

Eine Interaktionsanalyse des Nod-like-Rezeptors NLRP7

Interdomän-spezifische Analysen und die Identifizierung
neuer Proteininteraktionen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Heike Singer

aus

Gummersbach

Bonn, Mai 2014

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

- 1. Gutachter:** Priv. Doz. Dr. Osman El-Maarri
- 2. Gutachter:** Prof. Dr. med. Joachim L. Schultze

Tag der Promotion: 10.11.2014

Erscheinungsjahr: 2015

Erklärung zur Urheberschaft

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Ich habe keinerlei andere als die angegebenen Hilfsmittel verwendet. Jegliches direkt oder indirekt übernommenes Gedankengut wurde nach bestem Wissen und Gewissen kenntlich gemacht.

Ferner erkläre ich hiermit, dass diese vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation vorgelegt worden ist.

Bonn, den 12.05.2014

Heike Singer

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Zusammenfassung | 1 |
| Summary | 3 |
| 1 Einleitung | 5 |
| 1.1 Villöse Trophoblastenerkrankungen | 5 |
| 1.1.1 Sporadische Blasenmole | 5 |
| 1.1.1.1 <i>Partialmole</i> | 6 |
| 1.1.1.2 <i>Blasenmole (komplette Mole)</i> | 7 |
| 1.1.2 Rezidivierende biparentale Blasenmole (BiBM) | 7 |
| 1.2 Der Nod-like Rezeptor NLRP7 | 10 |
| 1.2.1 Struktur und Effektor-domänen von NLRP7 | 10 |
| 1.2.2 Bekannte Funktionen von NLRP7 | 12 |
| 1.2.3 Das NLRP7 Inflammasom | 13 |
| 1.2.4 Zelluläre Lokalisation und Expression von NLRP7 | 16 |
| 1.3 NLR-Proteine und ihre Rolle in der Fortpflanzung und Entwicklung | 17 |
| 1.3.1 NLRP5 | 17 |
| 1.3.2 NLRP2 | 17 |
| 1.3.3 NLRP14 | 18 |
| 1.4 KH domain containing 3-like (KHDC3L) | 18 |
| 1.5 Epigenetik und BiBM | 19 |
| 1.5.1 Epigenetik | 19 |
| 1.5.1.1 <i>DNA-Methylierung</i> | 20 |
| 1.5.1.2 <i>Histonmodifikationen</i> | 21 |
| 1.5.1.3 <i>Epigenetik in Keimzellen</i> | 22 |
| 1.5.2 Deregulation multipler Imprinting-Loci bei BiBM | 23 |
| 1.6 Die Zwei Treffer-Hypothese | 26 |
| 1.7 Zielsetzung und Vorgehen | 27 |
| 2 Material und Methoden | 28 |
| 2.1 Material | 28 |
| 2.1.1 Reagenzien und Chemikalien | 28 |
| 2.1.2 Laborgeräte | 30 |
| 2.1.3 Verbrauchsmaterialien | 31 |
| 2.1.4 Kommerzielle Anwendungs-Kits | 32 |
| 2.1.5 Vektoren | 32 |
| 2.1.6 Längenstandards | 33 |
| 2.1.7 Puffer und Lösungen | 33 |
| 2.1.8 Enzyme | 34 |
| 2.1.9 Primärantikörper | 34 |
| 2.1.10 Sekundärantikörper | 35 |
| 2.1.11 Verwendetes biologisches Material | 35 |
| 2.1.12 Medien für Bakterienkultur | 36 |
| 2.1.13 Medien für Hefekultur | 36 |
| 2.1.14 Medien für Zellkultur | 37 |
| 2.1.15 Oligonukleotide | 37 |
| 2.1.16 Programme | 38 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.2 | Methoden | 39 |
| 2.2.1 | Molekularbiologische Methoden | 39 |
| 2.2.1.1 | <i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i> | 39 |
| 2.2.1.2 | <i>Gezielte Mutagenese</i> | 40 |
| 2.2.1.3 | <i>Agarose-Gelelektrophorese</i> | 41 |
| 2.2.1.4 | <i>DNA-Isolation aus Agarosegelen</i> | 42 |
| 2.2.1.5 | <i>Sequenzierung</i> | 42 |
| 2.2.1.6 | <i>Klonierung</i> | 44 |
| | Gateway Klonierungs-Technologie | 44 |
| | Restriktionsfreies Klonieren | 47 |
| 2.2.1.7 | <i>DpnI Verdau</i> | 49 |
| 2.2.1.8 | <i>Transformation in E.coli</i> | 49 |
| 2.2.1.9 | <i>Plasmid-Präparation</i> | 50 |
| 2.2.1.10 | <i>Bestimmung der DNA-Konzentration</i> | 50 |
| 2.2.1.11 | <i>Bisulfit Konversion der DNA</i> | 50 |
| 2.2.1.12 | <i>BiHot PCR</i> | 53 |
| 2.2.2 | Zellbiologische Methoden | 54 |
| 2.2.2.1 | <i>Kultivierung von human embryonic kidney Zellen (HEK293T)</i> | 54 |
| 2.2.2.2 | <i>Subkultivierung von HEK293T Zellen</i> | 54 |
| 2.2.2.3 | <i>Langzeitlagerung von HEK293T Zellen</i> | 54 |
| 2.2.2.4 | <i>Zellzahlbestimmung</i> | 55 |
| 2.2.2.5 | <i>Transfektion</i> | 55 |
| 2.2.3 | Hefe Di-Hybrid-System | 56 |
| 2.2.3.1 | <i>Kultivierung von Hefezellen</i> | 56 |
| 2.2.3.2 | <i>Präparation kompetenter Hefezellen</i> | 57 |
| 2.2.3.3 | <i>Transformation von Hefezellen</i> | 57 |
| 2.2.3.4 | <i>Identifikation interagierender Proteine mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System</i> | 57 |
| 2.2.4 | Proteinbiochemische Methoden | 58 |
| 2.2.4.1 | <i>SDS-PAGE</i> | 58 |
| 2.2.4.2 | <i>Immunopräzipitation</i> | 60 |
| 2.2.4.3 | <i>Blue-Native-PAGE</i> | 60 |
| 2.2.5 | Konfokale Laser-Rastermikroskopie | 63 |
| 2.2.6 | Pyrosequenzieren | 65 |
| 2.2.6.1 | <i>Die Pyrosequenzier-Reaktion</i> | 65 |
| 2.2.6.2 | <i>Einzelstrang-Präparation für die Pyrosequenzierreaktion</i> | 66 |
| 2.2.7 | SIRPH (SNuPE-IP RP HPLC)-Analyse | 68 |
| 2.2.7.1 | <i>SNuPE (Single Nukleotid Primer Extension)</i> | 68 |
| 2.2.7.2 | <i>IP-RP-HPLC</i> | 69 |
| 2.2.8 | Protein Modellierung | 70 |
| 3 | Ergebnisse | 71 |
| 3.1 | Oligomerisierung von NLRP7 | 71 |
| 3.1.1 | Hefe Di-Hybrid Interaktionsanalysen zur Charakterisierung der Oligomerisierungs-Schnittstellen von NLRP7 | 71 |
| 3.1.2 | Untersuchung von 3 BiBM-assoziierten Mutationen und einem non-synonymen SNP mit dem Hefe-Di-Hybrid System und deren Einfluss auf die Oligomerisierung von NLRP7 | 74 |
| 3.1.3 | Verifizierung der NLRP7 Hefe Di-Hybrid Interaktion zwischen der NAD-Domäne und dem Deletions-Konstrukt Δ LRR über Immunopräzipitation | 76 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.1.4 | Ein APAF1 basiertes „ <i>in silico</i> “ Modell von NLRP7 und dessen Aktivierung | 77 |
| 3.1.5 | Der Einfluss BiBM-assoziiertes NLRP7-Mutationen auf die zelluläre Lokalisation des Proteins | 80 |
| 3.1.6 | Identifizierung der juxt nukleären NLRP7-Aggregate nach transienter Transfektion | 83 |
| 3.1.7 | <i>In silico</i> Analyse der BiBM-assoziierten NLRP7-Mutationen und ihr möglicher Einfluss auf die Oligomerisierung | 85 |
| 3.2 | ZBTB16 als neuer potentieller Interaktionspartner von NLRP7 | 87 |
| 3.2.1 | Kommerzielle Hefe Di-Hybrid Analysen zur Identifizierung neuer Interaktionspartner | 87 |
| 3.2.2 | Verifizierung des potentiellen Interaktionspartner ZBTB16 und Lokalisierung der Interaktions-Schnittstellen zwischen NLRP7 und ZBTB16 mit dem Hefe Di-Hybrid System | 88 |
| 3.2.3 | Interaktionsanalyse zwischen NLRP7 und KHDC3L mit dem Hefe Di-Hybrid System | 90 |
| 3.2.4 | Einfluss der BiBM-assoziierten NLRP7-Mutationen auf die Interaktion mit ZBTB16 | 91 |
| 3.2.5 | Verifizierung der Hefe-Di-Hybrid Interaktion zwischen NLRP7 und ZBTB16 mittels Immunopräzipitation | 92 |
| 3.2.5.1 | ZBTB16 interagiert mit der NACHT-Domäne von NLRP7 | 93 |
| 3.2.5.2 | ZBTB16 bindet mit N- und C-terminalen Regionen an NLRP7 | 95 |
| 3.2.6 | Nachweis von NLRP7 und ZBTB16 in einem Multiproteinkomplex | 99 |
| 3.2.7 | Kolokalisations-Analysen von NLRP7 und ZBTB16 in HEK293T- Zellen mittels konfokaler Mikroskopie | 100 |
| 3.2.8 | Kolokalisations-Analysen von NLRP7 und KHDC3L in HEK293T-Zellen mittels konfokaler Mikroskopie | 106 |
| 3.2.9 | SIRPH-Analysen der Imprinting-Loci <i>H19</i> , <i>PEG3</i> , <i>NESP55</i> und <i>SNRPN</i> nach transienter Transfektion von NLRP7 und ZBTB16 in HEK293T-Zellen | 107 |
| 3.2.10 | Imprinting-Analyse der BiBM-assoziierten Mutationen R693P und R693W nach transienter Transfektion in HEK293T-Zellen mit der Pyrosequenzier-Methode | 111 |
| 4 | Diskussion | 113 |
| 4.1 | Aktivierung und Oligomerisierung von NLRP7 | 113 |
| 4.1.1 | Die NAD-Domäne induziert die Oligomerisierung von NLRP7 | 113 |
| 4.1.2 | Eine <i>in silico</i> -Analyse BiBM-assoziiertes Missense-Mutationen und ihre Auswirkungen auf die Proteinstruktur von NLRP7 | 116 |
| 4.1.3 | Die Regulation von NLRP7 über das Aggresom: Ein pathologischer oder physiologischer Mechanismus? | 118 |
| 4.2 | ZBTB16 als neuer potentieller Interaktionspartner von NLRP7 | 121 |
| 4.2.1 | ZBTB16 interagiert nur mit der aktivierten Form von NLRP7 | 121 |
| 4.2.2 | NLRP7 und ZBTB16 zeigen eine falsch positive Kolokalisation in den nukleären Speckles | 123 |
| 4.2.3 | NLRP7 und ZBTB16 kolokalisieren in juxt nukleären Aggregaten im Zytoplasma | 125 |
| 4.2.4 | BiBM: Ein defekter Imprintingmechanismus in <i>trans</i> ? | 126 |
| 5 | Fazit und Ausblick | 129 |
| | Literaturverzeichnis | 130 |

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Abbildungsverzeichnis | 138 |
| Abkürzungsverzeichnis | 141 |
| Aminosäurencode | 142 |
| Anhang | 143 |
| A.1 Tabellen | 143 |
| A.2 Primersequenzen | 147 |
| A.3 Vektorkarten | 155 |
| Publikationsverzeichnis..... | 158 |

Zusammenfassung

Mutationen in NLRP7 (NOD-Like Receptor family, pyrin domain containing 7) sind für das wiederholte Auftreten von biparentalen Blasenmolen (BiBMs) verantwortlich. Typische Merkmale dieser abnormalen Schwangerschaft sind ein übermäßiges Wachstum der Plazenta, eine gestörte Entwicklung bis hin zu einem fehlenden Embryo und ein verändertes Imprintingmuster an multiplen Imprinting-Loci. Bislang wurde noch nicht geklärt, ob sich der Imprinting-Defekt vor oder nach der Befruchtung entwickelt. Unsere Gruppe konnte zeigen, dass es sich bevorzugt um einen Defekt auf dem maternalen Allel handelt. Dies könnte auf eine Störung in der Etablierung des Imprints während der maternalen Gametogenese hinweisen. Aufgrund von fehlenden Informationen über die Funktion von NLRP7 während der Gameto- und Embryogenese konnte der Zusammenhang zwischen Geno- und Phänotyp der BiBM bislang nicht geklärt werden.

In dem ersten Teil dieser Dissertation wurde eine interdomän-spezifische Hefe Di-Hybrid-Analyse mit dem NLRP7-Protein durchgeführt, um vermeintliche Interaktionen der einzelnen Domänen während der Oligomerisierung ausfindig zu machen. Zusätzlich wurde ein *in silico*-Proteinmodell von NLRP7 in seiner inaktiven und aktivierten Form generiert um dieses mit den Interaktionen der Hefe Di-Hybrid-Analyse zu vergleichen. Die Ergebnisse beider Untersuchungen zeigten, dass die NAD-Domäne eine zentrale Rolle in dem Prozess der Oligomerisierung von NLRP7 spielt. Weiterhin wurde mittels konfokaler Mikroskopie ein pathophysiologischer Effekt bei zwei BiBM-assoziierten Missense-Mutationen und einem nicht-synonymen Single Nucleotide Polymorphism (nsSNP) nach transienter Transfektion in HEK293T-Zellen beobachtet und mit Hilfe von *in silico*-Analysen bewertet. Die Ergebnisse präsentieren Einblicke in die strukturellen inter-/intradomän-spezifischen Konformationsänderungen während der Aktivierung und nachfolgenden Oligomerisierung von NLRP7. Die in dieser Arbeit untersuchten Missense-Mutationen beeinflussen die intrazelluläre Formation eines Aggresoms, welches dadurch mögliche nachfolgende Signalwege stören und damit für einen der pathophysiologischen molekularen Effekte in BiBM verantwortlich sein könnte.

Der zweite Teil dieser Dissertation präsentiert den Transkriptions-Repressor ZBTB16 als neuen Interaktionspartner von NLRP7. Eine Hefe Di-Hybrid-Analyse von NLRP7 gegen eine ovarielle Transkriptbibliothek identifizierte eine Interaktion mit der C-

terminalen Zinkfinger-Domäne von ZBTB16. Die Interaktion wurde mittels Immunopräzipitation und konfokaler Mikroskopie in Säugerzellen bestätigt. Interaktions-Untersuchungen zwischen verschiedenen Deletionskonstrukten beider Proteine identifizierten multiple Interaktionsabschnitte von ZBTB16, welche vorwiegend mit der NACHT-Domäne von NLRP7 interagieren. Eine native Gelelektrophorese zeigte, dass beide Proteine Teil eines hochmolekularen, 480 kD großen Proteinkomplex sind. Die Überexpression von *NLRP7* in HEK293T-Zellen führte zu einem nukleären Export des endogenen ZBTB16, wo beide Proteine im Zytoplasma und in juxt nukleären Aggregaten miteinander kolokalisieren.

Methylierungsanalysen der imprintingspezifischen Loci *H19*, *NESP55*, *PEG3* und *SNRPN* zeigten keine signifikanten Änderungen nach transienter Transfektion beider Proteine in HEK293T-Zellen.

Summary

Mutations in *NLRP7* (NOD-Like-Receptor family, pyrin domain containing 7) are responsible for the recurrent loss of pregnancy known as biparentally inherited hydatidiform moles (BiHMs). This condition is characterized by abnormal growth of placenta, lack of proper embryonic development and abnormal methylation patterns at multiple imprinted loci within the molar tissues. It is unknown if the defect occurs in the establishment of imprint before or after fertilisation, but the high specificity of this defect at the maternal allele would point to a maternal germ line specific effect.

Lack of substantial knowledge, on the functional roles of NLRP7 protein, means that the genotype-phenotype correlations behind this disease remain elusive.

The first part of this PhD thesis presents a NLRP7 inter-domain yeast two-hybrid screen in order to understand putative domain-domain interactions within the protein. Additionally, threading based structural models of NLRP7 and its activated form were generated and used to have a structural perspective/correlation to the results obtained from the yeast two-hybrid screen. Both observations from the yeast two-hybrid screen and modeling suggest that the NAD domain is central to the oligomeric assembly of the NLRP7 protein. Furthermore, the molecular basis for the pathophysiological effect of three BiHM-causing missense mutations and one non-synonymous variant on the protein was investigated using confocal microscopy of transiently transfected wild type and mutated *NLRP7* in HEK293T-cells and *in silico* structural analysis. The results shed first insights into the likely structural inter/intra-domain rearrangements during the activation of NLRP7 and its subsequent oligomerization. The missense mutations investigated in our study seem to influence intracellular aggresome formation, which could disturb their normal downstream function and be one of the possible molecular effects underlying their pathophysiological impact.

The second part of this thesis presents the transcriptional repressor ZBTB16 as a new interactionpartner of NLRP7. A yeast two-hybrid screen with NLRP7 against a human ovarian cDNA library identified ZBTB16 as putative interaction partner of NLRP7. The protein interaction was further verified by immunoprecipitation and confocal microscopy in mammalian cells. Deletion mapping studies identified multiple interaction sites in ZBTB16 that preferentially interact with the NACHT domain of NLRP7. A Blue Native PAGE analysis showed that both proteins are present at a 480

kD protein complex. Furthermore the expression of *NLRP7* leads to an export of endogenous ZBTB16 to the cytoplasm where both proteins colocalize in the cytoplasm and in a cytoplasmic juxtannuclear aggregate.

DNA methylation analyses after transient transfection of both proteins in HEK293T doesn't show significant changes on the four imprinted regions *H19*, *NESP55*, *PEG3* und *SNRPN*.

1 Einleitung

NOD-Like Receptor family, pyrin domain containing 7 (*NLRP7*) wurde 1998 als das erste humane Maternaleffekt-Gen identifiziert. Mutationen in *NLRP7* sind verantwortlich für eine familiäre biparentale Form der Blasenmolen-Schwangerschaft. Typische Merkmale einer solchen Schwangerschaft sind eine deutlich vergrößerte Plazenta, eine Hyperproliferation des Trophoblastenepithels, ein fehlender Embryo und abnormale Methylierungsmuster an mehreren Imprinting-Loci des maternalen Genoms nach Analyse des Abortmaterials. Allerdings ist bis heute unklar welcher molekulare Mechanismus für den wiederkehrenden Phänotyp einer Blasenmole verantwortlich ist.

1.1 Villöse Trophoblastenerkrankungen

In der sich entwickelnden Plazenta bilden zytotrophoblastäre Stammzellen den villösen Trophoblasten, ein zweischichtiges Epithel welches die Chorionzotten überzieht. Die zwei Schichten des Trophoblasten bestehen aus Zytotrophoblastzellen und dem äußeren Synzytiotrophoblasten [1,2]. Das Synzytium spielt eine entscheidende Rolle für die plazentare Versorgungsfunktion und dient als Schutzbarriere für den Fetus.

Das typische Merkmal für eine villöse Trophoblastenerkrankung ist der Nachweis differenzierungsgestörter Chorionzotten.

1.1.1 Sporadische Blasenmole

Die verbreitete Form der Blasenmole ist sporadisch und lässt sich in die beiden Erscheinungsformen Partialmole und Blasenmole (komplette Mole) einteilen [3,4].

Die Blasenmole ist eine villöse Trophoblastenerkrankung und repräsentiert eine abnorme Schwangerschaft infolge einer Befruchtungsstörung [5].

Die geographische Verteilung der Erkrankung variiert mit einer Frequenz von 1:600 Schwangerschaften in westlichen Ländern [6], und zeigt zwei- bis zehnfach höhere Frequenzen in entwickelnden und unterentwickelten Ländern [7,8].

1.1.1.1 Partialmole

Bei der Partialmole handelt es sich zytogenetisch in 90% der Fälle um einen triploiden Karyotyp mit absteigender Häufigkeit von 69,XXX 69,XXY und selten 69,XYY. Zwei Drittel des Genoms stammen vom Vater und nur ein Drittel von der Mutter [3,4,9].

Sonographisch zeigt sich meist eine vergrößerte Plazenta die mit blasigen Strukturen durchsetzt sein kann. Die HCG-Werte (humanes Choriongonadotropin) sind nur teilweise erhöht und ein Embryo ist regelmäßig entwickelt mit unterschiedlich stark ausgeprägten Fehlbildungen. Die histologischen Merkmale zeigen vereinzelte fokale Zottenblasen mit trophoblastärer Proliferation. Außerdem können extraembryonale Membranen wie Chorion und Amnion, Nabelschnur, kernhaltige rote Blutzellen, embryonales Gewebe bis hin zu einem normal oder fehlgebildeten Fötus in einer Partialmole auftreten (Abb. 1.1) [10,11].

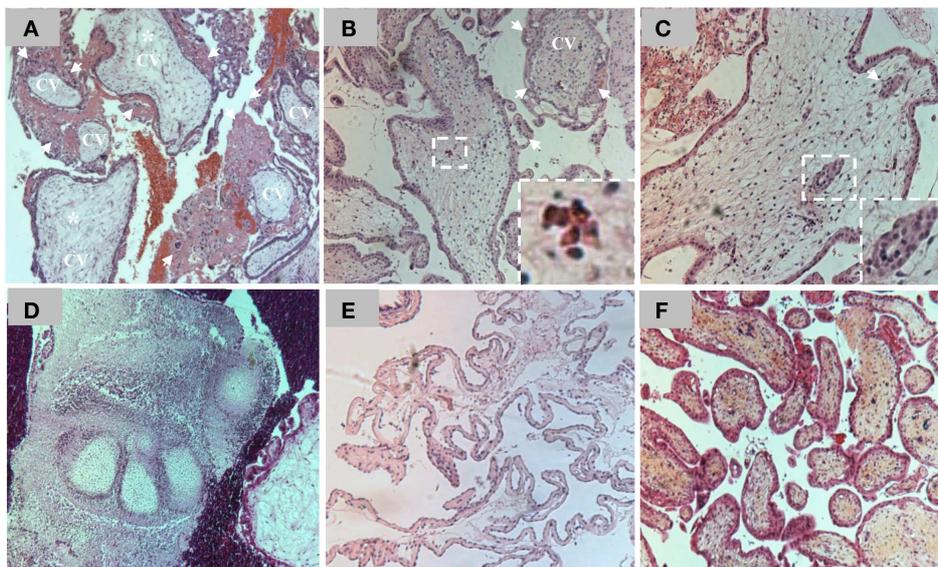


Abb. 1.1: Blasenmole und Partialmole: Histologische Präparate im Vergleich. A) Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) einer kompletten Blasenmole. Die Chorionzotten (CV) zeigen eine exzessive Proliferation des Trophoblasten (siehe weiße Pfeile). **B)** HE-Färbung einer Partialmole. Nur vereinzelte Chorionzotten (CV) zeigen eine Proliferation des Trophoblasten (weiße Pfeile). Die Vergrößerung zeigt kernhaltige rote Blutzellen, die normalerweise nur im Blutkreislauf des Fetus vorkommen (weiß gestrichelter Kasten). **C)** Chorionzotte einer Partialmole mit trophoblastären Einschlüssen (weiß gestrichelter Kasten) **D & E)** Fetale Zehenanlagen und fetale Membranen in einer Partialmole. **F)** Im Vergleich zu einer Blasenmolen zeigt die HE-Färbung eines Spontanaborts keine Proliferation des Trophoblasten an den Chorionzotten (Slim & Wallace, 2013).

1.1.1.2 Blasenmole (komplette Mole)

Bei der kompletten Blasenmole handelt es sich zytogenetisch zumeist um einen diploiden Karyotyp (46, XX) bei dem eine „leere“ Eizelle (ohne intaktes Genom) durch ein haploides Spermium befruchtet wird (androgenetischer Ursprung). Die Folge ist eine Verdopplung des väterlichen Genoms in der befruchteten Eizelle. Selten findet sich auch ein 46,XY Karyotyp bei dem eine leere Eizelle mit zwei haploiden Spermien (X und Y) oder einem diploiden Spermium (XY; Ausfall der ersten Reifeteilung) befruchtet wurde [12].

Makroskopisch und sonographisch zeigt das Abradat eine stark vergrößerte Plazenta mit blasig vergrößerten Chorionzotten. Die HCG-Werte sind stark erhöht und ohne Anlage eines Embryos. Histologisch zeigen fast alle Chorionzotten eine Hyperproliferation des sie umgebenden Trophoblastenepithels mit degenerativen Flüssigkeitseinlagerungen innerhalb der Zotten. In der Blasenmole lässt sich histologisch kein extraembryonales oder embryonales Gewebe nachweisen [11].

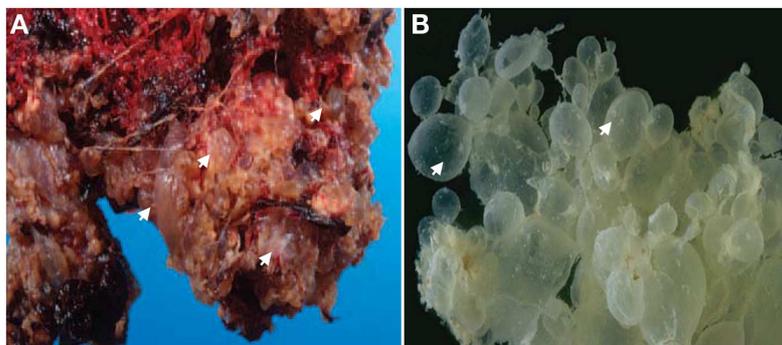


Abb. 1.2: Makroskopische Morphologie einer Blasenmole. **A)** Foto einer Blasenmole direkt nach der chirurgischen Entfernung. Die Bläschen (weiße Pfeile) repräsentieren die mit Wasser gefüllten Chorionzotten. **B)** Foto einer Blasenmole nach der Entfernung von Blutresten. Die wasserbefüllten und degenerierten Chorionzotten bilden eine traubenartige Struktur (nur zwei der Chorionzotten sind mit Pfeilen markiert) (Slim & Wallace, 2013).

1.1.2 Rezidivierende biparentale Blasenmole (BiBM)

Sowohl die sporadische Partialmole als auch die sporadische Blasenmole sind die Folge einer abnormalen Expression imprinting-assoziiierter Gene. Gene die dem Imprinting (Prägung) unterliegen werden abhängig von welchem Elternteil das Allel stammt entweder nur auf dem paternalen Allel (Vater) oder nur auf dem maternalen

Allel (Mutter) aktiv expremiert. Der Überschuss eines paternalen Chromosomensatzes führt zu einer abnormalen Expression der imprinting-assoziierten Gene, und damit zu einer unkontrollierten Proliferation des Trophoblasten bei der sporadischen Partial- bzw. Blasenmole [13].

Neben den hier beschriebenen sporadischen Blasenmolen, zeigen einzelne Patientinnen und auch familiäre Fälle (mindestens zwei betroffene Frauen innerhalb einer Familie) das Krankheitsbild einer rezidivierenden biparentalen Blasenmole. Hierbei kommt es bei den Patientinnen trotz einer biparentalen Befruchtung, d.h. einer gleichmäßigen Verteilung des maternalen und paternalen Genoms, zu einem wiederholten Auftreten einer Blasenmolen-Schwangerschaft [14]. Bis 1980 waren nur sechs rezidivierende familiäre Fälle in der Literatur bekannt, dessen Zahl sich jedoch bis 1999 um 30 neue familiäre Fälle ausweitete. Bis 1999 wurden weitere 88 Einzelfälle einer rezidivierenden Blasenmole beschrieben [15].

Bei der Suche nach einem für die rezidivierende BiBM verantwortlichen Gen, identifizierte eine Arbeitsgruppe 1999 den ersten dafür verantwortlichen Maternaleffekt-Locus 19q13.4 [16]. 2006 wurde innerhalb dieser Region *NLRP7* als das kausale Maternaleffekt-Gen identifiziert [17]. Die Mutationen segregierten in den analysierten Familien und jede Patientin hatte zwei defekte Allele, jedes vererbt von einem Elternteil. Die rezidivierende BiBM ist somit eine autosomal rezessive Erkrankung bei der bis heute zirka 42 verschiedene *NLRP7*-Mutationen in Patientinnen verschiedenster Bevölkerungen beschrieben wurden (siehe Abb. 1.3) [18,19,20,21,22,23,24,25]. In 65% der Fälle handelt es sich um proteinverkürzende Mutationen (Stop-Mutationen, Splice-Mutationen, kleine Insertionen und Deletionen), während 35% der BiBMs Missense-Mutationen aufweisen.

Die familiäre BiBM zeigt eine ungewöhnliche Variabilität in ihrem Phänotyp. So erlitten drei betroffene Patientinnen innerhalb einer Familie (MoLb1*) neben Blasenmolen auch spontane Aborte (SA), Totgeburten, einen frühen neonatalen Todesfall, eine mißgebildete Lebendgeburt, aber auch zwei gesunde Lebendgeburten [16].

*MoLB1 ist eine konsanguine libanesische Familie, in der zwei Schwestern und eine Cousine an rezidivierender BiBM litten (Moglabey et al 1999).

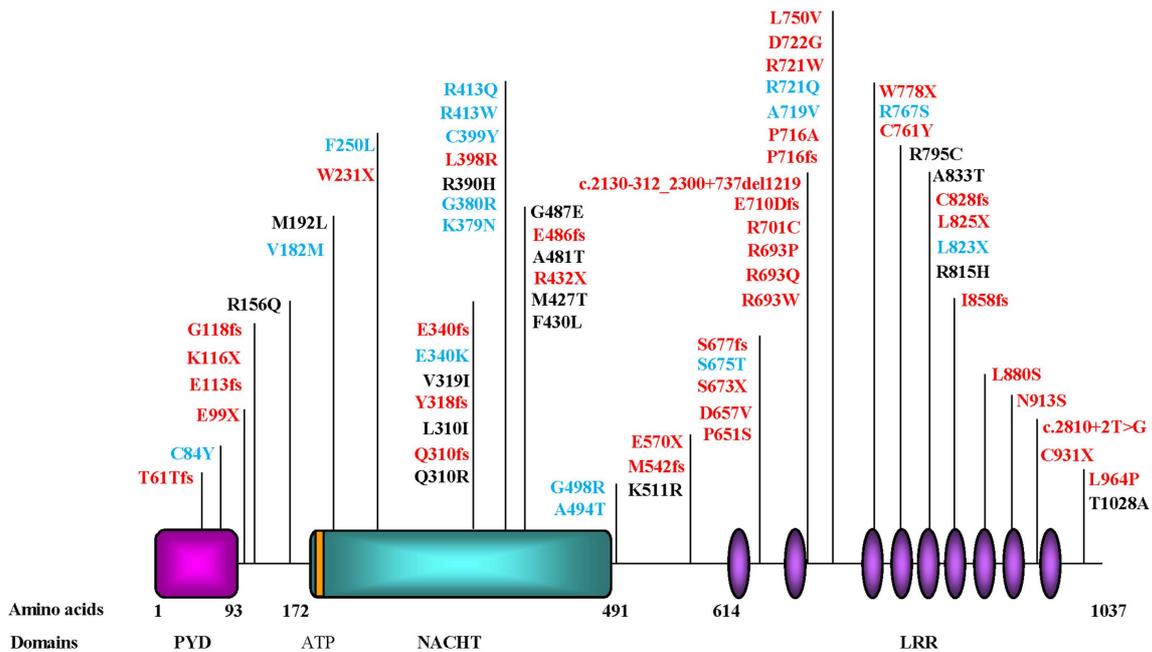


Abb. 1.3: NLRP7 Proteinstruktur mit beschriebene Mutationen. PYD (Pyrin-Domäne), NACHT (NAIP, CIITA, HET-E und TP-1 Proteinfamilie), ATP (ATP-bindendes Sequenzmotif Walker A, AS 178-186), LRR (Leucin-rich Repeats) (siehe auch Abschnitt 1.2.1). **Rot:** Patienten mit zwei defekten Allelen (Nonsense, Frameshift, Splice Site und Missense-Mutationen) **Blau:** Sequenzvarianten, ein defektes Allel (meist Missense-Mutationen) **Schwarz:** Sequenzvarianten, die auch in der normalen Bevölkerung zu finden sind. (Slim & Wallace, 2013).

Bei Frauen mit mindestens drei SA (keine Blasenmole) oder Frauen mit einer einzelnen Blasenmole, konnte in 8% und in 13% der Fälle ein heterozygoter nicht-synonymer SNP (nsSNP, nicht-synonymer Single Nucleotide Polymorphism) in *NLRP7* nachgewiesen werden. Ein SNP ist eine Sequenzvariation die nicht nur bei der Patientin sondern auch gehäuft in der zugehörigen ethnischen Bevölkerungsgruppe zu finden ist. Bei einem nsSNP kommt es zu einem Aminosäurenwechsel, der in einer kodierenden Region auch Auswirkungen auf die Funktion des Proteins haben kann [26].

Zudem zeigte sich, dass Patientinnen mit nur einem defekten Allel einen schwächeren Phänotyp aufweisen als Patientinnen mit zwei defekten Allelen.

1.2 Der Nod-like Rezeptor NLRP7

NLRP7 ist ein Nod-like Rezeptor (NLR) und zählt zu einer der vier großen Gruppen der sogenannten „Pattern Recognition Rezeptoren“ (PRRs). PRRs sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems und dienen der Erkennung von Pathogenen.

Die vier Hauptgruppen setzen sich aus dem C-Typ Lektin Rezeptoren (CLR), den Toll-like Rezeptoren (TLR), Nod-like Rezeptoren und den RIG-I-like Rezeptoren (RLR) zusammen. Während die NLRs und RLRs ausschließlich intrazellulär und frei im Zytoplasma lokalisieren sind die CLRs und TLRs membrangebunden. PRRs reagieren auf ein großes Spektrum an mikrobiellen Pathogenen über sog. PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) und endogene Bestandteile beschädigter Zellen sog. DAMPs (Danger-associated molecular patterns) woraufhin sie die Produktion von entzündungsspezifischen Zytokinen wie Interleukin-1 β (IL1 β), Interleukin 6 (IL6) und Interleukin 18 (IL18) induzieren [27].

Die verschiedenen NLR Protein-Subfamilien werden anhand ihrer N-terminalen Effektor-domänen, der Pyrin-Domäne (PYD), der Baculovirus inhibitor recruitment Domain (BIR) oder der Caspase recruitment Domain (CARD) unterschieden [28].

1.2.1 Struktur und Effektor-domänen von NLRP7

NLRP7 besteht aus vier funktionellen Domänen, einer N-terminalen Pyrin-Domäne (PYD), einer NACHT-Domäne (benannt nach den vier NTPase-Domäne enthaltenden Proteinen **NAIP**, **CIITA**, **HET-E** und **TP1**), einer NACHT-assoziierten Domäne (NAD) und einer C-terminalen LRR-Domäne bestehend aus 8-10 LRR (Leucin-rich Repeats), abhängig von der jeweiligen Isoform [29]. Es existieren sechs verschiedene durch alternatives Splicing entstandene Isoformen von NLRP7, die sich entweder in der Anzahl der LRRs oder durch das Fehlen der NACHT-Domäne voneinander unterscheiden [30]

Die PYD-Domäne ist eine kleine Domäne (92 Aminosäuren) die in allen Nod-like Rezeptoren und apoptotischen Proteinen vorkommt. Sie dient als Adapter und leitet zelltodspezifische Signale weiter, indem sie Proteine miteinander verbindet, die funktionell an dem programmierten Zelltod beteiligt sind. PYDs sind in der Lage sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit strukturell ähnlichen Domänen zu

bilden. Zu diesen Domänen zählen die „death domain“ (DD), die „death effector domain“ (DED) und die „Caspase activation and recruitment domain“ (CARD) [31].

Die NACHT- und die NAD-Domäne bezeichnet man gemeinsam auch als Nukleotid-bindende Domäne (NBD). An dem N-terminalen Abschnitt der NACHT-Domäne befindet sich das ATP-bindende Walker A/P-loop und das Mg^{2+} bindende Walker B Motiv [32]. Aufgrund der hier lokalisierten und in allen NLRPs hoch konservierten Sequenzabschnitte, zählen diese zu den sog. STAND (**S**ignal **t**ransduction **A**TPasen with **n**umerous **d**omains) innerhalb der Proteinfamilie der AAA+ (**A**TPasen **A**ssociated with diverse cellular **A**ctivities) ATPasen [33]. Man geht davon aus, dass die Bindung spezifischer Nukleotide an das Walker A Motiv die Aktivierung und anschließende Oligomerisierung der NLRPs induziert, und dadurch eine für die Immunabwehr wichtige Signal-Plattform ausbildet [34]. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung der Nukleotide ATP/dATP an NLRP3 essentiell für die Funktion und Signalweiterleitung des Proteins ist [35]. Bei einer Aktivierung bindet ATP an das Walker A/P-loop Motiv und wird durch das an Walker B gebundene Mg^{2+} hydrolysiert, was schließlich zu einer Konformationsänderung in dem Protein führt [32,33]. Die funktionale Rolle der NAD-Domäne ist bislang unbekannt.

Die Leucin-Rich-Repeat-Domäne (LRR) findet man in vielen Proteinen mit unterschiedlichsten Funktionen wie z.B. den TLRs, RanGAPs (Ran GTPase aktivierende Proteine) und RNase Inhibitor Proteinen. Bei den membrangebundenen TLRs ragt die LRR-Domäne in das extrazelluläre Milieu und dient dort als Sensor für PAMPs und DAMPs. Sobald ein pathogenes oder „danger“-assoziiertes Molekül erkannt wird, kommt es zu einer Signalweiterleitung in die Zelle und zu einer anschließenden Immunantwort [36]. Man geht davon aus, dass die LRR-Domäne in den NLRs die gleiche Funktion wie bei den TLRs ausübt. Jedoch kommt es nach der Erkennung eines LRR-spezifischen PAMP oder DAMP zu einer Oligomerisierung des intrazellulären NLRs. Dieses Oligomer dient als Grundgerüst für einen hochmolekularen Protein-Komplex, der dann als das sog. Inflammasom die Immunantwort induziert (siehe dazu 1.2.3) [29].

