASC-Specks wurde LPS und Nigericin eingesetzt. Beide Kombinationen liefern die zur Inflammasom Aktivierung benötigten dualen Signale und führten in den BMDCs wie erwartet zur Fokus Bildung, welche sich klassischerweise als ein distinktes Aggregat pro Zelle deutlich zeigt. Infektion mit *tcpC* positiven Stämmen konnte im

Gegensatz zu dem *tcpC* negativen Stamm kaum Speck Bildung induzieren (vgl. Abbildung 23, Abbildung 25). Folglich inhibiert TcpC die Inflammasom Assemblierung, damit auch die Aktivierung der Caspase-1 und die Sekretion von IL-1 $\beta$ . Durch Quantifizierung der gebildeten Caspase-1 Specks/Zelle konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der IL-1 $\beta$  Inhibition und der Anzahl der Specks geschaffen werden. TcpC ist in der Lage die Bildung der Caspase-1 Specks signifikant zu reduzieren, parallel wird die IL-1 $\beta$  Menge im Überstand der infizierten BMDCs (vgl. Abbildung 10) reduziert. Die Western Blot Analysen bestätigen ebenfalls den Zusammenhang zwischen Inhibition der Caspase-1 Spaltung und IL-1 $\beta$  Freisetzung (Abbildung 10). Interessanterweise finden sich durch Infektion von CFT073 *tcpC::kan* nahezu identische Mengen an Caspase-1- und ASC-Specks pro Zelle (vgl. Abbildung 24, Abbildung 26). Dies deutet darauf hin, dass beide Proteine im gleichen Inflammasom Komplex vorhanden sind. Es wäre daher sehr wichtig, die Immunfluoreszenz Färbung für NLRP3 zu wiederholen, um eine sichere Aussage in Bezug auf den verwendeten NOD-like Rezeptor zu treffen. Hinweise auf die Bildung eines einzelnen Inflammasoms mit mindestens zwei NLRs pro Zelle während einer Infektion mit *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium wurden kürzlich von Man et al publiziert. Hochauflösende Konfokalmikroskopie bestätigen in dieser Studie die Anwesenheit von Caspase-1, ASC und NLRP3 oder NLRC4 innerhalb eines Specks (Man et al., 2014).

Die Inhibition der Caspase-1 Aktivierung stellt einen postulierten Mechanismus zur Modulation der Immunantwort durch pathogene Bakterien dar (Bergsbaken et al., 2009; Miao et al., 2010). Für das Protein YopM aus *Yersinia pestis* konnte durch direkte Bindung an Caspase-1 erstmals die Inhibition der Caspase-1 Aktivierung und der IL-1 $\beta$  Sekretion gezeigt werden (LaRock & Cookson, 2012). In dieser Arbeit wurden für den Virulenzfaktor TcpC aus CFT073 ebenfalls die molekularen Mechanismen der IL-1 $\beta$  Inhibition identifiziert. TcpC vermittelt, ähnlich wie YopM, die Inhibition der IL-1 $\beta$  Freisetzung durch Blockierung der Inflammasom Bildung über direkte Bindung an Caspase-1. Zusätzlich bindet TcpC über die TIR-Domäne an den Rezeptor NLRP3 und führt vermutlich über kompetitive Verdrängung zur Unterbrechung des Signalweges.

Dies ist ein weiterer neuer Mechanismus wie ein bakterielles TIR-Domänen Protein in der Lage ist, die Immunantwort des Wirtes zu modulieren. Zusätzlich zur bereits charakterisierten Inhibition der TLR vermittelten Zytokin Sekretion (Cirl et al., 2008) kann der humanpathogene Erreger den NLR vermittelten Signalweg durch TcpC über direkte Interaktion mit Schlüsselmolekülen blockieren. Dies ermöglicht dem UPEC die Kolonisation des Blasenepithels, Bildung von IBCs und die Etablierung der Infektion.

### 4.3 Therapeutische Aspekte von TcpC

Zusätzlich zu einem besseren Verständnis der Wirt-Pathogen Interaktion zwischen dem uropathogenen *E. coli* CFT073, und Komponenten des angeborenen Immunsystems, können durch den Virulenzfaktors TcpC weitere Erkenntnisse in Bezug auf einen therapeutischen Nutzen gewonnen werden.

Harnwegsinfektionen sind eine der häufigsten humanen Infektionen und werden klassischerweise mit Antibiotika therapiert. Vor allem wiederkehrende Infektionen stellen in Hinsicht auf therapeutische Möglichkeiten eine große Herausforderung dar, da durch den wiederholten Einsatz von Antibiotika auch Resistenzen der uropathogenen Stämme steigen und als Folge neue Therapieansätze benötigt werden (Stamm & Norrby, 2001; Zhang & Foxman, 2003).

Studien mit klinischen Patientenisolaten konnten zeigen, dass gerade bei schweren Fällen von Nierenentzündungen die Frequenz an *tcpC* positiven *E. coli* Stämmen im Vergleich zu anderen Formen von Harnwegsinfekten bis zu 40% betrug (Cirl *et al.*, 2008). Daher könnte TcpC ein interessantes Ziel für die Entwicklung neuer Therapiestrategien darstellen. Hierfür wäre es von Nutzen, entweder die Sekretion des Virulenzfaktors zu verhindern, oder die Neutralisation des Virulenzfaktors durch entsprechende therapeutische Antikörper, um so die Beeinflussung des Immunsystems des Wirtes zu inhibieren.

Ein zweiter wichtiger Aspekt bezieht sich auf den therapeutischen Nutzen von TcpC als potentieller anti-inflammatorischer Wirkstoff. Da TcpC in der Lage ist, die TLR vermittelte Zytokin Sekretion (Cirl *et al.*, 2008) sowie die Freisetzung des höchst pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  zu inhibieren, könnte das bakterielle TIR-Protein zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie dem Muckle-Wells-Syndrom eingesetzt werden. Die Ursache dieser seltenen Erbkrankheit liegt an einer genetischen Mutation des *nlrp3* Gens und führt zu einer erhöhten, unkontrollierten Produktion von IL-1 $\beta$  welches u.a. zu episodischen Fieberanfällen führen kann (Agostini *et al.*, 2004, Kastner, 2005). Mittlerweile ist bekannt, dass Mutation im *nlrp3* Gen zu einem breiten Spektrum an Syndromen, auch unter dem Namen CAPS (*Cryopyrin-associated periodic syndrome*) bekannt, führen (Shinkai *et al.*, 2008). Bislang werden monoklonale Antikörper gegen IL-1 $\beta$ , IL-1R Antagonisten sowie IL-1 $\beta$  bindende Proteine zur Therapie eingesetzt. Durch die bindenden Eigenschaften von TcpC an NLRP3 sowie die Blockierung der Caspase-1 Spaltung wäre ebenfalls die Unterbrechung der unkontrollierten IL-1 $\beta$  Freisetzung möglich. TcpC könnte aufgrund seines breiten inhibitorischen Spektrums innerhalb des innaten Immunsystems als allgemeiner immun-supprimierender Wirkstoff eingesetzt werden. Dafür sprechen die von TIR-TcpC abgeleiteten Peptide (BB- und DD-Peptid), welche in der Lage sind, durch Blockade des TLR4 abhängigen Signalweges die TNF $\alpha$  Sekretion von LPS stimulierten Makrophagen zu inhibieren (Snyder *et al.*, 2013).

## 4.4 *In Vitro* Charakterisierung von TcpB

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TcpC aus dem UPEC Stamm CFT073 an Caspase-1, dem Schlüsselmolekül während der IL-1 $\beta$  Freisetzung bindet, und damit die Aktivierung des pro-inflammatorischen Zytokins inhibiert. Desweiteren konnte die direkte Interaktion von TcpC an den dafür verantwortlichen Rezeptor NLRP3 mittels Co-IP und Pull-Down Assays demonstriert werden.

Auch für das homologe Protein TcpB aus *Brucella melitensis* wurden parallel Protein:Protein Interaktionsstudien zusammen mit Inflammasom Komponenten durchgeführt. Ziel war es, erste Anhaltspunkte für einen theoretisch möglichen Einfluss von TcpB auf die Inflammasom Kaskade zu gewinnen.

Darüber hinaus wurde auch die TcpB vermittelte TLR Inhibition funktionell näher charakterisiert, um weitere Einblicke in die molekularen Mechanismen des Virulenzfaktors zu erhalten.

### 4.4.1 TcpB und TcpB Mutanten interagieren mit NLRP3

Aufgrund erster Hinweise auf eine proteolytische Eigenschaft von TcpB (Dr. Arbeit C. Cirl, 2009), wurde auch dieser Fragestellung innerhalb der *in vitro* Charakterisierung nachgegangen. Innerhalb der Box 1 der TIR-Domäne von TcpB wurden zwei Serin Reste (S124 und S127) identifiziert, welche im katalytischen Zentrum einer potentiellen Serin-Protease liegen könnten. Durch *in vitro*-Protease-Assays wurde für TcpB, jedoch nicht für das mutierte Protein TcpB-S127I proteolytische Aktivität festgestellt (Dr. Arbeit C. Cirl, 2009). Daraus ergab sich die Hypothese, dass TcpB über proteolytischen Funktion zu einer Beeinflussung der TLR- und Inflammasom Signalkaskade führen könnte.

In dieser Arbeit wurde diese Theorie mit Hilfe der Serin Mutante TcpB-S127I und der Doppel-Austausch Mutante TcpB-S124AS127I mittels Konfokalmikroskopie, Immunopräzipitations- und Reporteragen-Assays untersucht. Bisherige Studien beschreiben die zelluläre Verteilung von überexprimiertem TcpB in HEK 293 Zellen als tubulär und zeigen, dass TcpB in der Lage ist, mit Bestandteilen des Zytoskeletts, den Mikrotubuli, und der Plasmamembran zu koloalisieren (Radhakrishnan *et al.*, 2009). Die Bindung von TcpB an Mikrotubuli wird über einen längeren Bereich des BB Loops der TIR Domäne vermittelt und ist von dem konservierten Glycin Rest 158 abhängig (Radhakrishnan *et al.*, 2009). In den vorliegenden Studien konnte zunächst ein Einfluss der Serine auf die zelluläre Lokalisation von TcpB im Überexpressionssystem demonstriert werden. Konfokalmikroskopische Analysen (durchgeführt von S. Dürr) zeigten, dass der Austausch der Serine 124 und 127 die zytosolische Verteilung sowie die Struktur von TcpB stark beeinflussten. Wildtyp TcpB bildet, wie von Radakrishnan *et al.* beschrieben, eine tubuläre Struktur im Zytoplasma

(Radhakrishnan *et al.*, 2009), die Mutante TcpB-S127I verhält sich ähnlich zur Wildtypform und bildet ebenso tubuläre Strukturen. Der Austausch beider Serine S124 und S127 führt hingegen zu einer diffusen Verteilung im gesamten Zytoplasma der HEK 293 Zelle (vgl. Abbildung 27).

Die Co-Transfektion der TcpB Varianten zusammen mit den Inflammasom Komponenten NLRP3, ASC und Caspase-1 lieferte desweiteren detaillierte Anhaltspunkte, ob eine Beeinflussung des Inflammasoms theoretisch möglich ist. Interessanterweise verhindert das tubulär verteilte TcpB die Expression von NLRP3 und Caspase-1, ASC war davon nicht berührt. Die Mutante TcpB-S127I hemmt ebenfalls die Expression von Caspase-1 und minimiert die Menge an NLRP3. Die Doppelmutante TcpB-S124AS127I hingegen stört die Expression der Inflammasom Moleküle nicht und unterstützt damit die Hypothese einer proteolytischen Funktion durch die Serine 124 und 127. Analog zu TcpC kommt es zwischen TcpB-S124AS127I und NLRP3 zu einer Kolo-kalisation. Im Unterschied zu TcpC kann keine Kolo-kalisation mit Caspase-1 beobachtet werden. Daher ist eine direkte Interaktion zwischen TcpB und Caspase-1 eher unwahrscheinlich. In Bezug auf den Adapter ASC verhalten sich TcpB und TcpC identisch, beide TIR-Proteine kolo-kalisieren nicht mit ASC (vgl. Abbildung 16, Abbildung 28).

Schlussfolgernd wurde durch die Daten der Konfokalmikroskopie Analyse eine direkte Assoziation zwischen TcpB und NLRP3 in Erwägung gezogen. Mit Hilfe von Co-IP Studien konnte gezeigt werden, dass diese beiden Proteine tatsächlich direkt miteinander interagieren. Auch hier wurden die beiden TcpB Varianten TcpB-S127I und TcpB-S124AS127I parallel analysiert und sind ebenso in der Lage an NLRP3 zu binden. Es zeigte sich abermals, dass das Vorhandensein der Serin Reste 124 und 127 Einfluss auf die Expression von TcpB selbst und auf ko-transfizierte Proteine besitzt. Der Austausch der Serine begünstigte die Co-Expression von TcpB und NLRP3, möglicherweise durch Verhinderung eines autoproteolytischen Abbaus. Ähnlich wie für TcpC beobachtet, stabilisiert TcpB die Expression von NLRP3 (vgl. Abbildung 29). Um die an der Interaktion beteiligte Domäne von NLRP3 einzugrenzen, wurden die Co-IPs von TcpB und den TcpB Serin Mutanten mit NLRP3 $\Delta$ LRR, der trunktierten Form ohne der LRR Domäne, analog zu TcpC wiederholt. Während die TcpB Mutanten mit NLRP3 $\Delta$ LRR interagierten, verhinderte Wildtyp TcpB die Co-Expression von NLRP3 $\Delta$ LRR jedoch vollständig, so dass es im Zelllysat zu keiner Interaktion der beiden Proteine kommen konnte (vgl. Abbildung 30). Möglicherweise geschieht dies durch Unterschiede in der Proteinfaltung der trunktierten Form von NLRP3. Inflammasom assoziierte Proteine wie Card8 und Pannexin-1 wurden von TcpB nicht gebunden. Demnach interagiert TcpB unabhängig seiner potentiell proteolytischen Funktion mit dem NOD-like Rezeptor NLRP3 vermutlich über den N-terminalen Bereich. Weitere Interaktionsstudien mit den einzelnen Domänen von NLRP3 (NACHT und CARD)

könnten weitere Hinweise darauf liefern, welcher spezifische Teil des Proteins für die Bindung TcpB verantwortlich ist. Ob es durch diese Interaktion auch zu einer Beeinflussung der Inflammasom Aktivierung analog zu TcpC kommen kann, wäre von großem Interesse. Dafür könnten Reportergergen Analysen mit TcpB und den Serinmutanten durchgeführt werden und hierbei die Induktion der IL-1 $\beta$  Produktion als „read out“ detektiert werden. Um sichere Anhaltspunkte einer modulierenden Wirkung im direkten Wirt-Pathogen Kontext zu gewinnen, wären *in vitro* und *in vivo* Infektionsstudien mit *B. melitensis* und einer *tcpB* – Deletionsmutante, analog wie für CFT073, notwendig. Aufgrund des benötigten Sicherheitsstandards S3 konnten während dieser Arbeit keine Infektionsstudien durchgeführt werden.

#### 4.4.2 TcpB und TcpB Mutanten interagieren mit TIRAP

Wie bereits erwähnt, bindet TcpB an den TLR Adapter TIRAP/MAL (Radhakrishnan *et al.*, 2009; Sengupta *et al.*, 2010, Chaudhary *et al.*, 2012). Diese Interaktion konnte in der vorliegenden Arbeit erneut im HEK 293 Überexpressionssystem bestätigt werden. Desweiteren wurden in der Immunoblot Analyse zwei unterschiedlich große Isoformen von TIRAP detektiert, wobei die größere Variante vermutlich der phosphorylierten Form von TIRAP (TIRAP-P) zugeordnet werden kann (Kenny & O'Neill, 2008). TcpB bindet hauptsächlich die nicht phosphorylierte Form, da gleichzeitig die Expression von TIRAP-P durch TcpB reduziert wurde. Um die Relevanz der potentiell katalytisch aktiven Serine auf die Interaktion mit TIRAP zu untersuchen, wurde die Co-IP auch mit den Serin Mutanten TcpB-S127I und TcpB-S124AS127I wiederholt. Hinsichtlich der Interaktion mit TIRAP spielen die Serine keine Rolle, beide Mutanten binden an den TLR Adapter. Eine Verminderung der Menge an phosphoryliertem TIRAP konnte durch Ko-Expression der Mutanten dagegen nicht beobachtet werden. Folglich werden beide TIRAP Isoformen von den Mutanten gebunden (vgl. Abbildung 32). Zusätzlich wurde gepüft, ob die TIR-Domäne von TcpB die Interaktion zu TIRAP und NLRP3 vermittelt. Diese Fragestellung kann jedoch nicht vollständig beantwortet werden, da nach 48 h Transfektionsdauer NLRP3, TIRAP und alle weiteren ko-transfizierten Proteine im Lysat der HEK 293 Zellen nicht mehr nachweisbar waren. Hier kam es vermutlich zu einem vollständigen Abbau durch TIR-TcpB. Zur Kontrolle wurden alle Proteine einzeln transfiziert und konnten über Western Blot Analyse detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Ähnliche Beobachtungen machten Alaidarous *et al.*, auch in ihren Studien konnte ein Effekt von TIR-TcpB in HEK 293 Zellen nicht analysiert werden, da TIR-TcpB nicht exprimiert wurde bzw. sich vermutlich auto-proteolytisch abbaute (Alaidarous *et al.*, 2014).

Die Phosphorylierung von TIRAP an den Tyrosinen 86, 106 und 159 ist für die Signalweiterleitung essentiell. Mutationen dieser Tyrosine führen zur reduzierten Aktivierung

von NF- $\kappa$ B und zur Verstärkung der Bindung an TLR4 (Gray *et al.*, 2006; Piao *et al.*, 2008). Die selektive Reduktion der TIRAP-P Expression durch TcpB könnte auf einen neuen Mechanismus zur Modulation der TLR-Kaskade hinweisen. Die Signal-kompetente Form würde demnach gezielt durch Proteolyse abgebaut und kann folglich nicht mehr zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen. Dies ist für den Erreger von großem Vorteil, da so die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine inhibiert wird. Wird die proteolytische Funktion von TcpB durch den Austausch der Serine dagegen inaktiv, so wird der Abbau der Signal-kompetenten Form von TIRAP verhindert und es kommt lediglich zu einer Bindung. Ob auch durch die alleinige Bindung, ohne proteolytische Funktion, eine Inhibition erreicht werden kann, wurden in dieser Arbeit ebenfalls untersucht und im folgenden Abschnitt diskutiert (4.4.3).

Sengupta *et al.* konnten ebenfalls den Abbau von TIRAP-P durch TcpB im Überexpressionssystem beobachten (Sengupta *et al.*, 2010). Die Untersuchungen wurden mit TcpB sowie einer Mutante von TcpB durchgeführt. Bei der damals verwendeten TcpB Mutante handelte es sich um TcpB mit einer Mutation innerhalb des konservierten Motivs der homologen Box 1 Region (Deletion der AA123 – 125). Die Mutante TcpB  $\Delta$ 123-125 war im Vergleich zu Wildtyp TcpB nicht in der Lage TIRAP-P zu reduzieren. Interessanterweise wurde in der hier vorliegenden Arbeit zufällig eine Mutante verwendet, die durch den Austausch des Serins 124 ebenfalls eine Mutation innerhalb dieser Region trägt. Somit kann die Beobachtung, dass diese Region für die Verminderung von TIRAP-P benötigt wird, unabhängig bestätigt werden und zusätzlich auf einen bestimmten Serin Rest eingegrenzt werden.

Als Mechanismus des TIRAP-P Abbaus wurde von Sengupta *et al.* die Poly-Ubiquitylierung und somit Degradierung von TIRAP durch reine Anwesenheit von TcpB diskutiert. Anhand der hier vorliegenden Arbeit kann über die Poly-Ubiquitylierung des TLR Adapters keine Aussage getroffen werden, es kommt in erste Linie zu einer Verminderung der TIRAP Menge durch Ko-Expression von TcpB. Ob TcpB tatsächlich die Ubiquitylierung von TIRAP-P bewirkt oder ob TcpB tatsächlich proteolytische Eigenschaften besitzt, lässt sich noch nicht endgültig beantworten. Der Einsatz von spezifischen Serinprotease Inhibitoren könnte die Hypothese einer potentiellen Serinprotease Funktion von TcpB aufklären und weitere Einblicke in die molekularen Mechanismen des Virulenzfaktors liefern.

TIRAP besitzt über seine Phospholipid-Bindekapazität die Möglichkeit, an die Plasmamembran zu binden und dort als Brückenadapter zur Rekrutierung von zytoplasmatischem Myd88 an die membranständigen TLRs zu fungieren (Fitzgerald *et al.*, 2001; Horng *et al.*, 2002; Kagan & Medzhitov, 2006; Yamamoto *et al.*, 2002, Bonham *et al.*, 2014). TcpB besitzt, ebenso wie TIRAP, eine N-terminale Phospholipid-Bindedomäne und kolokalisiert mit der Plasmamembran. Solch ähnliche Eigenschaften werden auch „molekulare Mimikry“ genannt

(Radhakrishnan *et al.*, 2009). An der Plasmamembran ist es für den Virulenzfaktor möglich, mit TIRAP zu interagieren, darüber die Signalweiterleitung zu unterbrechen und TIRAP möglicherweise durch Proteolyse gleichzeitig zu degradieren. Zusätzlich zu der bereits genauer untersuchten Interaktion von TcpB und Myd88 (Cirl *et al.*, 2008, Chaudhary *et al.*, 2012) verfügt der Virulenzfaktor folglich über einen bi-funktionalen Mechanismus zur Inhibition der TLR Signaltransduktion.