Im Gegensatz dazu bindet die LRR-Domäne der RanGAPs an ein GTPase gebundenes Ran. An diesen Komplex bindet das Ran-bindende Protein (RanBP) und induziert die Hydrolyse zu RanGDP. Die dadurch gewonnene Energie wird von Transportproteinen genutzt um gebundene RNAs und Proteine über den

Kernporenkomplex zwischen Zellkern und Zytoplasma hin und her zu transportieren [37].

Ein Großteil der RNase Inhibitor Proteine besteht vorwiegend aus Leucin-rich Repeats. Hier binden diese RNase A und Angiotensin wodurch sie die Degradierung von RNA verhindern oder die Angiogenese regulieren [38].

1.2.2 Bekannte Funktionen von NLRP7

Bislang wurde die funktionelle Rolle von NLRP7 in fünf verschiedenen Studien untersucht. Die Untersuchungen beschränken sich hierbei hauptsächlich auf die angeborene Immunantwort einzelner NLRP7-Domänen nach Zugabe verschiedener mikrobieller und chemischer Substanzen.

Die Transkription und Synthese eines IL1 β Vorläuferproteins (Pro-IL1 β) wird erst nach einer immuninduzierten Stimulation (z.B. durch NLRs, TLRs) aktiviert. Das im Zytosol befindliche Pro-IL1 β trifft hier auf die inaktive Form der Caspase-1 (Pro-Caspase-1). Nach einer Aktivierung der Caspase-1 induziert diese die Abspaltung des aktiven IL1 β von seinem Vorläuferprotein, welches daraufhin in das extrazelluläre Milieu sezerniert wird.

Zwei Studien konnten mittels transienter Transfektion zeigen, dass NLRP7 eine herunterregulierende Wirkung auf das intrazelluläre IL1 β Vorläuferprotein hat.

In der ersten Studie erklärte man sich die herunterregulierende Wirkung von NLRP7 auf Pro-IL1 β als Folge einer gestörten Abspaltung des aktiven IL1 β von seinem Vorläuferprotein. Die Untersuchungen zeigten dass NLRP7 sowohl an Pro-IL1 β als auch an Pro-Caspase-1 bindet, und dass die durch Caspase-1, ASC und NLRP1 Δ LRR induzierte Sekretion von IL1 β gleichermaßen von NLRP7 inhibiert wird. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte, dass NLRP7 nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung eine anti-inflammatorische Rolle einnimmt [39].

In der zweiten Studie geht man hingegen davon aus, dass die Überexpression von NLRP7 die Produktion des intrazellulären IL1 β Vorläuferproteins vermindert bzw. stört. In den Untersuchungen war die Synthese von Pro-IL1 β gleichermaßen gestört, unabhängig davon, welche Domäne (PYD, NACHT oder LRR) oder welche Deletionskonstrukte (Δ PYD, Δ NACHT, Δ LRR) von NLRP7 überexpressiert wurden [40]. Weiterhin zeigte diese Studie, dass eine LPS-Stimulierung peripherer mononukleärer Blut-Zellen (PBMCs) von BiBM-Patienten mit ein oder zwei NLRP7 Mutationen zu einer deutlich verringerten IL1 β Sekretion führt.

Okada et al. untersuchten die funktionelle Rolle von NLRP7 in Testes. Hier konnte gezeigt werden, dass eine durch siRNA herunterregulierte *NLRP7* Expression auch die unkontrollierte Proliferation einer humanen embryonalen testikulären Krebszelllinie (Tera-1) reduziert [41]. Diese Daten lieferten eine interessante Parallele für die bei der BiBM einhergehende Hyperproliferation des Trophoblastenepithels. NLRP7 könnte demnach wichtige Funktionen während des Zellzyklus bzw. während der Zellteilung einnehmen.

Khare et al. konnten zeigen, dass eine Stimulierung mit acetylierten Lipoproteinen die Entstehung eines NLRP7-Inflammasoms (NLRP7-ASC-Caspase-1) induziert. (siehe dazu 1.2.3) [42].

Eine aktuelle Studie von Mahadevan et al. untersuchte einen *NLRP7* Knock-out in humanen embryonalen Stammzellen. Hier konnte gezeigt werden, dass der Verlust von NLRP7 zu einer verfrühten Expression der beiden Trophoblasten-Marker GCM1 (Glial Cells Missing Homolog 1) und INSL4 (Insulin-Like 4) sowie zu einer Erhöhung der HCG-Werte führt [43]. Diese Ergebnisse bestätigen das klinische Bild der Blasenmole, in dem ein mutiertes *NLRP7* zu einer Hyperproliferation des Trophoblasten mit erhöhten HCG-Werten führt.

1.2.3 Das NLRP7 Inflammasom

Manche NLRPs können sich zu einem sog. Inflammasom formieren, dies ist ein hochmolekularer Proteinkomplex, welcher inflammatorische Caspasen und Zytokine aktiviert und dadurch die angeborene Immunantwort induziert.

Aus der Pyrin enthaltenden NLR-Familie sind NLRP1, NLRP3 und seit kurzem NLRP7 für die Formierung eines Inflammasomkomplex bekannt. Zudem wurde NLRP6 und NLRP12 bislang eine inhibitorische Wirkung zugeschrieben [44].

Die Mehrheit aller *NLRPs*, mit Ausnahme von *NLRP1* und *NLRP3*, sind als Gen-Cluster auf dem Chromosom 11p15 (*NLRP6*, 10 und 14) und auf dem Chromosom 19q13.4 (*NLRP2*, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12 und 13) lokalisiert, wohingegen *NLRP1* auf dem Chromosom 17p13 und *NLRP3* auf Chromosom 1q44 lokalisiert sind [45].

NLRP1 besitzt neben den klassischen vier NLRP-Domänen C-terminal noch die zwei zusätzlichen Domänen FIIND (Function To Find Domain) und CARD (Caspase recruitment Domain), wodurch sich der Aktivierungsmechanismus von dem der anderen Inflammasom-formenden NLRPs unterscheidet [29].

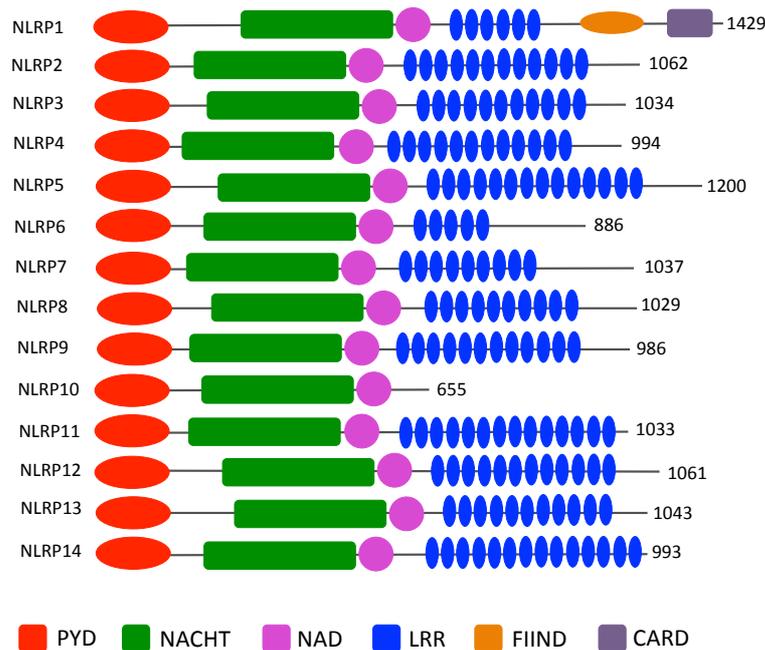


Abb. 1.4: Domänen-Struktur der NLRP Protein-Familie. Alle NLRPs zeigen die gleiche Vier-Domänenstruktur: PYD-NACHT-NAD-LRR. Lediglich NLRP10 und NLRP1 variieren: NLRP10 enthält keine LRR-Domäne und NLRP1 besitzt C-terminal noch die zwei zusätzlichen Domänen FIIND und CARD (adaptiert von Tschopp et al.2003).

Bei einem Inflammasom fungieren die NLR-Proteine als Sensoren für PAMPs und DAMPs. Man geht davon aus, dass die LRR-Domäne hierbei die exogenen oder endogenen Pathogene erkennt. Nach der Stimulation kommt es zu einer Konformationsänderung in dem inaktiven Protein bei der die zuvor von der LRR-Domäne verborgene NACHT-Domäne freigelegt wird. ATP und Mg^{2+} binden an die konservierten Sequenzmotive Walker A und Walker B innerhalb der NACHT-Domäne und aktivieren somit den hochenergetischen Prozess der Oligomerisierung. Das NLRP-Oligomer rekrutiert daraufhin über die PYD-Domäne das Signaltransduktionsmolekül ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD) welches schließlich über die CARD-Domäne Caspase-1 aktiviert. Die aktive Caspase-1 induziert dann die Aktivierung und Sekretion von IL1 β und IL18 [29,32,35,46].

Bei dem NLRP1-Inflammasom kommt es neben einer ASC-assoziierten Caspase-1 Rekrutierung zu einer direkten Interaktion zwischen der C-terminalen CARD Domäne und der Caspase-5. Der dadurch entstandene Kontakt beider Caspasen führt somit zu einer Caspase-Aktivierung mit anschließender Aktivierung und Sekretion der Cytokine IL1 β und IL18 [29,47].

Entscheidend bei der Inflammasom-induzierten Immunantwort ist die Spezifität der jeweiligen LRR-Domäne. Jedes NLRP erkennt andere PAMPs oder DAMPs die zu einer Aktivierung und Formierung eines Inflammasoms führen. So erkennt die LRR-Domäne von NLRP1 z.B. Muramyl-dipeptid (MDP), ein Bestandteil der Zellwand in Mykobakterien und das von dem Erreger *B. anthracis* produzierte Anthrax-Toxin [47,48].

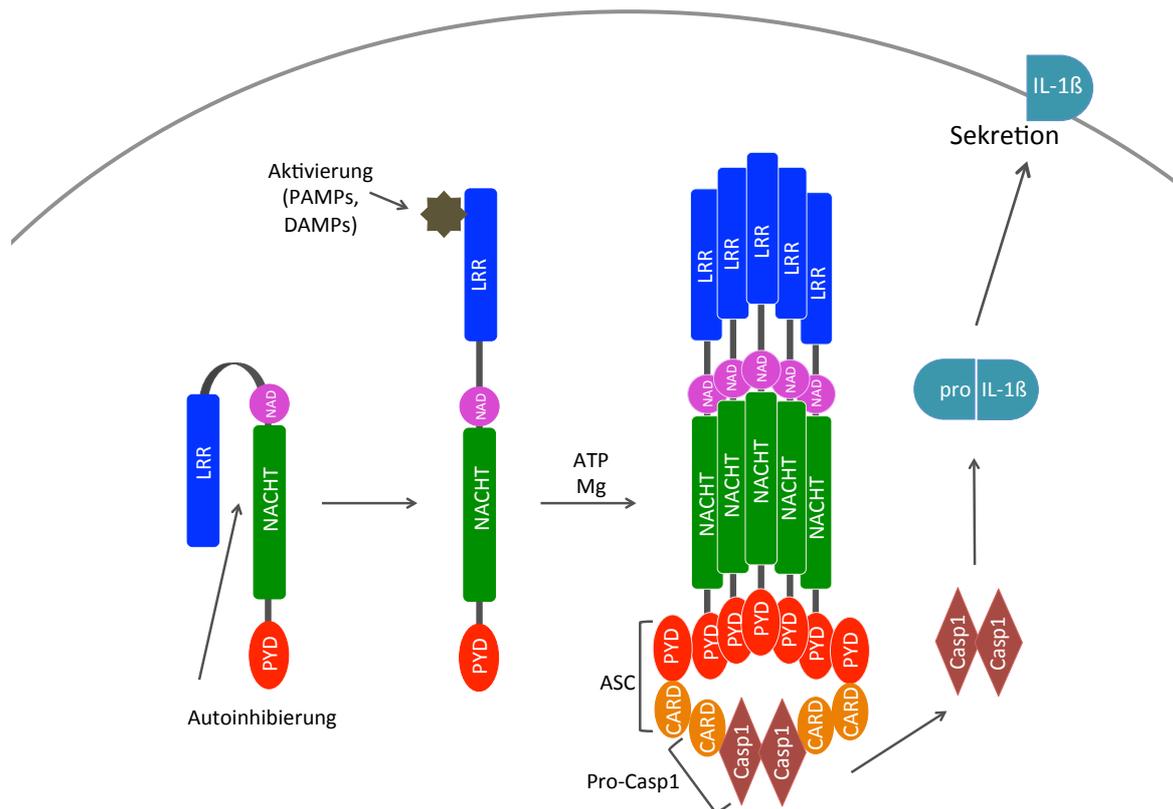


Abb. 1.5: Hypothetischer Aktivierungsmechanismus eines NLRP-Inflammasoms. In nicht stimulierten Zellen befindet sich das NLRP-Protein in einem inaktiven Zustand, indem die LRR Domäne an der NACHT-Domäne bindet und dadurch dessen Oligomerisierung verhindert. Sobald die LRR-Domäne spezifische PAMPs oder DAMPs erkennt, kommt es zu einer Konformationsänderung und zu einer Freilegung der NACHT-Domäne. Durch das Binden von ATP und Mg²⁺ an der NACHT-Domäne kommt es zu einer Aktivierung und anschließenden Oligomerisierung des Proteins. ASC bindet an die PYD-Domäne welche daraufhin die Caspase-1 aktiviert. Die aktive Caspase-1 induziert die Aktivierung und anschließende Sekretion von IL-1β (Schema adaptiert von Pétrilli et al.,2007).

Die LRR-Domäne von NLRP3 erkennt ebenfalls verschiedene bakterielle Komponenten wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS), MDP oder auch virale RNA. Hier geht man aber davon aus, dass der erste Pathogen-Kontakt lediglich die Expression des Proteins erhöht und erst weitere DAMP-spezifische Signale wie reaktive

Sauerstoffspezies (ROS), Poren-formende Toxine, oder ein gestörter Kalzium/Kalium Austausch zu einer Interaktion mit ASC und anschließender Inflammasom-Formierung führen [49,50,51,52].

NLRP6 und NLRP12 wurden in Zusammenhang mit Darmentzündungen und Darmkrebs entdeckt [53,54]. Beiden Proteinen wird eine inhibierende Wirkung zugeschrieben. So konnte gezeigt werden, dass sie eine TLR-induzierte Aktivierung von NF- κ B unterdrücken [44]. Es ist jedoch noch unklar welche Liganden zu einer Konformationsänderung und einer anschließenden Inflammasom-Formation führen. Zuletzt konnten Khare et al. zeigen, dass die von Mykoplasmen produzierten diacylierten Lipopeptide die Formierung eines NLRP7-Inflammasoms induzieren [42].

1.2.4 Zelluläre Lokalisation und Expression von NLRP7

In Monozyten zeigt das endogene NLRP7 eine diffuse homogene Verteilung im Zytoplasma welche sich jedoch nach LPS-Stimulierung polarisiert und neben dem Zellkern mit dem Mikrotubuli-Organisationszentrum kolokalisiert. So führte eine Behandlung von EBV spezifischen Lymphozyten mit dem Mikrotubuli-destabilisierenden Agens Nocodazol zu einer Depolarisierung der Mikrotubuli und folglich zu einer Fragmentation des NLRP7 Signals [40].

Die Überexpression von NLRP7 in HEK293T-Zellen zeigte eine diffuse Verteilung des Proteins im Zytoplasma dessen Signal sich jedoch je nach Intensität und Menge des Proteins als punktartige Akkumulation neben dem Zellkern nachweisen lässt [42].

NLRP7 wird in einer Vielzahl an Geweben expremiert. Dazu gehören die Leber, Lunge, Plazenta, Milz, Schilddrüse, periphere Blut-Leukozyten, Testes und Ovarien. [39,41].

Der Zusammenhang zwischen Mutationen in *NLRP7* und BiBM, veranlasste eine Arbeitsgruppe die Expression der 14 verschiedenen NLR-Proteine während der Gameto- und Embryogenese zu untersuchen. Die Transkripte von *NLRP7* wurden in Keimzellen, Meiose I und II Oozyten, Spermatozyten und in 2-5 Tage alten Embryos nachgewiesen [55]. Weiterhin zeigte sich hier, wie die Expression von *NLRP7* während der Oogenese stetig sinkt und ihren niedrigsten Wert an Tag 3 der Embryogenese erreicht. Ab Tag 3 des entwickelnden Embryos kommt es schließlich wieder zu einem starken Anstieg der NLRP7 Expression.

1.3 NLR-Proteine und ihre Rolle in der Fortpflanzung und Entwicklung

1.3.1 NLRP5

NLRP5 (ursprünglich OP1, Mater) war das erste Gen bei dem gezeigt wurde, dass es eine entscheidende Rolle in der Fortpflanzung von Säugern einnimmt [56]. *NLRP5* wurde aus einem Maus-Modell isoliert, das unter einer autoimmun-assoziierten Oophoritis litt, welche sich aufgrund einer neonatalen Thymektomie entwickelt hatte. Entnimmt man weiblichen Mäusen am dritten Tag nach ihrer Geburt den Thymus entwickeln diese spontane Autoimmun-Erkrankungen mit organspezifischen Entzündungen und Lymphozyten-Infiltrationen [57]. In manchen Maus-Stämmen richtete sich der prägnanteste Antikörper gegen die Eizellen und reagierte dort mit *NLRP5*. Daraufhin wurden weibliche *NLRP5* -/- Knock-out-Mäuse erzeugt. Trotz einer normalen Ovulation und *in vivo*-Fertilization der Weibchen, stoppte die embryonale Entwicklung im Zwei-Zell-Stadium.

NLRP5 ist Bestandteil spezialisierter cytoplasmatischer Intermediärfilamente in der Oozyte (CPLs = Cytoplasmic Lattices) die für die Verteilung von Organellen, maternalen mRNAs und maternalen Proteinen zuständig sind [58]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass *NLRP5* auch an den Mitochondrien und den Kernporen einer Oozyte lokalisiert ist, was als Antwort auf oxidativen Stress während der Eizellen-Alterung gewertet wird [59].

1.3.2 NLRP2

NLRP2 ist das dem *NLRP7* am nächsten verwandte humane Gen. Man geht davon aus, dass beide Gene während der Evolution aus demselben Maus-Ortholog entstanden sind [45]. Eine Mutation in *NLRP2* führt zu der humanen Imprinting-Erkrankung Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS). Bislang wurde nur ein einzelner Fall in einer Familie beschrieben, bei dem die Mutter eine homozygote *NLRP2* Frameshift-Mutation an zwei ihrer Kinder weiter vererbte, die daraufhin an BWS erkrankten [60]. Der Fall erweckte eine hohe Aufmerksamkeit aufgrund der epigenetischen Parallelen zu dem Erscheinungsbild der BiBM (siehe 1.4). Trotzdem, seit diesem einzelnen Fallbeispiel wurde kein weiterer BWS-Fall mit Mutationen in

NLRP2 beschrieben. Ein *NLRP2* *-/-* Knock-out in noch unreifen murinen Oozyten, führte wie in *NLRP5* zu einem embryonalen Arrest im Zwei-Zell-Stadium [61].

1.3.3 NLRP14

Das humane *NLRP14* wird ausschließlich in Testes expremiert. Eine Studie zeigte das *NLRP14* Mutationen zu Störungen in der Spermatogenese führen [62]. *NLRP14* liegt auf dem chromosomalen Locus 11p15 innerhalb dessen sich ein großes Gen-Cluster aus monoallelisch expremierten Genen (Imprinting-Loci) befindet (siehe dazu 1.5.1.4). Analysen über den genomischen Imprintingstatus von *NLRP14* zeigten jedoch eine biallelische Expression. *NLRP14* liegt neben den beiden für die Zinkfinger-Proteine ZNF214 und ZNF215 codierenden Regionen die für Defekte in der Spermatogenese verantwortlich sind. Westerveld et al. beschrieben vier kausale heterozygote Missense-Mutationen und eine Stopmutation für *NLRP14*. Seither wurden jedoch keine weiteren Fälle beschrieben.

1.4 KH domain containing 3-like (*KHDC3L*)

KH domain containing 3-like (*KHDC3L*) wurde 2011 von Parry et al. entdeckt und ist neben *NLRP7* das zweite für BiBM verantwortliche Gen [63].

KHDC3L liegt auf dem Chromosom 6 und bislang wurden 4 BiBM-assoziierte Mutationen für dieses Gen beschrieben (siehe Abb. 1.6). Die Mutationen in *KHDC3L* finden sich in 10-14% der BiBM-Patienten ohne *NLRP7*-Mutation und betreffen immer beide Allele [64].

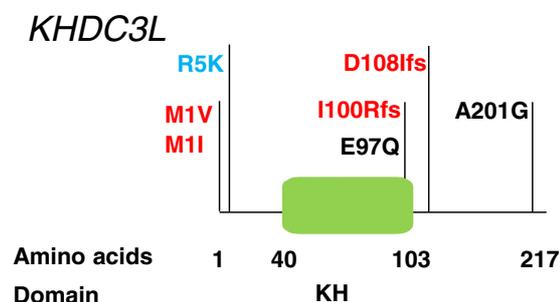


Abb. 1.6: Proteinstruktur von *KHDC3L* mit beschriebenen Mutationen und nsSNPs. *KHDC3L* kodiert für ein 217 Aminosäuren großes Protein mit einer atypischen KH-Domäne (grün). **Rot:** Patienten mit zwei defekten Allelen. **Blau:** Sequenzvarianten, ein defektes Allel (meist Missense-Mutationen) **Schwarz:** Sequenzvarianten, die auch in der normalen Bevölkerung zu finden sind. (Nguyen & Slim, 2014)

KHDC3L gehört zu der Oozyten- und Embryo-spezifischen KHDC1 (KH homology domain containing 1) Protein-Familie. Es kodiert für ein 217 Aminosäuren großes Protein mit einer atypischen KH-Domäne, welches im Vergleich zu anderen KH-Domänen-Proteinen nicht die Fähigkeit besitzt RNA zu binden. Zu der humanen KHDC1 Protein-Familie zählen *KHDC3L*, *KHDC1*, *DPPA5* (developmental pluripotency associated 5) und *OOEP* (oocyte-expressed protein) [65]. Reddy et al. zeigten in einer lymphoblastären Zelllinie eine Kollokalisierung von KHDC3L und NLRP7 am MTOC und dem Golgi-Apparat. Man geht davon aus, dass beide Proteine zusammen in einem Proteinkomplex ähnliche oder überlappende Funktion ausüben.

1.5 Epigenetik und BiBM

Die Epigenetik spielt eine entscheidende Rolle in der Pathologie der Blasenmole. So zeigt bereits das parentale Ungleichgewicht bei der sporadischen Mole, wie ein Überschuss des paternalen (Xp) Chromosomensatz (69,XpXpXm), bzw. das komplette Fehlen eines maternalen (Xm) Chromosomensatz (46,XpXp) zu Störungen in der Embryonalentwicklung und zu einer Hyperproliferation des Trophoblasten führt. Die Arbeitsgruppe um Surani et al. konnte anhand von nukleären Transplantationen in Mäusen zeigen, dass der paternale Chromosomensatz für die Entwicklung des extraembryonalen Gewebe zuständig ist, während der maternale Chromosomensatz die Entwicklung des Embryos gewährleistet [66]. Diese Beobachtungen wurden auch durch die spezifischen Phänotypen androgenetischer und gynogenetischer Aborte bestätigt. Während Aborte mit einem 69XpXpXm Genotyp den Phänotyp einer klassischen PHM aufweisen, zeigen 69XmXmXp Genotypen einen gut entwickelten Embryo mit degeneriertem Trophoblast [67]. Die beschriebenen Phänotypen einer Blasenmole begründen sich hier aus dem Ungleichgewicht der monoallelisch expremierten Gene („imprinted Genes“), deren Expression für gewöhnlich auf dem paternalen und maternalen Allel verschieden ist.

1.5.1 Epigenetik

Der menschliche Organismus besteht aus einer Vielfalt von Zellen verschiedener Gewebetypen. Trotz der identischen genetischen Ausstattung bildet jedes Gewebe eine Vielzahl von spezialisierten Zelltypen. Die Verschiedenartigkeit der Zellen

resultiert also nicht aus Veränderungen der Nukleotid-Sequenz, sondern ergibt sich aus der Aktivität der verschiedenen Gene in dem jeweiligen Zelltyp. So wird in einer typischen Zelle nur die Hälfte des Genoms aktiv transkribiert und schließlich für die Produktion eines Proteins verwendet. Dieser universelle Vorgang der Genexpression führt durch sein differenzielles zeitliches und räumliches Vorkommen zur Entwicklung der verschiedenen Charakteristika einzelner Zellen. Die spezialisierten Aktivierungsmuster benötigen eine Vielzahl von potentiell reversiblen Regulationsmechanismen, welche sich in die beiden Hauptkategorien DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen einteilen lassen.

1.5.1.1 DNA-Methylierung

Einer der größten und vielfältigsten Bereiche der Epigenetik ist die DNA-Methylierung. Der bereits in Prokaryoten etablierte Prozess der DNA-Methylierung dient hier vor allem zum Schutz vor fremden genetischen Material aus z. B. Phagen oder anderen Prokaryoten. In Eukaryoten ist die DNA-Methylierung neben der Abwehr von fremder DNA (z. B. Retroviren) zusätzlich eine Kontrolle der Genexpression, Genrepression, Kontrolle der Differenzierung und Entwicklung von Zellen, die Erhaltung chromosomaler Integrität, die Verhinderung homologer Rekombination, Imprinting und vor allem der Onkogenese [68].

Die DNA-Methylierung ist eine kovalente Modifikation der DNA, die jedoch keinen Einfluss auf die Abfolge der Nukleotide nimmt. Die Methyltransferase katalysiert hier die Übertragung einer Methylgruppe von dem Methyl donor S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) auf das fünfte Kohlenstoff-Atom des Pyrimidinrings eines Cytosins (5-mC) von Cytosin-Guanosin-Dinukleotiden (CpGs). Ein Großteil dieser modifizierten CpGs befindet sich in repetitiven Sequenzen und den CpG-Inseln [69].

Das DNA-Methylierungsmuster wird mitotisch und meiotisch vererbt. Der Transfer der Methylgruppe wird hierbei von den DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert. Der Vorgang der Demethylierung erfolgt hingegen entweder aktiv durch Demethylasen oder passiv bei mitotischer Teilung ohne „maintenance“-Methylierung (Instandhaltungsmethylierung) [70,71]. Die Familie der Methyltransferasen zählt sechs Mitglieder mit zum Teil gleichen Funktionen. DNMT1 erhält das Methylierungsmuster während der DNA-Replikation und bevorzugt hemimethylierte DNA als Substrat [68]. DNMT1o ist eine oozyten-spezifische Isoform der DNMT1. Ihre Deletion führt in mutanten Mäusen zum Verlust der maternalen Prägung von

Genen [72]. Die Methyltransferase DNMT2 ist eine RNA-Methyltransferase welche über den Mechanismus einer DNA-Methyltransferase arbeitet. Die DNMT2 besitzt neben einer nur schwachen DNA-Methylierungsaktivität die Fähigkeit tRNA zu methylieren [73]. Die beiden Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b sind sogenannte *De novo*-Methyltransferasen. Sie sind für die Schaffung neuer Methylierungsmuster verantwortlich. Daher sind sie bei der Entwicklung von Organen sowie der Differenzierung von Zellen unabdingbar [74]. Die letzte zu beschreibende Methyltransferase Dnmt3L hat keine eigene Transferaseaktivität sondern interagiert mit den beiden anderen Dnmt3-Proteinen und ist essentiell für die Etablierung des Imprinting in weiblichen Keimzellen [75].

1.5.1.2 Histonmodifikationen

Chromatin besteht bis zu 50% aus Proteinen, wie z.B. den Histonen. Die Histone führen dazu, dass sich das DNA-Molekül um die Nukleosomen legt. Diese interagieren zusätzlich mit weiteren Proteinen und führen zu einer dichteren Packung der DNA. Somit spielen sie eine entscheidende Rolle für die Zugänglichkeit der Gene durch andere Proteine. Vereinfacht bedeutet dies, dass bei einer dichteren Chromatinpackung externe Proteine weniger gut mit der DNA interagieren und es nicht zur Transkription kommen kann [76]. Durch verschiedenste Modifikationen sowohl in ihren Kerndomänen als auch hauptsächlich in den aminoterminalen Schwanzbereichen werden die Histone posttranslational durch mehr als 100 Modifikationen beeinflusst. Dazu zählen Azetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitylierung [77]. Die Azetylierung der Histone durch die Histonazetyltransferasen (HATs) bewirkt eine Auflockerung des Chromatins, denn die positive Ladung der Histone wird durch die negativ geladene Azetyl-Gruppe aufgehoben. Die Anziehungskräfte zwischen den dadurch neutralisierten Histonen und dem negativ geladenem Phosphatrückgrat des DNA-Strangs werden somit stark geschwächt. Die DNA wird so für Proteine zugänglicher, was in den meisten Fällen zu einer erhöhten Expressionsrate führt. Bei der durch HDACs (Histondeacetylasen) bewirkten Umkehrung dieser Reaktion kommt es zur Inaktivierung benachbarter Gene. Weiterhin können Methylierungen von Histonen zur Festschreibung eines inaktivierten Chromatinzustands führen oder auch als Bindesignal für Proteine wirken und so andere Funktionen vermitteln [75].

1.5.1.3 Epigenetik in Keimzellen

Bereits 1984 entdeckten McGrath und Solter, dass die paternale DNA (väterlichen Ursprungs) und die maternale DNA (mütterlichen Ursprungs) sich voneinander unterscheiden. Nachdem sie die Nuclei zweier Oozyten in einer Oozyte zu einer Zygote fusionierten zeigte sich, dass die uniparentalen Embryos nicht lebensfähig sind und für eine normale Befruchtung beide Genome, sowohl von dem Vater als auch von der Mutter notwendig sind [78]. Diese parentalen Unterschiede basieren auf spezifischen epigenetischen Markierungen (durch DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen) im Genom, die zu einer monoallelischen Expression bestimmter Gene, sog. „Imprinted genes“ führen. Während in den Keimzellen des entwickelnden Embryos ein geschlechtsspezifisches Imprinting etabliert werden muss, bleibt das Imprinting in den somatischen Zellen erhalten.

In der Maus entstehen die Keimzellen an Tag 6.5 der embryonalen Entwicklung und werden als primordiale Keimzellen (Primordial Germ Cells = PGCs) bezeichnet. Hier konnte gezeigt werden das *Bmp4* (Bone Morphogenetic Protein 4) ein entscheidendes Signalmolekül bei der Entwicklung von PGCs ist [79]. Embryos mit einem *Bmp4* *-/-* Knock-out sind nicht in der Lage PGCs auszubilden. Bestimmte embryonale Zellen senden das *Bmp4*-Signal an benachbarte Zellen, welche sich daraufhin zu PGCs entwickeln. In dem weiteren Verlauf der PGC-Entwicklung induziert *Bmp4* die Expression des transkriptionellen Repressor Blimp-1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1) [80]. Blimp-1 unterdrückt schließlich die Expression von differenzierungsspezifischen Homeobox-Genen und verhindert dadurch eine Ausdifferenzierung der noch somatischen Zellen während der Embryogenese [81]. Das epigenetische Profil der sich entwickelnden Keimzellen ist zu diesem Zeitpunkt noch identisch zu dem der somatischen Zellen in dem entwickelnden Embryo. An Tag 7.5 der Entwicklung wandern die PGCs an ihren Bestimmungsort, die Genitalleiste. Auf dem Weg dorthin kommt es zu den ersten epigenetischen Veränderungen innerhalb der Zelle. Die Methylierung an den CpGs geht langsam verloren, während die Methylierung an verschiedenen Histonen ansteigt [82]. Erreichen die PGCs die Genitalleiste kommt es zu einer zweiten Demethylierungswelle, welche schließlich die Methylierung der paternal und maternal geprägten Regionen entfernt [83]. Dieses komplette Auslöschen des parentalen Imprinting-Musters ist essentiell für den sich entwickelnden Embryo, da somit ein

dem Geschlecht entsprechendes neues Imprinting-Muster in den Keimzellen etabliert werden kann. Der Zeitpunkt für die Etablierung des neuen Imprints ist ebenfalls geschlechtsspezifisch. In männlichen Embryos startet die DNA-Methylierung der Keimzellen noch vor der Meiose und endet vor der Geburt, wobei das Imprinting-Muster der weiblichen Keimzellen sich erst nach der Geburt entwickelt und nach Abschluss der Meiose I endet. Der genaue molekulare Mechanismus wie es zu der Erkennung der spezifischen Imprinting-Regionen kommt ist jedoch bis heute ungeklärt. Man geht davon aus, dass eine aktive Transkription den Ort und die Zeit der Methylierung an Imprinting-spezifischen Regionen bestimmt, welche wiederum durch Faktoren wie z.B. die Größe der Oozyte koordiniert wird [84].

Im Gegenteil zu den somatischen Zellen durchlaufen Keimzellen eine Reduktionsteilung die sog. Meiose bei der die Tochterzellen (Spermazelle oder Oozyte) nur die Hälfte des parental Chromosomenguts erhalten. Auch hier zeigte sich wie wichtig bestimmte epigenetische Markierungen für die Verteilung der Chromosomen sind. Fehlt z.B. die Histon-Methyltransferase PRDM9, führt dies sowohl in der männlichen als auch in der weiblichen Gametogenese zu Störungen in der Synapse und der homologen Rekombination [85]. PRDM9 modifiziert Histon 3 an Lysin 4 (H3K4) mit einer Methylgruppe und induziert dadurch eine Auflockerung des Chromatins. Auch die Histon-Azetylierung ist unerlässlich bei der Segregation der Chromosomen. So ermöglicht eine Inhibierung der Histon-Deazetylierung zwar eine normale Befruchtung der Oozyte, dennoch sinkt die Anzahl der Lebendgeburten um bis zu 50%, die mit einer gravierenden Fehlverteilungen der Chromosomen einhergehen [86].

Eine funktionale DNA-Methylierung, Histon-Methylierung und Histon-Azetylierung ist daher essentiell für die korrekte Reifung der männlichen und weiblichen Gameten.

1.5.2 Deregulation multipler Imprinting-Loci bei BiBM

Das bezeichnende Merkmal einer biparentalen Blasenmole ist der trotz nachweisbaren maternalen und paternalen Chromosomensatz, identische Phänotyp zu einer sporadischen Mole. Dies führte zu der Hypothese, dass die für BiBM verantwortlichen Gene *NLRP7* und *KHDC3L* wichtige Funktionen in der Etablierung oder Erhaltung des Imprinting ausüben könnten.

1. Einleitung

| DMR | Chr | <i>KHDC3L</i> | | <i>NLRP7</i> | | | Conclusion |
|--------------------------------|-----|---------------|------------|--------------|------------------|--------|------------|
| | | [47] | [23] | [54] | [55] | [23] | |
| Reference Patient ID | | L1 | | 4 & 6 | HM70 & HM73 | S4 | |
| Number of HMs (n) | | n=1 | n=2 | n=2 | n=2 | n=1 | |
| Maternally methylated | | | | | | | |
| <i>KCNQ1OT1^a</i> | 11 | --- | --- | | --- | --- | --- |
| <i>SNRPN^b</i> | 15 | --- | | -,--- | --- | | --- |
| <i>PEG1</i> | 7 | --- | | | | | --- |
| <i>PEG3</i> | 19 | --- | | --- | | | --- |
| <i>GNAS-1A^a</i> | 20 | --- | | | | | --- |
| <i>GNAS-AS</i> | 20 | --- | | | Complex | | Inconcl. |
| <i>GNAS-XLαS^b</i> | 20 | Normal | | | Normal | | Normal |
| <i>ZAC^a</i> | 6 | | --- | | | --- | --- |
| <i>PEG10^a</i> | 7 | | Normal, -- | | | Normal | Normal |
| Paternally methylated | | | | | | | |
| <i>H19^a</i> | 11 | Normal | | +, ++ | Normal | | Inconcl. |
| <i>GNAS-NESP55^b</i> | 20 | +++ | +++ | +++ | +++ ^c | +++ | +++ |

Abb. 1.7: Zusammenfassung BiBM-assoziierter Imprinting-Analysen. Insgesamt vier Studien untersuchten die Methylierung einer Vielzahl von Imprinting-Loci in BiBMs von Patientinnen mit zwei Defekten Allelen in *NLRP7* oder *KHDC3L*. Unterschiedliche Ergebnisse bei zwei untersuchten BiBMs sind mit einem Komma getrennt. ^a = primärer Imprint, ^b = sekundärer Imprint. **Referenzen:** 47 = Judson et al. 2002, 23 = Hayward et al. 2009, 54 = El-Maarri et al. 2003, 55 = Kou et al. 2008. (Nguyen & Slim, 2014)

Wir und drei andere Gruppen untersuchten die DNA-Methylierung von verschiedenen primären und sekundären Imprinting-Genen in insgesamt acht BiBMs, deren Patientinnen je zwei defekte Allele in *NLRP7* oder *KHDC3L* aufwiesen (Abb. 1.7). Die erste Studie von Judson et al. untersuchte insgesamt neun verschiedene Imprinting-Loci innerhalb einer Blasenmole (Abb. 1.7 Ref.47: [87]). Die Patientin stammt aus einer konsanguinen pakistanischen Familie (Familie L1) mit einer, wie sich erst Jahre später herausstellte, homozygoten Missense-Mutation in dem Codon1 von *KHDC3L* [63]. Sechs von sieben maternal methylierten DMRs zeigten einen Verlust in der Methylierung, während es bei einem von zwei paternal methylierten Imprinting-Loci (*NESP55*) zu einer Zunahme der Methylierung kam. Der paternal methylierte Locus *H19* zeigte hingegen eine normale Methylierung. Diese Diskrepanz zwischen den beiden paternal methylierten Loci gab erste Hinweise darüber, dass der Defekt nicht während der männlichen Gametogenese auftritt. *H19* ist ein primärer Imprint der während der männlichen Gametogenese etabliert wird, während *NESP55* als sekundärer Imprint erst nach der Befruchtung in der Blastozyste etabliert wird. Insgesamt zeigten die maternalen Loci in dieser Studie sowohl bei den primären als

auch bei den sekundären Imprints einen generellen Methylierungs-Verlust, was als Hinweis für einen Defekt in der weiblichen Gametogenese sprechen würde.