#### **4.4.3 TcpB und die TcpB Mutante S124AS127I inhibieren die TIRAP Signalweiterleitung**

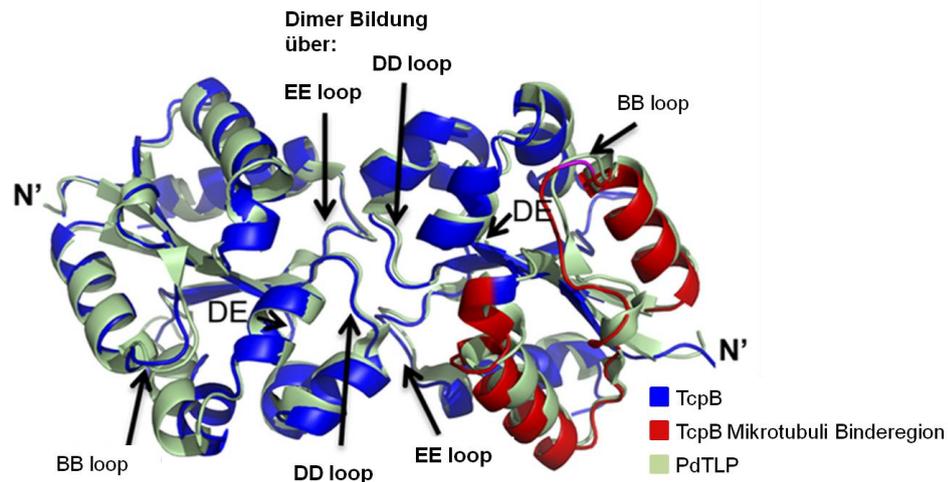
In dieser Arbeit wurde die heterotypische Interaktion zwischen TcpB und TIRAP zusätzlich mit funktionellen Daten erweitert. Mit Hilfe von Co-IP Studien konnte gezeigt werden, dass der Austausch der Serine keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen TcpB und TIRAP besitzt, es durch den Aminosäure Austausch lediglich zu einer Veränderung der zellulären Lokalisation kommt (vgl. Abbildung 27). Die Frage, ob die Bindung von TcpB und TIRAP auch zur Inhibition der TLR Signalkaskade führen kann, wurde mit Hilfe von Reportergen Assays untersucht. Übereinstimmend mit früheren Publikationen führt die Überexpression von TIRAP dosis-abhängig zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B Reporters und TcpB ist in der Lage das Signal zu inhibieren (Radhakrishnan *et al.*, 2009). Der Austausch beider Serine S124 und S127 innerhalb der TIR-Domäne beeinträchtigt die inhibitorische Fähigkeit von TcpB nicht. TcpB S124AS127I kann die TIRAP vermittelte Signaltransduktion ebenfalls hemmen (vgl. Abbildung 33). Interessanterweise kommt es zu einem unterschiedlichen Verlauf der Inhibition im direkten Vergleich zu WT TcpB. Auszuschließen sind Unterschiede in der Bindungsstärke zwischen TcpB und TIRAP. Beide TcpB Varianten zeigen auf dem Immuno Blot ähnlich starke Präzipitationsergebnisse für TIRAP (vgl. Abbildung 32). Betrachtet man jedoch die Expressionsmengen von TcpB und der Mutante in Form der Einzeltransfektion, so wird deutlich, dass es durch den Austausch der Serine zu Unterschieden in der Proteinmenge kommen kann (vgl. Abbildung 29). Möglicherweise sind daher die verschiedenen Verläufe der TIRAP Inhibition auf unterschiedliche TcpB Proteinmengen zurückzuführen. Die Differenzen könnten auch innerhalb der potentiell proteolytischen Funktion von TcpB liegen. Wie die Co-IP Analysen zeigen konnten, führt speziell WT TcpB zu einer verminderten Expression der phosphorylierten und Signal-kompetenten Form von TIRAP (TIRAP-P). Der Serin Mutante TcpB S124AS127I fehlt diese Eigenschaft und es kommt zu keiner Reduktion von TIRAP-P (vgl. Abbildung 32).

#### 4.4.4 Kristallstruktur der TIR-Domäne von TcpB und TIRAP

In Kooperation mit Greg Snyder (University of Maryland, Baltimore, USA) und Sam Xiao (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) konnten kürzlich die aktuellen Kristallstrukturen der TIR-Domänen von TcpB (2.3 Å Auflösung) und TIRAP (2.5 Å) entschlüsselt werden (Snyder *et al.*, 2014). Auf diese Weise kann nun die molekulare Basis für die Interaktion zwischen einem bakteriellen und einem Säugetier TIR-Protein aufgeklärt werden.

Die TIR-Domäne von TcpB nimmt die typische TIR-Domänen Struktur, ähnlich wie für andere TIR-Domänen beschrieben, ein (Xu *et al.*, 2000, Nyman *et al.*, 2008, Ohnishi *et al.*, 2009, Snyder *et al.*, 2013). Sie besteht aus 5 alternierenden  $\alpha$  Helices und  $\beta$  Faltblättern. Innerhalb der TIR-Domäne befindet sich die bereits erwähnte Mikrotubuli Bindestelle zwischen der  $\alpha$ B und  $\beta$ B Region. In diesem Abschnitt ist auch der wichtige Glycin Rest (G 158) ansässig, welcher für die Stabilisierung der Mikrotubuli als essentiell charakterisiert wurde. Zusätzlich zur TLR Modulation wurde für TcpB eine stabilisierende Funktion während der Mikrotubuli Organisation beschrieben (Radhakrishnan *et al.*, 2011). TcpB greift demnach auch in das Geschehen der Mikrotubuli Dynamik ein und könnte dadurch indirekt auch auf verschiedene Signaltransduktionsprozesse wie den NF- $\kappa$ B und MAP Kinasen Signalweg Einfluss nehmen, da die Mikotubuli Stabilisierung hier eine wichtige Rolle spielt (Bergstrahl & Ting, 2006).

Die TIR-Domäne von TcpB bildet über die DD und EE Loop Region symmetrische Homodimere innerhalb des Kristalls. Diese Dimerbildung ist nahezu identisch zum Kristall des TIR-Domänen Dimers des bakteriellen Proteins PdTLP aus *Paracoccus denitrificans*, siehe Abbildung 35 (Chan *et al.*, 2009). Diese Gemeinsamkeit deutet daraufhin, dass die Dimerbildung eine wichtige Rolle bei der Funktion der bakteriellen TIR-Proteine spielen könnte, da beide TIR-Proteine in der Lage sind, die TLR Signaltransduktion zu modulieren. Hinweise dafür liefern desweiteren NF- $\kappa$ B Reporterstudien mit verschiedenen Mutationen innerhalb der Dimer Schnittstelle von TIR-TcpB, welche die inhibitorischen Fähigkeiten von TcpB auf den TLR4 aktivierten NF- $\kappa$ B Weg beeinträchtigen. Vor allem die Mutation des Glycin Restes 158, sowie Mutationen im Bereich der AA 220 bis 236 wiesen deutliche Unterschiede im inhibitorischen Potential auf (Alaidarous *et al.*, 2014).



**Abbildung 35: Vergleich der TIR-Domänen Dimere von *TcpB*<sup>S124AS127I</sup> und *PdTLP***

Schematische Überlagerung der TIR-Domänen Dimere aus *TcpB* (blau) und *PdTLP* (mintgrün). Die Dimerbildung findet an der DD und der EE Loop Region statt. Die Mikrotubuli Binderegion von *TcpB* zwischen  $\alpha$ B und  $\beta$ B Loop ist rot gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach Snyder *et al.*, 2014

Auffallend ist die Tatsache, dass der TIR-*TcpB* Kristall nur mit der Doppel-Serinmutante S124AS127I gewonnen werden konnte. Sämtliche Versuche mit Wildtyp *TcpB* zeigten, wie bereits bei den Überexpressionsversuchen (vgl. Kapitel 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3), den autoproteolytischen Abbau des Proteins. Erst durch die Verwendung der Mutante S124AS127I gelang es Snyder *et al.* die TIR-Domäne von *TcpB* zu kristallisieren. Der Austausch der Serine besitzt jedoch keine Auswirkung auf die Proteinstruktur und die Dimerbildung, wie anhand der zur gleichen Zeit publizierten WT TIR-*TcpB* Strukturen deutlich wird (Kaplan-Turkoz *et al.*, 2013, Alaidarous *et al.*, 2014).

Da TIRAP ein wichtiges molekulares Ziel des bakteriellen TIR-Proteins ist, wurde auch diese Kristallstruktur analysiert. Die Kristallstruktur der TIR Domäne von humanem TIRAP zeigt große Ähnlichkeit zu TIR-*TcpB* und zu anderen TIR-Domänen. Sie unterscheidet sich jedoch durch eine Disulfid Brücke zwischen Cystein 89 und 134 welche für mikrobielle TIR-Domänen untypisch ist. Die Struktur wird durch bereits bestehende Kristallstrukturen von TIRAP bestätigt (Valkov *et al.*, 2011, Lin *et al.*, 2012).

Über die aktuellen Kristallstrukturen der TIR-Domänen von *TcpB* und TIRAP konnten die molekulare Ähnlichkeiten aber auch die Unterschiede der beiden TIR-Domänen gezeigt werden und so wichtige Einblicke in die molekularen Mechanismen der Wirt-Pathogen Interaktion gewonnen werden.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass der Virulenzfaktor *TcpB* aus *Brucella melitensis* in der Lage ist, sowohl die TIRAP vermittelten als auch die Myd88 vermittelten Signalwege zu inhibieren. Dies geschieht über die direkte Interaktion der TIR-Domänen von Myd88 und

TIRAP. Für die Bindung an TIRAP sowie die Dimerbildung scheinen die beiden ausgetauschten Serine innerhalb der BOX1 nicht essentiell zu sein, wie anhand der funktionellen und strukturellen Daten deutlich wird. Es wurden durch diesen Austausch jedoch weitere Hinweise auf eine potentiell proteolytische Funktion von TcpB gewonnen. Durch Koexpression von TcpB konnte im Vergleich zur eingesetzten Serin Mutante eine deutliche Verminderung der signalkompetenten Form von TIRAP beobachtet werden. Möglicherweise kommt es durch diese Eigenschaft neben der Interaktion mit TIRAP auch zu einer Unterbrechung der TLR-Signalweiterleitung durch proteolytischen Abbau. TcpB spielt damit eine wichtige Rolle bei der Etablierung einer Infektion des Wirtes.

## 5 Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem ist der erste Abwehrmechanismus gegen eindringende Pathogene und wird durch keimbahnkodierte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PPRs) aktiviert. Diese Rezeptoren, darunter Toll-like und Nod-like Rezeptoren (TLR, NLR) erkennen eine große Anzahl von hochkonservierten pathogen-assoziierten Molekülen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) und induzieren nach Erkennung eine Signalkaskade zur Produktion von pro-inflammatorischen Molekülen, welche schließlich zur Eliminierung des Pathogens führt.

Eine Schlüsselrolle spielt die Aktivierung des Inflammasoms, einem Multiproteinkomplex bestehend aus einem NLR Protein (z.B. NLRP3), dem Adapter ASC (*apoptotic speck-containing protein containing a CARD*) und pro-Caspase-1. Die Hauptaufgabe des Inflammasoms ist die Aktivierung der Caspase-1, welche anschließend ihre Substrate pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 spaltet.

Die in dieser Arbeit dargelegten Befunde beschreiben die Rolle des bakteriellen „*TIR containing proteins C*“ (TcpC) des uropathogenen Stammes *E. coli* CFT073 als Inhibitor für die Aktivierung des Inflammasoms. TcpC ist in der Lage, durch Bindung an NLRP3 und an Caspase-1, die Aktivierung des Inflammasoms zu blockieren und damit die Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  zu inhibieren. Die Wechselwirkung zwischen TcpC und der Inflammasom Komponenten wird über die TIR Domäne von TcpC vermittelt, der Adapter ASC wird jedoch nicht von TcpC gebunden. In infizierten Knochenmarkszellen kommt es durch TcpC zu einer nahezu vollständigen Blockade der Inflammasom-Oligomerisierung sowie zu reduzierter IL-1 $\beta$  Freisetzung.