Eine spätere Studie von Hayward et al. untersuchte neben zwei Blasenmolen der bereits von Judson et al. untersuchten Patientin (Familie L1), eine Blasenmole von einer Patientin mit einer homozygoten Missense-Mutation in *NLRP7* (L398R). Die Patientin litt insgesamt unter 14 BiBMs ohne eine familiäre Vorgeschichte (Abb. 1.7 Ref. 23: [21]).

Für beide Patientinnen zeigte sich in dem untersuchten Gewebe auf den maternalen Imprinting-Loci *KCNQ10T1* und *ZAC* ein Verlust der Methylierung und auf dem paternalen Imprinting-Lokus *NESP55* eine Zunahme der Methylierung. Lediglich der maternale Imprinting-Lokus *PEG10* zeigte einen nur leichten Verlust der Methylierung in einer der beiden BiBMs der *KHDC3L*-Patientin (Familie L1), während die anderen beiden BiBMs auf diesem Locus unauffällig waren.

Zwei weitere Studien, unter anderem unsere Arbeitsgruppe, untersuchten den Imprinting-Status von insgesamt vier verschiedenen BiBMs in vier verschiedenen Patientinnen mit zwei defekten Allelen in *NLRP7*.

Hierbei untersuchte unsere Gruppe die vier verschiedenen Imprinting-Loci *H19*, *NESP55*, *PEG3* und *SNRPN* zweier BiBMs, deren Patientinnen Schwestern in der konsanguinen Familie MoLb1 sind (Abb. 1.7 Ref. 54: [88]). Mit Hilfe eines „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs) konnte unsere Arbeitsgruppe zwischen dem paternalen und maternalen Allel unterscheiden und zeigte erstmals, dass der Imprinting-Defekt speziell das maternale Allel betrifft. Die beiden maternal methylierten Imprinting-Loci *SNRPN* und *PEG3* zeigten einen Verlust der Methylierung auf dem maternalen Allel, während die paternal methylierten DMRs *H19* und *NESP55* eine eindeutige Zunahme der Methylierung auf dem maternalen Allel aufwiesen.

Kou et al. untersuchten zwei BiBMs zweier Patientinnen aus Mexiko (HM70 & HM73). Beide Patientinnen haben die gleiche Missense-Mutation in *NLRP7* (L750V; HM73 homozygot, HM70 heterozygot) und sind ohne familiäre Vorgeschichte für BiBMs. Die BiBMs beider Patientinnen zeigten eine verminderte Methylierung auf vier von sechs maternal methylierten DMRs, während die paternale Methylierung des sekundären Imprints von *NESP55* sich signifikant erhöht zeigte (Abb. 1.7 Ref. 55: [22]).

Zusammenfassend zeigen BiBMs eine abnormale Methylierung an multiplen Imprinting-Loci des maternalen Allels, die entweder während der Oogenese oder Embryogenese entstanden sind.

1.6 Die Zwei-Treffer-Hypothese

Trotz vieler Daten weiß man bis heute nicht welche Rolle NLRP7 in der Oozyte hat, und ob sich bestimmte immunspezifische Funktionen auf das Krankheitsbild auswirken.

Gerade deswegen hat sich in der Literatur die Theorie eines sog. Zwei-Treffer Mechanismus während der Entwicklung einer BiBM verbreitet.

Man geht davon aus, dass Oozyten von Patienten mit einer NLRP7-Mutation bereits mehrere Defekte aufweisen die den Embryo bereits in der frühen Entwicklung an seinem Wachstum hindern (Treffer 1). Aufgrund einer gestörten Immunantwort wird die abnormale Schwangerschaft ohne Embryo von dem Immunsystem nicht erkannt und abgestoßen, so dass es zu einer hyperproliferativen Degeneration der Chorionzotten kommt (Treffer 2).

1.7 Zielsetzung und Vorgehen

Mutationen in *NLRP7* sind die Ursache für die Pathogenese von biparentalen Blasenmolen. Der dafür verantwortliche molekulare Mechanismus ist jedoch bis heute ungeklärt. Multiple abnormale Imprintingmuster in den untersuchten biparentalen Blasenmolen lassen vermuten, dass *NLRP7* eine Komponente in einem Methylierungsmechanismus *in trans* darstellt.

Die meisten funktionellen Untersuchungen mit *NLRP7* konzentrieren sich jedoch hauptsächlich auf die immunspezifischen Aufgaben des Proteins, was unter anderem daran liegt, dass in der Maus kein *NLRP7*-Homolog existiert.

Eine Intradomän-spezifische Hefe Di-Hybrid-Analyse von *NLRP7* soll den für diese Proteinfamilie bekannten Prozess der Aktivierung und Oligomerisierung darstellen und helfen den möglichen Einfluss drei BiBM-assoziiierter Missense-Mutationen und eines non-synonymen SNP (nsSNP) auf diesen Prozess zu untersuchen. Weiterhin soll mittels transienter Transfektion die zelluläre Lokalisation dieser Mutationen im Vergleich zu der Lokalisation des Wildtyp-Proteins in HEK293T-Zellen untersucht werden.

Da *NLRP7* keine DNA-Bindedomäne enthält oder vergleichbare Funktionen bzw. Domänen mit Methyltransferasen teilt, soll eine Suche nach potentiellen *NLRP7*-Interaktionspartnern helfen, mögliche imprintingspezifische nukleäre Signalwege aufzuspüren. Mit Hilfe einer Hefe Di-Hybrid-Analyse zwischen *NLRP7* und zwei verschiedenen Transkriptbibliotheken (normalisiert und ovariell) sollen mögliche Interaktionspartner identifiziert und verifiziert werden. Potentielle Interaktionen sollen mittels Immunopräzipitation und konfokaler Mikroskopie in HEK293T-Zellen bestätigt werden.

2 Material und Methoden

Die beschriebenen Versuchsansätze wurden in molekularbiologischen Laboren der Sicherheitsstufe S1 mit der dafür üblichen Ausstattung durchgeführt. Alle Chemikalien wurden in den höchsten Reinheitsgraden bestellt und bei Verwendung spezieller Materialien bzw. Chemikalien wurde gesondert auf den Hersteller bzw. die Bezugsquelle hingewiesen.

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

| Name | Hersteller |
|---|---|
| Acetonitril | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Agar | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| Agarose | Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland) |
| Ampicillin | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Bacto Yeast Extract (Hefeextrakt) | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| β-Mercaptoethanol | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| CDP-Star Chemiluminescent Substrate | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| ddTTP | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| ddCTP | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| dNTPs | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| dH ₂ O (Deionisiertes Wasser) | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| DO-Supplement -LEU | Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) |
| DO-Supplement -TRP | Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) |
| DO-Supplement -LEU/-TRP | Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) |
| DO-Supplement -LEU/-TRP/-HIS | Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) |
| DO-Supplement -LEU/-TRP/-HIS/-ADE | Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) |
| DTT (Dithiothreitol) | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Dulbecco's PBS (1x, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺) | PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland) |
| Eisessig | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| Ethanol | Merck (Darmstadt, Deutschland) |

2. Material und Methoden

| | |
|--|--|
| Ethidiumbromid | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| FBS/Sera plus (Fetales Kälberserum) | PAN Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland) |
| Glycin | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| HiDi Formamid | Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) |
| Kanamycin | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Lithium-Acetat | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Luminol | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| MEM with Earls Salts | PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland) |
| Methanol | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| Minimal SD Agar Base | Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) |
| Minimal SD Base | Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) |
| Natriumacetat (NaAc) | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| NEAA (Nicht essentielle Aminosäuren) | PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland) |
| N,N-Dimethylacrylamide (DMA) | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| NativePAGE Running Buffer (20x) | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| NativePAGE Cathode Additive (20x) | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| NuPAGE LDS Sample Buffer (4x) | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| NuPAGE Sample Reducing Agent | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| NuPAGE Transfer Buffer (20x) | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| Paraformaldehyd (PFA) | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin 100 x) | PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland) |
| Proteaseinhibitor (complete mini) | Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland) |

2. Material und Methoden

| | |
|--|---|
| Polyethylene-Glycol (PEG 4000) | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| SDS | Roth (Karlsruhe, Deutschland) |
| Streptavidin Sepharose High Performance | GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) |
| Triethylammoniumacetat (TEAA) | Transgenomics (Glasgow, UK) |
| TO-PRO-3 Iodide (642/661) in DMSO | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| Tris | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Tris-Glycine SDS Gele, Ladepuffer und Laufpuffer | Bio-Rad (München, Deutschland) |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Trypton/Pepton | BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Vectashield Mounting Medium | Vector Labs (Burlingame, US) |
| Whatman Westran PVDF membran | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| YPD Agar Medium | Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) |
| YPD Medium | Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) |

2.1.2 Laborgeräte

| Name | Hersteller |
|---|--|
| ANTAES 48/72 Sterilbank | BIOHIT (Rosbach, Deutschland) |
| Autoklav (2540L) | Systemec (Wettenberg, Deutschland) |
| FluorChem SP | Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, Deutschland) |
| Gel Doc XR (Geldokumentation) | Bio-Rad (München, Deutschland) |
| CO ₂ -Inkubator (Zellkultur) | Nunc (Langenselbold, Deutschland) |
| HPLC (WAVE DNA Fragment Analyse System) | Transgenomics (Glasgow, UK) |
| Induce II Inkubator | MMM Münchener Medizin Mechanik GmbH (Planegg, Deutschland) |
| Konfokales Mikroskop Olympus Fluoview FV 1000 | Olympus (Tokyo, Japan) |
| Mini-Protean Tetra Cell & Mini Trans-Blot | Bio-Rad (München, Deutschland) |

2. Material und Methoden

| | |
|---|--|
| pH-Meter | Knick (Berlin, Deutschland) |
| Photometer (Nanodrop 3300) | Thermo Scientific (Waltham, US) |
| Pipette (Reference 10 µl, 100 µl, 1000 µl, Research Mehrkanal 100 µl) | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| PowerPac HV Power Supply | Bio-Rad (München, Deutschland) |
| Pyrosequenzierer (PSQ96MA) | Biotage AB (Uppsala, Schweden) |
| Sequenziergerät 3130xl Genetic Analyzer | Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) |
| Thermocycler (T1, T3, T3000) | Biometra (Göttingen, Deutschland) |
| Thermomixer comfort | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| Waage (PM2000) | Mettler (Gießen, Deutschland) |
| X Cell Sure Lock Mini Cell & X Cell II Blot | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| Zentrifuge | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) Sigma Laborzentrifugen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland) |

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

| Material | Hersteller |
|---|--|
| 1,5 ml / 2 ml Reaktionsgefäße | Eppendorf (Hamburg, Deutschland) |
| 15 ml / 50 ml Röhrchen | Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland) |
| Cellstar 6 Well Cell Culture Plate | Greiner Bio One GmbH (Frickenhausen, Deutschland) |
| Kryoröhrchen 2 ml | Corning B.V. Life Sciences (Amsterdam, Niederlande) |
| Stripette 5 ml / 10 ml / 25 ml Costar | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Tissue Culture Dish 100 mm | Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) |
| Pipettenspitzen | Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) |
| Objektträger (26 x 76mm) | Labomedic (Bonn, Deutschland) |
| Deckgläser (24 x 60mm) | Labomedic (Bonn, Deutschland) |
| Deckgläser rund (15mm) | Labomedic (Bonn, Deutschland) |
| Mini Proteian TGX Gele 10% 10-well | Bio-Rad (München, Deutschland) |
| NativePAGE Novex 4-16% Bis-Tris Gele | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |

2. Material und Methoden

| | |
|----------------------------------|--|
| NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gele | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
|----------------------------------|--|

2.1.4 Kommerzielle Anwendungs-Kits

| Name | Hersteller |
|---|---|
| Anti-FLAG M2 Affinity Gel | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit | Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) |
| DNeasy Blood & Tissue Kit | QIAGEN (Hilden, Deutschland) |
| EZ DNA Methylation-Gold Kit | ZYMO Research (Irvine, US) |
| Lipofectamine 2000 | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| Pyro Gold Reagents | QIAGEN (Hilden, Deutschland) |
| QIAprep Gel Extraction Kit | QIAGEN (Hilden, Deutschland) |
| QIAprep Spin Miniprep/ Midiprep Kit | QIAGEN (Hilden, Deutschland) |
| NativePAGE Sample Prep Kit | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |

2.1.5 Vektoren

Die Vektorkarten der jeweiligen Plasmide befinden sich in Anhang A.3.

| Name | Verwendungszweck | Hersteller |
|--------------------|--------------------------------------|--|
| pDONR 201 | Gateway-Klonierung (Entry-Vektor) | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| pGBKT7 | Yeast-Two-Hybrid (Gal4-System) | Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) |
| pGADT7 | Yeast-Two-Hybrid (Gal4-System) | Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) |
| pcDNA3.1/myc-His B | Immunopräzipitation | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| pcDNA3.1/Flag | Immunopräzipitation | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| pEGFP-C1 | Konfokale Mikroskopie | Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) |
| pDsRED2-N1 | Konfokale Mikroskopie | Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) |

2.1.6 Längenstandards

| Name | Hersteller |
|---|---|
| GeneRuler 100 bp DNA Ladder | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| GeneRuler 1kb DNA Ladder | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| Precision Plus Protein Dual Color Standards | Bio-Rad (München, Deutschland) |
| NativeMARK™ Unstained Protein Standard | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |

2.1.7 Puffer und Lösungen

| | |
|-------------------------------------|---|
| Auftragspuffer für Agarosegele (4x) | 40 % w/v Saccharose 0,1 % w/v Xylencyanol 0,1 % w/v Bromphenolblau auf 100 ml mit TAE-Puffer auffüllen |
| Dream Taq Puffer (1x) | 100 µl 10 x Dream-Puffer 80 µl Nukleotidstammlsg. (Endkonzentration 2,5 mM) 720 µl Aqua. Dest |
| EtOH-Acetat-Lösung | 0,1 M NaAc pH 4,6 75 % v/v EtOH |
| Lösung A (HRP-Detektion) | 0,1 M Tris-HCl 25 mg Luminol |
| Lösung B (HRP-Detektion) | 11 mg Hydroxycumarinsäure in 10 ml DMSO |
| Nonidet-P40 | 150 mM NaCl 1% NP-40 / Triton 100 50 mM Tris, pH 8,0 |
| PFU-Puffer (1x) | 100 µl 10 x PFU-Puffer 80 µl Nukleotidstammlsg. (Endkonzentration 1,25 mM) 720 µl Aqua. Dest |
| „Stripping“ Puffer | 15 g Glycin 1 g SDS 10 ml Tween 20 pH 2,2 einstellen und auf 1000 ml mit Aqua dest. Auffüllen |
| TAE (50x) | 0,5 M EDTA pH 8,0 2 M Tris 1 M Eisessig Erst EDTA in 100 ml Aqua dest. Lösen und pH-Wert einstellen, dann 900 ml mit den anderen Chemikalien versetzen und die Volumina mischen. |

2. Material und Methoden

| | |
|----------------------|---|
| TBS (10x) | 0,1 M Tris 1,5 M NaCl |
| TE-Puffer (pH 8) | 10 mM Tris HCL pH 8 1 mM EDTA |
| Transferpuffer (10x) | 250 mM Tris (pH 8,3) 1,92 M Glycin 1% w/v SDS |

2.1.8 Enzyme

| Name | Hersteller |
|--------------------------------------|---|
| BP Clonase II Enzym Mix | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| Dream Taq DNA Polymerase | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| Dpnl | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| Exol | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| FastAP | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| Hotfire Taq Polymerase | Solis Biodyne (Tartu, Estland) |
| iproof DNA Polymerase | Bio-Rad (München, Deutschland) |
| LR Clonase II Enzym Mix | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| Phusion High-Fidelity DNA Polymerase | Finnzymes/Thermo Scientific (Vantaa, Finnland) |
| <i>Pfu Turbo</i> DNA Polymerase | Agilent Technologies (Böblingen, Deutschland) |
| TERMI Polymerase | Solis Biodyne (Tartu, Estland) |

2.1.9 Primärantikörper

| Name | Verdünnung | Hersteller |
|-------------------------|------------|--|
| Anti-c-Myc (rabbit) | WB: 1:500 | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Anti-c-Myc-HRP (mouse) | WB: 1:2500 | Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Deutschland) |
| Anti-Flag M2 (mouse) | WB: 1:500 | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Anti-Flag M2-AP (mouse) | WB: 1:1000 | Sigma-Aldrich (München, Deutschland) |
| Anti-NLRP7 (goat) | IF:1:100 | Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland) |

2. Material und Methoden

| | | |
|---------------------------------|-----------|---|
| Anti-26s Proteasome (mouse) | IF: 1:100 | Abcam (Cambridge, UK) |
| Anti-ubiquitin (mouse) | IF: 1:100 | Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland) |
| Anti-PLZF/ZBTB16 (mouse) | IF: 1:100 | Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland) |
| Anti- γ -tubulin (mouse) | IF: 1:100 | Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland) |
| Anti-Vimentin (rabbit) | IF: 1:100 | Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland) |

2.1.10 Sekundärantikörper

| Name | Verdünnung | Hersteller |
|---|------------|--|
| Anti-mouse IgG _{2a} -HRP (goat) | WB: 1:4000 | Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland) |
| Anti-mouse IgG (goat)- Alexa Fluor 488 | IF: 1:1000 | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| Anti-mouse IgG (donkey)- Alexa Fluor 555 | IF: 1:1000 | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| Anti-rabbit IgG (goat)- Alexa Fluor 555 | IF: 1:1000 | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| Anti-rabbit IgG-HRP (donkey) | WB: 1:4000 | Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland) |

2.1.11 Verwendetes biologisches Material

| Name | Firma/Hersteller |
|--|--|
| <i>E. coli</i> DH5 α , Library Efficiency DH5 α Competent Cells | Invitrogen/Life technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| HEK293T (human embryonic kidney cells) | DMSZ (Braunschweig, Deutschland) |
| One Shot TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i> | Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) |
| Hefestamm AH109 | Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) |

2.1.12 Medien für Bakterienkultur

DH5alpha

LB-Medium:

| | |
|---------------------|--------|
| Trypton/Pepton | 10 g/L |
| Bacto Yeast Extract | 5 g/L |
| NaCl | 5 g/L |

Der Ansatz wird mit Wasser bidest. aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf mindestens 50°C werden die entsprechenden Antibiotika in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugeben.

LB-Platten:

| | |
|----------------|--------|
| Trypton/Pepton | 10 g/L |
| Hefeextrakt | 5 g/L |
| NaCl | 5 g/L |
| Agar | 15 g/L |

Der Ansatz wird mit Wasser bidest. aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf mindestens 50°C werden die entsprechenden Antibiotika (Endkonzentration 50 µg/ml) zugeben und in Petrischalen gegossen. Die ausgehärteten Platten werden bei 4°C gelagert.

Bakterienstock:

Die Vorkultur (5 ml) wird abzentrifugiert, das Pellet in 730 µl frischem LB-Medium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführen. Des Weiteren wurde 130 µl Glycerol hinzugefügt und die Glycerolstocks bei -80°C gelagert.

2.1.13 Medien für Hefekultur

YPD-Medium:

| | |
|------------|--------|
| YPD-Medium | 50 g/L |
|------------|--------|

YPD-Agar-Medium:

| | |
|-----------------|--------|
| YPD-Agar-Medium | 70 g/L |
|-----------------|--------|

SD-Agar-Platten (SD low):

| | |
|-------------------------|----------|
| Minimal SD Agar-Base | 46,7 g/L |
| -Leu/-Trp D0 Supplement | 0,64 g/L |

SD-Agar-Platten (SD med):

| | |
|------------------------------|----------|
| Minimal SD Agar-Base | 46,7 g/L |
| -Leu/-Trp/-His D0 Supplement | 0,62 g/L |

SD-Agar-Platten (SD high):

| | |
|-----------------------------------|----------|
| Minimal SD Agar-Base | 46,7 g/L |
| -Leu/-Trp/-His/-Ade D0 Supplement | 0,60 g/L |

2.1.14 Medien für Zellkultur

HEK293T

Expressionsmedium:

| | |
|--------------------------|-------------|
| MEM-Medium | 500 ml |
| FBS | 50 ml (10%) |
| NEAA | 5 ml (1%) |
| Penicillin/ Streptomycin | 5 ml (1%) |

Transfektionsmedium:

| | |
|------------|--------|
| MEM-Medium | 500 ml |
|------------|--------|

2.1.15 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma Eurofins hergestellt.
Die Primersequenzen befinden sich in Anhang A.2.

2.1.16 Programme

- Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>)
- Geneious R6 (<http://www.geneious.com/>)
- GraphPad PRISM (<http://www.graphpad.com/>)
- ITASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)
- MOLPROBITY (http://psb.kobic.re.kr/molprobit/public_html/)
- MZ-Dock (<http://zdock.umassmed.edu/m-zdock/>)
- YASARA (<http://www.yasara.org/>)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Kary Mullis entwickelte 1983 die Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) zur exponentiellen Vervielfältigung spezifischer Nucleinsäuren [89,90]. Bei dieser Methode macht man sich die Eigenschaft der DNA-Polymerase zunutze, welche doppelsträngige DNA an ihrem freiem 3'-OH-Ende verlängert. Diese Situation kann künstlich durch kurze Oligonucleotide (Primer) erzeugt werden, die komplementär zu einem bestimmten DNA-Abschnitt sind. Zwei Primer (jeweils für den sense- und antisense-Strang) legen somit den Start- sowie Endpunkt des zu amplifizierenden DNA-Stranges fest.

In der Regel besteht jeder PCR-Zyklus aus den drei Schritten Strangtrennung, Hybridisierung der Primer und DNA-Synthese. Im ersten Schritt werden die Stränge des ursprünglichen DNA-Moleküls getrennt indem man den Ansatz für 30 Sekunden zwischen 92-98°C erhitzt („Denaturierung“). Anschließend wird das Reaktionsgemisch schnell auf eine Primer-spezifische Temperatur (zwischen 50-62°C) abgekühlt, damit die Primer mit einem 3'-Ende eines DNA-Stranges hybridisieren können („Annealing“). Schließlich erfolgt die DNA-Synthese bei 72°C, der optimalen Reaktionstemperatur der Taq-DNA-Polymerase (aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*), die beide Primer in Richtung der Zielsequenz, von 5' nach 3' verlängert („Elongation“). Die Zielsequenz wird so exponentiell amplifiziert. Im Idealfall entsteht nach n Zyklen die 2ⁿ-fache Produktmenge.

Neben der zu amplifizierenden DNA werden ein Primerpaar („forward“ und „reverse“), alle vier Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs), eine Pufferlösung, Mg²⁺-Ionen und eine hitzestabile DNA-Polymerase für die Amplifikation benötigt.

| <u>PCR-Ansatz:</u> | <u>PCR-Programm:</u> |
|---|----------------------|
| 24 µl 1x PCR-Puffer | 95°C 5 min |
| je 0,5 µl 20 pmol Primer („forward“ und „reverse“) | 95°C 30 s |
| 0,2 µl Taq - Polymerase | 50 - 62°C 30 s |
| 20 - 100 ng DNA | 72°C 1 min / kb |
| | 72°C 5 min |
| | 4°C ∞ |

} 25-30 x

2.2.1.2 Gezielte Mutagenese

Die PCR kann auch dazu genutzt werden, um einen gezielten Nukleotidaustausch in der DNA durchzuführen (engl. site-directed mutagenesis). Dafür werden Mutagenese-Primer benötigt, die die gewünschte Punktmutation in der Mitte tragen, ansonsten aber komplementär zur Zielsequenz und insgesamt mindestens 30 Basenpaare lang sind [91].

Für die Mutagenese-PCR wurde die PFU-Polymerase verwendet, welche neben der 5'-3' Polymeraseaktivität auch eine 3'-5' Exonukleaseaktivität besitzt. Durch die 3'-5' Exonukleaseaktivität erhält die PFU-Polymerase Korrektur-Eigenschaften (proof reading) mit der falsch eingebaute Nukleotide erkannt und anschließend entfernt werden. Somit arbeitet die PFU-Polymerase genauer aber auch wesentlich langsamer im Vergleich zur herkömmlichen Taq-Polymerase.

| <u>PCR-Ansatz:</u> | <u>PCR-Programm:</u> |
|---|--------------------------------------|
| 23 µl 1x PFU-Puffer | 95°C 3 min |
| je 0,4 µl 20 pmol Primer („forward“ und „reverse“) | 95°C 30 s |
| 0,5 µl PFU - Polymerase | 60°C 1 min |
| 1 µl Template (10 ng/µl) | 68°C 2 min / kb des Plasmids |
| | 95°C 30 s |
| | 60°C 1 min |
| | 68°C 2 min / kb des Plasmids + 2 min |
| | 4°C ∞ |

} 15x

} 15x

Nach der Mutagenese wurde ein DpnI-Verdau wie unter 2.2.1.7 beschrieben durchgeführt.

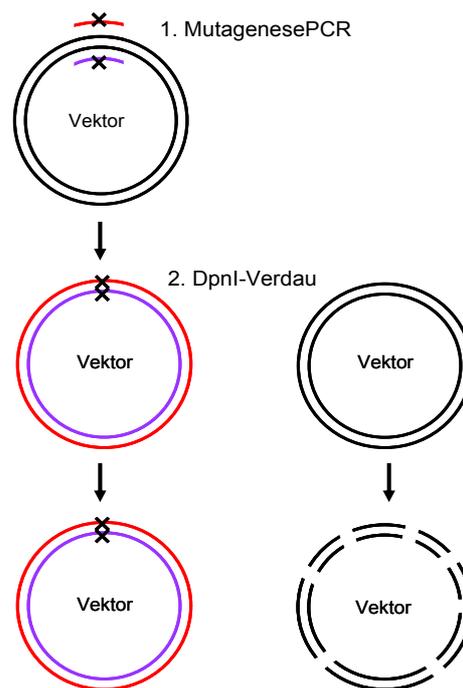


Abb. 2.1: Prinzip der Mutagenese-PCR.

Nach der Denaturierung des Original-Plasmids hybridisieren die Mutagenese-Primer mit dem Plasmid und die Taq-Polymerase beginnt das Plasmid zu amplifizieren. Nach der PCR-Reaktion wird das Original-Plasmid durch die Endonuklease DpnI abgebaut, das neu amplifizierte, mutationstragende Plasmid hingegen nicht.

2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Moleküle hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt werden. Dazu wird an das Agarose-Gel ein elektrisches Feld angelegt und die aufgrund ihrer Phosphatreste negativ geladenen DNA-Moleküle wandern zur Anode. Zwischen der Größe der Fragmente und deren zurückgelegter Wegstrecke besteht ein negativ logarithmischer Zusammenhang, so dass eine Auftrennung nach Größe möglich wird. Durch die Agarosekonzentration kann die Porengröße des Gels und somit die Wanderungsfähigkeit der DNA-Moleküle beeinflusst werden. Die aufgetrennte DNA kann schließlich mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid, der in doppelsträngige DNA interkaliert, durch Bestrahlung mit UV-Licht (254-366 nm) sichtbar gemacht werden [92].

Für die Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurde Agarose 1%ig w/v mit 1 x TAE-Lösung aufgekocht und Ethidiumbromid hinzugegeben (Endkonzentration 10 µg/ml). Die DNA-Proben wurden mit 1x Auftragspuffer versetzt und anschließend für 25-35 min bei 150V in 1xTAE-Puffer elektrisch aufgetrennt. Als Längenstandard wurden je nach Größe des erwarteten PCR-Produkts definierte DNA-Marker verwendet. Die Detektion sowie Dokumentation erfolgte über ein ChemiDoc-System der Firma Biorad.

2.2.1.4 DNA-Isolation aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung von DNA-Fragmenten können diese gezielt aus Agarosegelen herausgeschnitten und aufgereinigt werden. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich sog. „Megaprimer“ aus Agarosegelen ausgeschnitten und aufgereinigt um diese für das restriktionsfreie Klonieren (RF) zu verwenden (Abschnitt 2.2.1.6).

Die Isolation von DNA-Molekülen aus Agarosegelen erfolge mit Hilfe des QIAprep Gel Extraction Kit von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.1.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Bestimmung der Nukleotidabfolge eines DNA-Abschnitts. In dieser Arbeit erfolgte die Sequenzierung mittels der „Kettenabbruchsynthese“ nach Frederick Sanger [93]. Zuerst wird der Bereich, den man sequenzieren möchte, mittels PCR amplifiziert und anschließend aufgereinigt um überschüssige Primer und dNTPs zu entfernen. Die Sequenzierreaktion erfolgt mit dem aufgereinigten PCR-Produkt, einem einzelnen Primer, dNTPs, fluoreszenzmarkierten ddNTPs (für jede Base ein anderer Fluoreszenzfarbstoff) und einer Taq-Polymerase. Ähnlich wie bei der herkömmlichen PCR läuft die Sequenzierreaktion auch in den Schritten Denaturierung, Primer-Anlagerung und Primer-Verlängerung ab. Der Unterschied liegt darin, dass aufgrund der Benutzung von nur einem Primer auch nur ein komplementärer Strang während der Reaktion verlängert wird. Zusätzlich wird neben der großen Menge an Desoxy-Nukleotiden (dNTPs), eine kleine Menge an Didesoxy-Nukleotiden (ddNTPs), denen die OH-Gruppe am 3' C-Atom fehlt, eingesetzt. Nach zufälligem Einbau eines fluoreszenzmarkierten ddNTPs wird der DNA-Strang nicht weiter verlängert, da die

DNA-Polymerase das nächste Nukleotid aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe nicht kondensieren kann. Wegen des Abbruchs der Sequenzierreaktion nach Einbau eines ddNTPs wird diese Methode „Kettenabbruchsynthese“ genannt. So entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge mit einem spezifisch endständigen fluoreszierendem ddNTP. Über eine Kapillarelektrophorese können diese Fragmente aufgetrennt und der Fluoreszenz-Farbstoff in Abhängigkeit zu der Länge des DNA-Fragments detektiert werden. Schließlich entsteht ein Chromatogramm, welches die Basenabfolge als Abfolge der Fluoreszenzmaxima wiedergibt.

Die Sequenzierreaktion wurde nach folgendem Schema und Temperaturprofil angesetzt:

| <u>Sequenzier-Ansatz:</u> | <u>Sequenzier-Programm:</u> |
|---|-----------------------------|
| 2 µl aufgereinigtes PCR-Produkt oder Plasmid | 96°C 1 min |
| 0,5 µl Ready Mix | 96°C 10 s |
| 1,5 µl 5 x Sequenzierpuffer | 50°C 5 s |
| 0,5 µl 3,2 pmol „forward“ oder „reverse“ Primer | 60°C 4 min |
| 6,5 µl Aqua dest. | 4°C ∞ |

Nach Abschluss der Sequenzierreaktion wurde der Ansatz sofort mittels Ethanol-Acetat Fällung aufgereinigt oder zur späteren Aufreinigung bei -20°C gelagert.

EtOH-Acetat-Fällung und Sequenzierung

Das Sequenzierprodukt wurde mit einer Ethanol-Acetat-Lösung gefällt und mit EtOH gewaschen um überschüssige ddNTPs zu entfernen, die bei der Detektion des Sequenzierproduktes stören würden.

Zu dem Sequenzierprodukt wurden 10 µl Aqua dest., 2 µl Natrium-Acetat (3M, pH 4,6) und 50 µl Ethanol (95%) hinzugefügt und 45 min bei 4°C und 4000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Zellstoff ausgeklopft und 1 min über Kopf bei 1000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit 200 µl Ethanol (70%) versetzt und abermals bei 4°C bei 4000 U/min 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation wiederholt verworfen und die Pellets getrocknet. Zur Analyse mittels eines Kapillarsequenziergeräts wurden die Pellets in 15 µl HiDi-Formamid aufgenommen.

2.2.1.6 Klonierung

Bei der Klonierung wird ein beliebiges DNA-Fragment in einen Vektor integriert. Der Vektor kann z.B. ein Plasmid sein, welches anschließend zur Vermehrung in einen Wirtsorganismus (z.B. *Escherichia coli*) transformiert werden kann.

Die „klassische“ Klonierung nutzt Restriktionsenzyme um das Plasmid zu öffnen. Somit wird das Plasmid linearisiert und besitzt je nach Wahl des Restriktionsenzym(s) sog. „glatte“ Enden (blunt ends) oder „überhängende“ Enden (sticky ends). Die DNA, die als Insert in den Vektor integriert, sollte möglichst dieselben Enden wie die des offenen Vektors besitzen. Durch eine DNA-Ligase kann das Insert kovalent mit dem Vektor verknüpft werden. Klonieren ist auch ohne die Verwendung von Restriktionsenzymen und DNA-Ligase möglich:

Gateway Klonierungs-Technologie

Die Gateway Klonierungs-Technologie stammt von Invitrogen. Das System nutzt die seitenspezifische Rekombination des Phagen Lambda. Für die Integration der Lambda-DNA in das E.coli Genom besitzen beide Organismen sogenannte Rekombinations-Abschnitte, *attP* in dem Phagen Lambda und *attB* in E.coli. Die Integration wird über zwei Enzyme katalysiert: Das Phagen-kodierte Protein Int (Integrase) und das E.coli Protein IHF (Integration Host Factor). Dieser Vorgang ist reversibel. Für die Exzision wird zusätzlich das Phage Lambda Protein Xis benötigt.

Die Gateway-Reaktion ist eine „in vitro“ Version der Integration und Exzision zwischen Lambda und E.coli. Hierbei wird zunächst der zu klonierende DNA-Abschnitt mit den entsprechenden DNA Rekombinations-Sequenzen (*attB1* und *attB2*-Überhang) amplifiziert. Diese 25bp Überhänge werden in der BP-Reaktion von den an der Rekombination beteiligten Enzymen erkannt und über Rekombination in einen sog. Donor-Vektor (pDONR201) kloniert (Abb 2.2). Der Donor-Vektor enthält eine Gateway-Kassette dessen *attP*-Überhänge das *ccdB*-Gen flankieren. Bei dem *ccdB*-Gen handelt es sich um ein Selbstmordgen, dessen Genprodukt auf die im Labor verwendeten Bakterienstämme toxisch wirkt indem es die Gyrase hemmt. Durch die Rekombination zwischen den *attB* und *attP*-Überhängen wird das *ccdB*-Gen gegen das PCR-Produkt ausgetauscht und es entsteht ein Entry-Klon (Eingangs-Clone) mit flankierenden *attL*-Überhängen. Als Nebenprodukt bleibt das mit *attR* versehene Selbstmordgen erhalten. Nach erfolgreicher Transformation sind somit nur die Bakterien mit dem korrekt rekombinierten Entry-Klon überlebensfähig.

2. Material und Methoden

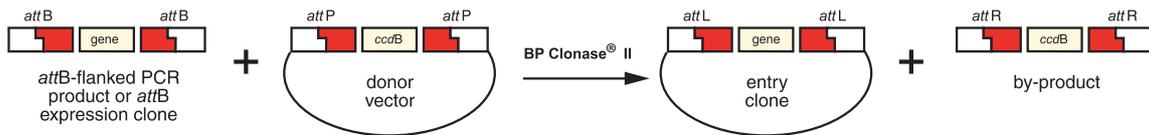


Abb. 2.2: Gateway-Klonierung BP-Reaktion. Die zu klonierende cDNA mit attB-Überhängen rekombiniert nach Zugabe der BP Clonase mit den attP-Überhängen des *ccdB*-Gens im Donorvektor. Es entsteht ein cDNA enthaltender „Entry“-Klon mit attL Überhängen, während das mit attR-Überhängen versehene *ccdB*-Gen ein inaktives Nebenprodukt bildet (Quelle: Invitrogen, Gateway Technology).

Aus dem transkriptionell stillen Entry-Klon kann man schließlich den zu klonierenden Genabschnitt in jeden beliebigen Expressions-Vektor umklonieren. Hierbei schneiden die entsprechenden Rekombinationsproteine der LR-Reaktion die flankierenden attL-Überhänge des Entry-Klons und ligieren diese mit den entsprechenden attR-Überhängen eines sogenannten Destination-Vektors (Ziel-Vektor). Zwischen den attR-Überhängen befindet sich wieder ein *ccdB*-Gen. Nach erfolgreicher Rekombination entsteht ein Expressions-Vektor mit flankierenden attB-Überhängen. Sein Nebenprodukt enthält das *ccdB*-Gen mit flankierenden attP-Überhängen (Abb 2.3). Nach erfolgreicher Transformation sind somit nur die Bakterien mit dem korrekt rekombinierten Expressions-Klon überlebensfähig. Die unterschiedliche Antibiotika-Resistenz zwischen Entry-Vektor (Kanamycin) und Expressions-Vektor (Ampicillin) ermöglicht eine doppelte Selektion.



Abb. 2.3: Gateway-Klonierung LR-Reaktion. Die attL-Überhänge des „Entry“-Klon rekombinieren bei Zugabe der LR Clonase mit dem „Destination“-Vektor. Nach dem Austausch entsteht ein Expressions-Klon mit attB-Überhängen und als Nebenprodukt ein Vektor mit dem jetzt inaktiven *ccdB*-Gen und flankierenden attP-Überhängen (Quelle: Invitrogen, Gateway Technology).

2. Material und Methoden

Die attB-PCR-Produkte wurden mittels einer iproof DNA-Polymerase (Bio-Rad) hergestellt:

PCR-Ansatz:

10 µl HF-Puffer
1 µl dNTPs (10 mM)
je 1 µl 20 pmol Primer
(„forward“ und „reverse“)
1 µl Template (10 ng)
0,5 µl iproof DNA - Polymerase
ad 50 µl Aqua dest.

PCR-Programm:

| | | |
|------|--------|--------|
| 98°C | 30 s | |
| 98°C | 10 s | } 30 x |
| 60°C | 30 s | |
| 72°C | 1 min | |
| 72°C | 10 min | |
| 4°C | ∞ | |

Aufreinigung des attB-PCR-Produktes:

50 µl PCR-Produkt
150 µl TE
100 µl 30% PEG/Mg Lösung

Der Ansatz wurde gut gemischt und bei 10,000xg für 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 µl TE gelöst.

BP-Reaktion:

1-10 µl aufgereinigtes attB-PCR-Produkt (30-300ng)
2 µl Donor-Vektor (150ng/µl)
4 µl 5 x BP Clonase™ Reaktionspuffer
auf 16µl TE-Puffer, pH 8,0

4 µl BP Clonase™ Enzym-Mix

Der Ansatz wurde in ein 1,5 ml Zentrifugengefäß pipettiert und gut gemischt. Der Enzym-Mix wurde zuletzt hinzugefügt und die Reaktion schließlich über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl Proteinase K und einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C wurde die Reaktion gestoppt. Von der BP-Reaktion wurde 1 µl in 50 µl kompetente E.colis transformiert.

LR-Reaktion:

- 1-10 µl Entry-Klon (100-300ng)
- 2 µl Destination-Vektor (150ng/µl)
- 4 µl 5 x LR Clonase™ Reaktionspuffer
- auf 16µl TE-Puffer, pH 8,0

- 4 µl LR Clonase™ Enzym-Mix

Der Ansatz wurde in ein 1,5 ml Zentrifugengefäß pipettiert und gut gemischt. Der Enzym-Mix wurde zuletzt hinzugefügt und die Reaktion schließlich über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl Proteinase K und einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C wurde die Reaktion gestoppt.

Im Fall einer doppelten Kanamycin-Resistenz wurde nach der LR-Reaktion ein Enzymverdau durchgeführt. Das Enzym darf in diesem Fall nur im Entry-Vector schneiden. Von der LR-Reaktion wurde 1 µl in 50 µl kompetente E.colis transformiert.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Hefe-Konstrukte wurden mit Hilfe des Gateway-Verfahrens in die entsprechenden Vektoren kloniert.

Restriktionsfreies Klonieren

Bei dem restriktionsfreien Klonieren („restriction free cloning“) wird das gewünschte DNA-Fragment mittels PCR in den Vektor integriert. Dafür muss das DNA-Fragment Sequenz-Überhänge in einer Länge von mindestens 30bp besitzen, die komplementär zu der für die Insertion gewählte Vektorsequenz sind. Da das Insert bis zu 3 kb groß sein kann und mit seinen Überhängen die Funktion eines Primers hat, wird es auch „Megaprimer“ genannt. Die Megaprimer werden über PCR generiert und mittels Gelextraktion für den Einsatz in die „restriction free cloning-PCR“ (RF-PCR) entsprechend aufgereinigt. Prinzipiell funktioniert die RF-PCR wie eine herkömmliche PCR. Der Megaprimer hybridisiert mit dem einzelsträngigen Plasmid und die Taq-Polymerase synthetisiert den Gegenstrang. Nach der RF-PCR wird ein DpnI-Verdau durchgeführt um das ursprüngliche Plasmid ohne Insert zu entfernen. Mittels RF-Klonierung sind auch Deletionen oder ein kompletter Austausch des Inserts möglich [94].

2. Material und Methoden

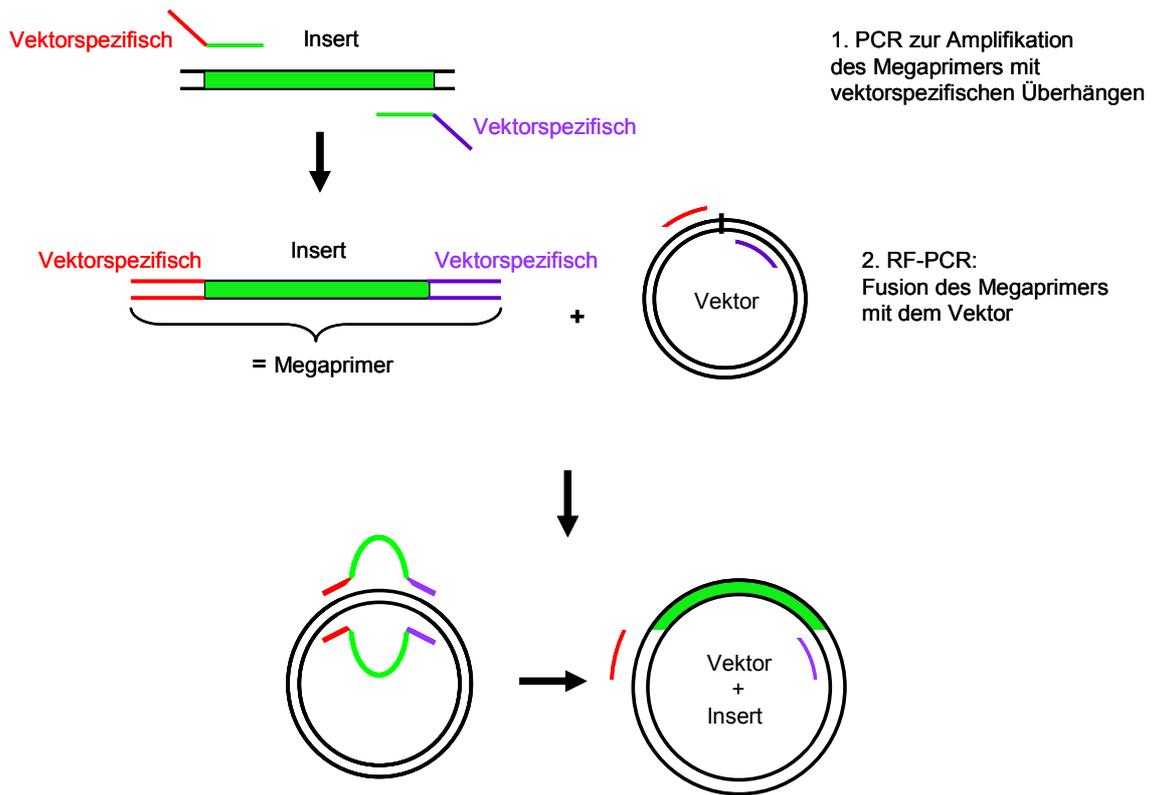


Abb 2.4: Schema zum restriktionsfreiem Klonieren (Restriction free cloning).

In einem ersten PCR-Ansatz wird ein sog. „Megaprimers“ mit Überhängen, die komplementär zu dem Plasmid sind amplifiziert. In der zweiten PCR (RF-PCR) bindet der Megaprimers an das Plasmid und die Taq-Polymerase synthetisiert den Gegenstrang, so dass ein Konstrukt entsteht indem das Insert von dem Vektor integriert wurde.

Die Megaprimers wurden mittels einer iproof DNA-Polymerase (Bio-Rad) hergestellt:

PCR-Ansatz:

| | |
|----------|---|
| 10 µl | HF-Puffer |
| 1 µl | dNTPs (10 mM) |
| je 1 µl | 20 pmol Primer („forward“ und „reverse“) |
| 1 µl | Template (10 ng) |
| 0,5 µl | iproof DNA - Polymerase |
| ad 50 µl | Aqua dest. |

PCR-Programm:

| | | |
|------|--------|--------|
| 98°C | 30 s | } 30 x |
| 98°C | 10 s | |
| 60°C | 30 s | |
| 72°C | 1 min | |
| 72°C | 10 min | |
| 4°C | ∞ | |

| <u>RF-PCR-Ansatz:</u> | <u>PCR-Programm:</u> |
|---|----------------------|
| 4 µl Phusion HF-Puffer | 98°C 2 min 30 s |
| 1,6 µl dNTPs (2,5 mM) | 98°C 30 s |
| 1 µl Megaprimer (50 - 100 ng) | 60°C 1 min |
| 0,5 µl Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase | 72°C 6 min |
| 1,5 µl Vektor (10 ng/µl) | 72°C 7 min |
| 11,5 µl Aqua dest. | 4°C ∞ |

Alle in der Immunopräzipitation und konfokalen Mikroskopie verwendeten cDNA-Konstrukte wurden über das restriktionsfreie Klonieren („restriction free cloning“) in die entsprechenden Vektoren eingefügt.

2.2.1.7 DpnI Verdau

DpnI ist eine Endonuklease die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA an der Sequenz 5'-Gm⁶ATC-3' schneidet.

Bakterien methylieren ihre eigene DNA, um sie von Fremd-DNA, die durch Bakteriophagen eingeschleust wurde, zu unterscheiden. Plasmide die in *E.coli* amplifiziert werden, werden ebenfalls von dem Bakterium methyliert. Diesen Mechanismus macht man sich nach der Mutagenese-PCR zu nutze, um das methylierte Original-Plasmid welches keine Mutation trägt, abzubauen. Die mutagenisierten Plasmide, die mittels PCR generiert wurden, sind nicht methyliert und werden somit nicht von der Endonuklease DpnI geschnitten.

In den PCR-Ansatz (20-25 µl, Mutagenese oder RF-Klonierung) wurden 1 µl DpnI hinzugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

2.2.1.8 Transformation in *E.coli*

Plasmide werden für eine Vervielfältigung in kompetente Zellen (*E.coli*) transformiert. Eine Selektion erfolgt über Nährböden mit Antibiotikum, auf dem nur *E.coli* wachsen können, die das Plasmid mit entsprechendem Antibiotikum-Resistenzgen aufgenommen haben.

Transformation in One Shot Top10 *E.coli*

Zu den auf Eis aufgetauten chemisch kompetenten *E.coli* - Zellen (50 µl) wurden 5 µl des mit DpnI verdauten Mutagenese-Ansatzes/ RF-Ansatzes gegeben. Nach 30 min Inkubation wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 45 s durchgeführt. Der Ansatz wurde direkt für 2 min auf Eis gekühlt und anschließend erfolgte eine Zugabe von 250 µl SOC-Medium. Die *E.coli*-Zellen wurden für 60 min bei 37°C geschüttelt und abschließend auf einer LB-Platte (mit entsprechendem Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.9 Plasmid-Präparation

Die Plasmidpräparation dient der Gewinnung und Aufreinigung von Plasmiden, die in Bakterien vermehrt wurden. Dazu wird eine Bakterienkultur durch alkalische Lyse aufgeschlossen, von Proteinen befreit und die Plasmid-DNA mittels einer Silicagel-Membran von dem restlichen Lysat befreit. Schließlich wird die DNA in Wasser eluiert.

Je nach Verwendungszweck wurde das Miniprep oder Midiprep Kit (Qiagen) verwendet. Bakterienlyse und Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die isolierten Plasmide wurden in Wasser aufgenommen und die DNA-Konzentration sowie der Reinheitsgrad photometrisch bestimmt.

2.2.1.10 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA lässt sich mittels eines UV-Spektralphotometers bestimmen. Da einzel- sowie doppelsträngige Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm haben, wurde die Messung bei dieser Wellenlänge durchgeführt.

2.2.1.11 Bisulfit Konversion der DNA

Die Bisulfit-Konvertierung ermöglicht die gezielte und genomweite Basenumwandlung eines DNA-Moleküls. Das Prinzip dieser Methode basiert auf einer selektiven Konversion von freien unmethylierten Cytosin-Resten zu Uracil-

Resten durch Behandlung mit Natriumbisulfit, während methylierte Cytosin-Reste als Cytosinbasen bestehen bleiben .

Die Reaktion verläuft in 3 Schritten (siehe Abb. 2.5): 1) Sulfonierung, 2) Desaminierung, und 3) Desulfonierung.

- 1) Reversible Sulfonierung von Cytosin-Resten zu Cytosin-6-sulfanat bei niedrigem pH-Wert und niedriger Temperatur
- 2) Irreversible hydrolytische Desaminierung von Cytosin-6-sulfanat zu Uracil-6-sulfanat unter hohen Konzentrationen von Natriumbisulfit und hoher Temperatur. Das pH-Optimum liegt zwischen pH 5 und 6.
- 3) Reversible Desulfonierung von Uracil-6-sulfanat zu Uracil bei hohem pH-Wert.

Doppelstrang-DNA bleibt bei dieser Reaktion nahezu unverändert. Es ist daher wichtig, dass die DNA zuvor denaturiert wird. Bei der nun vorliegenden Einzelstrang-DNA verläuft die Reaktion hoch selektiv.

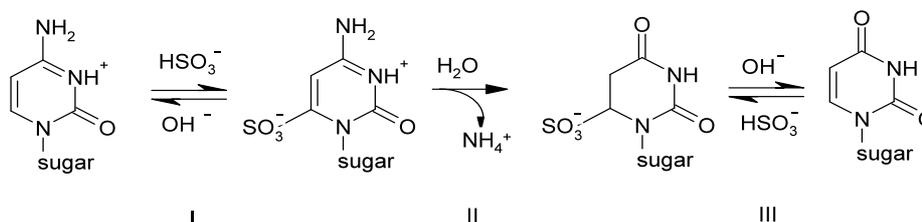


Abb. 2.5: Bisulfit Konversionsreaktion. I. Sulfonierung, II. Desaminierung, III. Desulfonierung

Das Uracil wird in der darauffolgenden BiHot-PCR (siehe 2.2.1.12) als Thymin amplifiziert, so dass ein ursprüngliches CG-Basenpaar durch ein TA-Basenpaar ersetzt wird (siehe Abb. 2.6). Die Bisulfitbehandlung wird genutzt um die Methylierungsmuster bestimmter Loci zu analysieren. Durch die Analyse spezifischer CpG-Dinukleotide (hier durch Pyrosequenzierung und SIRPH-Analyse, siehe 2.2.6 und 2.2.7) innerhalb einer spezifischen DNA-Sequenz, erhält man Informationen über intragene, intergene aber auch über genomweite Methylierungsmuster.

2. Material und Methoden



Abb. 2.6: Bisulfitkonversion genomischer DNA. Das Schema zeigt den gezielten Basenaustausch eines DNA-Moleküls an einer Beispielsequenz. Nach der Denaturierung bewirkt Natriumbisulfit die Konversion von allen unmethylierten Cytosin-Resten in Uracil-Reste während die methylierten Cytosin-Reste nicht umgewandelt werden.

Für die Bisulfitkonversion wurde die DNA der zuvor transient transfizierten Zelllysate isoliert (DNeasy Blood & Tissue, Qiagen) 1 µg in einem Volumen von 10 µl eingesetzt und auf 20 µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Jede Probe wurde dann mit 130 µl Konversionsreagenz versetzt und in einem Thermozykler entsprechend den Angaben der Hersteller denaturiert und desaminiert:

Bisulfitkonversion:

20 µl DNA (500 ng) in a.dest
130 µl Konversionsreagenz

PCR-Programm:

98°C 10 min
64°C 150 min
4°C ∞

2.2.1.12 *BiHot PCR*

Die BiHot-PCR entspricht einer normalen Polymerasekettenreaktion (siehe 2.2.1.1) mit dem Unterschied, dass nicht Wildtyp-DNA als Kopiervorlage dient sondern bisulfitkonvertierte DNA. Die Bisulfit-DNA ist bereits einzelsträngig und die unmethylierten Cytosine wurden durch Uracil ersetzt. Wegen der RNA-ähnlichen Struktur wurde die Hotfire Taq Polymerase eingesetzt. Diese ist chemisch so modifiziert, dass sie erst nach einem 15 minütigen Hitzeschritt von 95 °C aktiviert wird. So verhindert man Primerdimere oder eine vorzeitige Elongation von unspezifisch gebundenen Primern.

PCR-Ansatz:

| | |
|------------|---|
| 2,5 µl | MgCl ₂ (25mM) |
| 2,5 µl | 10x Puffer B Solis Biodyne |
| 2,5 µl | dNTP's (je 2,5 mM) |
| je 1 µl | 20 pmol Primer („forward“ und „reverse“) |
| 2,5 µl | Bisulfit-DNA |
| 1 µl | Hotfire Taq Polymerase 5 U/µl |
| ad 14,5 µl | Aqua dest. |

PCR-Programm:

| | | |
|------|--------|--------|
| 95°C | 15 min | |
| 92°C | 30 s | } 34 x |
| X°C* | 30 s | |
| 72°C | 1 min | |
| 72°C | 10 min | |
| 4°C | ∞ | |

*Die Anlagerungstemperatur ist abhängig von dem verwendeten Primerpaar.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an der Sterilbank. Die verwendeten Medien und Puffer wurden vor der Benutzung - falls nicht anders beschrieben - auf die Erhaltungstemperatur der jeweiligen Zelllinie vorgewärmt.

2.2.2.1 Kultivierung von human embryonic kidney Zellen (HEK293T)

Die humane HEK293T-Zelllinie wurde aus einer embryonalen Nierenzelle mit DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus 5 geschaffen. Die hypotriploiden Epithelzellen wachsen adhärent bei 37°C unter 5% CO₂ Begasung.

Die dauerhafte Kultivierung von HEK293T-Zellen erfolgte mit MEM-Medium, dem 10% FBS zugeführt wurde, sowie 1% NEAA und 1% Penicillin/Streptomycin (=Expressionsmedium). Ein Nährmediumwechsel erfolgte in regelmäßigen Abständen von 3-4 Tagen.

2.2.2.2 Subkultivierung von HEK293T Zellen

Bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 2 min bei 37°C mit 2 ml Trypsin-EDTA inkubiert. Die Endopeptidase Trypsin bewirkt ein Ablösen der adhären Zellen durch Spalten der extrazellulären Proteine. Durch Zugabe der doppelten Menge an Medium wird das Trypsin inaktiviert. Nach anschließender Zentrifugation (500 g, 2 min) wird das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und im gewünschten Passagier-Verhältnis auf die Zellkulturschalen verteilt.

2.2.2.3 Langzeitlagerung von HEK293T Zellen

Wegen der Gefahr von Kontaminationen und der Dedifferenzierung von Zellen (bei hohen Zell-Passagen) sollten kryokonservierte Zellstocks „junger“ Zellpassagen hergestellt werden um auf diese zurückgreifen zu können.

Dazu wurden die Zellen zuerst mit Trypsin behandelt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml Medium, welches zusätzlich DMSO (10%) und FBS (20%) enthielt, resuspendiert und direkt in auf Eis gekühlten Kryoröhrchen überführt.

Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde bei -20°C , danach für 24-48 Stunden bei -80°C und schließlich für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zur Rekultivierung der Zellstocks wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, sofort in 8 ml frisches Medium überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Entfernung des zellschädigenden DMSO abgenommen, das Zellpellet mit frischem Medium vermengt und auf eine Zellkulturschale gegeben.

2.2.2.4 Zellzahlbestimmung

Damit die Zellen zur Transfektion die nötige Konfluenz von 80-90% erreichen und die Versuche reproduzierbar sind, wurden die Zellen 24 Stunden zuvor mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Für 6-well (3,6 cm) Platten wurden 1,1 Mio. Zellen in 3 ml Medium in jede Vertiefung verteilt.

2.2.2.5 Transfektion

Für die Transfektionen von HEK293T-Zellen wurde Lipofectamine2000 benutzt. Lipofectamine2000 ist ein Gemisch aus Lipiden und anderen Komponenten, die DNA komplexieren. Dieser Komplex sorgt für das unbeschadete Eindringen der DNA in Säugerzellen, die somit mit der gewünschten DNA transfiziert werden. Für eine effiziente Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von 80-90% aufweisen.

Die Transfektion wurde in 6-well (3,6 cm) Platten durchgeführt. Vor der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, da das FBS und Antibiotikum in dem Standardmedium die Transfektion stören. Dafür wurde das alte Medium abgenommen und 2 ml Transfektionsmedium (MEM, ohne Zusätze) pro Vertiefung hinzugefügt. Für die Transfektion wurden 10 μl Lipofectamine2000 in 100 μl Transfektions-medium (Opti-MEM) vermengt und 5 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden 4 μg DNA in 100 μl Transfektionsmedium vermengt. Beide Ansätze wurden vermischt und 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz vorsichtig auf die Zellen getropft und 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abermals gewechselt und die Zellen mit 2 ml Expressionsmedium (MEM mit Zusätzen) für 48h inkubiert.

2.2.3 Hefe Di-Hybrid-System

Das Hefe Di-Hybrid-System wurde ursprünglich von Fields und Song (1989) entwickelt und dient der Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* [95].

Die Grundlage für dieses System bilden Transkriptionsfaktoren, die aus zwei Domänen definierter Struktur und Funktion bestehen: Die DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) erkennt spezifische Sequenzen einer upstream activating sequence (UAS), die Aktivierungsdomäne (AD) initiiert den Transkriptionskomplex. Von dem Promotor ausgehend erfolgt durch Zusammenwirken dieser Komponenten die Transkription der Zielgene. Für einen klassischen Hefe Di-Hybrid Ansatz wird die „Beute“-cDNA eines zu untersuchenden Proteins in einen sog. Beute-Vektor kloniert und damit an die DNA-BD des Transkriptionsfaktors fusioniert, gleichermaßen wird die „Köder“-cDNA in den sog. Köder-Vektor kloniert und damit an die DNA-AD des Transkriptionsfaktors fusioniert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Hefe-Di-Hybrid-System *Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System* von Clontech verwendet. Bei dem *Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System* von Clontech liegen die DNA-BD und AD des eukaryotischen Transkriptionsfaktors GAL4 in den beiden Vektoren pGBKT7 (DNA-BD) und pGADT7 (DNA-AD). Der Hefestamm AH109 dient als Reporterstamm und enthält neben den drei Reportergenen His3, Ade2 und lacZ zusätzlich noch das Mel1 Gen. Alle 4 Reportergene liegen unter der Kontrolle eines Gal4-Promotors.

Zudem ist der Hefestamm AH109 Leucin und Tryptophan-auxotroph. Dieser Mangel wird durch die Aufnahme des pGBKT7-Vektors mit dem TRP1-Gen und durch die Aufnahme des pGADT7-Vektors mit dem LEU2-Gen ausgeglichen. Mangelmedien ohne Leucin und Tryptophan dienen somit als Kontrolle für Doppeltransformatanten.

2.2.3.1 Kultivierung von Hefezellen

Die Hefezellen werden bei -80°C als Glycerin-Stock gelagert (in YPD-Medium mit 25% Glycerin). Zur Erstellung einer YPD-Stock-Platte wurden mit einem sterilen Glasstab ein paar Zellen von der noch gefrorenen Oberfläche des Glycerin-Stocks abgekratzt und auf einer YPD-Platte ausgestrichen mit Parafilm verschlossen und für 2-3 Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Die Stock-Platte wurde nie länger als 1 Monat bei 4°C aufbewahrt.

2.2.3.2 Präparation kompetenter Hefezellen

Von der Stock-Platte wurden mehrere 2-3 mm große Kolonien des Hefestammes AH109 gepickt und in 1 ml flüssigem YPD resuspendiert. Diese Suspension wurde zu 50 ml YPD-Medium gegeben und bei 30°C über Nacht geschüttelt (200 UpM). Nach dem Erreichen der stationären Phase ($OD_{600} > 1,5$) wurde die Vorkultur mit YPD-Medium auf ein Gesamtvolumen von 300 ml verdünnt ($OD_{600} 0,3$) und weitere 2h bei 30°C geschüttelt. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,5 - 0,6 wurden die Zellen bei 1000g (5min/RT) in 50 ml Falkons abzentrifugiert und in 30 ml Aqua dest. gewaschen und wieder vereint. Nach erneuter Zentrifugation (1000g/5min) wurden die Zellen in 1,5 ml 1x TE/LiAc resuspendiert.

2.2.3.3 Transformation von Hefezellen

Für jeden Transformations-Ansatz wurden je 100 ng Plasmid-DNA des Beute- bzw. Köder-Vektors zusammen mit 100 µg Träger-DNA (Herings-Sperma-DNA) und 100 µl kompetenten Hefezellen pipettiert und gut gemischt. Nach Zugabe von 600 µl PEG/Lithiumacetat-Lösung wurde der Ansatz für 30 min bei 30°C inkubiert (200 UpM). Nach der Zugabe von 70 µl DMSO und vorsichtigem Invertieren (3-4x), erfolgte der Hitzeschock bei 42°C in einem Wasserbad (15 min). Der Ansatz wurde anschließend für 2 min auf Eis gekühlt, abzentrifugiert (13000 UpM, RT, 5 s) und das Sediment in 500 µl 1xTE-Puffer resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden anschließend 200 µl auf Selektionsmedium ausgestrichen und für 4 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.3.4 Identifikation interagierender Proteine mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System

Zur Selektion von Doppeltransformanden wurde die Zellsuspension auf -LEU/-TRP Mangelmedium (SDlow) ausgestrichen. Nach 4-tägiger Inkubation bei 30°C wurden die positiven Doppeltransformanden zusätzlich auf -LEU/-TRP/-HIS- (SDmed) und auf -LEU/-TRP/-HIS/-ADE- (SDhigh) Mangelmedien überimpft. Hierzu wurden je 3-4 Kolonien in 200 µl Aqua dest. resuspendiert und davon je 10 µl auf die drei verschiedenen Mangelmedien getropft. Somit diente das Selektionsmedium -LEU/-

TRP zur Kontrolle und Bestätigung von Doppeltransformatanten, während die beiden Selektionsmedien -LEU/-TRP/-HIS- und -LEU/-TRP/-HIS/-ADE der Identifikation interagierender Proteine dienen. Nicht selten kommt es zu einer Autoaktivierung des *His* Reportergens, welche jedoch meistens durch den zusätzlichen Mangel von Adenin im SDhigh-Medium unterdrückt werden kann. Zudem lässt sich diese Autoaktivierung durch den Zusatz von 2-10 mM 3-AT zu den jeweiligen Selektionsmedien stoppen.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 SDS-PAGE

Bei einem Western Blot werden Proteine auf eine Trägermembran (z.B. Nitrozellulose oder PVDF) übertragen und schließlich mittels Immundetektion spezifisch nachgewiesen. Somit erhält man unter anderem Informationen über die Größe, Reinheit und die Expressionsmenge eines Proteins.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Vor dem eigentlichen Western Blot müssen die Proteine zuerst elektrophoretisch nach ihrer Größe in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden.

Nichtkovalente Proteinwechselwirkungen werden durch das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zerstört und durch Zugabe von β -Mercaptoethanol oder DTT werden die Disulphidbrücken der Proteine reduziert. Dadurch wird gewährleistet, dass das Laufverhalten der Proteine nur durch ihre Masse bestimmt wird, da ein SDS-Anion zwei Aminosäuren bindet und die negative Ladung, die das Protein dadurch erhält, größer ist als seine Eigenladung.

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurden 10%ige Tris-Glycin-Gele von Biorad verwendet.

Zur Herstellung der Proteinlysate wurden die transfizierten Zellen eines 6 wells mit 250 μ l RIPA-Puffer inkl. Proteaseinhibitor aufgeschlossen. In 10 ml RIPA-Puffer wurde je eine Tablette Proteaseinhibitor aufgelöst. Ungefähr 20 μ g Protein wurden im Verhältnis 1:2 mit 2xLaemmli-Ladepuffer dem 5% β -Mercaptoethanol zugesetzt wurde vermengt und für 5 min bei 75°C inkubiert. Als Protein Größen-Standard wurden 5 μ l „Precision Plus Protein Dual Xtra“ verwendet.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit einem Tris-Glycin/SDS-Laufpuffer (1x) bei einer Stromstärke von 200 V für 30 min.

Proteinblotting

Bei dem Western Blot werden die zuvor im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran übertragen. Die PVDF-Membran wurde zunächst in Methanol und anschließend wie das Whatman-Papier in Transferpuffer eingelegt. Der Transfer erfolgte bei 250 mA für 60 min auf Eis.

Immundetektion

Nach dem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran über Nacht bei 4°C in 5% Milch-TBST inkubiert um freie, unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte für 60 min bei RT. Nach 3-fachem Waschen mit TBST für jeweils 5 min erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für 60 min bei RT. Anschließend wurde die Membran abermals 3 x 5 min mit TBST gewaschen.

Zur HRP-Immundetektion wurde 1 ml Lösung A mit 100 µl Lösung B und 1,3 µl H₂O₂ gemischt und auf der Membran verteilt. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP) oxidiert das in der Detektionslösung vorhandene Luminol. Es entsteht eine Chemilumineszenz die detektiert werden kann.

„Stripping“ von Western Blots

Die PVDF-Membran kann nach der Detektion von den Antikörpern befreit werden um anschließend dieselbe Membran mit anderen Antikörpern zu inkubieren.

Dazu wurde die Membran zweimal für 10 min mit dem „Stripping“-Puffer, 2 x 10 min in PBS und schließlich 2 x 5 min mit TBST gewaschen. Die Membran wurde über Nacht in 5% Milch-TBST blockiert, 3 x 5 min in TBST gewaschen und danach mit den entsprechenden Antikörpern behandelt.

2.2.4.2 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation ist eine Methode um Protein-Interaktionen unter *in vivo*-ähnlichen Verhältnissen nachzuweisen. Die zu untersuchenden Proteine werden zunächst in einer eukaryotischen Zelllinie überexprimiert. Aus dem entsprechenden Zelllysate wird mit Hilfe eines Antikörpers eines der beiden Proteine präzipitiert. Alle Proteine die mit diesem Protein direkt interagieren werden kopräzipitiert und können dadurch mittels Immunoblot nachgewiesen werden.

Die Antikörper für die Präzipitation können entweder direkt an das Protein binden oder sich gegen ein sogenanntes „tag“ richten. Tags sind kleine Peptid-Epitope die man mit der jeweiligen Proteinsequenz fusioniert und überexprimiert. Das Epitop eines solchen Tags wird dann spezifisch von einem entsprechenden Antikörper erkannt. In dieser Arbeit wurde mit Myc- und Flag-markierten Proteinen gearbeitet. Die Immunopräzipitation erfolgte dann mit Agarose-Beads an die ein Anti-Flag-M2 spezifischer Antikörper gekoppelt wurde (Firma Sigma Aldrich).

Pro Ansatz wurden 40 µl Anti-Flag-Beads mit 250 µl Zelllysate über Nacht bei 4°C in einem Überkopfmischer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads 6x mit je 700 µl eiskaltem PBS gewaschen und das Präzipitat schließlich in 25 µl Laemmli-Puffer mit 5% β-Mercaptoethanol bei 75°C eluiert und denaturiert.

2.2.4.3 Blue-Native-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen unter nativen Bedingungen wurde die Methode der Nativ-Gelelektrophorese (Blue native PAGE) nach Schagger verwendet [96]. Mit dieser Methode können Proteine und Multiproteinkomplexe (MPCs) in ihrer nativen Form aufgetrennt werden. Auch in diesem System werden die Proteine durch eine negative Ladung in einem Acrylamidgel aufgetrennt. Die negative Ladung kommt dabei nicht wie bei der SDS-PAGE durch das geladene Detergenz Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) zustande, sondern einerseits durch die Eigenladung der Proteine und andererseits durch das an die Proteine angelagerte Coomassie Brilliant Blue G 250. Die native Auftrennung der Proteine wurde mit dem NativePAGE Bis-Tris Gel-System von Invitrogen durchgeführt.

Blue Native-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Die zuvor transient transfizierten HEK293T-Zellen, wurden mit Hilfe eines Nativ-Lysepuffer bestehend aus NativePAGE Sample Buffer, verschiedenen Digitonin-Konzentrationen (1- 2,5%) und einem Protease Inhibitor Cocktail lysiert und bei 100.000g für 45 min ultrazentrifugiert.

Anschließend wurde dem Überstand 5% [w/v] Coomassie Brilliant Blue G250 zugefügt. Die Proben wurden auf ein 4-16%iges Novex Bis-Tris Gel aufgetragen. Der äußere Behälter des Gelträgers wurde mit 1x NativePAGE Anoden Puffer und der innere Bereich des Gelträgers mit 1x NativePAGE „DarkBlue“ Kathodenpuffer befüllt und bei 150V für 20 Minuten laufen gelassen. Nachdem die Proben 1/3 der Laufstrecke erreicht hatten wurde der „Darkblue“ Kathodenpuffer gegen einen „LightBlue“ Kathodenpuffer (weniger Coomassie Brilliant Blue G 250) ausgetauscht und die Proben weitere 100 Minuten bei 150V laufen gelassen. Als Marker diente der „NativeMARK™ Unstained Protein Standard“ (Invitrogen).

| <u>Reagenzien</u> | <u>Dark Blue</u> | <u>Light Blue</u> |
|------------------------------------|------------------|-------------------|
| NativePAGE™ Running Buffer (20x) | 10 ml | 10 ml |
| NativePAGE™ Cathode Additive (20x) | 10 ml | 1 ml |
| Aqua dest. | 180 ml | 189 ml |
| Total Volume | 200 ml | 200 ml |

Proteinfärbung und Proteinblotting der 1. Dimension

Die BN-PAGE wurde immer in einem doppelten Ansatz durchgeführt, so dass ein Gel für den Immunoblot weiter verwendet wurde, während das zweite Gel zur direkten Visualisierung der Proteine mit Coomassie angefärbt wurde.

Der Proteintransfer der 1. Dimension erfolgte hier mit einem Semi-dry-System von Invitrogen. Die PVDF-Membran wurde zunächst in Methanol und anschließend wie das Whatman-Papier und die Schwämme in 1xNuPAGE Transferpuffer eingelegt. Da die Proben zuvor mit verschiedenen Digitonin Konzentrationen reduziert wurden, wurde dem Transferpuffer ein zusätzliches Antioxidanz zugefügt. Der Transfer erfolgte bei 25 V für 60 min auf Eis.

2. Material und Methoden

Zum fixieren der Proteine wurde die Membran nach dem Transfer für 15 min in 20 ml 8%ige Essigsäure eingelegt. Eine zusätzliche 10-minütige Inkubation für in 20 ml Stripping-Puffer entfernte Überreste von Coomassie Brilliant Blue G250. Die Immunodetektion erfolgte nach dem bereits beschriebenen Protokoll (siehe SDS-PAGE).

Coomassie Färbung

| | | |
|------------|--------|-----------------|
| Fixierung | 40 ml | Methanol |
| | 10 ml | Essigsäure |
| | 50 ml | Aqua dest. |
| Färbung | 30 ml | Methanol |
| | 10 ml | Essigsäure |
| | 0,02 g | Coomassie R-250 |
| | 60 ml | Aqua dest. |
| Entfärbung | 8 ml | Essigsäure |
| | 92 ml | Aqua dest. |

Präparation und Proteinauftrennung der 2. Dimension

Die 2D-Gelelektrophorese kombiniert die 1. Dimension der nativen Gelelektrophorese mit einer nachfolgenden SDS-PAGE um große Proteinkomplexe in die entsprechenden Untereinheiten aufzutrennen.

Nach der Auftrennung über eine native Gelelektrophorese wurde dieser Gelstreifen ausgeschnitten und die darin enthaltenen Proteine und Proteinkomplexe wurden für die anschließende SDS-PAGE in drei verschiedenen Lösungen (je 5ml) inkubiert. Hierbei werden die Proteine denaturiert und erhalten die erforderliche negative Ladung.

Anschließend wurde der Gelstreifen waagrecht auf ein 4-12 %iges NuPAGE Novex BisTris 2D Gel gelegt und der Multiproteinkomplex unter normalen SDS-PAGE Bedingungen aufgetrennt. Monomere Proteine laufen in der 2. Dimension entsprechend dem Gel-Gradienten einer hyperbolischen Diagonale entlang, während die Proteine eines Multiproteinkomplex sich unter der Diagonalen vertikal zueinander auftrennen (siehe Abb. 2.7) [97].

Lösungen

| | | |
|---------------------|------------|------------------------------------|
| Reducing Solution | 4,5 ml | 1xNuPAGE LDS Sample Buffer |
| | 0,5 ml | NuPAGE Sample Reducing Agent (10x) |
| Alkylating Solution | 5 ml | 1xNuPAGE LDS Sample Buffer |
| | 28 μ l | DMA (=50mM) |
| Quenching Solution | 4 ml | 1xNuPAGE LDS Sample Buffer |
| | 1 ml | Ethanol |
| | 50 μ l | NuPAGE Sample Reducing Agent (10x) |

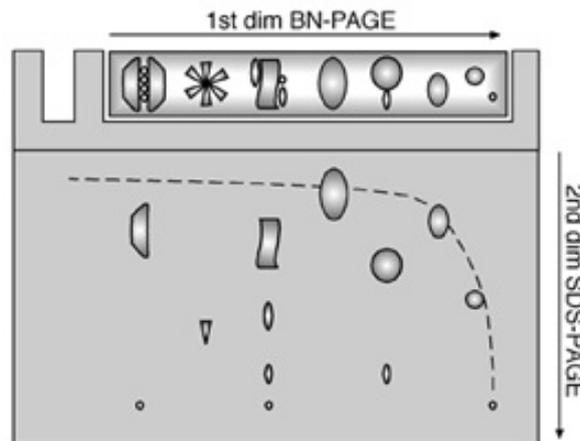


Abb. 2.7: Zwei-dimensionale BN-PAGE/SDS-PAGE. Proteine und MPCs werden unter nativen Bedingungen in der ersten Dimension (BN-PAGE) aufgetrennt. Für die zweite Dimension werden die MPCs in dem Gelstreifen mittels SDS denaturiert und anschließend über eine SDS-PAGE separiert. Monomere Proteine wandern in einer hyperbolischen Diagonalen entlang des Gelgradienten, während die MPCs sich unterhalb der Diagonalen entlang einer vertikalen Linie auftrennen .

2.2.5 Konfokale Laser-Rastermikroskopie

Die konfokale Laser-Rastermikroskopie (CLSM = confocal laser scanning microscope) ermöglicht eine punktweise Beleuchtung des Objektes, durch einen Laser der Punkt für Punkt Fluoreszenzmoleküle anregt. Jedes einzelne Signal wird dann an einem Computer zu einem Bild zusammengesetzt. Mit Hilfe eines beweglichen Spiegelsystems wird der Laserstrahl über das Objekt geführt und ermöglicht dadurch eine vollständige Abbildung der Fokusebene. Durch den Einsatz eines dichroitischen Spiegels lässt sich die optische Anregung von der optischen

Detektion trennen und ermöglicht somit die Anwendung von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen. Ein sog. Photomultiplier (PMT) verstärkt das Signal wodurch bereits sehr geringe Fluoreszenzsignale detektiert werden können.

Das hier verwendete konfokale Mikroskop Olympus Fluoview FV1000 war mit zwei Helium-Neon-Lasern (543 nm, 633 nm) verschiedener Anregungswellen ausgestattet.