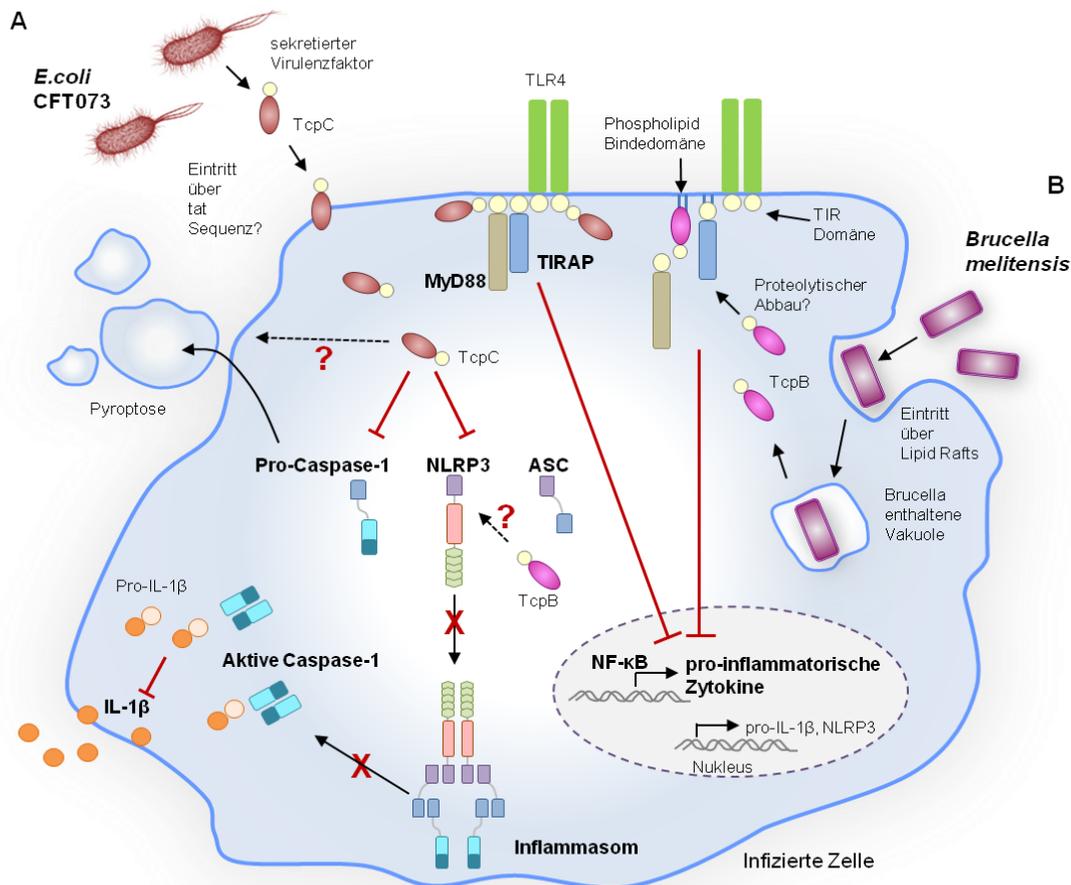
Desweiteren wurde auch für das „*TIR containing protein B*“ (TcpB) aus *Brucella melitensis* eine Interaktion mit NLRP3 gezeigt, die Interaktion mit Caspase-1 war jedoch nicht nachweisbar.

Die strukturelle Homologie der TIR Domäne ermöglicht es TcpC und TcpB an TIR Domänen Proteine des TLR-Systems zu binden und dadurch die Immunantwort zu modulieren. Beide Proteine sind in der Lage mit Myd88, dem zentralen Adapter des TLR-Systems, zu interagieren. In der Wirtszelle kommt es parallel zu einer reduzierten Freisetzung NF- $\kappa$ B-abhängiger Zytokine. TcpC bindet über seinen BB Loop auch an TLR4. (Cirl *et al.*, 2008, Snyder *et al.*, 2013; Snyder *et al.*, 2014). In dieser Arbeit konnte darüber hinaus die direkte Assoziation von TcpB mit dem TLR Adaptermolekül TIRAP/MAL bestätigt werden und über kristallographische Analyse in Kooperation mit Sam Xiao und Greg Snyder (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) weiter charakterisiert werden.

Zusätzlich wurde die Funktion zweier spezifischer Serin Reste innerhalb eines potentiell katalytisch aktiven Zentrums innerhalb der TIR Domäne von TcpB untersucht. Frühere

Studien deuteten darauf hin, dass die Serine S124 und S127 eine proteolytische Funktion vermitteln und darüber ebenso Einfluss auf die TLR- und NLR-Signaltransduktion nehmen könnten. Daher wurden Serin-Austauschmutanten hergestellt, welche in dieser Arbeit biochemisch und funktionell analysiert wurden. Durch Transfektionsstudien konnte eine verminderte Ko-Expression von TIRAP-P und Inflammasom Molekülen in Anwesenheit von TcpB gezeigt, jedoch nicht durch die TcpB Serin Mutanten. Proteinstruktur und Homodimerbildung von TcpB zeigten sich durch den Austausch der Serine nicht beeinflusst. Auch die direkte Bindung an TIRAP sowie die Inhibition der TIRAP-Signalweiterleitung erfolgt unabhängig dieser Serine (Snyder *et al.*, 2014, Radhakrishnan *et al.*, 2009, Radhakrishnan *et al.*, 2009, Alaidarous *et al.*, 2014).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, wie bakterielle TIR Proteine in der Lage sind, die Immunantwort des Wirtes zu dämpfen, um sich darüber erfolgreich zu etablieren. Die postulierten molekularen Mechanismen sind in Abbildung 36 im Modellsystem dargestellt.



**Abbildung 36: Postulierte Modelldarstellung des molekularen Mechanismus von TcpC/TcpB**

(A) Das Protein TcpC (*TIR containing protein C*) des uropathogenen Stammes *E. coli* CFT073 wirkt als sekretierter Virulenzfaktor über direkte Bindung an Myd88 und TLR4 inhibitorisch auf die Induktion Nf-κB abhängiger Zytokine. Parallel wird auch die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms durch Interaktion mit NLRP3 und Caspase-1 blockiert und so die Freisetzung von IL-1β unterbrochen.

(B) Das Protein TcpB (*TIR containing protein B*) aus *Brucella melitensis* bindet an die TLR Adapter Moleküle Myd88 und TIRAP und blockiert darüber die Signalweiterleitung und Induktion pro-inflammatorischer Zytokine. TcpB verfügt über eine Phospholipid-Bindedomäne und möglicherweise über proteolytische Eigenschaften. Der Einfluss der NLRP3 Interaktion ist bislang nicht analysiert.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

### A

$\alpha$	alpha
Abb.	Abbildung
AIM2	absent in melanoma 2
Amp	Ampicillin
AP-1	aktivierendes Protein 1
APC	Antigen-präsentierende Zelle ( <i>antigen presenting cell</i> )
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Amminosäure
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
aTc	Anhydrotetracyclin
ATP	Adenosin Triphosphat

### B

$\beta$	beta
BMDM	Knochenmarksmakrophagen ( <i>bone marrow derived macrophages</i> )
bp	Basenpaar (base pair)
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw	beziehungsweise

### C

$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
CARD	Caspase-Rekrutierungsdomäne
cDNA	komplementäre ( <i>complementary</i> ) DNA
Cm	Chloramphenicol
CV	Säulenvolumen (column volume)

### D

DC	Dendritische Zellen
DD	<i>death domain</i>
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxytrinukleotide
dsRNA	doppelsträngige ( <i>double stranded</i> ) Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol

### E

ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence Technique</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraacetat
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylen-Glykol-tertraacetat
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EPEC	Enteropathogene <i>E. colis</i>
$\epsilon x$	Extinktionskoeffizient bei x nm
ExPECs	Extraintestinale pathogene <i>E. colis</i>

---

<b>F</b>	
FCS	fötales Kälber- (calf) Serum
<b>G</b>	
g	Erdbeschleunigung
γ	gamma
GF	Gelfiltration
<b>H</b>	
h	humanen Ursprungs
h	Stunde
HABA	2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
HBS	HEPES-buffered Saline
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
h.i.	hitzeinaktiviert
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HSP	Hitzeschockprotein ( <i>heat shock protein</i> )
HRP	Meerrettich ( <i>Horse Radish</i> ) Peroxidase
<b>I</b>	
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IκB	Inhibitor von NF-κB
IKK	Inhibitor von NF-κB Kinase
IL	Interleukin
IL-R	Interleukin-Rezeptor
IPAF	ICE-Protease aktivierender Faktor
IPS-1	<i>Interferon promoter stimulator-1</i>
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulatorischer Faktor
<b>J</b>	
JNK	JUN N-terminale Kinase
<b>K</b>	
kDa	Kilodalton
KO	Knock-out
<b>L</b>	
LB	Luria Bertoni
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine Rich Repeat</i>
<b>M</b>	
m	murinen Ursprungs
m	milli
μ	micro
MAL	<i>MyD88-adaptor like</i>
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPKKK	MAPK Kinase Kinase
M-CSF	Makrophagen-spezifischer koloniestimulierender Faktor
MDA5	Melanoma-Differenzierungs-assoziiertes Gen 5
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

min	Minute
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MW	<i>Mean residue weight</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
<b>N</b>	
n	nano
NAIP	<i>Neuronal apoptosis inhibitor protein</i>
NALP	NACHT-, LRR- und Pyrin-Domänen enthaltende Proteine
NF-κB	nukleärer Faktor κB
NGS	normales Ziegen (goat) Serum
NK Zelle	Natürliche Killerzelle
NOD	Nukleotidbinde-Oligomerisierung-Domäne
NP-40	Nonident P-40
<b>O</b>	
OD600	Optische Dichte bei 600nm
ORF	<i>Open reading frame</i>
<b>P</b>	
Pam3CSK4	Tripalmityl-Cysteinyl-Seryl-Tetralysin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen assoziiertes molekulares Muster ( <i>pattern</i> )
Pap	Pyelonephritis-assoziiertes Pilus
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBT	PBS-Tween
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
pDC	plasmacytoide dendritische Zellen
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PKC	Protein kinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly(I:C)	Polyinosin/Polycytosin
PRR	Mustererkennungsrezeptor ( <i>pattern recognition receptor</i> )
PYD	<i>Pyrin domain</i>
<b>R</b>	
RIG-I	Retinsäure-induzierbares Gen I
RIP	Rezeptor-interagierendes Protein
RLR	<i>RIG-I-Like Receptor</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotationen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT	Raumtemperatur
<b>S</b>	
SAC	Streptavidin-Affinitätschromatographie
SARM	steriles□□- und Armadillo-HEAT-Motiv-enthaltendes Protein
SaTLP	<i>Staphylococcus aureus</i> TIR-like protein
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
ssDNA	einzelsträngige ( <i>single-stranded</i> ) Nukleinsäure

ssRNA	einzelsträngige ( <i>single-stranded</i> ) Ribonukleinsäure
<b>T</b>	
TAB1	<i>TAK1-binding protein 1</i>
TAE	Tris Acetat EDTA
TAK1	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math>-activated kinase 1</i>
TAT	<i>trans-activator of transcription</i>
TBK	<i>TNF-receptor-associated factor-family-member-associated NF-<math>\kappa</math>B activator binding kinase</i>
TcpB	<i>TIR domain containing protein B</i>
TcpC	<i>TIR domain containing protein C</i>
TE	Tris-Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraacetat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TH2	T Helferzelle 2
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor
TIRAP	<i>TIR-domain-containing adaptor protein</i>
TICAM	<i>TIR-domain-containing adaptor molecule</i>
TipA	<i>TIR-like protein A</i>
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor ( <i>Toll-like receptor</i> )
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF6	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor molecule inducing IFN-<math>\gamma</math></i>
Tris	Tris-(Hydroxylmethyl-)Aminomethan
<b>U</b>	
U	unit (Einheit der Enzymaktivität)
ü.N.	über Nacht
UPEC	Uropathogener <i>Escherichia coli</i>
UV	ultraviolett
<b>V</b>	
v/v	Volumen pro Volumen
<b>W</b>	
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht

Aminosäuren werden gemäß Standard Nomenklatur abgekürzt:

A Ala Alanin	L Leu Leucin
R Arg Arginin	K Lys Lysin
N Asn Asparagin	M Met Methionin
D Asp Aspartat	F Phe Phenylalanin
C Cys Cystein	P Pro Prolin
Q Gln Glutamin	S Ser Serin
E Glu Glutamat	T Thr Threonin
G Gly Glycin	W Trp Tryptophan
H His Histidin	Y Tyr Tyrosin
I Ile Isoleucin	V Val Valin

## 7 Literaturverzeichnis

- Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M.F., Hawkins, P.N. & Tschopp, J. (2004) NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*, **20**(3), 319-325.
- Akira, S. (2003) Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem*, **278**(40), 38105-38108.
- Akira, S. & Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, **4**(7), 499-511.
- Alaidarous, M., Ve, T., Casey, L.W., Valkov, E., Ericsson, D.J., Ullah, M.O., Schembri, M.A., Mansell, A., Sweet, M.J. & Kobe, B. (2014) Mechanism of bacterial interference with TLR4 signaling by Brucella Toll/interleukin-1 receptor domain-containing protein TcpB. *J Biol Chem*, **289**(2), 654-668.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. & Flavell, R.A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, **413**(6857), 732-738.
- Allen, I.C., Scull, M.A., Moore, C.B., Holl, E.K., McElvania-TeKippe, E., Taxman, D.J., Guthrie, E.H., Pickles, R.J. & Ting, J.P. (2009) The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity*, **30**(4), 556-565.
- Anderson, G.G., Martin, S.M. & Hultgren, S.J. (2004) Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. *Microbes Infect*, **6**(12), 1094-1101.
- Anderson, K.V., Bokla, L. & Nusslein-Volhard, C. (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*, **42**(3), 791-798.
- Antonopoulos, C., El Sanadi, C., Kaiser, W.J., Mocarski, E.S. & Dubyak, G.R. (2013) Proapoptotic chemotherapeutic drugs induce noncanonical processing and release of IL-1beta via caspase-8 in dendritic cells. *J Immunol*, **191**(9), 4789-4803.
- Bauernfeind, F., Ablasser, A., Bartok, E., Kim, S., Schmid-Burgk, J., Cavlar, T. & Hornung, V. (2011) Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell Mol Life Sci*, **68**(5), 765-783.
- Bauernfeind, F. & Hornung, V. (2013) Of inflammasomes and pathogens--sensing of microbes by the inflammasome. *EMBO Mol Med*, **5**(6), 814-826.
- Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., Hornung, V. & Latz, E. (2009) Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*, **183**(2), 787-791.
- Bean, M.A., Pees, H., Fogh, J.E., Grabstald, H. & Oettgen, H.F. (1974) Cytotoxicity of lymphocytes from patients with cancer of the urinary bladder: detection by a 3-H-proline microcytotoxicity test. *Int J Cancer*, **14**(2), 186-197.
- Bergsbaken, T. & Cookson, B.T. (2007) Macrophage activation redirects yersinia-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. *PLoS Pathog*, **3**(11), e161.
- Bergsbaken, T., Fink, S.L. & Cookson, B.T. (2009) Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*, **7**(2), 99-109.
- Bergsbaken, T., Fink, S.L., den Hartigh, A.B., Loomis, W.P. & Cookson, B.T. (2011) Coordinated host responses during pyroptosis: caspase-1-dependent lysosome exocytosis and inflammatory cytokine maturation. *J Immunol*, **187**(5), 2748-2754.
- Bergstralh, D.T. & Ting, J.P. (2006) Microtubule stabilizing agents: their molecular signaling consequences and the potential for enhancement by drug combination. *Cancer Treat Rev*, **32**(3), 166-179.
- Beutler, B. (2004) Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, **430**(6996), 257-263.
- Bonham, K.S., Orzalli, M.H., Hayashi, K., Wolf, A.I., Glanemann, C., Weninger, W., Iwasaki, A., Knipe, D.M. & Kagan, J.C. (2014) A promiscuous lipid-binding protein diversifies the subcellular sites of toll-like receptor signal transduction. *Cell*, **156**(4), 705-716.

- Bowie, A. & O'Neill, L.A. (2000) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol*, **67**(4), 508-514.
- Boyden, E.D. & Dietrich, W.F. (2006) Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet*, **38**(2), 240-244.
- Brennan, M.A. & Cookson, B.T. (2000) Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol*, **38**(1), 31-40.
- Brint, E.K., Xu, D., Liu, H., Dunne, A., McKenzie, A.N., O'Neill, L.A. & Liew, F.Y. (2004) ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol*, **5**(4), 373-379.
- Brodsky, I.E., Palm, N.W., Sadanand, S., Ryndak, M.B., Sutterwala, F.S., Flavell, R.A., Bliska, J.B. & Medzhitov, R. (2010) A Yersinia effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system. *Cell Host Microbe*, **7**(5), 376-387.
- Broz, P., von Moltke, J., Jones, J.W., Vance, R.E. & Monack, D.M. (2010) Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell Host Microbe*, **8**(6), 471-483.
- Bruey, J.M., Bruey-Sedano, N., Luciano, F., Zhai, D., Balpai, R., Xu, C., Kress, C.L., Bailly-Maitre, B., Li, X., Osterman, A., Matsuzawa, S., Tersikh, A.V., Faustin, B. & Reed, J.C. (2007) Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell*, **129**(1), 45-56.
- Burckstummer, T., Baumann, C., Bluml, S., Dixit, E., Durnberger, G., Jahn, H., Planyavsky, M., Bilban, M., Colinge, J., Bennett, K.L. & Superti-Furga, G. (2009) An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol*, **10**(3), 266-272.
- Burns, K., Janssens, S., Brissoni, B., Olivos, N., Beyaert, R. & Tschopp, J. (2003) Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med*, **197**(2), 263-268.
- Cai, X., Chen, J., Xu, H., Liu, S., Jiang, Q.X., Halfmann, R. & Chen, Z.J. (2014) Prion-like Polymerization Underlies Signal Transduction in Antiviral Immune Defense and Inflammasome Activation. *Cell*, **156**(6), 1207-1222.
- Carty, M., Goodbody, R., Schroder, M., Stack, J., Moynagh, P.N. & Bowie, A.G. (2006) The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol*, **7**(10), 1074-1081.
- Ceballos-Olvera, I., Sahoo, M., Miller, M.A., Del Barrio, L. & Re, F. (2011) Inflammasome-dependent pyroptosis and IL-18 protect against Burkholderia pseudomallei lung infection while IL-1beta is deleterious. *PLoS Pathog*, **7**(12), e1002452.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M.A., Foster, S.J., Mak, T.W., Nunez, G. & Inohara, N. (2003) An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol*, **4**(7), 702-707.
- Chan, S.L., Low, L.Y., Hsu, S., Li, S., Liu, T., Santelli, E., Le Negrate, G., Reed, J.C., Woods, V.L., Jr. & Pascual, J. (2009) Molecular mimicry in innate immunity: crystal structure of a bacterial TIR domain. *J Biol Chem*, **284**(32), 21386-21392.
- Chaudhary, A., Ganguly, K., Cabantous, S., Waldo, G.S., Micheva-Viteva, S.N., Nag, K., Hlavacek, W.S. & Tung, C.S. (2012) The Brucella TIR-like protein TcpB interacts with the death domain of MyD88. *Biochem Biophys Res Commun*, **417**(1), 299-304.
- Chen, S. & Sun, B. (2013) Negative regulation of NLRP3 inflammasome signaling. *Protein Cell*, **4**(4), 251-258.
- Cirl, C., Wieser, A., Yadav, M., Duerr, S., Schubert, S., Fischer, H., Stappert, D., Wantia, N., Rodriguez, N., Wagner, H., Svanborg, C. & Miethke, T. (2008) Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat Med*, **14**(4), 399-406.
- Corbel, M.J. (1997) Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis*, **3**(2), 213-221.

- Craven, R.R., Gao, X., Allen, I.C., Gris, D., Bubeck Wardenburg, J., McElvania-Tekippe, E., Ting, J.P. & Duncan, J.A. (2009) Staphylococcus aureus alpha-hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. *PLoS One*, **4**(10), e7446.
- Cruz, C.M., Rinna, A., Forman, H.J., Ventura, A.L., Persechini, P.M. & Ojcius, D.M. (2007) ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem*, **282**(5), 2871-2879.
- Cusson-Hermance, N., Khurana, S., Lee, T.H., Fitzgerald, K.A. & Kelliher, M.A. (2005) Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- $\kappa$ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem*, **280**(44), 36560-36566.
- Debaisieux, S., Rayne, F., Yezid, H. & Beaumelle, B. (2012) The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic*, **13**(3), 355-363.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C. & Chen, Z.J. (2000) Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, **103**(2), 351-361.
- Dinareello, C.A. (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, **87**(6), 2095-2147.
- Dinareello, C.A. (2009) Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, **27**, 519-550.
- Dorfleutner, A., Bryan, N.B., Talbott, S.J., Funya, K.N., Rellick, S.L., Reed, J.C., Shi, X., Rojanasakul, Y., Flynn, D.C. & Stehlik, C. (2007) Cellular pyrin domain-only protein 2 is a candidate regulator of inflammasome activation. *Infect Immun*, **75**(3), 1484-1492.
- Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nunez, G., Schnurr, M., Espevik, T., Lien, E., Fitzgerald, K.A., Rock, K.L., Moore, K.J., Wright, S.D., Hornung, V. & Latz, E. (2010) NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, **464**(7293), 1357-1361.
- Faustin, B., Lartigue, L., Bruey, J.M., Luciano, F., Sergienko, E., Bailly-Maitre, B., Volkmann, N., Hanein, D., Rouiller, I. & Reed, J.C. (2007) Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell*, **25**(5), 713-724.
- Feldmann, F., Sorsa, L.J., Hildinger, K. & Schubert, S. (2007) The salmochelin siderophore receptor IroN contributes to invasion of urothelial cells by extraintestinal pathogenic Escherichia coli in vitro. *Infect Immun*, **75**(6), 3183-3187.
- Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Yu, J.W., Datta, P., Miller, B., Jankowski, W., Rosenberg, S., Zhang, J. & Alnemri, E.S. (2007) The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ*, **14**(9), 1590-1604.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Datta, P., Wu, J. & Alnemri, E.S. (2009) AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*, **458**(7237), 509-513.
- Ferrandon, D., Imler, J.L., Hetru, C. & Hoffmann, J.A. (2007) The Drosophila systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol*, **7**(11), 862-874.
- Fink, S.L., Bergsbaken, T. & Cookson, B.T. (2008) Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**(11), 4312-4317.
- Fink, S.L. & Cookson, B.T. (2006) Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol*, **8**(11), 1812-1825.
- Fitzgerald, K.A., McWhirter, S.M., Faia, K.L., Rowe, D.C., Latz, E., Golenbock, D.T., Coyle, A.J., Liao, S.M. & Maniatis, T. (2003) IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*, **4**(5), 491-496.
- Fitzgerald, K.A., Palsson-McDermott, E.M., Bowie, A.G., Jefferies, C.A., Mansell, A.S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M.T., McMurray, D., Smith, D.E., Sims, J.E., Bird, T.A. & O'Neill, L.A. (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*, **413**(6851), 78-83.
- Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P.M. & Golenbock, D.T. (2003) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*, **198**(7), 1043-1055.