Immunfärbung

Die auf Glasplättchen in 6-well Platten kultivierten HEK293T-Zellen wurden transient mit 800ng/Plasmid transfiziert und für 24h inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1xPBS erfolgte für 5 min eine Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA). Nach einem erneuten Waschschrift mit 1xPBS wurden die Zellen für 20 min bei RT mit einer Blockierlösung (1xPBS, 10% FBS und 0,1% Triton-X-100) behandelt um dadurch das Risiko unspezifischer Bindungen zu minimieren. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1xPBS wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert. Die Verdünnung des Primärantikörpers (alle 1:100) erfolgte in einer speziellen Antikörperlösung (1xPBS, 0,1% FBS, 0,1% Triton-X-100). Am nächsten Tag wurden die Zellen nach 2-3 Waschschriften mit 1xPBS erneut für 20 min blockiert. Danach folgte für 2h bei 4°C unter Lichtausschluss eine Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper. Die Sekundärantikörper (alle 1:1000) wurden ebenfalls in der oben genannten speziellen Antikörperlösung verdünnt. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1xPBS wurden die Zellen für 2-3 min mit einer ToPro3-Lösung (1:8000) benetzt. ToPro3 ist ein fluoreszierender Farbstoff der speziell die DNA in den Zellkernen anfärbt und im Infrarot-Bereich messbar ist.

Nach weiteren drei Waschschriften mit 1xPBS wurden die Glasplättchen mit Vectashield Mounting Medium auf Objektträgern eingeschlossen und an dem konfokalen Mikroskop Olympus Fluoview FV1000 mittels Laser-scanning Mikroskopie analysiert und mit der Olympus Fluoview Software (Version 2.1b) dokumentiert.

Die Präparate in denen die zu untersuchenden Proteine direkt an fluoreszierenden Proteinen gekoppelt waren wurden direkt mit der ToPro3-Lösung behandelt, auf Objektträger eingeschlossen und an dem konfokalen Mikroskop Olympus Fluoview FV1000 untersucht.

Mikroskopische Auswertung der zellulären Aggresom-Formation

Die auf Glasplättchen kultivierten HEK293T-Zellen wurden transient mit einem N-terminal EGFP-gekoppelten NLRP7 (Wildtyp oder Mutanten) transfiziert. Pro Konstrukt wurden je drei Experimente durchgeführt.

Die an dem konfokalen Mikroskop beobachtete Proteinverteilung wurde in drei verschiedene Typen eingeteilt. Für jedes der drei Experimente wurden 4-5 Sichtfelder/1000Zellen (40er Objektiv) gezählt und ausgewertet.

2.2.6 Pyrosequenzieren

2.2.6.1 Die Pyrosequenzier-Reaktion

In der Analyse von Methylierungsmustern erwies sich die Pyrosequenziermethode als Goldstandard. Durch die Bisulfitkonversionsreaktion (siehe 2.2.1.11) entsteht im Genom ein C/T Polymorphismus der dem Methylierungsgrad des jeweiligen CpG-Dinukleotid entspricht. Im Gegensatz zu der normalen Didesoxymethode nach Sanger (siehe 2.2.1.5.), wird bei der Pyrosequenzier-Methode die Synthese des Gegenstranges in Echtzeit sequenziert. Die Methode beruht auf der indirekten bioluminometrischen Messung von Pyrophosphat (PPi). In einem Komplex aus einzelsträngiger DNA-Sequenz und einem Sequenzierprimer katalysiert die DNA-Polymerase (Klenowfragment ohne 3'-5'-Exonukleaseaktivität) den Einbau des zum Matrizenstrang komplementären Desoxynukleotidtriphosphat. Jede Inkorporation bewirkt die Freisetzung von Pyrophosphat. Durch Zugabe von ATP-Sulfurylase, Luziferase, Apyrase und den beiden Substraten Adenosinphosphosulfat (APS) und Luziferin wird die Anzahl inkorporierter Nukleotide sichtbar gemacht.

Die ATP-Sulfurylase setzt das Pyrophosphat in Anwesenheit von Adenosin 5'Phosphosulfat quantitativ zu ATP um. Dieses ATP veranlasst die durch die Luziferase katalysierte Reaktion von Luziferin zu Oxiluziferin. Bei der Umwandlung entsteht proportional zum ATP-Gehalt sichtbares Licht. Dieses Licht wird über eine CCD- (charge coupled device) Kamera detektiert und in einem Pyrogramm als Peak dargestellt. Jedes Lichtsignal ist somit proportional zur Anzahl eingebauter Nukleotide. Das einzubauende Nukleotid liegt nicht im Reaktionsansatz vor sondern wird separat hinzu pipettiert. Bevor das nächste Nukleotid hinzu pipettiert wird, baut die Apyrase überschüssiges Nukleotid ab.

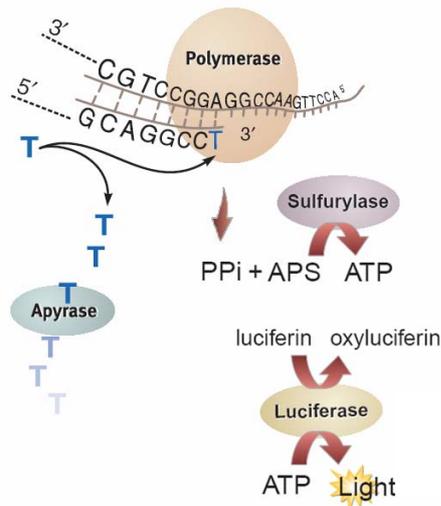


Abb. 2.8: Pyrosequenzier-Reaktionskaskade. Jedes eingebaute Nucleotid setzt ein Pyrophosphat (PPi) frei. Das Pyrophosphat aktiviert eine Enzymkaskade die ein Lichtsignal generiert welches proportional zu der Menge an eingebauten Nucleotiden ist. Bevor ein neues Nucleotid hinzugefügt wird, baut die Apyrase noch überschüssige Nucleotide ab. (www.biotage.com)

2.2.6.2 Einzelstrang-Präparation für die Pyrosequenzierreaktion

Vor der eigentlichen Reaktion erfolgt die Amplifikation der Region die man untersuchen will mittels BiHot-PCR (siehe 2.2.1.12). Da der Sequenzierprimer nicht an einer doppelsträngigen DNA-Sequenz binden kann, wird die Region mit einem biotinylierten Primer amplifiziert. Das PCR-Produkt mit dem 5'-biotinylierten Strang, wird von Streptavidin-beschichteten Perlen eingefangen und die nicht-biotinylierten Stränge können in einer NaOH-Lösung entfernt werden. NaOH trennt die Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Strängen. In einem speziellen Waschpuffer werden die übrigen biotinylierten Stränge wieder neutralisiert und anschließend in eine Lösung aus Anlagerungspuffer und Sequenzierprimer überführt.

Die Einzelstrang-Präparation erfolgt mit einem Vakuum Präparations-Werkzeug. In der dazugehörigen Präparations-Station werden 4 Behälter mit 1) 70% Ethanol, 2) 0,2 M NaOH, 3) Waschpuffer und 4) Aqua dest. befüllt. Währenddessen befinden sich die Proben auf einem Schüttler um somit die Sedimentation der Streptavidin-Perlen und dem daran befestigten PCR-Produkt zu verhindern. Die Proben werden schließlich über ein Vakuum von dem Präparations-Werkzeug aufgenommen und in der oben aufgeführten Reihenfolge 1) - 3) für jeweils 5 s in die jeweiligen Behälter getaucht. Die Perlen haften an dem Werkzeug und die Lösungen werden über ein Schlauchsystem in einen Abfallbehälter überführt. Zuletzt werden die Proben in eine

2. Material und Methoden

mit Anlagerungspuffer und Sequenzierprimer befüllte „PSQ 96er Wellplate“ überführt und auf einem 80 °C heißen Heizblock für 2 min inkubiert. Das Vakuum Präparations-Werkzeug wird nach Abgabe der Perlen für 20 s mit Aqua dest. gewaschen.

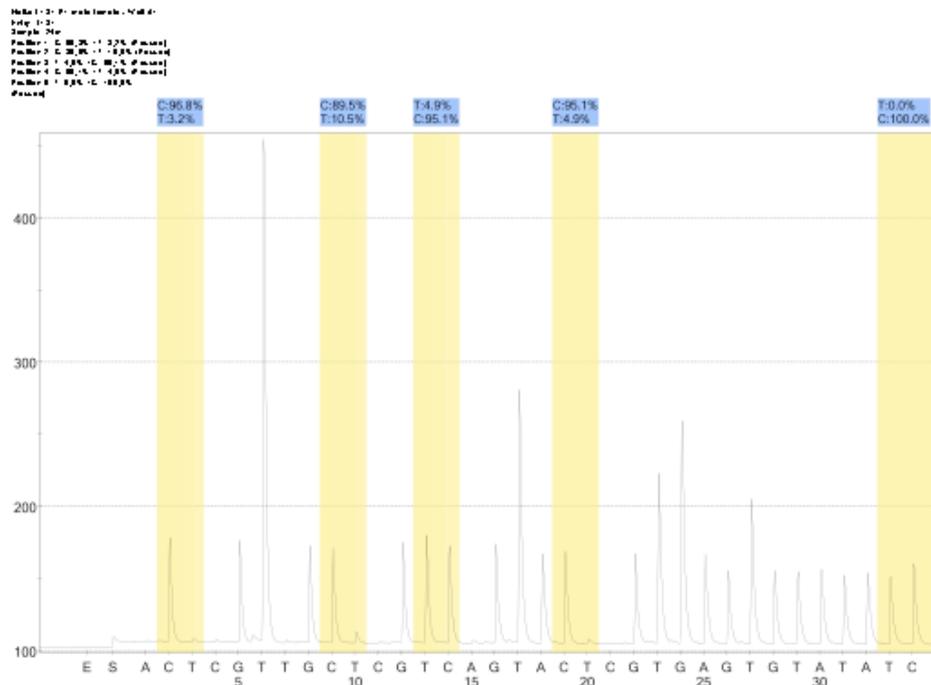


Abb. 2.9: Pyrogramm. Das Pyrogramm zeigt die Methylierung von fünf CpG-Dinukleotiden (gelb markiert) innerhalb einer spezifischen Sequenzregion von einer Probe. Die X-Achse zeigt die einprogrammierte Nukleotidsequenz. Entsprechend der Sequenzvorlage wird dNTP im Überschuss hinzupipettiert. Die Menge der eingebauten Nukleotide korrelieren mit dem gemessenen Lichtsignal dargestellt als Peak.

Die Enzyme, Substrate und die 4 verschiedenen dNTPs (A/C/G/T) werden in eine Patrone pipettiert. Da dATP ein Substrat der Luciferase ist, wird zur Polymerisation kein normales dATP verwendet sondern Desoxyadenosinalpha-thiotriphosphat (dATP α S). Das dATP α S wird nur von der DNA-Polymerase jedoch nicht von der Luziferase erkannt. Dies vermeidet falsche bzw. zu hohe Peaks.

Nachdem das Pyrosequenzier-Gerät mit der Probenplatte und der Patrone bestückt wurde, beginnt die Reaktionskaskade und nach 45 min können die Pyrogramme am Computer ausgewertet werden (siehe Abb. 2.9).

2.2.7 SIRPH (SNUPE-IP RP HPLC)-Analyse

Die SIRPH-Methode ermöglicht, wie das Pyrosequenzieren, eine quantitative Analyse der DNA-Methylierung an spezifischen CpG Dinukleotiden. Das Bisulfit-PCR-Produkt der zu untersuchenden Region, wird über einen ExoI FastAP Enzymverdau von überschüssigen PCR-Oligonukleotiden und dNTPs befreit. Nach der SNUPE (Single Nukleotid Primer Extension)-Reaktion werden die verlängerten Primer anschließend per Ionen-Paar Umkehrphasen Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (IP RP HPLC) aufgetrennt [98].

Enzymverdau:

| | |
|----------|---------------|
| 0,125 µl | ExoI 20 U/ µl |
| 0,5 µl | Fast AP |
| 0,2 µl | FastAP Puffer |
| 5 µl | PCR-Produkt |
| 1,17 µl | Aqua dest. |

Inkubations-Programm:

| | |
|------|--------|
| 37°C | 15 min |
| 85°C | 15 min |
| 4°C | ∞ |

2.2.7.1 SNUPE (Single Nukleotid Primer Extension)

Bei der SNUPE Reaktion werden Primer entworfen, die das 5'-Ende ausgewählter CpG- (bzw. TpG-) Dinukleotide einer Bisulfitsequenz flankieren. Die Primer sind identisch zu der Bisulfitsequenz, so dass sie mit dem gegenüberliegenden Strang an ein GpC (bzw. ApC) hybridisieren. Das 3'-Ende der Primer wird über mehrere Temperaturzyklen in einem Thermozykler mit einem ddCTP oder ddTTP verlängert.

SNUPE Reaktion:

| | |
|--------|---------------------------|
| 2 µl | Verdaute Bisulfit-DNA |
| 2 µl | Puffer C Solis Biodyne |
| 2 µl | MgCl ₂ (25 mM) |
| 2 µl | ddNTP's (C+T) je 1mM |
| 2 µl | Primer F/R (je 12,5 pmol) |
| 0,2 µl | TERMI Polymerase 5 U/µl |
| 8 µl | Aqua dest. |

SNUPE-Programm:

| | | |
|------|--------|-------|
| 94°C | 2 min | } 70x |
| 92°C | 30 s | |
| 40°C | 30 s | |
| 52°C | 10 min | |
| 4°C | ∞ | |

2.2.7.2 IP-RP-HPLC

Nach der SNUPE Reaktion werden die verlängerten Oligonukleotide nach Größe und Hydrophobizität über eine IP-RP-HPLC (WAVE DNA Fragment Analysis System, Transgenomics) aufgetrennt. Mit Hilfe einer Injektionsnadel werden 20 µl der Probe auf eine Säule überführt. Die negativ geladene DNA bindet über ihre Phosphat- und Carbonylgruppen an das Triethylammonium-Kation der TEAA-Lösung (mobile Phase). Über die Alkylgruppen am anderen Ende des TEAA-Moleküls wird die DNA an der hydrophoben neutralen Polymermatrix aus Polystyrol-Divinylbenzol fixiert (stationäre Phase). Nach diesem initialen Bindungsvorgang erfolgt die Ionen-Umkehrphasenchromatographie. Zwei Pufferlösungen mit einem Acetonitrilanteil von 9 (Puffer A): 1 (Puffer B) werden durch die Säulenmembran geführt. Durch graduelle Zunahme von Puffer B, stellt sich nach 8,1 min ein gleiches Mengenverhältnis ein und die DNA-Moleküle lösen sich von der stationären Phase. Ein UV-Detektor misst schließlich die Retentionszeit der Oligonukleotide.

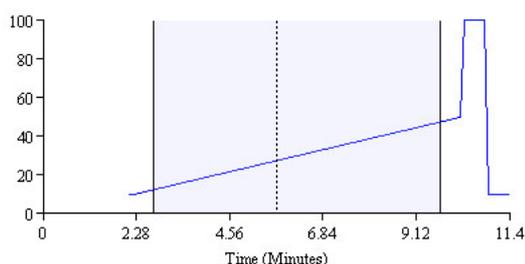


Abb. 2.10: Puffergradient der HPLC. Die X-Achse zeigt die Zeit in Minuten nach der Probeninjektion. Die Y-Achse zeigt den steigenden prozentualen Anteil von Puffer B im Puffergemisch.

Unverlängerte und verlängerte Primer lassen sich dadurch in einem Chromatogramm voneinander unterscheiden. Die mit ddTTP-verlängerten Primer werden durch die höhere Hydrophobizität von ddTTP später von der Säule gelöst als die ddCTP-verlängerten Primer. Jedem Primer können somit 3 Peaks (unverlängert, verlängert C, verlängert T) zugeordnet werden, im Idealfall 2 Peaks (verlängert C, verlängert T) bei einem vollständigem Verbrauch des eingesetzten Primers (siehe Abb. 2.11). Das Verhältnis der Peakhöhe zwischen den verlängerten Primern entspricht dem Verhältnis zwischen methylierten und unmethylierten Cytosin einer spezifischen CpG Stelle.

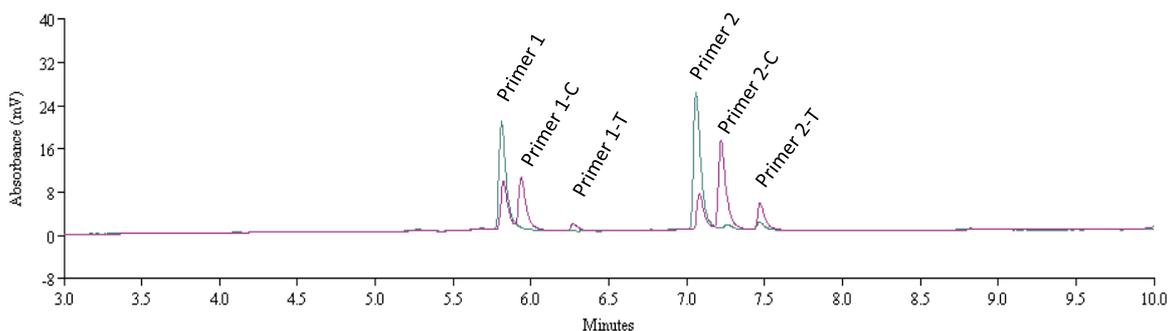


Abb. 2.11: HPLC-Absorptionsdiagramm: SIRPH mit zwei verschiedenen Primern. Der SNUPE-Reaktionsansatz ohne Zusatz eines Bisulfid-PCR-Produktes (Leerwert) zeigt die unverbrauchten Primer (in grün dargestellt). Der SNUPE-Reaktionsansatz mit einem Bisulfid-PCR-Produkt zeigt für beide Primer drei Peaks: 1) Reste des noch unverbrauchte Primer 2) den C- verlängerten Primer und 3) den T-verlängerten Primer (in violett dargestellt).

2.2.8 Protein Modellierung

Die Modellierung des inaktiven und aktivierten NLRP7-Proteins wurde über den ITASSER Server durchgeführt [99]. Die Kristallstruktur des mausspezifischen Apaf1-Proteins (PDB ID: 3SFZ) diente als Vorlage für die Modellierung des inaktiven NLRP7 Proteins. Weiterhin wurde mit Hilfe eines Elektronendichte-Profiles des Apaf1-Apoptosoms (PDB ID: 3J2T) die aktivierte Proteinstruktur von NLRP7 generiert.

Neben der bereits existierenden Kristallstruktur der N-terminalen Pyrin-Domäne [100] wurde mit Hilfe des ITASSER Server jede weitere Domäne erneut über eine individuelle Modellierung generiert. Die einzelnen Domänen wurden schließlich in das Grundgerüst der zuvor generierten vollständigen NLRP7 Struktur eingesetzt.

Die stereochemischen Qualitäten zwischen dem Modell und der Apaf1-Vorlage wurden anhand des MOLPROBITY Servers überprüft [101].

Das symmetrische Multimer-Docking erfolgte mit Hilfe des M-ZDock Server. Hier diente die aktivierte Struktur von NLRP7 als Vorlage. Aufgrund der vergleichbaren Proteingrößen von NLRP7 (1037 AA) und Apaf1 (1248 AA) wurde wie für Apaf1 (PDB ID: 3J2T) ein Multimer aus sieben Monomeren ($n=7$) generiert.

Die molekulare Umgebung der einzelnen Missense-Mutationen und dem non-synonymen SNP wurde mit Hilfe von YASARA und Chimera visualisiert [102,103].

Die *in silico*-Protein-Modellierungen wurden in Kooperation mit der AG Biswas von Dr. Arijit Biswas innerhalb unseres Institutes durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Oligomerisierung von NLRP7

Die in der Literatur beschriebenen Modelle der NLRP-spezifischen Aktivierung basieren auf Sequenz-Analysen, Homologie-Modellierungen oder dem indirekten Inflammasom-Rekonstruktions-Test. Man geht hier davon aus, dass es nach einem Kontakt der LRR-Domäne mit entsprechenden PAMPs oder DAMPs zu einer Konformationsänderung und damit zu einer Freilegung der NACHT-Domäne kommt, die somit die Oligomerisierung bzw. Aktivierung des Proteins induziert. [32,47,104].

Mit Hilfe eines Gal4-basierten Hefe Di-Hybrid-Systems, sollten bei einer inter-domän-spezifischen Analyse von NLRP7 die für die Oligomerisierung nötigen Interaktionsschnittstellen identifiziert werden.

Weiterhin sollte der Einfluss von drei BiBM-assoziierten NLRP7 Missense-Mutationen und eines nicht-synonymen SNP auf mögliche Änderungen der Struktur und Konformation des Proteins untersucht werden.

3.1.1 Hefe Di-Hybrid Interaktionsanalysen zur Charakterisierung der Oligomerisierungs-Schnittstellen von NLRP7

Für die Bestimmung der Oligomerisierungs-Schnittstellen von NLRP7 wurden 10 verschiedene NLRP7 cDNA-Konstrukte sowohl in den Beute-Vektor (pGBKT7) als auch in den Köder-Vektor (pGADT7) des Gal4-basierten Hefe Di-Hybrid-Systems kloniert (siehe Abb. 3.1). Die insgesamt 100 möglichen Kombinationen wurden jeweils in den Hefestamm AH109 transformiert und mit entsprechenden Selektivmedien auf Interaktion untersucht.

3. Ergebnisse

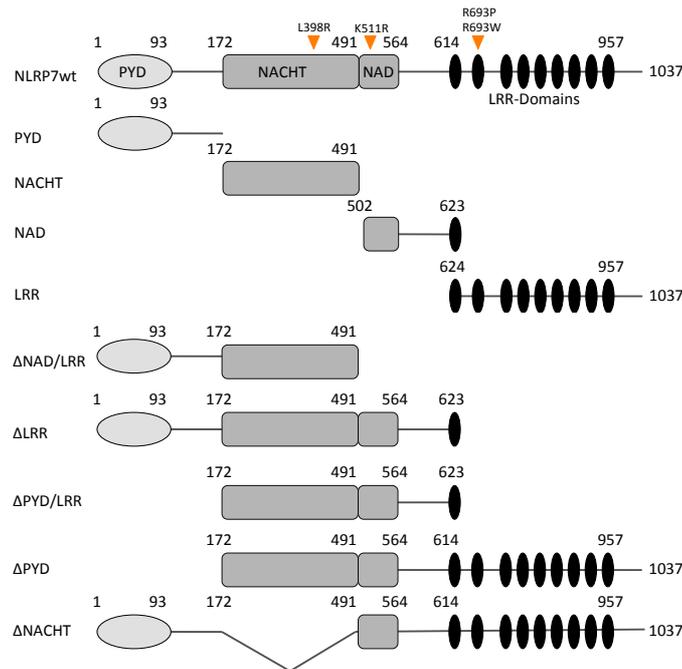


Abb 3.1: NLRP7-Konstrukte für die Hefe Di-Hybrid Analyse. Neben dem Wildtyp-Protein repräsentieren vier Konstrukte die einzelnen NLRP7-Domänen PYD (PYD-Domäne inkl. Linker), NACHT, NAD (NAD-Domäne inkl. dem ersten Leucin Rich Repeat) und die LRR Domäne (enthält alle neun Leucin-Rich Repeats). Zudem wurden die fünf Deletionskonstrukte Δ NAD/LRR (ohne NAD und LRR), Δ LRR (ohne LRR), Δ PYD/LRR (ohne PYD und LRR), Δ PYD (ohne PYD) und Δ NACHT (ohne NACHT Domäne) generiert. Die in dieser Arbeit untersuchten BiBM-assoziierten Mutationen sind mit Pfeilen (orange) markiert.

Alle 100 Reaktionen wurden zunächst über das Selektivmedium SDlow (Fehlen der Aminosäuren Trp und Leu; Abb. 3.2 links) auf Doppelexpression geprüft. Nur wenn beide Fusionsproteine (GAL-BD/Köder und GAL-AD/Beute) in dem Hefestamm exprimiert werden kommt es auf dem Selektivmedium zu einem Wachstum. Alle Interaktionen die doppelt, d.h. symmetrisch in Erscheinung traten wurden mit einer durchgezogenen Linie farbig eingekreist.

Die systematische Analyse zeigte fünf doppelt positive Interaktionen auf dem Selektivmedium SDmed (Fehlen der Aminosäuren Trp, Leu und His; siehe Abb. 3.2 mitte) und drei doppelt positive Interaktionen auf dem Selektivmedium SDhigh (Fehlen der Aminosäuren Trp, Leu, His und Ade; siehe Abb. 3.2 rechts).

Auf SDmed zeigte die NAD - Domäne ein klares Wachstum und somit eine positive Interaktion mit den Konstrukten Δ LRR (blauer Kreis), Δ PYD/LRR (grüner Kreis) und mit sich selbst (roter Kreis). Außerdem interagierte das Konstrukt Δ LRR mit dem Konstrukt Δ PYD/LRR (schwarzer Kreis) und ebenfalls mit sich selbst (gelber Kreis).

3. Ergebnisse

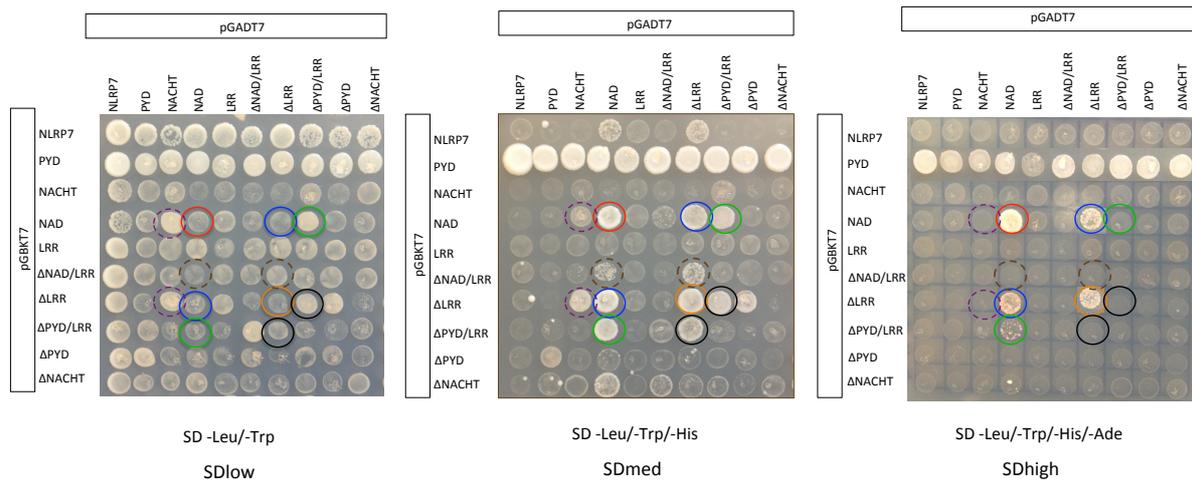


Abb. 3.2: Interdomän-spezifische Hefe Di-Hybrid Analyse von NLRP7. Alle zehn NLRP7-Konstrukte wurden jeweils in den Beute-Vektor (pGBKT7) und in den Köder-Vektor (pGADT7) kloniert. Die insgesamt 100 möglichen Doppel-Kombinationen wurden in den Hefestamm AH109 transformiert und auf Interaktion geprüft. Die Expression der Doppeltransformanten wurde über das Selektivmedium SDlow (links) nachgewiesen. Ein Wachstum der Hefezellen auf SDmed (mitte) und SDlow (rechts) präsentiert die potentiellen interdomän-spezifischen Interaktionen (farbig eingekreist). Durchgezogener Kreis = doppelt positiv, gestrichelter Kreis = einfach positiv. **SDmed:** NAD::NAD (rot), NAD::ΔLRR (blau), ΔLRR::ΔLRR (gelb), NAD::ΔPYD/LRR (grün), ΔLRR::ΔPYD/LRR (schwarz). NACHT::NAD und NACHT::ΔLRR (gestrichelt violett), ΔNAD/LRR::NAD und ΔNAD/LRR::ΔLRR (gestrichelt braun) Die Interaktion der PYD-Domäne (pGADT7) mit allen NLRP7-Konstrukten (pGBKT7) wurde als falsch positiv gewertet. **SD high:** NAD::NAD (rot), NAD::ΔLRR (blau), ΔLRR::ΔLRR (gelb). Alle anderen auf SDmed gezeigten Interaktionen, waren auf SDhigh nicht mehr nachweisbar.

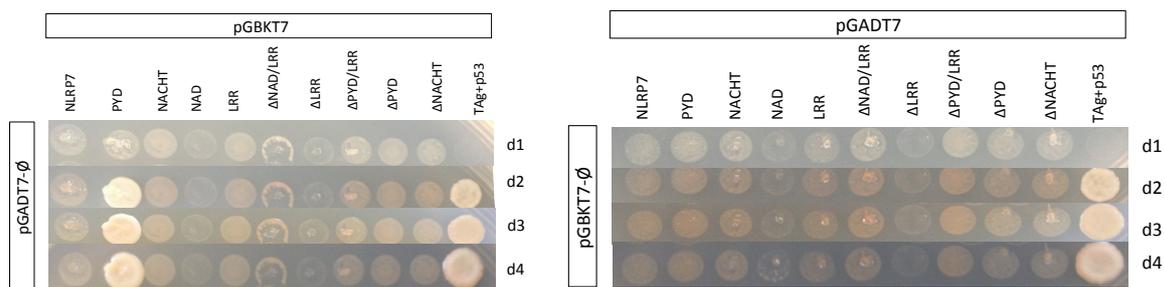


Abb. 3.3: Positiv- und Negativkontrollen für die interdomän-spezifische Hefe Di-Hybrid Analyse. Die zehn NLRP7-Konstrukte in dem Beute-Vektor (pGBKT7) wurden jeweils zusammen mit einem leeren Köder-Vektor (pGADT7) in den Hefestamm AH109 transformiert und auf das Selektivmedium SDhigh getropft (links). Die zehn NLRP7-Konstrukte in dem Köder-Vektor (pGADT7) wurden jeweils zusammen mit einem leeren Beute-Vektor (pGBKT7) in den Hefestamm AH109 transformiert und auf das Selektivmedium SDhigh getropft (rechts). Lediglich die PYD-Domäne (in pGBKT7) führte zu einer falsch positiven Aktivierung der Reportergene. Die beiden Konstrukte p53 und T-Antigen sind direkte Interaktionspartner und dienen als Positivkontrolle.

Zudem zeigten die einzelne NACHT-Domäne (gestrichelt violett) und das Deletionskonstrukt Δ NAD/LRR (gestrichelt braun) eine einfach positive Interaktion mit der NAD-Domäne und mit dem Deletionskonstrukt Δ LRR.

Auf dem Selektivmedium SD_{high} wurden sowohl die einfach positiven Interaktionen (gestrichelte Kreise violett und braun), als auch alle Interaktionen mit dem Deletionskonstrukt Δ PYD/LRR (grüne und schwarze Kreise) unterdrückt. Nur die NAD-Domäne und das Deletionskonstrukt Δ LRR interagierten weiterhin in allen vier möglichen Kombinationen (Kreise in grün, blau und gelb). Das Fusionsprotein GAL-BD/PYD führte zu einer falsch positiven Aktivierung der Reportergene und zeigte mit allen GAL-AD fusionierten NLRP7-Konstrukten ein Wachstum auf SD_{med} und SD_{high}. Alle anderen auf Autoaktivierung getesteten NLRP7-Konstrukte blieben negativ. Die miteinander interagierenden Proteine p53 und TAg dienten als Positivkontrolle (Abb. 3.3).

Interessanterweise blieben alle Konstrukte mit einer LRR-Domäne (NLRP7_{wt}, Δ PYD und Δ NACHT) auf beiden Selektivmedien (SD_{med} und SD_{high}) negativ. Die Ergebnisse deuten auf ein hohes Interaktionspotential der NAD-Domäne hin, welches möglicherweise durch die Anwesenheit der LRR-Domäne unterdrückt wird.

3.1.2 Untersuchung von 3 BiBM-assoziierten Mutationen und einem non-synonymen SNP mit dem Hefe-Di-Hybrid System und deren Einfluss auf die Oligomerisierung von NLRP7

Die für BiBM bereits beschriebenen Mutationen sind auf der speziell dafür angelegten Datenbank „Infervers“ für erbliche Autoimmun-Erkrankungen (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers/>) zusammengefasst.

Um als nächstes den Einfluss BiBM-assoziiertter Missense-Mutationen auf die Struktur und somit auf das Interaktionsverhalten von NLRP7 untersuchen zu können, wurden drei bekannte Missense-Mutationen und ein non-synonymer SNP (nsSNP) aus dieser Datenbank je nach Lokalisation (Proteindomäne) und Schweregrad bzw. Häufigkeit der erfassten und Mutations-assoziierten Blasenmolen ausgewählt. Die Mutation L398R befindet sich in der NACHT-Domäne, der nsSNP K511R in der NAD-Domäne und die beiden Mutationen R693P und R693W befinden sich in der LRR-Domäne. Für die N-terminale PYD-Domäne wurden bislang entweder

3. Ergebnisse

Nonsense oder Frame-shift-Mutationen beschrieben. Eine homozygote Missense Mutation ist für diese Domäne nicht bekannt.

Die Beute und Köder-Vektoren (pGBKT7 und pGADT7) der vier mutagenisierten NLRP7 Konstrukte, das Wildtyp-Konstrukt von NLRP7 und die beiden Deletions-Konstrukte NAD und Δ LRR wurden in 36 Kombinationen für einen erneute Hefe Di-Hybrid-Analyse in den Hefestamm AH109 transformiert und auf Interaktion überprüft (Abb. 3.4). Jede Mutation wurde somit gegen sich selbst, gegen das Wildtyp-Konstrukt und gegen die beiden Deletions-Konstrukte getestet. Nachdem alle 36 Reaktionen auf SDlow als positive Doppeltransformanten verifiziert wurden (Abb. 3.4 links), zeigten die weiteren Auswertungen auf den Selektivmedien SDmed und SDhigh die zuvor beschriebenen Interaktionen zwischen der NAD-Domäne und dem Deletionskonstrukt Δ LRR (Abb. 3.4 mitte und rechts). Alle anderen Kombinationen blieben negativ, was entweder darauf hindeutet, dass die Mutationen keinen Einfluss auf die Oligomerisierung des Proteins haben oder wahrscheinlich der Assay nicht sensitiv genug ist um den möglichen Einfluss einer Missense-Mutation auf die Proteinstruktur darzustellen.

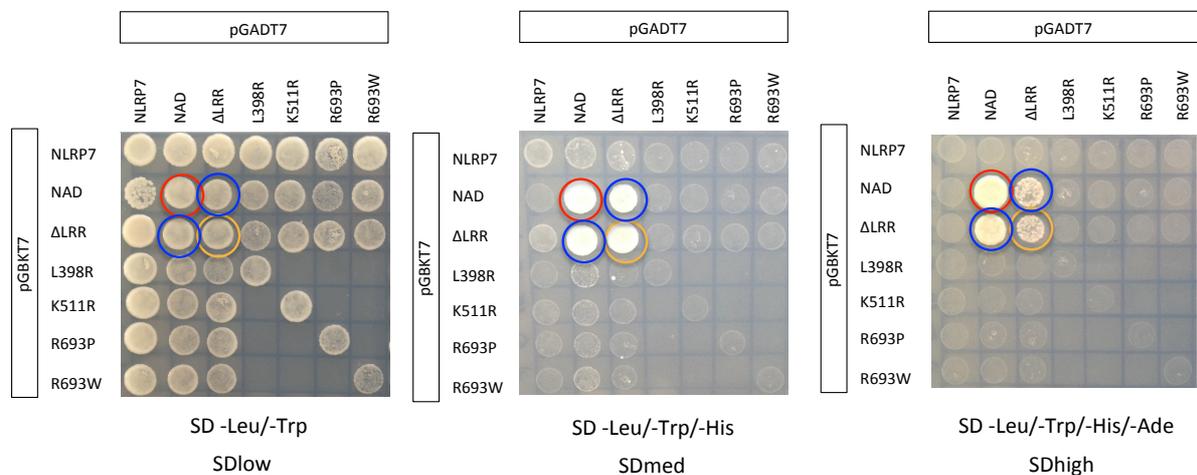


Abb. 3.4: Hefe Di-Hybrid Interaktionsanalyse BiBM-assoziiertes NLRP7 Mutationen. Die drei BiBM-assoziierten Mutationen L398R, R693P, R693W und der nsSNP K511R wurden auf Eigeninteraktion und auf Interaktion mit NLRP7 Wildtyp, NAD und Δ LRR geprüft. Das Selektivmedium SDlow (links) zeigt die Expression der untersuchten Doppeltransformanten. Auf SDmed und SDhigh konnten lediglich die bereits identifizierten Interaktionen NAD::NAD (rot), NAD:: Δ LRR (blau) und Δ LRR:: Δ LRR (gelb) nachgewiesen werden.

3.1.3 Verifizierung der NLRP7 Hefe Di-Hybrid Interaktion zwischen der NAD-Domäne und dem Deletions-Konstrukt Δ LRR über Immunopräzipitation

Die drei potentiellen Interaktionen der SDhigh assoziierten Hefe-Analysen NAD/NAD, NAD/ Δ LRR und Δ LRR/ Δ LRR wurden anschließend mittels Immunopräzipitation verifiziert. Hierfür wurden beide Konstrukte jeweils mit einem Myc-Epitop oder einem Flag-Epitop markiert, alle vier möglichen Kombinationen in HEK293T-Zellen kotransfiziert und für 48h inkubiert. Eine Überexpression aller vier Konstrukte nach Einzeltransfektion diente als Negativ-Kontrolle. Die in den Zelllysaten enthaltenen Flag-markierten Konstrukte wurden mit Anti-Flag beschichteten Agarose-Beads präzipitiert und mit einem Anti-Flag-Antikörper detektiert (Abb. 3.5a IB: α -Flag). Die entsprechend Myc-markierten Kopräzipitate wurden mit einem Anti-Myc Antikörper detektiert (Abb. 3.5a IB: α -Myc).

Die NAD-Domäne (13 kD) und das Deletionskonstrukt Δ LRR (68 kD) kopräzipitierten mit sich selbst und untereinander (Abb. 3.5a IB: α -Myc). Obwohl die Expression der NAD-Domäne in HEK293T-Zellen nur sehr schwach nachzuweisen war, konnte sowohl das präzipitierte Flag-NAD Monomer (IB: α -Flag) als auch das kopräzipitierte Myc-NAD Monomer (IB: α -Myc) mittels Immunoblot bei einer Größe von 13kD detektiert werden (Abb. 3.5a - 1.). Ebenso kopräzipitierte die Myc-markierte NAD-Domäne mit Flag- Δ LRR, sowie das Myc-markierte Δ LRR mit Flag-NAD (Abb. 3.5a - 2./3.). Weiterhin zeigte das Deletionskonstrukt Δ LRR neben einer sehr starken Expression auch eine starke Eigeninteraktion (Abb. 3.5a - 4.).

Zusätzlich ließ sich bei den beiden Konstrukten NAD und Δ LRR auf dem Immunoblot jeweils eine zusätzliche Bande bei 26 kD bzw. zwischen 150-250 kD nachweisen, welche vermutlich das Produkt zusätzlicher Aggregat- oder Oligomer-Formationen, die bei der zuvor durchgeführten Hitzebehandlung (75°C) für die SDS-PAGE entstanden sein könnten. Erstaunlicherweise zeigte die Flag-Immunopräzipitation des Wildtyp-Proteins NLRP7 (113 kD) nach Koexpression eines Myc- und Flag-markierten Wildtyp Konstruktes, eine klare Eigeninteraktion, welche in den Hefe Di-Hybrid Analysen verborgen blieb. Das Myc-markierte NLRP7 kopräzipitierte mit dem Flag-markierten NLRP7 (Abb. 3.5b - 1., IB α -Myc). Die Einzeltransfektionen des Myc- und Flag-markierten NLRP7 und anschließende Flag-Immunopräzipitationen dienten als Negativkontrolle (Abb.3.5b - 2./3.).

3. Ergebnisse

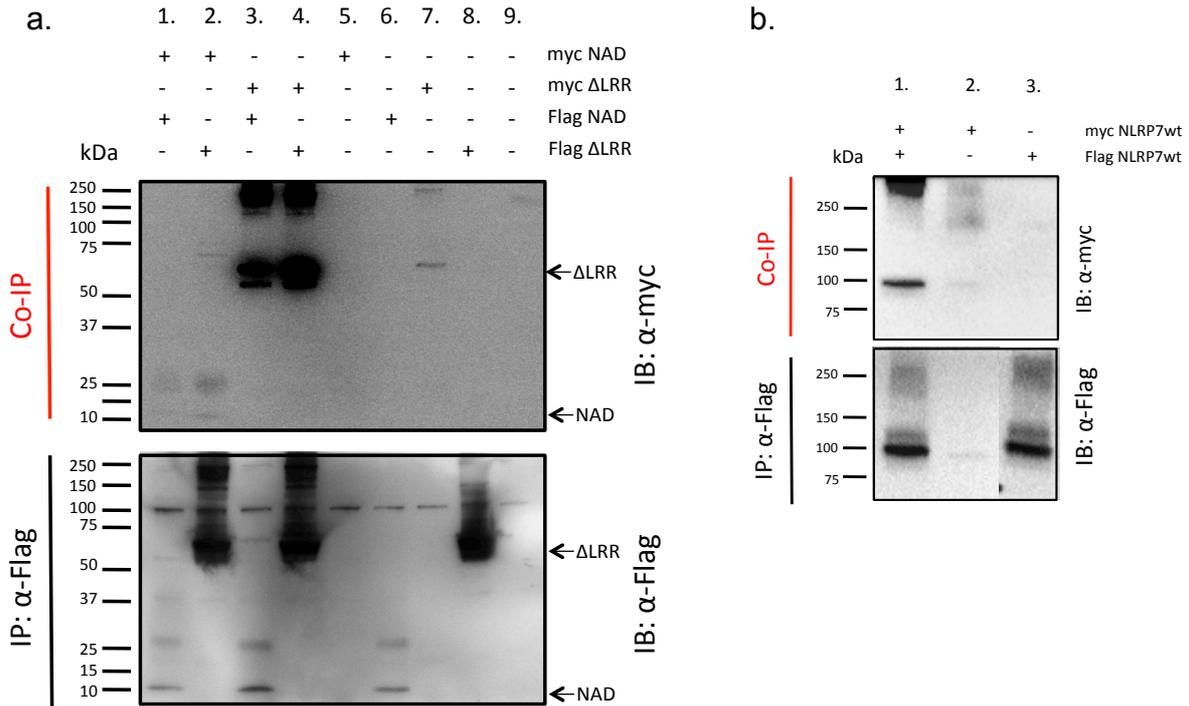


Abb. 3.5: Verifizierung der Interdomän-spezifischen Interaktionen von NLRP7 mittels Immunopräzipitation. **a.** Der untere Immunoblot visualisiert nach Flag-Immunopräzipitation die präzipitierten Flag-markierten NLRP7 Konstrukte NAD und Δ LRR (IP: α -Flag / IB: α -Flag), während der obere Blot die kopräzipitierten Myc-markierten Konstrukte NAD und Δ LRR darstellt (Co-IP / IB: α -Myc). Beide Konstrukte zeigen eine der Expression entsprechende Eigeninteraktion (Laufbände 1. und 4.) und interagieren auch untereinander (Laufbände 2. und 3.). Die Einzeltransfektion jedes untersuchten Konstruktes dienen als Negativkontrollen (Laufbände 5.-8.). In Laufbände 9. wurde ein Zelllysate untransfizierter HEK293T-Zellen mitgeführt. **b.** Nach Flag-Immunopräzipitation mit dem Wildtyp-Protein NLRP7 zeigt sich eine starke Eigeninteraktion (Co-IP/IB: α -Myc), Die Einzeltransfektionen des Flag- und Myc-markierten Proteins dienen als Negativkontrolle.

3.1.4 Ein APAF1 basiertes „*in silico*“ Modell von NLRP7 und dessen Aktivierung

Unabhängig von den Hefe Di-Hybrid Analysen wurde ein *in silico* Modell der aktivierten und nicht-aktivierten NLRP7 Proteinstruktur generiert um potentielle strukturelle Veränderungen während der Aktivierung darzustellen.

Sowohl das aktivierte als auch das inaktivierte Proteinmodell von NLRP7 zeigen klare Abgrenzungen zwischen den vier verschiedenen Proteindomänen PYD, NACHT, NAD und LRR (Abb. 3.6).

3. Ergebnisse

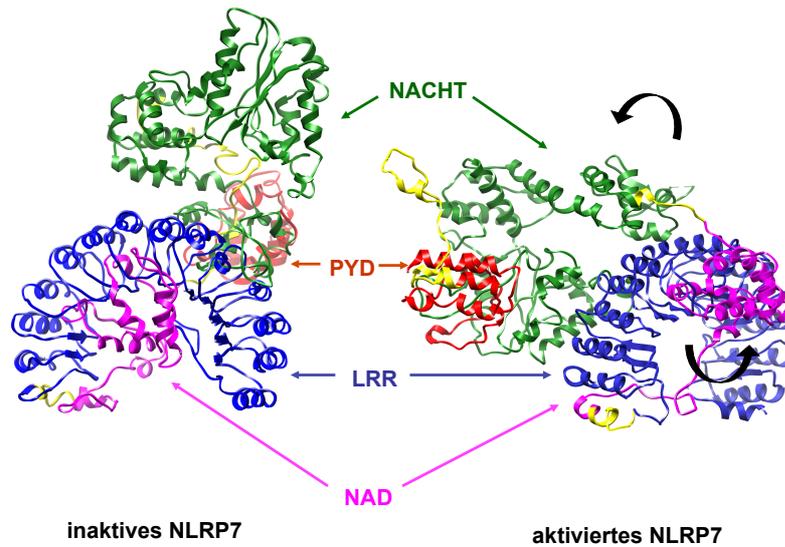


Abb. 3.6: *In silico* Modell des nicht-aktivierten und aktivierten NLRP7-Proteins. Ribbon-Modell von NLRP7 in seiner inaktiven (links) und aktivierten Form (rechts). Die vier einzelnen Domänen werden in verschiedenen Farben dargestellt: PYD (rot), NACHT (grün), NAD (magenta) und LRR (blau). Vor einer Aktivierung befindet sich die NAD-Domäne im Schutz der LRR-Domäne. Bei Aktivierung kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins, welche zu einem Austritt der NAD-Domäne aus der sie umgebenden LRR-Domäne führt (schwarze Pfeile).

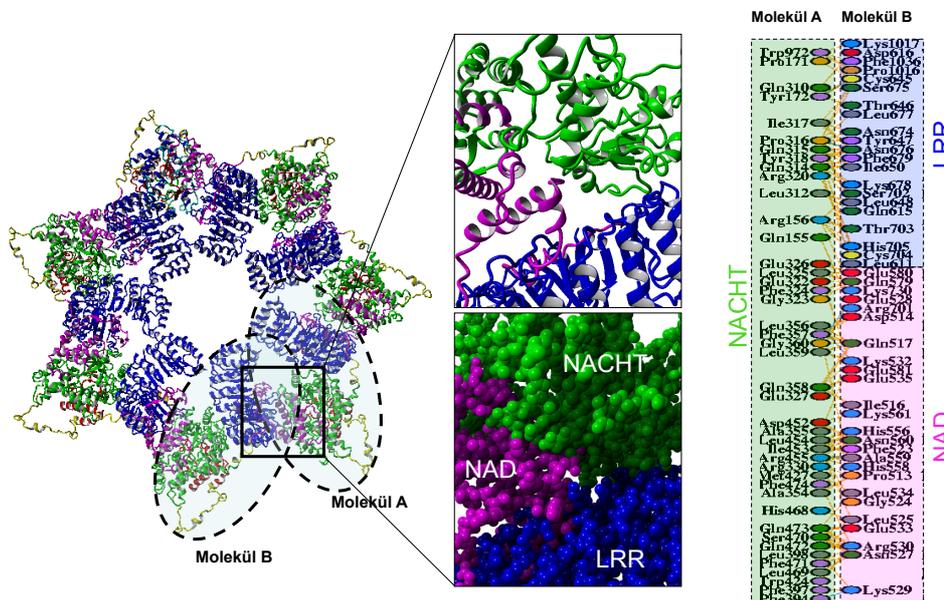


Abb. 3.7: *In silico* Modell eines NLRP7 Oligomers. Das NLRP7-Oligomer zeigt sieben miteinander verbundene NLRP7-Moleküle. Das Ribbon-Modell wurde mit Hilfe eines aktivierten NLRP7-Monomers über den MZ-Dock Server generiert (links). Eine Vergrößerung zeigt wie während der Oligomerisierung ein Großteil der NAD-Domäne (magenta) zusammen mit einem kleinen Abschnitt der LRR-Domäne (blau) des einen NLRP7-Moleküls mit der NACHT-Domäne (grün) eines zweiten NLRP7-Moleküls (mitte) interagieren. Die Abbildung ganz rechts zeigt die genauen Interaktions-Schnittstellen zweier NLRP7-Moleküle (Molekül A & B).

Die aktivierte Form von NLRP7 zeigt zwei auffällige strukturelle Veränderungen im Vergleich zu dem inaktiven Protein: 1) Während sich die NAD-Domäne (magenta) vor einer Aktivierung noch vollständig in dem Schutz der LRR-Domäne (blau) befindet, kommt es nach einer Aktivierung zu einer Freigabe der NAD-Domäne. 2) Eine gravierende Konformationsänderung führt bei Aktivierung zu einer Verlagerung der beiden N-terminalen Domänen PYD (rot) und NACHT (grün) und damit zu einer Freilegung von zuvor verborgenen Regionen (Abb. 3.6).

Eine multimerere Kopplung mit dem aktivierten NLRP7-Monomer zeigt, wie während der Oligomerisierung die NAD-Domäne und ein kleiner Teil der LRR-Domäne von einem NLRP7-Molekül mit der NACHT-Domäne eines zweiten NLRP7-Moleküls in Kontakt treten (Abb. 3.7). Ein Großteil der durch die Aktivierung induzierten strukturellen Änderungen innerhalb des Proteins, erfolgt in der Nähe dieser Motive und demonstriert zusätzlich wie wichtig die Bindung von ADP und Mg^{2+} für die Oligomerisierung des Proteins sind.

Während sich die NAD-Domäne aus dem Schutz der LRR-Domäne befreit, kommt es innerhalb der NAD-Domäne zu einer zusätzlichen Freilegung hydrophober Seitenketten (Abb. 3.8 rechts), welche zuvor in der inaktivierten Proteinform nicht sichtbar sind (Abb. 3.8 links). Diese intradomän-spezifischen Änderungen weisen zusätzlich darauf hin, dass die NAD-Domäne eine Schlüsselkomponente für den Oligomerisierungs-/Aktivierungsprozess des Proteins ist.

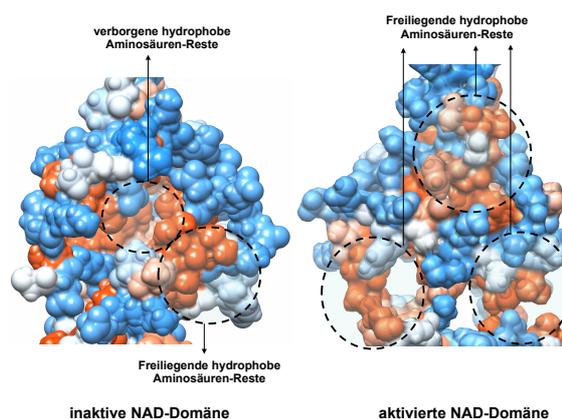


Abb. 3.8: *In silico* Modell der NAD Domäne vor und nach Aktivierung von NLRP7. *Space-filling*-Modell der NAD-Domäne vor (links) und nach Aktivierung (rechts). Die Anfärbung der Oberflächen wurde der Kyte und Doolittle Hydrophobizitäts-Skala nachempfunden: Blau angefärbte Moleküle sind hydrophil und orange angefärbte Moleküle sind hydrophob. Während sich bei der inaktivierten Form noch viele hydrophobe Seitenketten innerhalb der Domäne verbergen, kommt es nach Aktivierung zu einer Freigabe dieser Seitenketten an die Oberfläche (siehe schwarze gestrichelte Kreise).

3.1.5 Der Einfluss BiBM-assoziiierter NLRP7-Mutationen auf die zelluläre Lokalisation des Proteins

Man geht davon aus, dass BiBM-assoziierte Mutationen einen entsprechenden Effekt auf die Funktion des Proteins haben. Die nachfolgenden Untersuchungen sollten zeigen welchen Einfluss die Mutationen auf die Lokalisation des mutierten Proteins in der Zelle haben. Hierzu wurden die N-terminal EGFP-markierten NLRP7-Konstrukte Wildtyp, L398R, K511R, R693W oder R693P transient in HEK293T Zellen transfiziert.

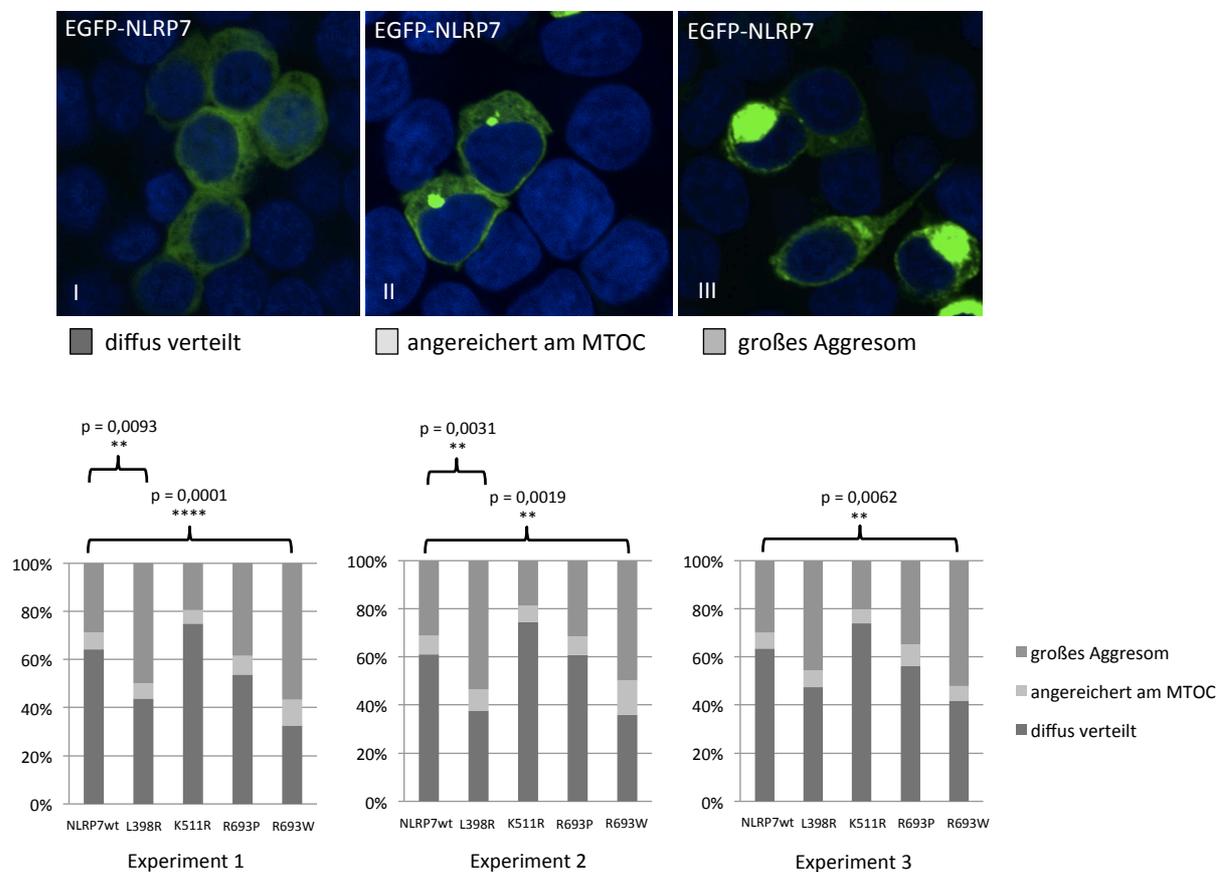


Abb. 3.10: BiBM-assoziierte Mutationen und ihr Einfluss auf die Aggresom-Formation. Das Bild oben zeigt die drei verschiedenen Proteinverteilungen des EGFP-markierten NLRP7 in der Zelle nach transienter Transfektion. Typ I: diffus verteilt (dunkelgrau), Typ II: angereichert am MTOC (hellgrau), Typ III: großes Aggresom (grau). Jedes der drei unten dargestellten Diagramme steht für ein Experiment und zeigt den Anteil der jeweiligen Proteinverteilung in Prozent. In jedem Experiment wurden jeweils das Wildtyp-Protein NLRP7 und die vier mutagenisierten NLRP7-Konstrukte L398R, K511R, R693P und R693W ausgezählt.

Für jedes einzelne Konstrukt wurden drei verschiedene Transfektionen durchgeführt. Weiterhin wurden durchschnittlich 1000 Zellen pro Experiment ausgezählt und beurteilt (siehe Anhang A.1 Tab. A.1a). Die Proteinverteilung innerhalb der Zelle wurde empirisch in drei verschiedene Erscheinungsbilder eingeteilt: Typ I = diffus verteilt, Typ II = angereichert am MTOC, Typ III = große Aggresom-Formation (Abb. 3.10 oben). Die Summe der jeweils gezählten Zelltypen pro Transfektion wurde prozentual auf 100% angeglichen und mit dem Chi-Square Test auf Signifikanz überprüft (Abb. 3.10 unten & Anhang A.1 Tab. A.1b).

Das Wildtyp-Konstrukt zeigte in allen drei Experimenten bei circa 60% der Zellen eine diffuse Proteinverteilung im Zytoplasma wohingegen 7% der Zellen zusätzlich zu der zytoplasmatischen Proteinverteilung kleine perinukleäre Aggregate aufwiesen. Die restlichen 30% der Zellen wiesen weitaus größere Proteinansammlungen auf, deren Durchmesser sich über das gesamte Zytoplasma verteilte.

Im Vergleich zu dem Wildtyp zeigte die Mutation L398R (NACHT-Domäne) in zwei von drei durchgeführten Experimenten einen signifikanten Anstieg in der Anzahl von Zellen mit großen Aggresom-Formationen (Experiment 1: $p=0,0093$; Experiment 2: $p=0,0031$) während der Anteil an Zellen mit einer diffusen Proteinverteilungen entsprechend abnahm. Der Anteil an Zellen mit einer diffusen Proteinverteilung verringerte sich verglichen zu dem Wildtyp um circa 20% (Exp. 1: 44 %; Exp. 2: 38%), während der Anteil an Zellen mit großen Aggresom-Formationen sich um die gleichen 20% erhöhte (Exp.1: 50%; Exp.2: 54%). Interessanterweise blieb der Anteil an Zellen mit nur kleinen perinukleären Aggregaten an dem MTOC stabil bei 7%. Die hier beobachtete Art der Proteinverteilung lässt sich anhand des „Seeding Nucleation“ Modells erklären. Die falsche Faltung eines Proteins ist ein thermodynamisch ungünstiger und damit langsamer Prozess, der schließlich die Grundlage für eine kinetisch günstige Expansion legt. Sobald sich stabile Proteinaggregate bilden kommt es zu einer schnellen exponentiellen Anreicherung [105].

Die Mutation R693W (LRR-Domäne) zeigte in allen drei Experimenten eine signifikante Zunahme an Zellen mit großen Aggresom-Formationen (Exp. 1: $p=0,0001$; Exp. 2: $p=0,0019$; Exp. 3: $p=0,0062$) und eine entsprechende Reduktion

3. Ergebnisse

an Zellen mit diffuser Proteinverteilung. Der Anteil von Zellen ohne jegliche Proteinakkumulation verringerte sich verglichen zum Wildtyp um 25-30% (Exp. 1: 33%; Exp. 2: 36%; Exp. 3: 42%), während sich die Zahl der Zellen mit großen Aggresom-Formationen um die entsprechende Menge erhöhte (Exp. 1: 57%; Exp. 2: 50%; Exp. 3: 52%). Auch hier zeigte sich eine stabile Anzahl an Zellen mit nur geringer Akkumulation am MTOC.

Im Vergleich dazu verhält sich die an der gleichen Aminosäure lokalisierte Substitution R693P nicht wie die Substitution R693W. Obwohl sich die Mutation an der gleichen Position wie die zuvor beschriebene Mutation R693W befindet, ließ sich die Verteilung der verschiedenen Zelltypen mit der des Wildtyp-Konstruktes vergleichen.

Der nsSNP K511R zeigte einen gegenteiligen Effekt in der Aggresom-Formation. Obwohl die Auswertungen keine Signifikanz aufweisen, zeigten alle drei Experimente eine Reduktion an Zellen mit großen Aggresom-Formationen und gleichzeitig mehr Zellen mit einer diffusen Proteinverteilung. Im Vergleich zum Wildtyp erhöhte sich die Zahl der Zellen ohne Proteinaggregate um bis zu 15% (Exp.1: 75%; Exp.2: 74%; Exp.3: 74%), während die Zellen mit großen Aggresom-Formationen entsprechend abnahm (Exp.1: 20%; Exp.2: 19%; Exp.3: 20%).

3.1.6 Identifizierung der juxtannukleären NLRP7-Aggregate nach transienter Transfektion

Parallel zu den in Abschnitt 3.1.5 gezeigten mikroskopischen Analysen sollten spezifische Zellmarker klären, ob es sich bei der perinukleären Aggregation um ein sog. „Aggresom“ handelt. Das Aggresom wurde 1998 von Johnsten et al. beschrieben [106]. Hierbei handelt es sich um eine Ansammlung von falsch gefalteten Proteinen, Chaperonen und Proteasomen rund um das Mikrotubulus-Organisationszentrum (MTOC). Aggresom-Formationen sind von dem Mikrotubulus-Netzwerk einer Zelle und dessen Dynein-Dynactin assoziierten Komplex abhängig. Die Zelle kontrolliert ubiquitinierte Proteinaggregate, indem diese mit Hilfe der an das Motorprotein Dynein gebundenen Histondeazetylase HDAC6 über die Mikrotubuli zu dem MTOC transportiert und dort in einem von Vimentin eingehüllten Aggresom angesammelt werden [107]. Zudem gibt es Studien zu einem sog. „physiologischen“ Aggresom, welches die Aktivität der induzierbaren NO Synthase (iNOS) reguliert [108]. Für den Nachweis eines Aggresoms wurden hier nach Expression des Fusionsprotein EGFP-NLRP7 die zellulären Marker γ -Tubulin, Ubiquitin, 26s Proteasom und Vimentin immunologisch angefärbt und auf Kolo-kalisation mit den juxtannukleären Proteinaggregaten untersucht (Abb. 3.9).

Alle vier Marker kolokalisierten innerhalb der Proteinaggregate. Die Kolo-kalisation mit γ -Tubulin, dem Hauptbestandteil des MTOC war ein erster Hinweis für ein NLRP7 Aggresom (Abb. 3.9 A-C). Die markante Kolo-kalisation von Ubiquitin mit den in der Zelle entstandenen Proteinaggregaten war ein weiterer Hinweis für deren kontrollierten Abbau (Abb. 3.9 D-F). Auch das 26s Proteasom zeigte neben einer diffusen Verteilung im Zytoplasma eine deutliche Akkumulation und Kolo-kalisation mit den Proteinaggregaten (Abb. 3.9 G-I). Neben dem Aggresom gelten JUNQ („juxtannuclear quality control“), iPOD („insoluble protein deposit“) und ERAC („ER-associated compartment“) als weitere Schutz- und Kontrollmechanismen einer Zelle vor Proteinaggregaten [109]. Lediglich das Aggresom wird von einer Vimentinschicht umhüllt und ist somit ein spezifischer Aggresommarker. Das Protein Vimentin gehört zu den Typ3 Intermediärfilamenten und ist Bestandteil des Zytoskeletts. Die Kolo-kalisationsanalysen zeigten eine deutliche Anreicherung und Kolo-kalisation des Vimentins um die juxtannukleären Aggregate (Abb. 3.9 J-L).

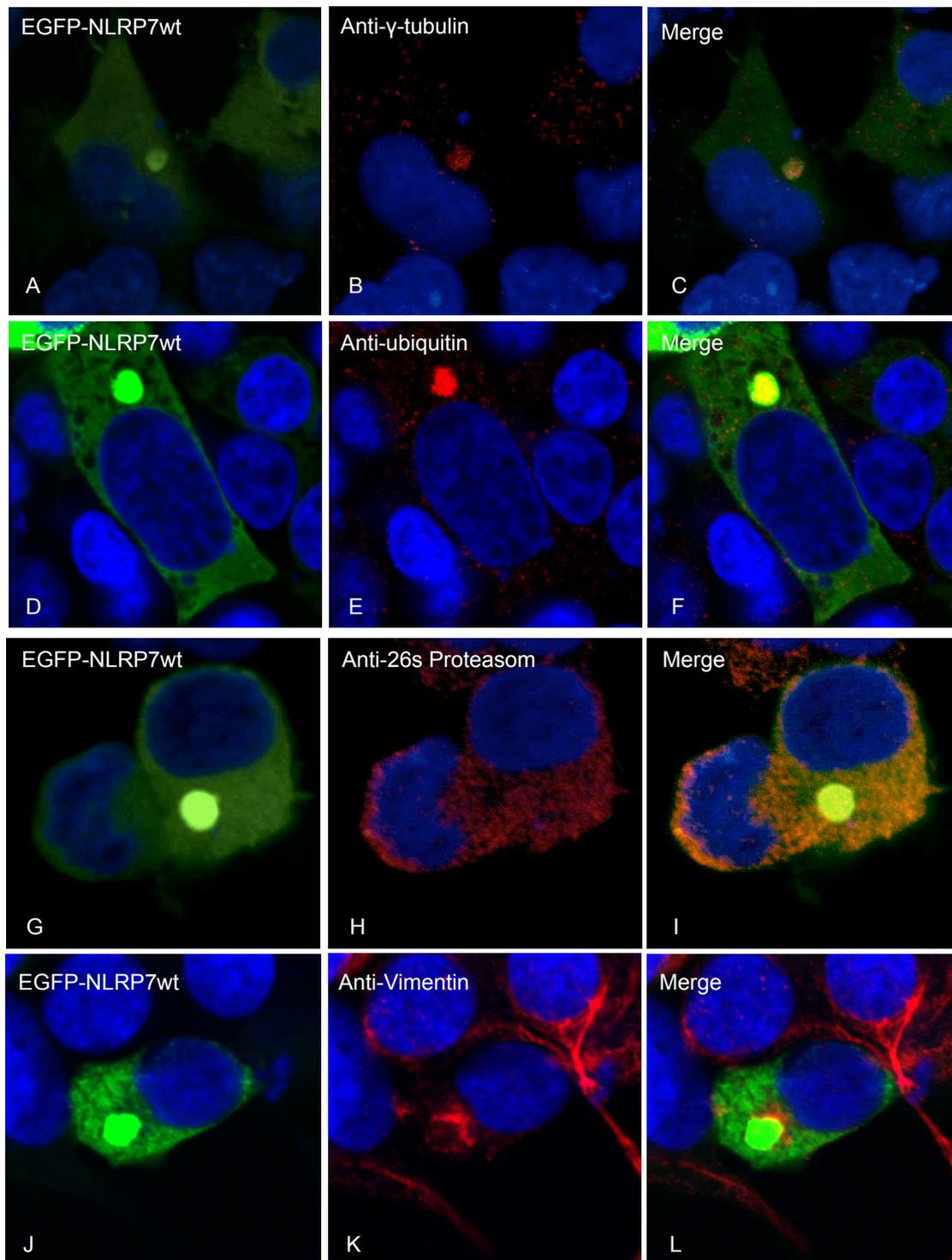


Abb. 3.9: Kolokalisations-Analysen von NLRP7 mit Aggresom-spezifischen Zellmarkern. A-C) Kolokalisation des EGFP-NLRP7-Aggregats mit γ -tubulin (MTOC). **D-F)** Kolokalisation des EGFP-NLRP7-Aggregats mit Ubiquitin **G-I)** Das 26s Proteasom zeigt eine diffuse zytoplasmatische Verteilung mit einer Anreicherung und Kolokalisation in dem juxtanukleären Aggregat. **J-L)** Vimentin umschließt und kolokalisiert mit dem juxtanukleären NLRP7-Aggregat. Die Immunfärbung der Erst-Antikörper γ -Tubulin, Ubiquitin, 26s Proteasom und Vimentin erfolgte mit AlexaFluor 555. Der Zellkern wurde mit ToPro3 angefärbt.

3.1.7 *In silico* Analyse der BiBM-assoziierten NLRP7-Mutationen und ihr möglicher Einfluss auf die Oligomerisierung

Nach einer *in silico* Mutagenese der drei Mutationen und der Non-Synonymen Variante ließen sich nach einem Vergleich zu dem Wildtyp-Protein biochemische und biophysikalische Unterschiede in der lokalen Umgebung jedes einzelnen Basenaustauschs ausmachen (Abb. 3.11).

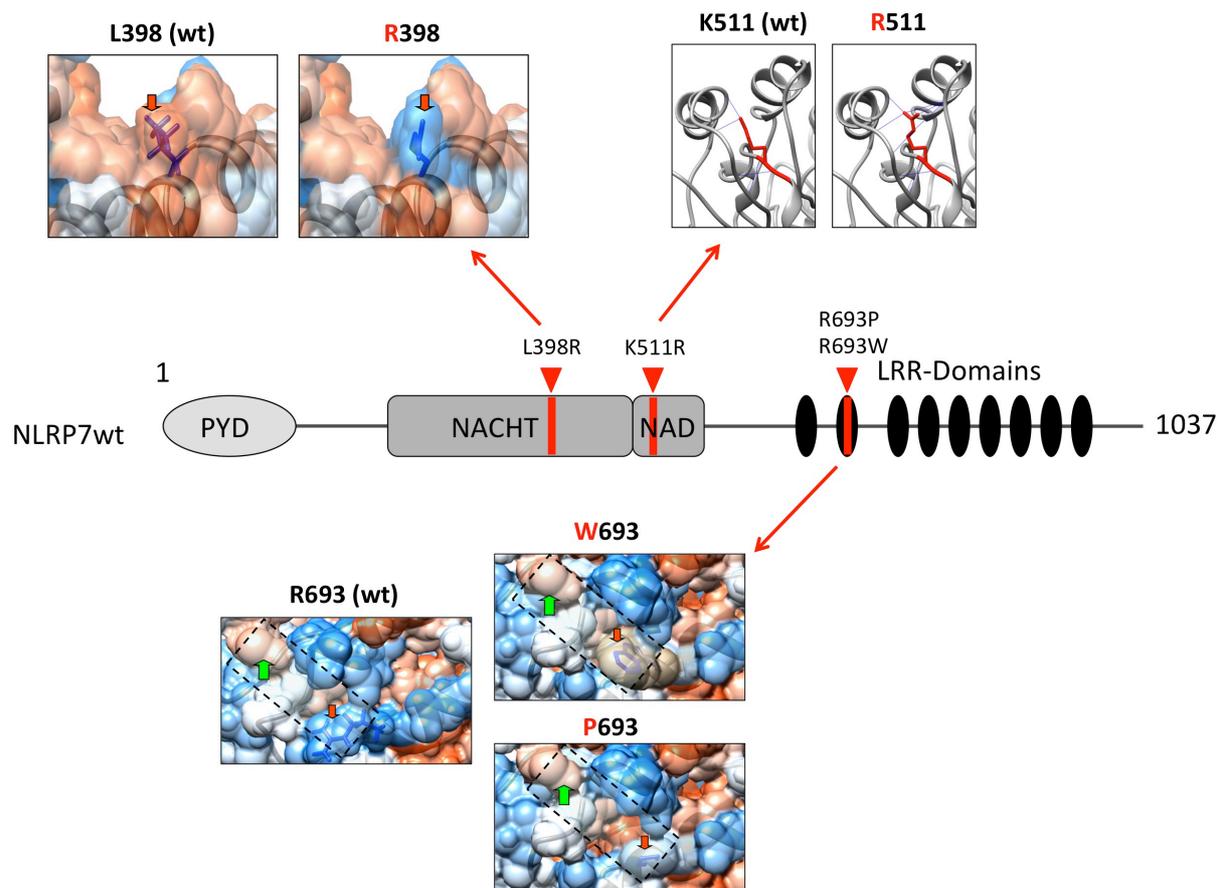


Abb. 3.11: *In silico* Analyse BiBM-assoziiierter NLRP7-Mutationen. Die betroffenen Aminosäuren und ihre lokale Umgebung werden hier jeweils als Wildtyp (linke Seite) und als Mutante (rechte Seite) dargestellt. Die Hydrophobizität entspricht der Kyte und Doolittle Skala, blau für hydrophil und orange für hydrophob. Die Aminosäure L398 (im Stick-Format dargestellt, roter Pfeil) ist Teil einer großen hydrophoben Oberfläche (orange gefärbte Oberfläche). Die Mutation R398 sticht aus der hydrophoben Oberfläche als hydrophile Aminosäure heraus (im Stick-Format, blau). Die lokale Umgebung des nsSNP K511R wird als graues Ribbon-Modell dargestellt, während die Aminosäure 511 im Stick-Format (rot) dargestellt wird. Die Seitenketten (Wasserstoffbrücken und Ionenbindungen) sind durch blaue Linien gekennzeichnet. Die Aminosäure R693 und die beiden Mutationen P693 und W693 werden als Stick-Format dargestellt (roter Pfeil). Nebenan liegt die bei Oligomerisierung mit der NACHT-Domäne interagierende LRR Region (grüner Pfeil). Die Mutation W693 führt lokal zu einer deutlichen Zunahme der Hydrophobizität.

3. Ergebnisse

So zeigt die in der NACHT-Domäne lokalisierte Mutation L398R anstatt eines vollständig zur Oberfläche hin exponierten hydrophoben Leucin (magenta; linke Seite) ein nur zum Teil exponiertes Arginin (blau; rechte Seite).

Bei dem in der NAD-Domäne lokalisierten nsSNP K511R kommt es bei einem Austausch von Lysin durch Arginin zu einer vermehrten Ausbildung von Seitenketten-Bindungen (z.B. Wasserstoffbrücken- und Ionenbindungen). Die meisten dieser zusätzlichen Brücken verbinden sich mit Seitenketten der LRR-Domäne.

Die in der LRR-Domäne befindlichen Mutationen R693W und R693P führen entweder zu einem nicht-konservativen Austausch, bei dem Arginin durch ein Oberflächen exponiertes hydrophobes Tryptophan ersetzt wird, oder zu einem weniger hydrophoben Austausch mit Prolin, welches jedoch die Helix an der Aminosäurenposition 693 durchbricht.

3.2 ZBTB16 als neuer potentieller Interaktionspartner von NLRP7

Mutationen in *NLRP7* führen bei Frauen zu immer wiederkehrenden Blasenmolen-Schwangerschaften. Das abnormale Abortmaterial zeigt deutliche Veränderungen der maternalen Imprinting-Loci hin zu einem paternalen Genotyp trotz einer biparentalen chromosomalen Anlage. Bis heute ist nicht klar wie das im Zytoplasma lokalisierte NLRP7 ohne eine DNA-Bindedomäne Einfluss auf die Prägung der DNA haben könnte. In dem zweiten Teil dieser Arbeit sollten mit Hilfe von Hefe Di-Hybrid Analysen potentielle Interaktionspartner von NLRP7 ausfindig gemacht werden, die an der Etablierung des Imprinting direkt oder indirekt beteiligt sein könnten.