- Fling, S.P. & Gregerson, D.S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem*, **155**(1), 83-88.
- Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T.D., Ozoren, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E.P. & Nunez, G. (2006) Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol*, **7**(6), 576-582.
- Fraser, I.P., Koziel, H. & Ezekowitz, R.A. (1998) The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol*, **10**(5), 363-372.
- Gay, N.J. & Keith, F.J. (1991) Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*, **351**(6325), 355-356.
- Ge, J., Gong, Y.N., Xu, Y. & Shao, F. (2012) Preventing bacterial DNA release and absent in melanoma 2 inflammasome activation by a Legionella effector functioning in membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**(16), 6193-6198.
- Ghosh, S., May, M.J. & Kopp, E.B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, **16**, 225-260.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Carneiro, L.A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M.K., Labigne, A., Zahringer, U., Coyle, A.J., DiStefano, P.S., Bertin, J., Sansonetti, P.J. & Philpott, D.J. (2003) Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*, **300**(5625), 1584-1587.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamailard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J. & Sansonetti, P.J. (2003) Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*, **278**(11), 8869-8872.
- Gray, P., Dunne, A., Brikos, C., Jefferies, C.A., Doyle, S.L. & O'Neill, L.A. (2006) MyD88 adapter-like (Mal) is phosphorylated by Bruton's tyrosine kinase during TLR2 and TLR4 signal transduction. *J Biol Chem*, **281**(15), 10489-10495.
- Greten, F.R., Arkan, M.C., Bollrath, J., Hsu, L.C., Goode, J., Miething, C., Goktuna, S.I., Neuenhahn, M., Fierer, J., Paxian, S., Van Rooijen, N., Xu, Y., O'Cain, T., Jaffee, B.B., Busch, D.H., Duyster, J., Schmid, R.M., Eckmann, L. & Karin, M. (2007) NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell*, **130**(5), 918-931.
- Gross, O., Poeck, H., Bscheider, M., Dostert, C., Hanneschlager, N., Endres, S., Hartmann, G., Tardivel, A., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Mocsai, A., Tschopp, J. & Ruland, J. (2009) Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature*, **459**(7245), 433-436.
- Gu, Y., Kuida, K., Tsutsui, H., Ku, G., Hsiao, K., Fleming, M.A., Hayashi, N., Higashino, K., Okamura, H., Nakanishi, K., Kurimoto, M., Tanimoto, T., Flavell, R.A., Sato, V., Harding, M.W., Livingston, D.J. & Su, M.S. (1997) Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science*, **275**(5297), 206-209.
- Guma, M., Ronacher, L., Liu-Bryan, R., Takai, S., Karin, M. & Corr, M. (2009) Caspase 1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation. *Arthritis Rheum*, **60**(12), 3642-3650.
- Guyer, D.M., Henderson, I.R., Nataro, J.P. & Mobley, H.L. (2000) Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic Escherichia coli. *Mol Microbiol*, **38**(1), 53-66.
- Harder, J., Franchi, L., Munoz-Planillo, R., Park, J.H., Reimer, T. & Nunez, G. (2009) Activation of the Nlrp3 inflammasome by Streptococcus pyogenes requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor. *J Immunol*, **183**(9), 5823-5829.
- Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guiet, C., Briere, F., Vlach, J., Lebecque, S., Trinchieri, G. & Bates, E.E. (2005) Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol*, **174**(5), 2942-2950.
- Hashimoto, C., Hudson, K.L. & Anderson, K.V. (1988) The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, **52**(2), 269-279.

- Hellmich, K.A., Levinsohn, J.L., Fattah, R., Newman, Z.L., Maier, N., Sastalla, I., Liu, S., Leppla, S.H. & Moayeri, M. (2012) Anthrax lethal factor cleaves mouse nlrp1b in both toxin-sensitive and toxin-resistant macrophages. *PLoS One*, **7**(11), e49741.
- Hornig, T., Barton, G.M., Flavell, R.A. & Medzhitov, R. (2002) The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature*, **420**(6913), 329-333.
- Hornig, T., Barton, G.M. & Medzhitov, R. (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol*, **2**(9), 835-841.
- Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D.R., Latz, E. & Fitzgerald, K.A. (2009) AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*, **458**(7237), 514-518.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A. & Latz, E. (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*, **9**(8), 847-856.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., Endres, S. & Hartmann, G. (2006) 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*, **314**(5801), 994-997.
- Hornung, V. & Latz, E. (2010) Intracellular DNA recognition. *Nat Rev Immunol*, **10**(2), 123-130.
- Hou, F., Sun, L., Zheng, H., Skaug, B., Jiang, Q.X. & Chen, Z.J. (2011) MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell*, **146**(3), 448-461.
- Huang, M.T., Taxman, D.J., Holley-Guthrie, E.A., Moore, C.B., Willingham, S.B., Madden, V., Parsons, R.K., Featherstone, G.L., Arnold, R.R., O'Connor, B.P. & Ting, J.P. (2009) Critical role of apoptotic speck protein containing a caspase recruitment domain (ASC) and NLRP3 in causing necrosis and ASC speck formation induced by *Porphyromonas gingivalis* in human cells. *J Immunol*, **182**(4), 2395-2404.
- Inohara, N., Koseki, T., Lin, J., del Peso, L., Lucas, P.C., Chen, F.F., Ogura, Y. & Nunez, G. (2000) An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem*, **275**(36), 27823-27831.
- Introna, M., Bast, R.C., Jr., Tannenbaum, C.S., Hamilton, T.A. & Adams, D.O. (1987) The effect of LPS on expression of the early "competence" genes JE and KC in murine peritoneal macrophages. *J Immunol*, **138**(11), 3891-3896.
- Iwasaki, A. & Medzhitov, R. (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*, **5**(10), 987-995.
- Jin, T., Perry, A., Jiang, J., Smith, P., Curry, J.A., Unterholzner, L., Jiang, Z., Horvath, G., Rathinam, V.A., Johnstone, R.W., Hornung, V., Latz, E., Bowie, A.G., Fitzgerald, K.A. & Xiao, T.S. (2012) Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity*, **36**(4), 561-571.
- Johnston, J.B., Barrett, J.W., Nazarian, S.H., Goodwin, M., Ricciuto, D., Wang, G. & McFadden, G. (2005) A poxvirus-encoded pyrin domain protein interacts with ASC-1 to inhibit host inflammatory and apoptotic responses to infection. *Immunity*, **23**(6), 587-598.
- Kagan, J.C. & Medzhitov, R. (2006) Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*, **125**(5), 943-955.
- Kahlenberg, J.M., Lundberg, K.C., Kertesz, S.B., Qu, Y. & Dubyak, G.R. (2005) Potentiation of caspase-1 activation by the P2X7 receptor is dependent on TLR signals and requires NF-kappaB-driven protein synthesis. *J Immunol*, **175**(11), 7611-7622.
- Kaisho, T. & Akira, S. (2003) Regulation of dendritic cell function through toll-like receptors. *Curr Mol Med*, **3**(8), 759-771.
- Kanneganti, T.D., Ozoren, N., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J.H., Franchi, L., Whitfield, J., Barchet, W., Colonna, M., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E.P., Akira, S. & Nunez, G. (2006) Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature*, **440**(7081), 233-236.
- Kaplan-Turkoz, B., Koelblen, T., Felix, C., Candusso, M.P., O'Callaghan, D., Vergunst, A.C. & Terradot, L. (2013) Structure of the Toll/interleukin 1 receptor (TIR) domain of the immunosuppressive *Brucella* effector BtpA/Btp1/TcpB. *FEBS Lett*, **587**(21), 3412-3416.

- Karasuyama, H. & Melchers, F. (1988) Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur J Immunol*, **18**(1), 97-104.
- Karin, M. & Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol*, **18**, 621-663.
- Kastner, D.L. (2005) Hereditary periodic fever syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 74-81.
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T. & Akira, S. (2008) Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*, **205**(7), 1601-1610.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S. (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, **11**(1), 115-122.
- Kawai, T. & Akira, S. (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, **11**(5), 373-384.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O. & Akira, S. (2005) IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol*, **6**(10), 981-988.
- Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Vande Walle, L., Louie, S., Dong, J., Newton, K., Qu, Y., Liu, J., Heldens, S., Zhang, J., Lee, W.P., Roose-Girma, M. & Dixit, V.M. (2011) Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*, **479**(7371), 117-121.
- Kayagaki, N., Wong, M.T., Stowe, I.B., Ramani, S.R., Gonzalez, L.C., Akashi-Takamura, S., Miyake, K., Zhang, J., Lee, W.P., Muszynski, A., Forsberg, L.S., Carlson, R.W. & Dixit, V.M. (2013) Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science*, **341**(6151), 1246-1249.
- Kenny, E.F. & O'Neill, L.A. (2008) Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. *Cytokine*, **43**(3), 342-349.
- Kim, S., Bauernfeind, F., Ablasser, A., Hartmann, G., Fitzgerald, K.A., Latz, E. & Hornung, V. (2010) *Listeria monocytogenes* is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. *Eur J Immunol*, **40**(6), 1545-1551.
- Kobayashi, K., Hernandez, L.D., Galan, J.E., Janeway, C.A., Jr., Medzhitov, R. & Flavell, R.A. (2002) IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, **110**(2), 191-202.
- Kobayashi, K.S. & van den Elsen, P.J. (2012) NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat Rev Immunol*, **12**(12), 813-820.
- Kofoed, E.M. & Vance, R.E. (2011) Innate immune recognition of bacterial ligands by NALPs determines inflammasome specificity. *Nature*, **477**(7366), 592-595.
- Kono, H. & Rock, K.L. (2008) How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*, **8**(4), 279-289.
- Kraemer, T.D., Quintanar Haro, O.D., Domann, E., Chakraborty, T. & Tchatalbachev, S. (2014) The TIR Domain Containing Locus of *Enterococcus faecalis* Is Predominant among Urinary Tract Infection Isolates and Downregulates Host Inflammatory Response. *Int J Microbiol*, **2014**, 918143.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259), 680-685.
- LaRock, C.N. & Cookson, B.T. (2012) The *Yersinia* virulence effector YopM binds caspase-1 to arrest inflammasome assembly and processing. *Cell Host Microbe*, **12**(6), 799-805.
- Latz, E., Xiao, T.S. & Stutz, A. (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*, **13**(6), 397-411.
- LeibundGut-Landmann, S., Waldburger, J.M., Krawczyk, M., Otten, L.A., Suter, T., Fontana, A., Acha-Orbea, H. & Reith, W. (2004) Mini-review: Specificity and expression of CLITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur J Immunol*, **34**(6), 1513-1525.

- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. & Hoffmann, J.A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, **86**(6), 973-983.
- Levinsohn, J.L., Newman, Z.L., Hellmich, K.A., Fattah, R., Getz, M.A., Liu, S., Sastalla, I., Leppla, S.H. & Moayeri, M. (2012) Anthrax lethal factor cleavage of Nlrp1 is required for activation of the inflammasome. *PLoS Pathog*, **8**(3), e1002638.
- Lin, S.C., Lo, Y.C. & Wu, H. (2010) Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*, **465**(7300), 885-890.
- Lin, Z., Lu, J., Zhou, W. & Shen, Y. (2012) Structural insights into TIR domain specificity of the bridging adaptor Mal in TLR4 signaling. *PLoS One*, **7**(4), e34202.
- Low, L.Y., Mukasa, T., Reed, J.C. & Pascual, J. (2007) Characterization of a TIR-like protein from *Paracoccus denitrificans*. *Biochem Biophys Res Commun*, **356**(2), 481-486.
- Luo, C., Hu, G.Q. & Zhu, H. (2009) Genome reannotation of *Escherichia coli* CFT073 with new insights into virulence. *BMC Genomics*, **10**, 552.
- Man, S.M., Hopkins, L.J., Nugent, E., Cox, S., Gluck, I.M., Tourlomousis, P., Wright, J.A., Cicuta, P., Monie, T.P. & Bryant, C.E. (2014) Inflammasome activation causes dual recruitment of NLRC4 and NLRP3 to the same macromolecular complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**(20), 7403-7408.
- Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D.M., Vucic, D., French, D.M., Lee, W.P., Roose-Girma, M., Erickson, S. & Dixit, V.M. (2004) Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*, **430**(6996), 213-218.
- Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M. & Dixit, V.M. (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, **440**(7081), 228-232.
- Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*, **10**(2), 417-426.
- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. & Tschopp, J. (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, **440**(7081), 237-241.
- Masters, J.R., Hepburn, P.J., Walker, L., Highman, W.J., Trejdosiewicz, L.K., Povey, S., Parkar, M., Hill, B.T., Riddle, P.R. & Franks, L.M. (1986) Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. *Cancer Res*, **46**(7), 3630-3636.
- Masters, S.L., Dunne, A., Subramanian, S.L., Hull, R.L., Tannahill, G.M., Sharp, F.A., Becker, C., Franchi, L., Yoshihara, E., Chen, Z., Mullooly, N., Mielke, L.A., Harris, J., Coll, R.C., Mills, K.H., Mok, K.H., Newsholme, P., Nunez, G., Yodoi, J., Kahn, S.E., Lavelle, E.C. & O'Neill, L.A. (2010) Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1beta in type 2 diabetes. *Nat Immunol*, **11**(10), 897-904.
- Medzhitov, R. & Janeway, C., Jr. (2000) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*, **173**, 89-97.
- Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, **296**(5566), 298-300.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C.A., Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, **388**(6640), 394-397.
- Miao, E.A., Alpuche-Aranda, C.M., Dors, M., Clark, A.E., Bader, M.W., Miller, S.I. & Aderem, A. (2006) Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol*, **7**(6), 569-575.
- Miao, E.A., Leaf, I.A., Treuting, P.M., Mao, D.P., Dors, M., Sarkar, A., Warren, S.E., Wewers, M.D. & Aderem, A. (2010) Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol*, **11**(12), 1136-1142.
- Miao, E.A., Mao, D.P., Yudkovsky, N., Bonneau, R., Lorang, C.G., Warren, S.E., Leaf, I.A. & Aderem, A. (2010) Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(7), 3076-3080.
- Mobley, H.L., Green, D.M., Trifillis, A.L., Johnson, D.E., Chippendale, G.R., Lockett, C.V., Jones, B.D. & Warren, J.W. (1990) Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human

- renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun*, **58**(5), 1281-1289.
- Monack, D.M., Navarre, W.W. & Falkow, S. (2001) Salmonella-induced macrophage death: the role of caspase-1 in death and inflammation. *Microbes Infect*, **3**(14-15), 1201-1212.
- Motshwene, P.G., Moncrieffe, M.C., Grossmann, J.G., Kao, C., Ayaluru, M., Sandercock, A.M., Robinson, C.V., Latz, E. & Gay, N.J. (2009) An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. *J Biol Chem*, **284**(37), 25404-25411.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263-273.
- Murakami, T., Ockinger, J., Yu, J., Byles, V., McColl, A., Hofer, A.M. & Horng, T. (2012) Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**(28), 11282-11287.
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P. & Dixit, V.M. (1997) IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*, **278**(5343), 1612-1615.
- Newman, R.M., Salunkhe, P., Godzik, A. & Reed, J.C. (2006) Identification and characterization of a novel bacterial virulence factor that shares homology with mammalian Toll/interleukin-1 receptor family proteins. *Infect Immun*, **74**(1), 594-601.
- Nour, A.M., Yeung, Y.G., Santambrogio, L., Boyden, E.D., Stanley, E.R. & Brojatsch, J. (2009) Anthrax lethal toxin triggers the formation of a membrane-associated inflammasome complex in murine macrophages. *Infect Immun*, **77**(3), 1262-1271.
- Nyman, T., Stenmark, P., Flodin, S., Johansson, I., Hammarstrom, M. & Nordlund, P. (2008) The crystal structure of the human toll-like receptor 10 cytoplasmic domain reveals a putative signaling dimer. *J Biol Chem*, **283**(18), 11861-11865.
- O'Neill, L.A., Fitzgerald, K.A. & Bowie, A.G. (2003) The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol*, **24**(6), 286-290.
- O'Neill, L.A., Golenbock, D. & Bowie, A.G. (2013) The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*, **13**(6), 453-460.
- Ohmori, Y. & Hamilton, T.A. (1994) Cell type and stimulus specific regulation of chemokine gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, **198**(2), 590-596.
- Ohnishi, H., Tochio, H., Kato, Z., Orii, K.E., Li, A., Kimura, T., Hiroaki, H., Kondo, N. & Shirakawa, M. (2009) Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**(25), 10260-10265.
- Oldenburg, M., Kruger, A., Ferstl, R., Kaufmann, A., Nees, G., Sigmund, A., Bathke, B., Lauterbach, H., Suter, M., Dreher, S., Koedel, U., Akira, S., Kawai, T., Buer, J., Wagner, H., Bauer, S., Hochrein, H. & Kirschning, C.J. (2012) TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science*, **337**(6098), 1111-1115.
- Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M. & Seya, T. (2003) TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem*, **278**(50), 49751-49762.
- Palsson-McDermott, E.M., Doyle, S.L., McGettrick, A.F., Hardy, M., Husebye, H., Banahan, K., Gong, M., Golenbock, D., Espevik, T. & O'Neill, L.A. (2009) TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway. *Nat Immunol*, **10**(6), 579-586.
- Pelegrin, P. & Surprenant, A. (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J*, **25**(21), 5071-5082.
- Pelegrin, P. & Surprenant, A. (2007) Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway. *J Biol Chem*, **282**(4), 2386-2394.
- Petrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F. & Tschopp, J. (2007) Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ*, **14**(9), 1583-1589.

- Piao, W., Song, C., Chen, H., Wahl, L.M., Fitzgerald, K.A., O'Neill, L.A. & Medvedev, A.E. (2008) Tyrosine phosphorylation of MyD88 adapter-like (Mal) is critical for signal transduction and blocked in endotoxin tolerance. *J Biol Chem*, **283**(6), 3109-3119.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.P., Naslund, T.I., Liljestrom, P., Weber, F. & Reis e Sousa, C. (2006) RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*, **314**(5801), 997-1001.
- Poeck, H., Bscheider, M., Gross, O., Finger, K., Roth, S., Rebsamen, M., Hanneschlager, N., Schlee, M., Rothenfusser, S., Barchet, W., Kato, H., Akira, S., Inoue, S., Endres, S., Peschel, C., Hartmann, G., Hornung, V. & Ruland, J. (2010) Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production. *Nat Immunol*, **11**(1), 63-69.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. & Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, **282**(5396), 2085-2088.
- Potocky, T.B., Menon, A.K. & Gellman, S.H. (2003) Cytoplasmic and nuclear delivery of a TAT-derived peptide and a beta-peptide after endocytic uptake into HeLa cells. *J Biol Chem*, **278**(50), 50188-50194.
- Poyet, J.L., Srinivasula, S.M., Tnani, M., Razmara, M., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E.S. (2001) Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J Biol Chem*, **276**(30), 28309-28313.
- Proell, M., Gerlic, M., Mace, P.D., Reed, J.C. & Riedl, S.J. (2013) The CARD plays a critical role in ASC foci formation and inflammasome signalling. *Biochem J*, **449**(3), 613-621.
- Radhakrishnan, G.K., Harms, J.S. & Splitter, G.A. (2011) Modulation of microtubule dynamics by a TIR domain protein from the intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Biochem J*, **439**(1), 79-83.
- Radhakrishnan, G.K., Yu, Q., Harms, J.S. & Splitter, G.A. (2009) *Brucella* TIR Domain-containing Protein Mimics Properties of the Toll-like Receptor Adaptor Protein TIRAP. *J Biol Chem*, **284**(15), 9892-9898.
- Raetz, M., Kibardin, A., Sturge, C.R., Pifer, R., Li, H., Burstein, E., Ozato, K., Larin, S. & Yarovinsky, F. (2013) Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-dependent IL-12 response to *Toxoplasma gondii* profilin. *J Immunol*, **191**(9), 4818-4827.
- Rathinam, V.A., Jiang, Z., Waggoner, S.N., Sharma, S., Cole, L.E., Waggoner, L., Vanaja, S.K., Monks, B.G., Ganesan, S., Latz, E., Hornung, V., Vogel, S.N., Szomolanyi-Tsuda, E. & Fitzgerald, K.A. (2010) The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol*, **11**(5), 395-402.
- Rathinam, V.A., Vanaja, S.K. & Fitzgerald, K.A. (2012) Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol*, **13**(4), 333-342.
- Rathinam, V.A., Vanaja, S.K., Waggoner, L., Sokolovska, A., Becker, C., Stuart, L.M., Leong, J.M. & Fitzgerald, K.A. (2012) TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. *Cell*, **150**(3), 606-619.
- Rayamajhi, M., Zhang, Y. & Miao, E.A. (2013) Detection of pyroptosis by measuring released lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol*, **1040**, 85-90.
- Regan, T., Nally, K., Carmody, R., Houston, A., Shanahan, F., Macsharry, J. & Brint, E. (2013) Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to *Listeria monocytogenes* in intestinal epithelial cells and macrophages. *J Immunol*, **191**(12), 6084-6092.
- Ritter, M., Gross, O., Kays, S., Ruland, J., Nimmerjahn, F., Saijo, S., Tschopp, J., Layland, L.E. & Prazeres da Costa, C. (2010) *Schistosoma mansoni* triggers Dectin-2, which activates the Nlrp3 inflammasome and alters adaptive immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(47), 20459-20464.
- Roberts, T.L., Idris, A., Dunn, J.A., Kelly, G.M., Burnton, C.M., Hodgson, S., Hardy, L.L., Garceau, V., Sweet, M.J., Ross, I.L., Hume, D.A. & Stacey, K.J. (2009) HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science*, **323**(5917), 1057-1060.

- Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A. & Bazan, J.F. (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(2), 588-593.
- Rothenfusser, S., Goutagny, N., DiPerna, G., Gong, M., Monks, B.G., Schoenemeyer, A., Yamamoto, M., Akira, S. & Fitzgerald, K.A. (2005) The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol*, **175**(8), 5260-5268.
- Ruben, S., Perkins, A., Purcell, R., Joung, K., Sia, R., Burghoff, R., Haseltine, W.A. & Rosen, C.A. (1989) Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol*, **63**(1), 1-8.
- Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M.H., Uematsu, S., Yang, B.G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., Tanaka, K., Kawai, T., Tsujimura, T., Takeuchi, O., Yoshimori, T. & Akira, S. (2008) Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nature*, **456**(7219), 264-268.
- Salcedo, S.P., Marchesini, M.I., Lelouard, H., Fugier, E., Jolly, G., Balor, S., Muller, A., Lapaque, N., Demaria, O., Alexopoulou, L., Comerci, D.J., Ugalde, R.A., Pierre, P. & Gorvel, J.P. (2008) Brucella control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS Pathog*, **4**(2), e21.
- Sander, L.E., Davis, M.J., Boekschoten, M.V., Amsen, D., Dascher, C.C., Ryffel, B., Swanson, J.A., Muller, M. & Blander, J.M. (2011) Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature*, **474**(7351), 385-389.
- Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O. & Akira, S. (2005) Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol*, **6**(11), 1087-1095.
- Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K. & Akira, S. (2003) Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$  (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF- $\kappa$ B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*, **171**(8), 4304-4310.
- Satoh, T., Kato, H., Kumagai, Y., Yoneyama, M., Sato, S., Matsushita, K., Tsujimura, T., Fujita, T., Akira, S. & Takeuchi, O. (2010) LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(4), 1512-1517.
- Savina, A. & Amigorena, S. (2007) Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev*, **219**, 143-156.
- Schmidt, T.G. & Skerra, A. (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng*, **6**(1), 109-122.
- Schotte, P., Denecker, G., Van Den Broeke, A., Vandenabeele, P., Cornelis, G.R. & Beyaert, R. (2004) Targeting Rac1 by the *Yersinia* effector protein YopE inhibits caspase-1-mediated maturation and release of interleukin-1 $\beta$ . *J Biol Chem*, **279**(24), 25134-25142.
- Schroder, K. & Tschopp, J. (2010) The inflammasomes. *Cell*, **140**(6), 821-832.
- Sengupta, D., Koblansky, A., Gaines, J., Brown, T., West, A.P., Zhang, D., Nishikawa, T., Park, S.G., Roop, R.M., 2nd & Ghosh, S. (2010) Subversion of innate immune responses by *Brucella* through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL. *J Immunol*, **184**(2), 956-964.
- Shinkai, K., McCalmont, T.H. & Leslie, K.S. (2008) Cryopyrin-associated periodic syndromes and autoinflammation. *Clin Exp Dermatol*, **33**(1), 1-9.
- Snyder, G.A., Cirl, C., Jiang, J., Chen, K., Waldhuber, A., Smith, P., Rommler, F., Snyder, N., Fresquez, T., Durr, S., Tjandra, N., Miethke, T. & Xiao, T.S. (2013) Molecular mechanisms for the subversion of MyD88 signaling by TcpC from virulent uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**(17), 6985-6990.
- Snyder, G.A., Deredge, D., Waldhuber, A., Fresquez, T., Wilkins, D.Z., Smith, P.T., Durr, S., Cirl, C., Jiang, J., Jennings, W., Luchetti, T., Snyder, N., Sundberg, E.J., Wintrode, P., Miethke, T. & Xiao, T.S. (2014) Crystal structures of the Toll/Interleukin-1 receptor (TIR) domains from the *Brucella* protein TcpB and host adaptor TIRAP reveal mechanisms of molecular mimicry. *J Biol Chem*, **289**(2), 669-679.

- Spear, A.M., Loman, N.J., Atkins, H.S. & Pallen, M.J. (2009) Microbial TIR domains: not necessarily agents of subversion? *Trends Microbiol*, **17**(9), 393-398.
- Spear, A.M., Rana, R.R., Jenner, D.C., Flick-Smith, H.C., Oyston, P.C., Simpson, P., Matthews, S.J., Byrne, B. & Atkins, H.S. (2012) A Toll/interleukin (IL)-1 receptor domain protein from *Yersinia pestis* interacts with mammalian IL-1/Toll-like receptor pathways but does not play a central role in the virulence of *Y. pestis* in a mouse model of bubonic plague. *Microbiology*, **158**(Pt 6), 1593-1606.
- Stahl, P.D. & Ezekowitz, R.A. (1998) The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol*, **10**(1), 50-55.
- Stamm, W.E. & Norrby, S.R. (2001) Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J Infect Dis*, **183 Suppl 1**, S1-4.
- Stutz, A., Horvath, G.L., Monks, B.G. & Latz, E. (2013) ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. *Methods Mol Biol*, **1040**, 91-101.
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J. & et al. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, **356**(6372), 768-774.
- Ting, J.P., Duncan, J.A. & Lei, Y. (2010) How the noninflammasome NLRs function in the innate immune system. *Science*, **327**(5963), 286-290.
- Ting, J.P., Lovering, R.C., Alnemri, E.S., Bertin, J., Boss, J.M., Davis, B.K., Flavell, R.A., Girardin, S.E., Godzik, A., Harton, J.A., Hoffman, H.M., Hugot, J.P., Inohara, N., Mackenzie, A., Maltais, L.J., Nunez, G., Ogura, Y., Otten, L.A., Philpott, D., Reed, J.C., Reith, W., Schreiber, S., Steimle, V. & Ward, P.A. (2008) The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity*, **28**(3), 285-287.
- Underhill, D.M. & Ozinsky, A. (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*, **20**, 825-852.
- Underhill, D.M., Ozinsky, A., Hajjar, A.M., Stevens, A., Wilson, C.B., Bassetti, M. & Aderem, A. (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, **401**(6755), 811-815.
- Unlu, S., Kumar, A., Waterman, W.R., Tsukada, J., Wang, K.Z., Galson, D.L. & Auron, P.E. (2007) Phosphorylation of IRF8 in a pre-associated complex with Spi-1/PU.1 and non-phosphorylated Stat1 is critical for LPS induction of the IL1B gene. *Mol Immunol*, **44**(13), 3364-3379.
- Vabulas, R.M., Wagner, H. & Schild, H. (2002) Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr Top Microbiol Immunol*, **270**, 169-184.
- Valkov, E., Stamp, A., Dimaio, F., Baker, D., Verstak, B., Roversi, P., Kellie, S., Sweet, M.J., Mansell, A., Gay, N.J., Martin, J.L. & Kobe, B. (2011) Crystal structure of Toll-like receptor adaptor MAL/TIRAP reveals the molecular basis for signal transduction and disease protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**(36), 14879-14884.
- Venkataraman, T., Valdes, M., Elsby, R., Kakuta, S., Caceres, G., Saijo, S., Iwakura, Y. & Barber, G.N. (2007) Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J Immunol*, **178**(10), 6444-6455.
- Voss, S. & Skerra, A. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng*, **10**(8), 975-982.
- Wald, D., Qin, J., Zhao, Z., Qian, Y., Naramura, M., Tian, L., Towne, J., Sims, J.E., Stark, G.R. & Li, X. (2003) SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol*, **4**(9), 920-927.
- Welch, R.A., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E.L., Liou, S.R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G.F., Rose, D.J., Zhou, S., Schwartz, D.C., Perna, N.T., Mobley, H.L., Donnenberg, M.S. & Blattner, F.R. (2002) Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(26), 17020-17024.
- Wright, K.J., Seed, P.C. & Hultgren, S.J. (2007) Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell Microbiol*, **9**(9), 2230-2241.

- Wu, J., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E.S. (2010) Involvement of the AIM2, NLRC4, and NLRP3 inflammasomes in caspase-1 activation by *Listeria monocytogenes*. *J Clin Immunol*, **30**(5), 693-702.
- Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J.L. & Tong, L. (2000) Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*, **408**(6808), 111-115.
- Yadav, M., Zhang, J., Fischer, H., Huang, W., Lutay, N., Cirl, C., Lum, J., Miethke, T. & Svanborg, C. (2010) Inhibition of TIR domain signaling by TcpC: MyD88-dependent and independent effects on *Escherichia coli* virulence. *PLoS Pathog*, **6**(9), e1001120.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. & Akira, S. (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, **301**(5633), 640-643.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K. & Akira, S. (2002) Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*, **420**(6913), 324-329.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K. & Akira, S. (2003) TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol*, **4**(11), 1144-1150.
- Yazdi, A.S., Guarda, G., Riteau, N., Drexler, S.K., Tardivel, A., Couillin, I. & Tschopp, J. (2010) Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**(45), 19449-19454.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. & Fujita, T. (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*, **5**(7), 730-737.
- Young, J.L., Sukhova, G.K., Foster, D., Kisiel, W., Libby, P. & Schonbeck, U. (2000) The serpin proteinase inhibitor 9 is an endogenous inhibitor of interleukin 1beta-converting enzyme (caspase-1) activity in human vascular smooth muscle cells. *J Exp Med*, **191**(9), 1535-1544.
- Zamboni, D.S., Kobayashi, K.S., Kohlsdorf, T., Ogura, Y., Long, E.M., Vance, R.E., Kuida, K., Mariathasan, S., Dixit, V.M., Flavell, R.A., Dietrich, W.F. & Roy, C.R. (2006) The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nat Immunol*, **7**(3), 318-325.
- Zeng, W., Sun, L., Jiang, X., Chen, X., Hou, F., Adhikari, A., Xu, M. & Chen, Z.J. (2010) Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. *Cell*, **141**(2), 315-330.
- Zhang, L. & Foxman, B. (2003) Molecular epidemiology of *Escherichia coli* mediated urinary tract infections. *Front Biosci*, **8**, e235-244.
- Zhao, Y., Yang, J., Shi, J., Gong, Y.N., Lu, Q., Xu, H., Liu, L. & Shao, F. (2011) The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature*, **477**(7366), 596-600.
- Zhong, Y., Kinio, A. & Saleh, M. (2013) Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front Immunol*, **4**, 333.
- Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P. & Tschopp, J. (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, **469**(7329), 221-225.

## 8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Prof. Dr. Thomas Miethke für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit bei ihm zu schreiben. Ich danke ihm ganz herzlich für seine Unterstützung, die ausgezeichnete Betreuung, die Diskussionsbereitschaft sowie das entgegengebrachte Vertrauen.

Desweiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Dirk Busch für die Möglichkeit danken, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rudi Vogel, der sich bereit erklärt hat, die Betreuung meiner Arbeit seitens des Wissenschaftszentrums Weihenstephan zu übernehmen.

Bedanken möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen meiner Arbeitsgruppe und allen Mitarbeitern des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft, für inhaltliche Diskussionen, Anregungen und das sehr angenehme, kollegiale und fröhliche Arbeitsklima.

Vor allem bei Susi Dürr, Tanja Ertl und Dr. Christine Cirl, die mir am Anfang dieser Arbeit wertvolle Tricks in Sachen Transfektion, Proteinexpression und Infektionen aller Art geben konnten. Danke an Susi für die vielen Plasmide, die schönen Konfokalmikroskopie Bilder und die Hilfe bei Computer Problemen. Danke an Tina Müller für die moralische Unterstützung, die Hilfsbereitschaft bei allem, die selbstgemachten Marmeladen und die aufmunternden Worte. Auch bei Monika Hammel möchte ich mich für ihre große Unterstützung bei Zytokin Messungen und Zellkulturarbeiten bedanken, für die ausgezeichnete Laborplatznachbarschaft und die vorbildliche Pflege von Rocky und der Prima Donna. Dr. Franziska Römmler möchte ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit im PMT Projekt, die zahlreichen Diskussionen in Kombination mit seelischem Beistand (vor unseren Vorträgen) und ihre persönliche Freundschaft danken.

Bei Dr. Ronny Milde, Julia Ritter, Dr. Patrick Rämer und allen Mitgliedern der AG Verschoor möchte ich mich ganz herzlich für die Hilfe bei den Mäusen und beim Mikroskopieren bedanken und natürlich für die lustigen Mittagspausen und die freitäglichen Löschzwerge und weiteren CO<sub>2</sub>-enthaltenden Getränken in Gesellschaft der AG Busch und AG Schiemann.

Nicht vergessen möchte ich Raphaela Semper, Dr. Manuel Ritter und die AG Gross für die Bereitstellung der Inflammasom Mäuse und Dr. Christian Bolz und Tobias Kruse für die Hilfe bei Äkta Problemen. Dr. Stefan Dreher danke ich für seine wertvollen Immunopräzipitations Tipps und den Vektoren für die Luziferase Assays.

Natürlich den besten Eltern der Welt, meinen Schwestern Katharina und Sophie und meinen Freunden für die Unterstützung in allen Lebenslagen, Liebe, Vertrauen und die Hilfe bei großen und kleinen Sorgen.

Der größte Dank gilt meinem Mann Markus. Er hat nicht nur diese Arbeit Kapitel für Kapitel Korrektur gelesen, sondern er hat mich tapfer ertragen, mich mit bestem Essen bei Laune gehalten, wusste mich in den richtigen Momenten zu motivieren und hat immer an mich geglaubt. Danke!!