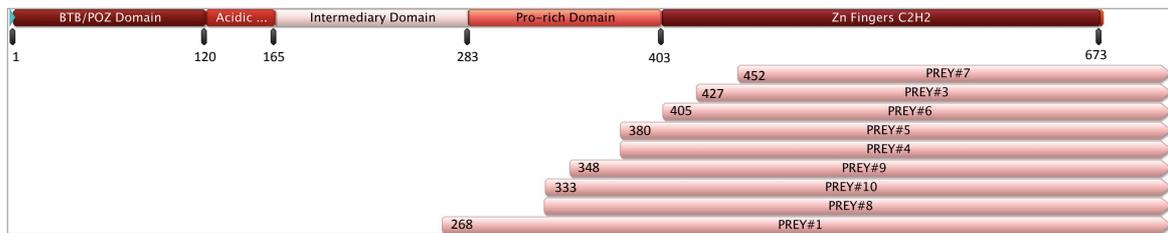
3.2.1 Kommerzielle Hefe Di-Hybrid Analysen zur Identifizierung neuer Interaktionspartner

Auf der Suche nach neuen Interaktionspartnern wurden von der Firma Dualsystems zwei unabhängige LexA-basierte Hefe Di-Hybrid Analysen durchgeführt. Das NLRP7-Protein wurde gegen eine normalisierte humane Transkript-Bibliothek und gegen eine ovarielle Transkript-Bibliothek auf Interaktion geprüft. Die Analysen, des Hefe-Screens mit der humanen Transkript-Bibliothek zeigten keine positiven Interaktionen. Der Hefe-Screen mit einer ovariellen Transkriptbibliothek zeigte hingegen 10 potentielle Köder und alle potentiellen Interaktionen wurden bereits von der Firma mit entsprechenden Selektivmedien und einem lacZ-Test verifiziert (Abb. 3.12 unten).

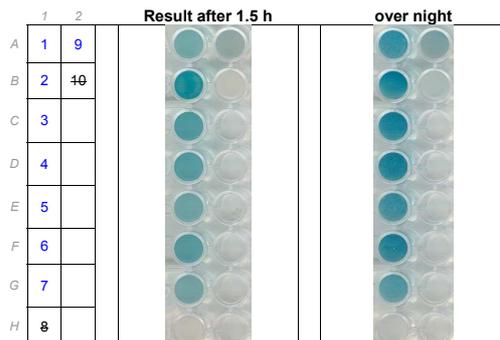
Neun der 10 Köder wurden von uns erneut sequenziert und analysiert. Eine Homologie-Analyse der neun Köder-Sequenzen in BLAST (Basic Local Alignment Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) zeigte für alle Sequenzen eine 100%ige Übereinstimmung mit dem C-terminalen Ende des Transkriptionsfaktors ZBTB16 (PLZF; Abb 3.12 oben). Die Köder enthielten entweder nur Sequenzabschnitte der Zinkfinger-Domäne oder zusätzlich Abschnitte der RD2-Domäne von ZBTB16. Der Köder mit der Bezeichnung Prey#1 (AA 268-673) wurde als „wirklich“ positiv identifiziert. Hier zeigte sich Wachstum auf dem Selektivmedien SDhigh und der lacZ-Test (HTX-Assay) zeigte eine stark positive Blaufärbung. Alle anderen Köder zeigten entweder kein Wachstum auf SDhigh (Prey#2, #3 und #7), nur schwaches Wachstum auf SDhigh (Prey #4, #5, #6 und #9) oder blieben negativ in dem lacZ-Test (Prey#8 und #10).

3. Ergebnisse

Prey Sequence Alignment



HTX assay results (lacZ)



Growth on SDhigh



| Prey # | Growth on SD-his | lacZ positive | Growth on SD-ade | Interaction |
|--------|------------------|---------------|------------------|--------------|
| 1 | + | +++ | ++ | strong |
| 2 | + | +++ | - | intermediate |
| 3 | + | +++ | - | intermediate |
| 4 | + | +++ | + | strong |
| 5 | + | +++ | + | strong |
| 6 | + | +++ | + | strong |
| 7 | + | +++ | - | intermediate |
| 8 | + | - | +++ | intermediate |
| 9 | + | + | + | intermediate |
| 10 | + | - | +++ | intermediate |

Abb. 3.12: Hefe Di-Hybrid Analysen von NLRP7 gegen eine ovarielle Transkriptbibliothek. Oben: Ein mit der Software Geneious durchgeführtes Sequenz-Alignment von neun identifizierten Köder-Konstrukten (Prey#1, #3-#10) identifiziert die Zinkfinger-Domäne und den Prolin-reichen Abschnitt der RD2-Domäne des Transkriptionsfaktors ZBTB16. Unten: Ergebnisse der LexA-basierten ovariellen Hefe Di-Hybrid Analyse von der Firma Dualsystem. Ein Vergleich der Interaktion zwischen Köder und NLRP7 mit dem HTX-Assay (lacZ-Test zur Messung der β -Galactosidase-Aktivität) und dem Wachstum auf SDhigh identifiziert Prey#1 als den stärksten potentiellen Interaktionspartner (roter Kasten).

3.2.2 Verifizierung des potentiellen Interaktionspartner ZBTB16 und Lokalisierung der Interaktions-Schnittstellen zwischen NLRP7 und ZBTB16 mit dem Hefe Di-Hybrid System

Zur Verifizierung der potentiellen Interaktion zwischen NLRP7 und ZBTB16 wurde die komplette cDNA von ZBTB16 in den Beute-Vektor pGBKT7 des Gal4 Hefe Di-Hybrid-Systems kloniert und gegen verschiedene NLRP7-Konstrukte im Köder-Vektor pGADT7 auf Interaktion geprüft (Abb. 3.12). Zu den NLRP7-Konstrukten zählen NLRP7 Wildtyp, die vier einzelnen Domänen (PYD, NACHT, NAD, LRR) und

3. Ergebnisse

fünf verschiedene Deletionskonstrukte (Δ NAD/LRR, Δ LRR, Δ PYD/LRR, Δ PYD und Δ NACHT).

Die Hefe Di-Hybrid Analyse zeigte auf dem Selektivmedium SD_{high} unterschiedlich starke Interaktionen zwischen ZBTB16 und den NLRP7-Konstrukten NAD, Δ NAD/LRR, Δ LRR, und Δ PYD/LRR (Abb. 3.13).

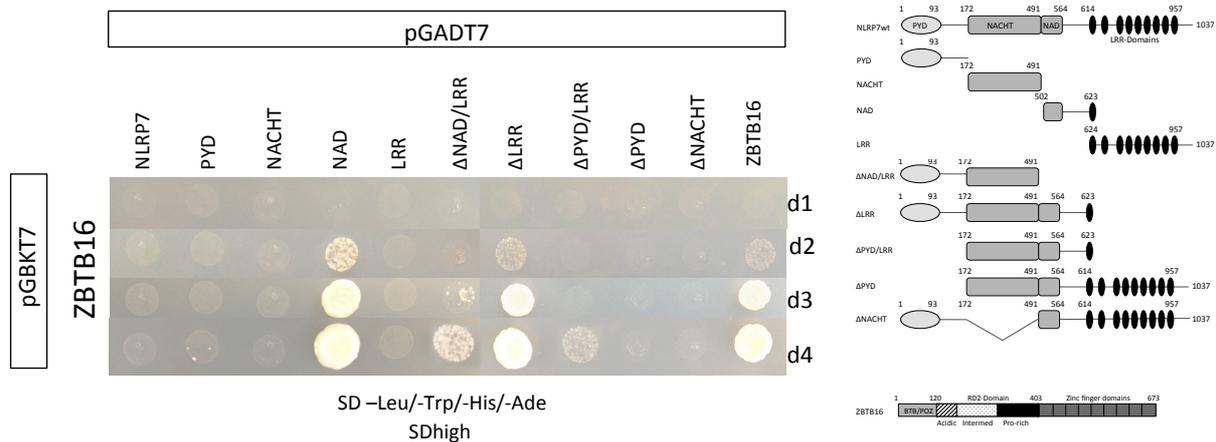


Abb. 3.13: Hefe Di-Hybrid Interaktions-Analyse zwischen ZBTB16 und verschiedenen NLRP7-Konstrukten. 10 verschiedene in dem Ködervektor pGADT7 befindliche NLRP7-Konstrukte (rechts dargestellt) wurden jeweils zusammen mit ZBTB16 Wildtyp in den Hefestamm AH109 transformiert und über 4 Tage (d1-4) auf dem Selektivmedium SD_{high} auf Interaktion geprüft. Die beiden NLRP7-Konstrukte NAD und Δ LRR interagieren stark mit ZBTB16, während Δ NAD/LRR und Δ PYD/LRR eine schwächere Interaktion aufweisen. NLRP7 Wildtyp zeigt keine Interaktion mit ZBTB16. Die Eigeninteraktion von ZBTB16 diente als Positivkontrolle.

Die NAD-Domäne und das Deletionskonstrukt Δ LRR induzieren eine relativ starke Interaktion mit ZBTB16 was mit einem leichten Wachstum der Hefezellen an Tag 2 (d2) beginnt und bis Tag 4 (d4) stetig zunimmt. Die beiden Deletionskonstrukte Δ NAD/LRR und Δ PYD/LRR führen hingegen zu einer schwächeren Interaktion mit ZBTB16 und zeigen erst ab Tag 4 ein leichtes Wachstum der Hefezellen auf SD_{high}. Eine Interaktion zwischen den beiden Vollängen-Konstrukten NLRP7 und ZBTB16 erwies sich in dem Hefe Di-Hybrid System als negativ. Auch die Interaktionsanalysen zwischen ZBTB16 und den NLRP7-Konstrukten PYD, NACHT, LRR, Δ PYD, und Δ NACHT zeigten kein Hefe-Wachstum auf SD_{high}.

Die beiden hier positiv reagierenden NLRP7-Konstrukte NAD und Δ LRR führten bereits in dem interdomän-spezifischen Hefescreen (Abschnitt 3.1.1) zu einer hohen Reaktivität untereinander, wohingegen die hier beobachtete Interaktionen mit den

NLRP7-Konstrukten Δ NAD/LRR und Δ PYD/LRR nur in Kombination mit ZBTB16 in Erscheinung traten.

Die Eigeninteraktion von ZBTB16 diente als Positivkontrolle (Negativ-Kontrollen siehe Abschnitt 3.1.1, Abb. 3.3). In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass ZBTB16 über seine N-terminale BTB-Domäne Homodimere bildet und darüber seine transkriptionelle Repression ausübt [110].

Alle positiven Interaktionen zwischen ZBTB16 und den drei Deletionskonstrukten, Δ NAD/LRR, Δ LRR und Δ PYD/LRR weisen darauf hin, dass die NACHT-Domäne eine entscheidende Schnittstelle für die Interaktion der beiden Proteine sein könnte, während die Anwesenheit der LRR-Domäne bzw. die Abwesenheit der NACHT-Domäne (siehe NLRP7, Δ PYD und Δ NACHT) diese Interaktion unterdrückt.

3.2.3 Interaktionsanalyse zwischen NLRP7 und KHDC3L mit dem Hefe Di-Hybrid System

KHDC3L ist neben *NLRP7* das zweite für BiBM verantwortliche maternale Effektgen. Aufgrund eines zu *NLRP7* ähnlichen Expressionsprofils während der Oogenese und einer gezeigten Kollokalisierung beider Proteine an dem MTOC in einer lymphoblastären Zelllinie, sollte in dem hier angewandten Hefe Di-Hybrid System eine mögliche direkte Interaktion beider Proteine überprüft werden [63,64]. Die cDNA von *KHDC3L* wurde wie zuvor für ZBTB16 in den Beutevektor pGBKT7 kloniert und gegen die 10 verschiedenen NLRP7-Konstrukte auf Interaktion geprüft (Abb. 3.14).

Lediglich die NAD-Domäne zeigte zusammen mit *KHDC3L* ab dem zweiten Tag ein stetiges Wachstum der Hefezellen auf SDhigh. Alle anderen neun NLRP7-Konstrukte führten zu keiner Interaktion mit *KHDC3L*.

Wie schon in Abschnitt 3.1.4 gezeigt werden konnte, ist die NAD-Domäne in Bezug auf Protein-Protein-Interaktionen eine hochreaktive Schlüsselkomponente. So induziert diese sowohl in der interdomän-spezifischen Hefe-Analyse (mit sich selbst) als auch zusammen mit ZBTB16 eine stark positive Interaktion auf SDhigh. Da jedoch keine anderen NLRP7-Konstrukte mit *KHDC3L* reagierten, wurde diese Interaktion als falsch positiv gewertet.

3. Ergebnisse

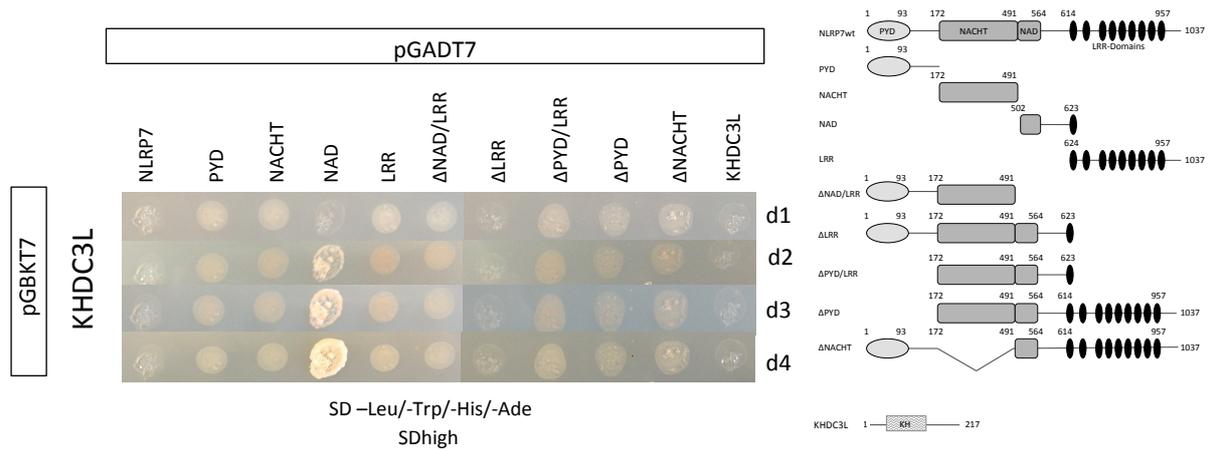


Abb. 3.14: Hefe Di-Hybrid Interaktions-Analyse von KHDC3L gegen verschiedenen NLRP7-Konstrukte. 10 verschiedene in dem Ködervektor pGADT7 befindliche NLRP7-Konstrukte (rechts dargestellt) wurden jeweils zusammen mit KHDC3L in den Hefestamm AH109 transformiert und über 4 Tage (d1-4) auf dem Selektivmedium SDhigh auf Interaktion geprüft. Nur die NAD-Domäne zeigt hier eine gewohnt starke Interaktion mit KHDC3L.

3.2.4 Einfluss der BiBM-assoziierten NLRP7-Mutationen auf die Interaktion mit ZBTB16

Weitere Hefe Di-Hybrid Interaktionsanalysen zwischen NLRP7 und ZBTB16 sollten nun zeigen, in wie weit die drei BiBM-assoziierten Mutationen und der nsSNP Einfluss auf die Interaktion beider Proteine haben. Die in Abschnitt 3.2.2 bereits durchgeführten Hefe-Analysen zeigten keine Interaktion zwischen den beiden Vollängen-Konstrukten NLRP7 und ZBTB16.

Die Hefe-Analyse von ZBTB16 (pGBKT7) gegen je eines der vier mutagenisierten NLRP7-Konstrukte (pGADT7) zeigte allein für den Aminosäureaustausch L398R eine positive Interaktion zwischen den beiden Vollängen-Konstrukten mit einem Wachstum der Hefezellen auf SDhigh ab dem dritten Tag (Abb 3.15). Die Mutation befindet sich in der NACHT-Domäne des NLRP7-Proteins was darauf hindeutet, dass dies eine entscheidende Interaktions-Schnittstelle zwischen beiden Proteinen sein könnte.

Die restlichen drei NLRP7-Sequenzvariationen K511R (NAD-Domäne), R693P und R693W (LRR-Domäne) hatten keinen Einfluss auf die Interaktion mit ZBTB16 und ein Wachstum der Hefezellen blieb aus.

Die bereits zuvor mit ZBTB16 positiv getesteten NLRP7-Konstrukte NAD und Δ LRR wurden als Positiv-Kontrollen mitgeführt. Genauso wie die Eigeninteraktion von

3. Ergebnisse

ZBTB16. Die Interaktions-Analyse zwischen ZBTB16 und einem leeren Prey-Vektor (pGADT7-Ø) diente als Negativ-Kontrolle

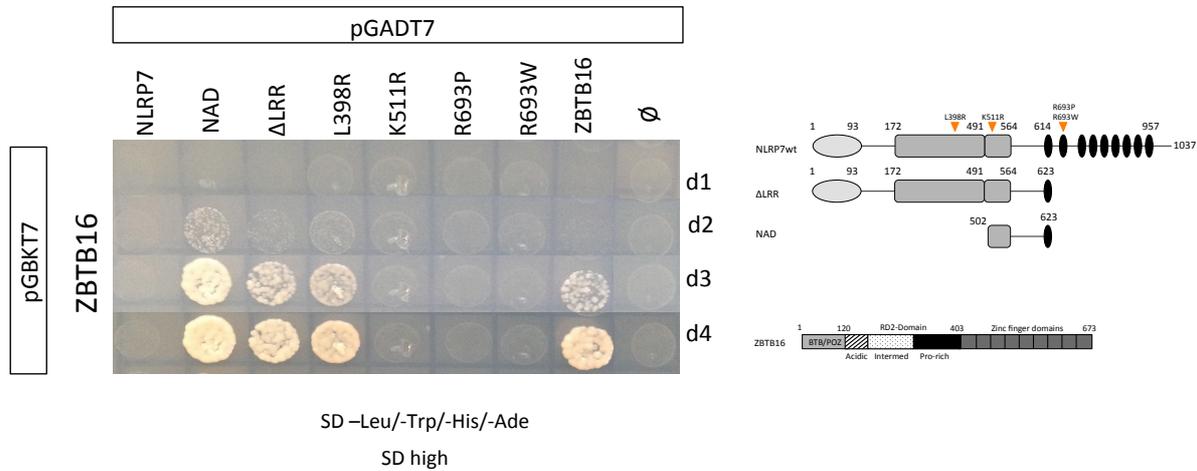


Abb. 3.15: Hefe Di-Hybrid Interaktions-Analyse zwischen ZBTB16 und vier BIM-assoziierten NLRP7-Mutationen. NLRP7 Wildtyp, NAD, ΔLRR und die vier mutagenisierten NLRP7-Konstrukte L398R, K511R, R693P und R693W (siehe Pfeile, orange) wurden jeweils zusammen mit ZBTB16 (pGBKT7) in den Hefestamm AH109 transformiert und über 4 Tage (d1-4) auf dem Selektivmedium SDhigh auf Interaktion geprüft. Das NLRP7-Konstrukt mit der in der NACHT Domäne lokalisierten Missense-Mutation L398R führte zu einer positiven Interaktion mit ZBTB16. NLRP7 Wildtyp und die anderen drei Mutationen zeigten keine Interaktion. Der leere Köder-Vektor pGADT7-Ø dient als Kontrolle und zeigt keine falsch positive Interaktion mit ZBTB16 (pGBKT7). NAD, ΔLRR und ZBTB16 (alle pGADT7) zeigen die erwartete Interaktion bzw. Eigeninteraktion mit ZBTB16 (pGBKT7).

3.2.5 Verifizierung der Hefe-Di-Hybrid Interaktion zwischen NLRP7 und ZBTB16 mittels Immunopräzipitation

Alle bisher durchgeführten Interaktionsanalysen basieren auf dem Modellsystem der Hefe. Demnach sind entsprechende Verifikationsanalysen in Säugerzellen unerlässlich. Alle bereits in der Hefe untersuchten NLRP7-Konstrukte wurden in einen säugerzell-spezifischen Vektor (pcDNA3.1-Flag) kloniert und dadurch N-terminal mit einem Flag-Epitop markiert. Gleichmaßen wurde die cDNA von ZBTB16, fünf weiteren ZBTB16 Deletionskonstrukten (del1-5) und KHDC3L in den Vektor pcDNA3.1-myc-HisB kloniert, wodurch jedes Konstrukt C-terminal mit einem Myc-Epitop markiert ist.

3.2.5.1 ZBTB16 interagiert mit der NACHT-Domäne von NLRP7

Zunächst wurde eine Interaktions-Analyse zwischen dem Volllängen-Konstrukt ZBTB16 und den neun verschiedenen NLRP7-Konstrukten NLRP7, NACHT, LRR, Δ NAD/LRR, Δ LRR, Δ PYD/LRR, Δ PYD, Δ PYD/NACHT, Δ NACHT in HEK293T-Zellen durchgeführt (Abb. 3.16). Nach entsprechender Ko-Expression wurden die verschiedenen NLRP7-Konstrukte mit einem Anti-Flag-Antikörper präzipitiert (Abb. 3.16, IP: α -Flag) und nach einem Immunoblot mit einem Anti-Myc-Antikörper (Abb. 3.16, IB: α -Myc) auf Kopräzipitation von ZBTB16 geprüft (Positiv- und Negativkontrollen siehe Abb. 3.17).

Im Gegensatz zu dem Hefe-System ist eine deutliche Interaktion zwischen den beiden Wildtyp-Konstrukten NLRP7 und ZBTB16 in Säugerzellen nachweisbar. Dies lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass es in den HEK293T-Zellen zu einer Aktivierung/Konformationsänderung des NLRP7-Proteins kommt (siehe Abschnitt 3.1.4) und die entsprechend interagierenden Regionen freigelegt werden. In der Hefe kommt es wahrscheinlich nicht zu dieser Konformationsänderung.

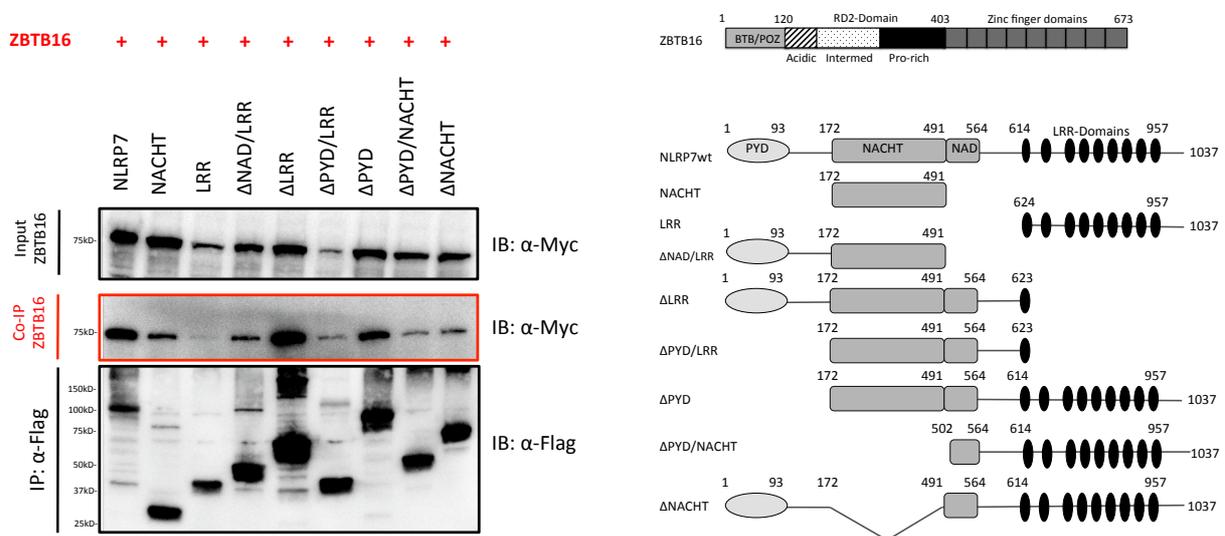


Abb. 3.16: Verifizierung der Hefe Di-Hybrid Interaktion von NLRP7 und ZBTB16 mittels Immunopräzipitation. Neun N-terminal Flag-markierte NLRP7-Konstrukte (siehe rechts) wurden jeweils zusammen mit dem C-terminal myc-markierten ZBTB16 in HEK293T-Zellen kotransfiziert. Nach geprüfter Expression von ZBTB16 (Input/IB: α -Myc) wurden die NLRP7-Konstrukte über Anti-Flag beschichtete Agarose-Beads präzipitiert (IP: α -Flag). Das ZBTB16-Kopräzipitat wurden mit einem Antikörper gegen Myc detektiert (Co-IP/IB: α -Myc, roter Kasten). Negativkontrollen siehe Abb 3.17.

3. Ergebnisse

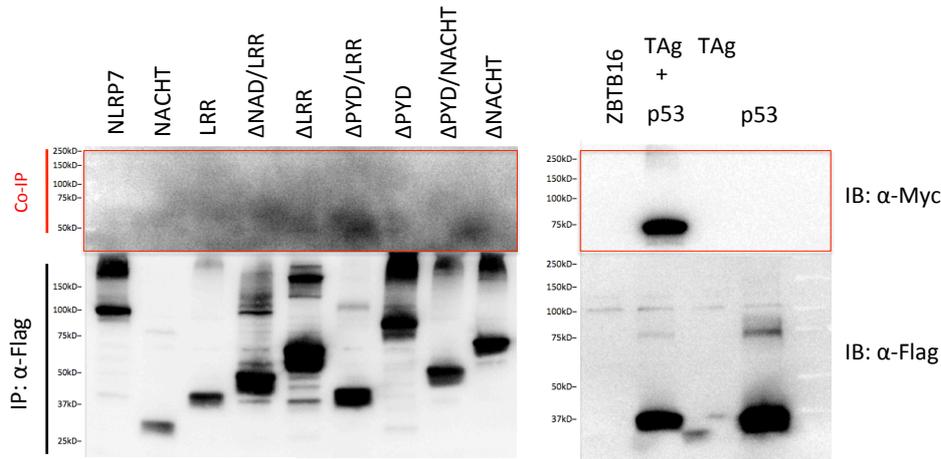


Abb. 3.17: Positiv- und Negativkontrollen der Flag-Immunopräzipitation. Als Negativkontrolle wurde jedes der neun Flag-markierten NLRP7-Konstrukte zusammen mit einem leeren Myc-Vektor in HEK293T-Zellen kotransfiziert und mit Anti-Flag präzipitiert (links). Auch die Einzeltransfektion des myc-markierten ZBTB16 zeigte nach Flag-IP keine falsch positive Interaktion mit den Agarose-Beads. Die Konstrukte p53 (Flag-markiert) und T-Antigen (Myc-markiert) dienten bei allen durchgeführten Flag-IPs als Positivkontrolle.

Die beiden NLRP7 Deletionskonstrukte Δ LRR und Δ PYD zeigten nach ihrer Präzipitation eine starke Interaktion mit ZBTB16. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion vermutlich nicht oder nicht nur von den beiden NLRP7-Domänen LRR und PYD induziert wird.

Weiterhin kopräzipitierte ZBTB16 etwas schwächer mit der einzelnen NACHT Domäne und mit dem Deletionskonstrukt Δ NAD/LRR.

Die Präzipitationen der Deletionskonstrukte ohne NACHT-Domäne (Δ PYD/NACHT und Δ NACHT) zeigten hingegen eine sehr schwache Interaktion mit ZBTB16 und wurden daher als negativ gewertet.

Die sehr schwache Interaktion zwischen Δ PYD/LRR lässt sich durch den Einsatz an geringer Proteinmenge von ZBTB16 in diesem Experiment erklären. Wiederholte Flag-IP-Experimente zwischen Δ PYD/LRR und ZBTB16 zeigten ansonsten ebenfalls eine positive Interaktion (Daten sind hier nicht aufgeführt).

Die Präzipitation der einzelnen C-terminalen LRR-Domäne des NLRP7-Proteins zeigte keine Interaktion mit ZBTB16.

Die Analyse der beiden einzelnen NLRP7-Domänen PYD und NAD wurde aus diesem Experiment ausgeschlossen, da die Expression der einzelnen Domänen zu schwach war um einen quantitativen Vergleich zu den anderen Experimenten durchführen zu können.

Zusammenfassend weisen die in diesem Immunopräzipitations-Experiment durchgeführten Interaktionsanalysen auf eine bevorzugte Bindungsaffinität zwischen ZBTB16 und der NACHT-Domäne von NLRP7 hin.

3.2.5.2 ZBTB16 bindet mit N- und C-terminalen Regionen an NLRP7

Zusätzliche Flag-IP Analysen mit fünf verschiedenen Deletionskonstrukten von ZBTB16 (ZBTB16_del1: AS 1-164, ZBTB16_del2: AS 120-483, ZBTB16_del3: AS 403-673, ZBTB16_del4: AS 268-673, ZBTB16_del5: AS 283-673) sollten die exakte Region des ZBTB16-Proteins bestimmen die mit NLRP7 direkt interagiert.

ZBTB16 besteht aus drei Domänen, es besitzt eine N-terminale BTB/POZ Domäne, eine RD2-Domäne die sich wiederum in drei Abschnitte unterteilt (Acidic/Intermediär/Prolin-rich) und eine C-terminale DNA-bindende Zinkfinger Domäne mit neun Zinkfingern (siehe auch Abb. 3.16 rechts oben). Sowohl die BTB- als auch die Zinkfinger-Domäne besitzen die Fähigkeit mit Proteinen zu interagieren [111]. Die Deletionskonstrukte ZBTB16_del1-3 wurden nach dem Schema der Drei-Domänen-Struktur von ZBTB16 generiert. Dabei entspricht ZBTB16_del4 dem Köder-Konstrukt aus der Hefe Di-Hybrid Analyse (Prey#1) und das dem del4 ähnliche Konstrukt ZBTB16_del5 sollte mit nur 5 anstatt 9 Zinkfingern die Suche nach der hier erwarteten Interaktions-Schnittstelle (siehe Hefe Di-Hybrid Abschnitt 3.2.1) näher charakterisieren.

Die Expression der einzelnen NLRP7-Domänen erwies sich oftmals als schwach und instabil. Daher wurden die Präzipitations-Analysen auf die fünf Konstrukte NLRP7, Δ NAD/LRR, Δ LRR, Δ PYD und Δ NACHT reduziert.

Neben den Deletionskonstrukten von ZBTB16 sollte eine Immunopräzipitation mit KHDC3L prüfen, ob die zuvor in Hefe durchgeführten Experimente zwischen NLRP7 und KHDC3L eine mögliche Proteininteraktion unterdrücken, die jedoch in HEK293T-Zellen nachweisbar ist.

Die fünf Myc-markierten ZBTB16-Konstrukte und das Vollängen-Konstrukt KHDC3L wurden je mit einem der fünf Flag-markierten NLRP7-Konstrukte in HEK293T-Zellen kotransfiziert und für 48h inkubiert. Die Flag-markierten NLRP7-Konstrukte wurden wie zuvor über einen Flag-spezifischen Antikörper präzipitiert (Abb. 3.18; Negativkontrollen und vollständige IP-Daten siehe Abb. 3.19 und 3.20).

3. Ergebnisse

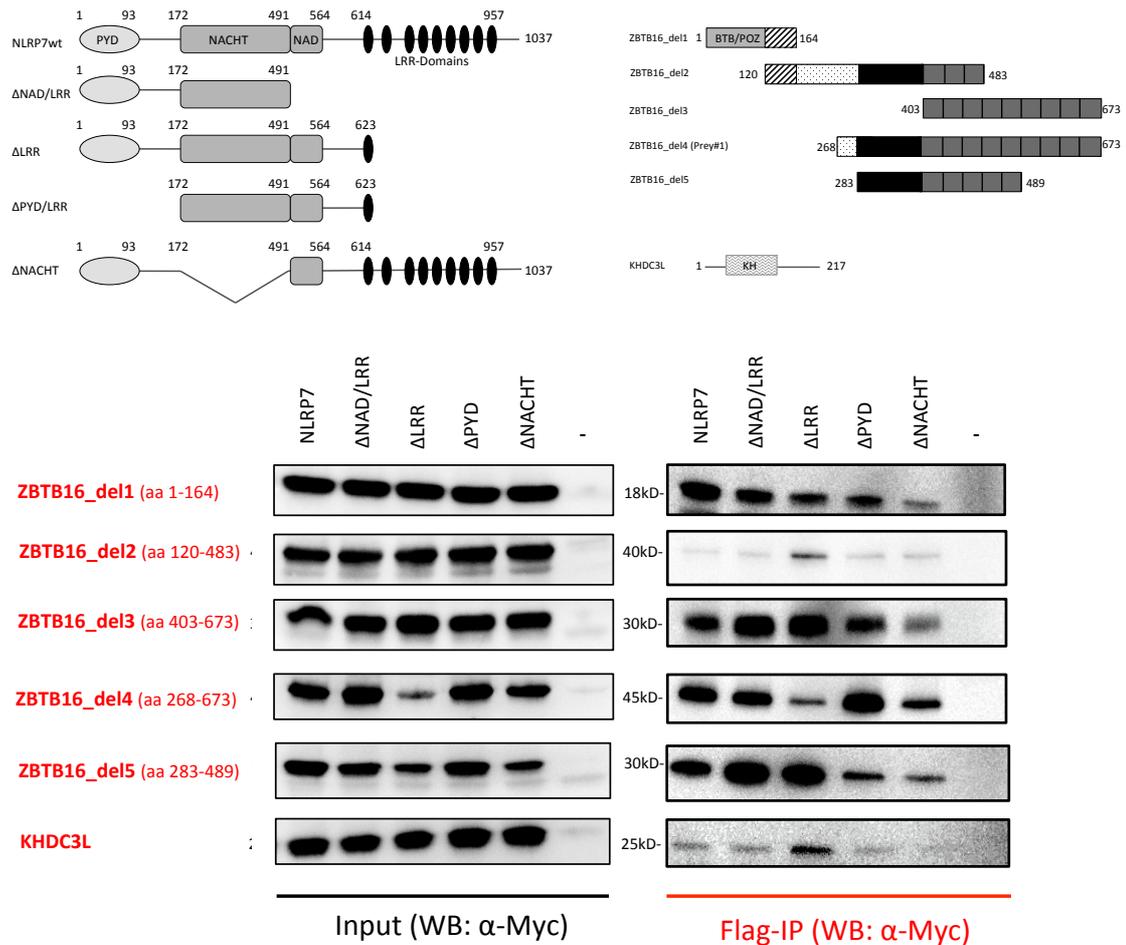


Abb 3.18: Identifizierung der interagierenden Regionen zwischen NLRP7 und ZBTB16 mittels Immunopräzipitation. Fünf Flag-markierte NLRP7-Konstrukte (siehe oben links) wurden jeweils zusammen mit fünf myc-markierten ZBTB16-Deletionskonstrukten (del1-5) oder KHDC3L (siehe oben rechts) in HEK293T-Zellen kotransfiziert. Nach geprüfter Expression von ZBTB16_del1-5/KHDC3L (Input/WB:α-Myc) wurden die NLRP7-Konstrukte über Anti-Flag beschichtete Agarose-Beads präzipitiert (siehe Abb. 3.20). Das ZBTB16- bzw. KHDC3L-Kopräzipitat wurde mit einem Antikörper gegen Myc detektiert (Flag-IP/WB:α-Myc, rote Linie). Negativkontrollen siehe Abb. 3.17 und 3.19.

Alle ZBTB16-Konstrukte, bis auf ZBTB16_del2, interagierten mit dem NLRP7 Wildtyp Protein. Der Verlust der Interaktion nach einer simultanen Deletion der C-terminalen Zinkfinger-Domäne und der N-terminale BTB-Domäne (ZBTB16_del2) könnte ein Hinweis für mehrere mit NLRP7 interagierende Proteinabschnitte sein.

Die NLRP7 Deletions-Konstrukte ΔNAD/LRR, ΔLRR, ΔPYD zeigten ein ähnliches Interaktionsschema wie das NLRP7 Wildtyp-Protein. Alle drei NLRP7 Deletionskonstrukte interagierten, bis auf ZBTB16_del2, mit allen ZBTB16-Konstrukten.

3. Ergebnisse

Die Präzipitation von NLRP7 Δ NACHT, dem einzigen NLRP7-Konstrukt ohne NACHT Domäne, führte bei allen ZBTB16-Konstrukten nur zu einer schwachen Kopräzipitation.

Von den beiden IP-Experimenten ZBTB16_del4/NLRP7 Δ LRR und ZBTB16_del5/NLRP7 Δ PYD wurde lediglich letzteres als negativ gewertete. Die schwache Kopräzipitation von ZBTB16_del4 mit Δ LRR resultiert hier aus der schwachen Expression des Interaktionspartners ZBTB16_del4 (siehe Input) Abb. 3.18). Die schwache Interaktion zwischen ZBTB16_del5 und Δ PYD hingegen, lässt vermuten, dass ZBTB16 nicht nur mit der NACHT-Domäne sondern auch mit der PYD-Domäne von NLRP7 eine direkte Bindung eingeht.

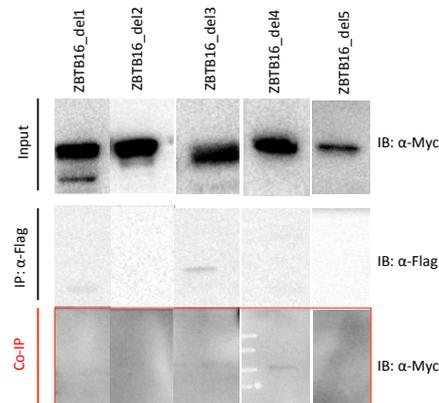


Abb. 3.19: Flag-Immunopräzipitation der Myc-markierten ZBTB16 Deletionskonstrukte. Als Negativkontrolle diente eine Einzeltransfektion der fünf verschiedenen ZBTB16 Deletionskonstrukte. Die Konstrukte zeigten nach einer Flag-Immunopräzipitation keine falsch positive Interaktion mit den Agarose-Beads.

3. Ergebnisse

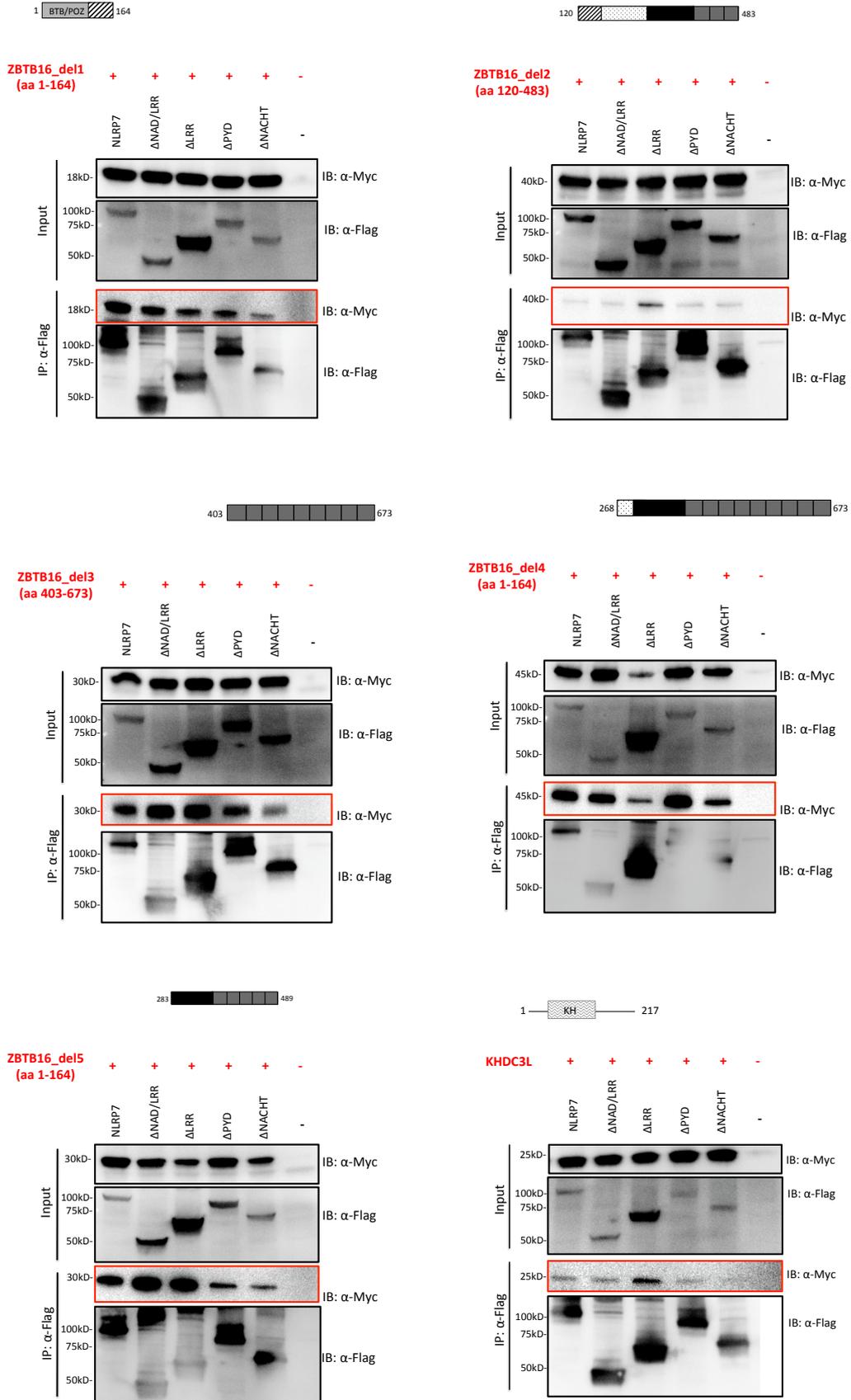


Abb. 3.20: Immunopräzipitationsanalysen zwischen NLRP7, ZBTB16_del1-5 und KHDC3L (Vollständige Daten). siehe auch Abb. 3.18.

3.2.6 Nachweis von NLRP7 und ZBTB16 in einem Multiproteinkomplex

Für verschiedene NLR-Proteine konnte bereits gezeigt werden, dass sie Teil eines Multiproteinkomplex sind. Auch für NLRP7 wurde die typische Protein-Formation aus NLRP, ASC und Caspase1 bereits nachgewiesen [42]. Direkt nach der Aktivierung von NLRP7 kommt es jedoch noch vor der Interaktion mit ASC zu einer proteinspezifischen Oligomerisierung, die ebenfalls als Multiproteinkomplex nachweisbar sein sollte. HEK293T-Zellen sind generell frei von Inflammasom-formenden Proteinen wie ASC, Caspase1 oder jeglichen NLRPs, so dass eine Oligomerisierung und anschließende Formation des Inflammasoms nicht möglich ist. Mit Hilfe einer nativen Gelelektrophorese (Blue Native PAGE) sollte die Inflammasom-unabhängige NLRP7-Oligomerisierung nachgewiesen werden. Weiterhin sollte eine Koexpression mit ZBTB16 prüfen, ob ZBTB16 Teil dieses Multiproteinkomplexes ist.

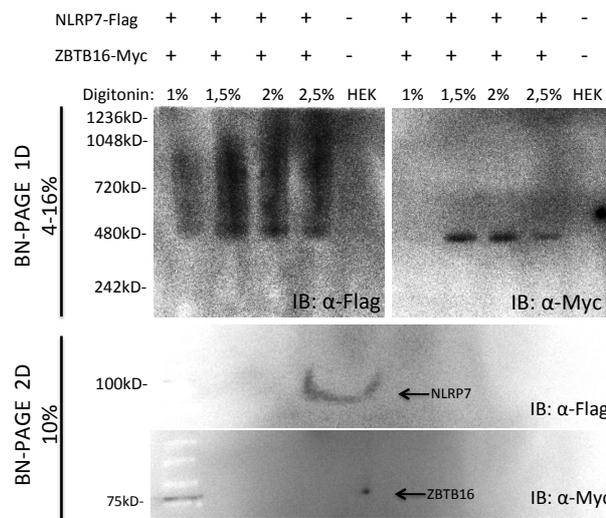


Abb. 3.21: Native Gelelektrophorese von NLRP7 und ZBTB16. Die oberen beiden Abbildungen (BN-PAGE 1D) präsentieren die erste Dimension einer zweidimensionalen BN-PAGE. Nach Koexpression in HEK293T-Zellen befinden sich beide Proteine in einem 480kD großen Proteinkomplex. Die Proteinkomplexe wurden über verschiedene Detergenz-Konzentrationen (1 - 2,5 % Digitonin) aus den Zellen gelöst. Das Flag-markierte NLRP7 erscheint in der ersten Dimension als ein langer „Schmier“ zwischen 480-1200 kD (BN-PAGE 1D/IB:α-Flag), während ZBTB16 nur als markante Linie bei einer Größe von 480 kD sichtbar wird (BN-PAGE 1D/IB:α-Myc). Die unteren beiden Abbildungen (BN-PAGE 2D) präsentieren die zweite Dimension. Durch die Auftrennung der ersten Dimension über eine SDS-PAGE erscheint NLRP7 als dünne leicht gebogene Linie bei 113kD (BN-PAGE 2D/IB:α-Flag), während ZBTB16 als Punkt bei 75 kD (BN-PAGE 2D/IB:α-Myc) vertikal darunter liegt.

Beide Proteine, NLRP7 (Flag-markiert) und ZBTB16 (Myc-markiert) wurden zusammen in HEK293T-Zellen überexprimiert und über verschiedene Digitonin-Konzentrationen (1-2,5%), aus den Zellen herausgelöst. Nach Ultrazentrifugation wurden die noch intakten Proteinkomplexe über eine native Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb 3.21).

In der ersten Dimension erschien NLRP7 auf dem Immunoblot als weitläufiger Multiproteinkomplex bei einer Größe von 480-1000 kD (Abb. 3.21, IB: α -Flag), während ZBTB16 als scharfe Bande bei 480 kD sichtbar wurde (IB: α -Myc).

In einer nachfolgenden zweiten Dimension wurde der Multiproteinkomplex der ersten Dimension über eine SDS-PAGE in seine Untereinheiten aufgetrennt.

Die Proteine ließen sich nach Denaturierung entsprechend bei 113 kD (NLRP7) und bei 75 kD (ZBTB16) nachweisen. Während NLRP7 als dünne (leicht gebogene) Linie sichtbar wurde, konnte ZBTB16 als scharfer Punkt direkt unterhalb von NLRP7 nachgewiesen werden.

Beide Proteine sind Teil eines 480 kD großen Multiproteinkomplex. Die hochmolekularen NLRP7-Oligomere lassen sich bis zu einer Größe von 1000 kD nachweisen, während ZBTB16 von der Oligomerisierung offensichtlich nicht mitgetragen wird.

3.2.7 Kolokalisations-Analysen von NLRP7 und ZBTB16 in HEK293T-Zellen mittels konfokaler Mikroskopie

Nachdem in Abschnitt 3.1.5 durch Lokalisationsanalysen mit dem transient transfizierten und fluoreszenzmarkierten NLRP7 eine deutliche Aggresom-Formation in HEK293T-Zellen nachgewiesen wurde, sollte nun untersucht werden, wie sich eine transiente Kotransfektion der fluoreszenzmarkierten Proteine ZBTB16 bzw. NLRP7 auf die zelluläre Verteilung beider Proteine auswirkt.

Für das Protein ZBTB16 ist bereits bekannt, dass dieses in sog. nukleären „Speckles“ lokalisiert. Speckles sind spezielle nukleäre Organellen, die wichtige Faktoren für die Prozessierung der prä-mRNA oder den Transport von RNA enthalten. Mehrere Studien konnten zudem zeigen, dass transkriptionell aktive Gene bevorzugt neben nukleären Speckles zu finden sind [112,113].

Die Einzeltransfektion von ZBTB16 zeigte sowohl bei N-terminaler Fusion mit EGFP als auch bei C-terminaler Fusion mit DsRed2 die für das Protein typische Lokalisation in den nukleären Speckles (Abb. 3.22 A & B). Eine Einzeltransfektion

des N-terminal EGFP-markierten NLRP7 zeigte eine homogene zytoplasmatische Verteilung des Proteins welche bei steigender Expression zu einer juxtanukleären Akkumulation führte (Abb. 3.22 C; siehe auch Abschnitt 3.1.5 & 3.1.6). Die gleiche zelluläre Verteilung konnte für das C-terminal mit DsRed2 markierte NLRP7-Protein beobachtet werden, obwohl sich die Fluoreszenz hier deutlich schwächer darstellte (Abb.3.22 D). Die C-terminale Fusion eines fluoreszierenden Proteins wie DsRed2 mit NLRP7 sollte hier kritisch betrachtet werden, da eine Fusion mit der LRR-Domäne Einfluss auf die Konformation des Proteins haben könnte.

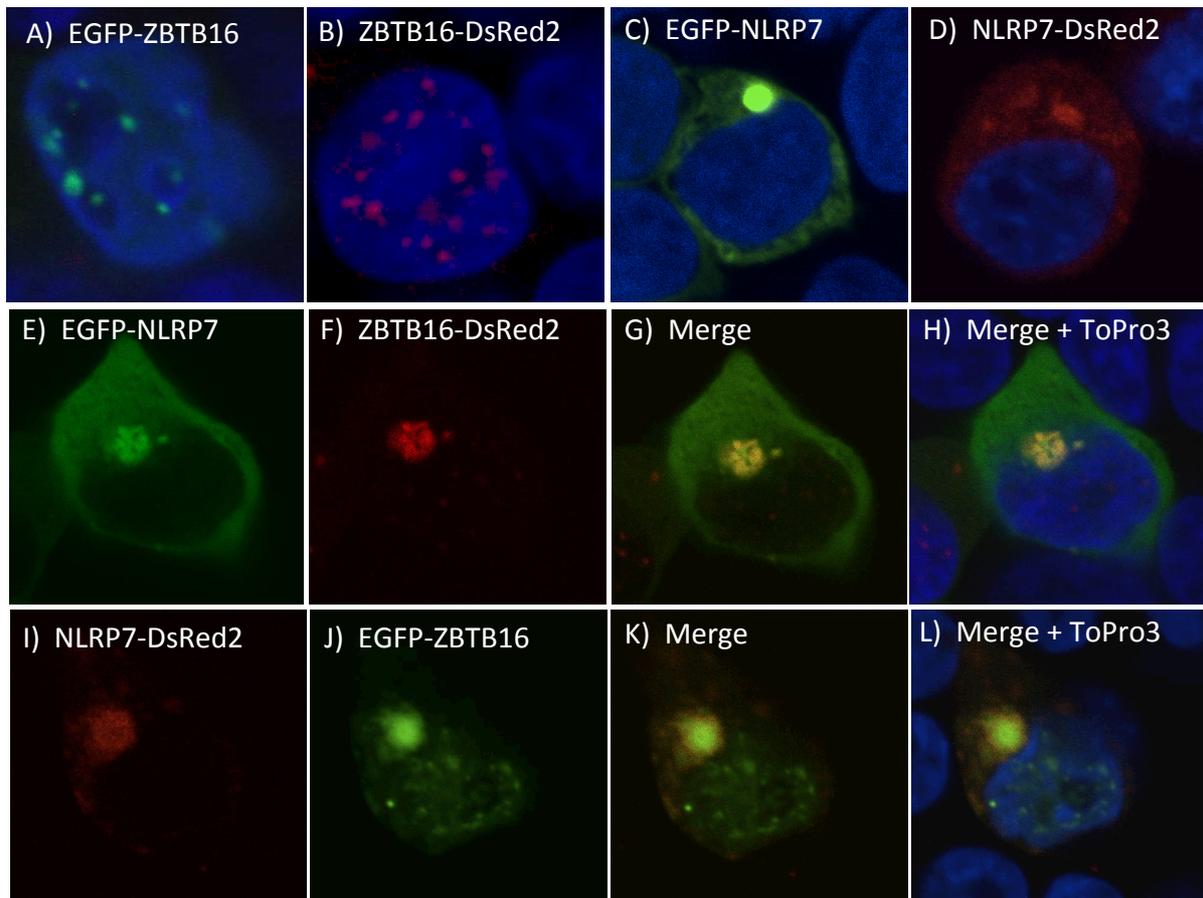


Abb. 3.22: Kolokalisation von NLRP7 und ZBTB16 in juxtanukleären Aggregaten.

A u. B) Zelluläre Lokalisation des N-terminal EGFP- und C-terminal DsRed2-markierten ZBTB16. Beide Konstrukte lokalisieren in nukleären Speckles. **C u. D)** Zelluläre Lokalisation des N-terminal EGFP- und C-terminal DsRed2-markierten NLRP7. Beide Konstrukte lokalisieren diffus im Zytoplasma mit zusätzlichen juxtanukleären Proteinaggregaten. **E-H)** Juxtanukleäre Kolokalisation von EGFP-NLRP7 mit ZBTB16-DsRed2. **I-L)** Juxtanukleäre Kolokalisation von NLRP7-DsRed2 mit EGFP-ZBTB16. Alle Untersuchungen wurden in HEK293T-Zellen durchgeführt. Der Nukleus wurde mit ToPro3 angefärbt.

Eine Koexpression beider Proteine führte zu einer Kolokalisation von ZBTB16 und NLRP7 in den für NLRP7 typischen juxtanukleären Aggregaten. Sowohl das N-

3. Ergebnisse

terminal EGFP-markierte NLRP7 mit ZBTB16-DsRed2 (Abb. 3.22 E-H), als auch das C-terminal DsRed2-markierte NLRP7 mit EGFP-ZBTB16 (Abb. 3.22 I-L), zeigten eine Kolokalisation von NLRP7 und ZBTB16 im Zytoplasma welche zu einer Reduktion des ZBTB16-Proteins in den nukleären Speckles führte.

Neben den beobachteten zytoplasmatischen Protein-Aggregaten, führten die beiden Fusionsproteine EGFP-NLRP7 und ZBTB16-DsRed2 zu einem nukleären Import von NLRP7 und dessen Kolokalisation mit ZBTB16 in den Speckles (Abb. 3.22 A-D). Diese nukleäre Kolokalisation zeigte sich jedoch nur in den Zellen mit einer noch ausgewogenen Expression beider Proteine. Sobald sich in den Zellen juxt nukleäre Aggregate formten, führte dies augenscheinlich zu einem nukleären Export beider Proteine. Für die beiden Fusionsproteine NLRP7-DsRed2 und EGFP-ZBTB16 trat diese nukleäre Kolokalisation nicht in Erscheinung. Hier könnte jedoch die bereits erwähnte C-terminale Fusion von DsRed2 mit NLRP7 ein Störfaktor für die Interaktion mit ZBTB16 und dem daraus resultierenden nukleären Import sein.

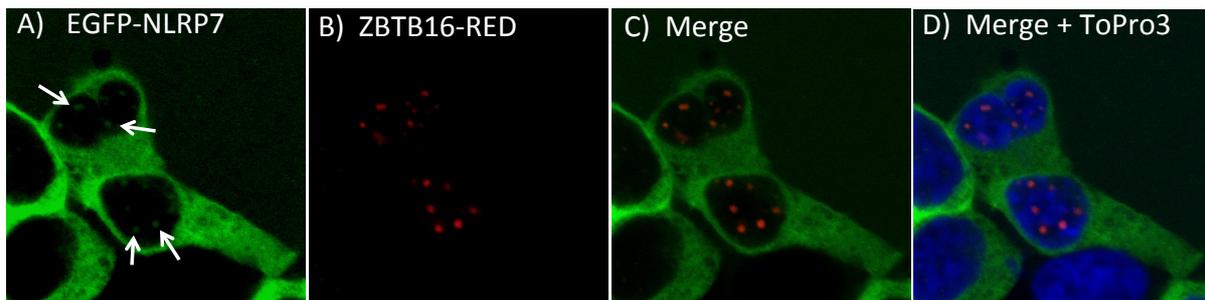


Abb. 3.23: Kolokalisation von EGFP-NLRP7 und ZBTB16-DsRed2 in nukleären Speckles. A-D) EGFP-NLRP7 und ZBTB16-DsRed2 kolokalisieren in den nukleären Speckles. Der in den Speckles befindliche Anteil von NLRP7 ist deutlich geringer als der von ZBTB16, wodurch die bei einer Kolokalisation typische orange bis gelbliche Färbung nach einem übereinanderlegen der Bilder kaum sichtbar ist.

Zusätzliche Kontrollanalysen zwischen dem Fusionsprotein ZBTB16-DsRed2 und dem EGFP erzielten hier den gleichen visuellen Effekt (Abb. 3.24 & 3.25). Das exprimierte EGFP-Protein verteilt sich in der ganzen Zelle. Aufgrund seiner Größe von nur 25 kD, diffundiert es auch ohne ein nukleäres Lokalisationssignal in den Zellkern (Abb. 3.24 A & B). Eine Koexpression mit ZBTB16-DsRed2 führte zu einer Akkumulation der EGFP-Moleküle in den nukleären Speckles (Abb. 3.25 A-D). Dies war ein erster Hinweis, dass es sich bei der Kolokalisation von EGFP-NLRP7 und ZBTB16-DsRed2 um eine falsch positive Interaktion handeln könnte.

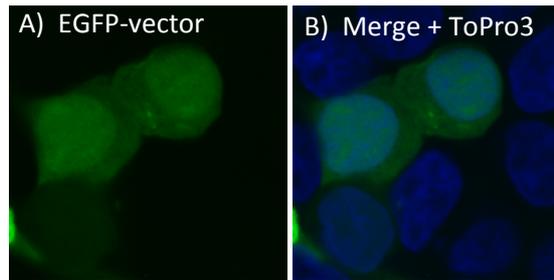


Abb. 3.24: Zelluläre Verteilung des EGFP. Nach einer Einzeltransfektion des leeren EGFP-Vektors, zeigt das grünfluoreszierende Protein eine diffuse Verteilung in dem Zytoplasma und dem Nukleus einer HEK293T-Zelle.

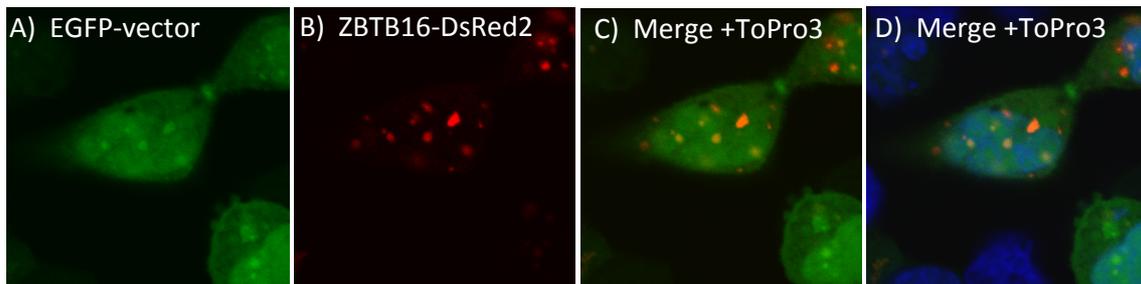


Abb. 3.25: Kolokalisationsanalysen von EGFP mit ZBTB16-DsRed2. Eine Kotransfektion von EGFP mit ZBTB16-DsRed2 in HEK293T-Zellen führt zu einer nukleären Akkumulation des grünfluoreszierenden Proteins in den Speckles.

Daraufhin wurde in einem neuen Experiment das N-terminal Flag-markierte NLRP7 (ohne EGFP) als Einzeltransfektion und zusammen mit ZBTB16-DsRed2 in HEK293T-Zellen überexprimiert. Anschließend wurde NLRP7 mit einem spezifischen Erstantikörper (Anti-NLRP7) und einem grünfluoreszierenden Zweitantikörper (AlexaFluor488) angefärbt (Abb. 3.26).

Die Einzeltransfektion von Flag-NLRP7 zeigte nach der NLRP7-spezifischen Immunfärbung die gleiche zytoplasmatische Proteinverteilung wie das Fusionsprotein EGFP-NLRP7 (Abb. 3.26 A-D). Neben den Zellen mit einer homogenen Proteinverteilung im Zytoplasma zeigten andere Zellen die typischen juxtannukleären Akkumulationen. Die Koexpression von Flag-NLRP7 mit ZBTB16-DsRed2 präsentierte zunächst das gleiche Ergebnis wie die zuvor mit dem Fusionsprotein EGFP-NLRP7 durchgeführten Experimente. Neben Zellen mit einer juxtannukleären Kolokalisation beider Proteine zeigten sich Zellen mit einer augenscheinlichen nukleären Kolokalisation beider Proteine in den Speckles (Abb. 3.26 E-H). Ein Kontrollexperiment bei dem ZBTB16-DsRed2 alleine in HEK293T-Zellen überexprimiert und die Zellen anschließend mit Anti-NLRP7 (AlexaFluor488)

3. Ergebnisse

angefärbt wurden, präsentierte jedoch eine falsch positive Interaktion des Antikörpers mit dem rotfluoreszierenden Protein DsRed2. Weitere Tests mit anderen DsRed2 Fusionsproteinen bestätigten die Kreuzreaktion des Antikörpers mit DsRed2 (Abb. hier nicht aufgeführt).

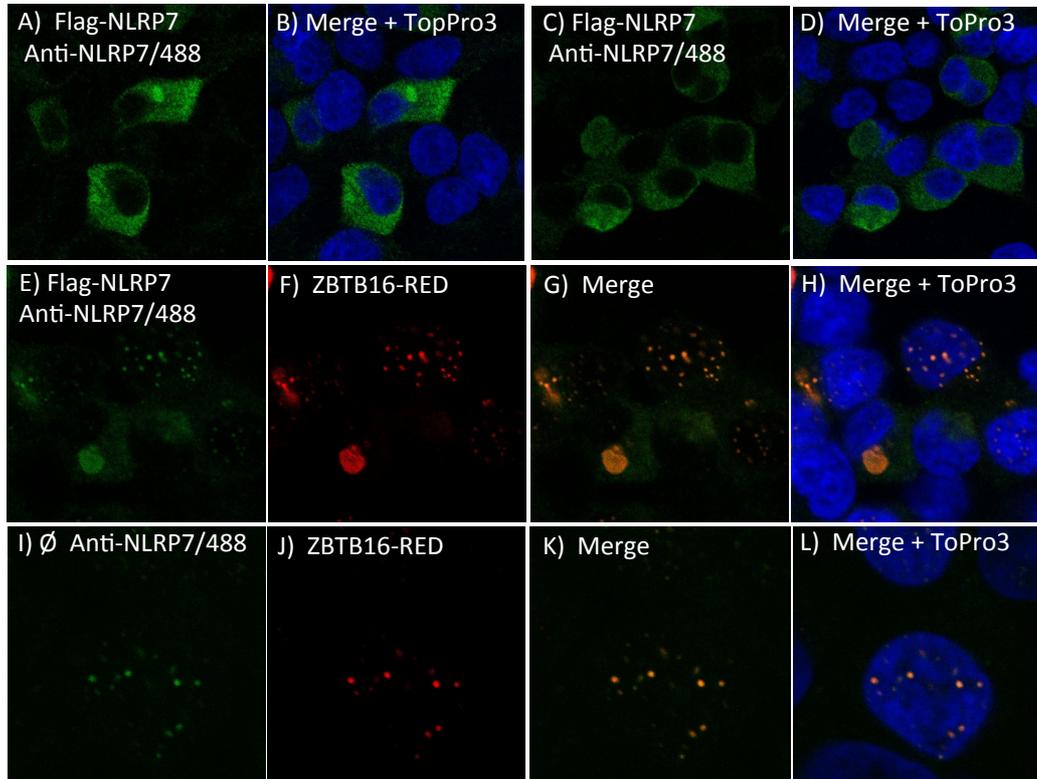


Abb. 3.26: Kolokalisationsanalysen von Flag-NLRP7 und ZBTB16-DsRed2. A-D) Nach Überexpression des Flag-markierten NLRP7 wurde das Protein spezifisch mit einem Antikörper gegen NLRP7 (Anti-NLRP7) und einem grünfluoreszierenden Zweitantikörper (AlexaFluor488) angefärbt. Die Proteinverteilung ist vergleichbar mit dem Fusionsprotein EGFP-NLRP7. E-H) Eine Koexpression von Flag-NLRP7 und ZBTB16-DsRed2 zeigt sowohl Zellen mit einer juxtannukleären Kolokalisation beider Proteine als auch Zellen mit einer Kolokalisation beider Proteine in den nukleären Speckles. I-L) Die Einzeltransfektion von ZBTB16-DsRed und anschließende Immunfärbung mit Anti-NLRP7 (AlexaFluor488) demonstriert die falsch positive Reaktion des NLRP7-spezifischen Antikörpers mit DsRed2.

Zuletzt bestätigte eine Kotransfektion des Fusionsprotein EGFP-ZBTB16 mit Flag-NLRP7 die falsch positive Kolokalisation beider Proteine in den nukleären Speckles (Abb. 3.27 A-D). Eine Immunfärbung mit dem NLRP7-spezifischen Antikörper und dem Zweitantikörper AlexaFluor594 visualisierte die Kolokalisation beider Proteine im Zytoplasma und in dem juxtannukleären Aggregat, wohingegen der angenommene nukleäre Import von NLRP7 nicht nachweisbar war (Abb. 3.27 A).

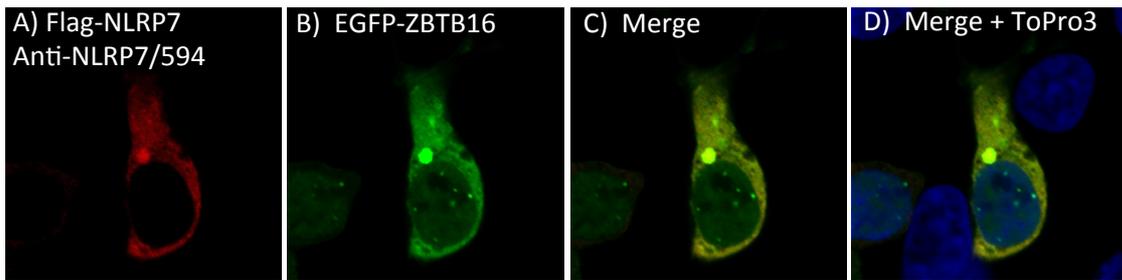


Abb. 3.27: Kolokalisationsanalysen von Flag-NLRP7 und EGFP-ZBTB16. A-D) Nach Koexpression des Fusionsprotein EGFP-ZBTB16 und dem Flag-markierten NLRP7 wurde NLRP7 spezifisch mit einem Antikörper gegen NLRP7 (Anti-NLRP7) und einem rotfluoreszierenden Zweitantikörper (AlexaFluor594) angefärbt. Die Proteine kolokalisieren im Zytoplasma und in einem juxtanukleären Aggregat. Ein nukleärer Import von NLRP7 war jedoch nicht nachweisbar (siehe A).

In einem weiteren Experiment sollte das endogene ZBTB16 Protein in HEK293T-Zellen mit einem spezifischen Erstantikörper gegen ZBTB16 und einem rotfluoreszierenden Zweitantikörper (AlexaFluor555) angefärbt werden. Die Färbung zeigte das endogene Protein in den typischen nukleären Speckles (Abb. 3.21 A) Eine Überexpression von EGFP-NLRP7 führte zu einem nukleären Export des endogenen ZBTB16 und zu einer Kolokalisation beider Proteine im Zytoplasma und in einem juxtanukleären Aggregat (Abb. 3.27 B-D). Eine Kolokalisation zwischen EGFP-NLRP7 und dem endogenen ZBTB16 in den nukleären Speckles konnte jedoch nicht detektiert werden.

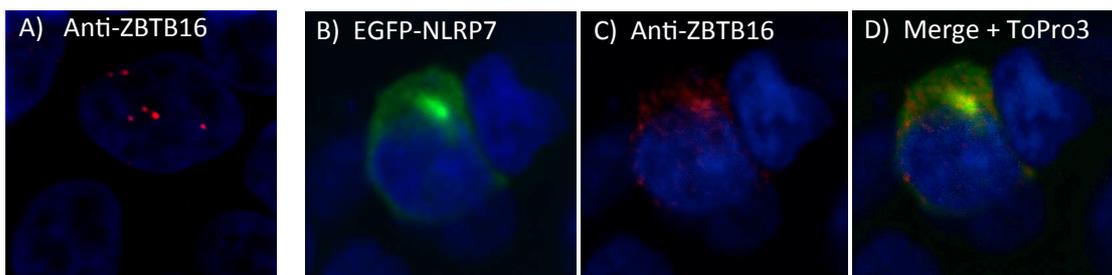


Abb. 3.28: Zytoplasmatische Kolokalisation von EGFP-NLRP7 mit dem endogenen ZBTB16. A) Immunfärbung von HEK293T-Zellen mit einem ZBTB16-spezifischen Erstantikörper und einem rotfluoreszierenden (AlexaFluor555) Zweitantikörper. Das endogene ZBTB16 zeigt die für das Protein typische Lokalisation in den nukleären Speckles. **B-D)** Eine Überexpression von EGFP-NLRP7 führt bei dem endogenen ZBTB16 zu einem nukleären Export und zu einer Kolokalisation mit NLRP7 im Zytoplasma.

3.2.8 Kolokalisations-Analysen von NLRP7 und KHDC3L in HEK293T-Zellen mittels konfokaler Mikroskopie

In einer Studie von Reddy et al. zeigten mikroskopische Analysen bereits eine juxt nukleäre Lokalisation des GFP-markierten Proteins KHDC3L in HEK293T-Zellen. Immunfärbungen mit einem spezifischen Antikörper gegen KHDC3L konnten diese Lokalisation sowohl nach Überexpression als auch für das native Protein bestätigen und zeigten zudem eine Kolokalisation mit dem überexprimierten Flag-markierten NLRP7 [64].

Die in dieser Arbeit durchgeführten direkten Interaktionsanalysen mit dem Hefe Di-Hybrid-System und mittels Immunopräzipitation wurden als negativ gewertet (siehe Abschnitt 3.2.3 & 3.2.5.2). Mikroskopisch sollte nochmals die Lokalisation von KHDC3L und dessen Kolokalisation mit NLRP7 in HEK293T-Zellen überprüft werden (Abb. 3.29).

Die Einzeltransfektion des C-terminal mit DsRed2 markierten KHDC3L zeigte eine diffuse Verteilung im Zytoplasma mit einer juxt nukleären Akkumulation. Zusätzlich führte die Expression von KHDC3L-DsRed2 zu einer Anreicherung des Proteins in der Plasmamembran (Abb. 3.29 A).

Die Koexpression der beiden Fusionsproteine KHDC3L-DsRed2 und EGFP-NLRP7, führte sowohl im Zytoplasma als auch in den bereits beschriebenen juxt nukleären Aggregaten zu einer Kolokalisation (Abb. 3.29 B-D).

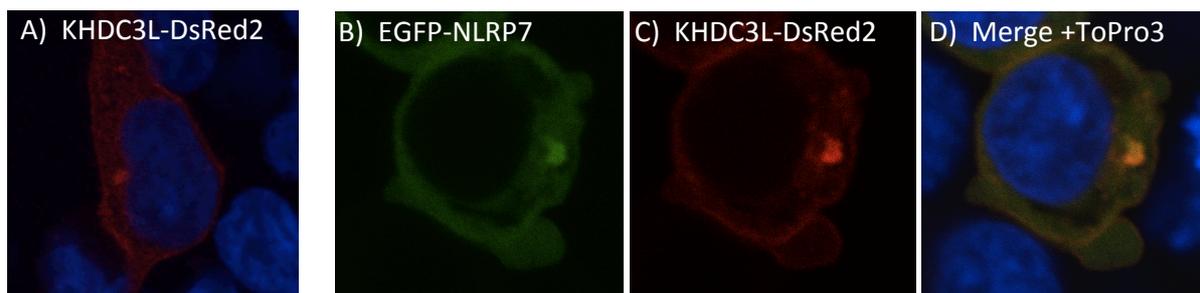


Abb. 3.29: Kolokalisationsanalysen von EGFP-NLRP7 mit KHDC3L-DsRed2. A) Zelluläre Kolokalisation des C-terminal mit DsRed2 markierten KHDC3L. Neben einer diffusen Verteilung im Zytoplasma und einer vermehrten Anreicherung in der Plasmamembran zeigt KHDC3L die gleiche juxt nukleäre Akkumulation wie NLRP7. **B-D)** Kolokalisation von EGFP-NLRP7 und KHDC3L-DsRed2 in juxt nukleären Aggregaten und im Zytoplasma.

3.2.9 SIRPH-Analysen der Imprinting-Loci *H19*, *PEG3*, *NESP55* und *SNRPN* nach transienter Transfektion von *NLRP7* und *ZBTB16* in HEK293T-Zellen

Typische Merkmale einer BiBM sind die abnormalen Methylierungsmuster multipler Imprinting-Loci auf dem maternalen Allel. Mehrere Studien konnten zeigen, dass in dem analysierten BiBM-Gewebe die maternal methylierten Imprinting-Loci ihre Methylierung verlieren, während es auf den paternal methylierten Imprinting-Loci zu einer Zunahme der Methylierung kommt. Diese Verschiebung des Methylierungsmuster auf dem maternalen Allel hin zu einem paternalen Imprintingmuster, würde den androgenetischen Phänotyp einer BiBM erklären.

ZBTB16 ist ein Transkriptionsfaktor der mit Hilfe von verschiedenen Histondeazetylasen (HDACs) und dem Proteinkomplex mSin3/SMRT/N-CoR an spezifische DNA-Sequenzen bindet und dort eine transkriptionelle Repression induziert [114]. Im Rahmen dieser Arbeit zeigten verschiedene Methoden die direkte Interaktion von NLRP7 mit ZBTB16.

Nach einer Überexpression beider Proteine in HEK293T-Zellen sollten mögliche funktionelle Auswirkungen auf das Imprintingmuster untersucht werden.

Für diesen Methylierungsassay wurden die Zellen jeweils einzeln mit ZBTB16, NLRP7 oder je einem der vier mutierten NLRP7-Konstrukte (L398R, K511R, R693P, R693W) transfiziert. In fünf zusätzlichen Ansätzen wurden alle fünf NLRP7-Konstrukte zusammen mit ZBTB16 transfiziert (ZBTB16+NLRP7, ZBTB16+L398R, ZBTB16+K511R, ZBTB16+R693P, ZBTB16+R693W). Jeder Ansatz wurde in dreifacher Ausführung transfiziert und 48h überexprimiert. Nach DNA-Isolation der betreffenden Zelllysate und Bisulfitkonversion, wurden vier verschiedene Imprinting-Loci amplifiziert und über die SIRPH-Methode analysiert.

Sowohl die beiden paternal methylierten Imprinting-Loci *H19* und *NESP55*, als auch die beiden maternal methylierten Loci *PEG3* und *SNRPN* zeigten bei einem Vergleich zu untransfizierten HEK293T-Zellen keine signifikanten Veränderungen in ihrem Methylierungsprofil (Abb. 3.30 und 3.31).

Für das paternal methylierte *H19* würde man entweder eine Zunahme oder ein unverändertes Methylierungsmuster erwarten. *H19* ist ein primärer Imprint der während der männlichen Gametogenese etabliert wird. Mit Hilfe unserer hochsensitiven SIRPH-Methode konnte eine Zunahme der Methylierung auf dem maternalen Allel in dem von unserer Gruppe untersuchten BiBM-Gewebe nachgewiesen werden [88]. Sowohl die einzeln transfizierten Konstrukte als auch die Kotransfektionen zeigten auf dem hier analysierten CpG nur eine geringe Variation von höchstens 1% (Abb. 3.30; siehe auch Anhang A.1 Tab. A.1c).

Auf dem paternal methylierten Locus *NESP55* wurden zwei CpGs untersucht (Abb. 3.30). Alle bisher veröffentlichten BiBM-Analysen, konnten eine signifikante Zunahme der Methylierung auf diesem sekundären Imprint nachweisen. Die hier durchgeführten Analysen zeigten jedoch keine signifikanten Abweichungen im Vergleich zu den unbehandelten HEK293T-Zellen. Ein Vergleich der mutierten NLRP7-Konstrukte zu dem Wildtyp-Protein auf CpG1 zeigte dennoch bei den Einzeltransfektionen eine Zunahme der Methylierung von bis zu 10% und bei den Kotransfektionen von bis zu 6%. Im Gegensatz dazu zeigten die mutierten Konstrukte bei *NESP55*-CpG2 nur eine Zunahme von höchstens 3% (Tab. A.1c).

Der maternal methylierte Imprinting-Locus *PEG3* zeigt nach Analyse biparentaler Blasenmolen immer eine signifikante Reduktion in den gemessenen Methylierungswerten. Bei den hier durchgeführten Analysen zeigte das NLRP7 Wildtyp-Konstrukt im Vergleich zu den untransfizierten HEK293T-Zellen sowohl als Einzeltransfektion als auch als Kotransfektion mit ZBTB16 eine Reduktion der Methylierung von 9% bzw. 6%. Im Gegensatz dazu verhielten sich die mutierten Konstrukte unauffällig und schwankten zwischen 1-2% (Abb. 3.31; Tab. A.1c).

Paternal Methyliert

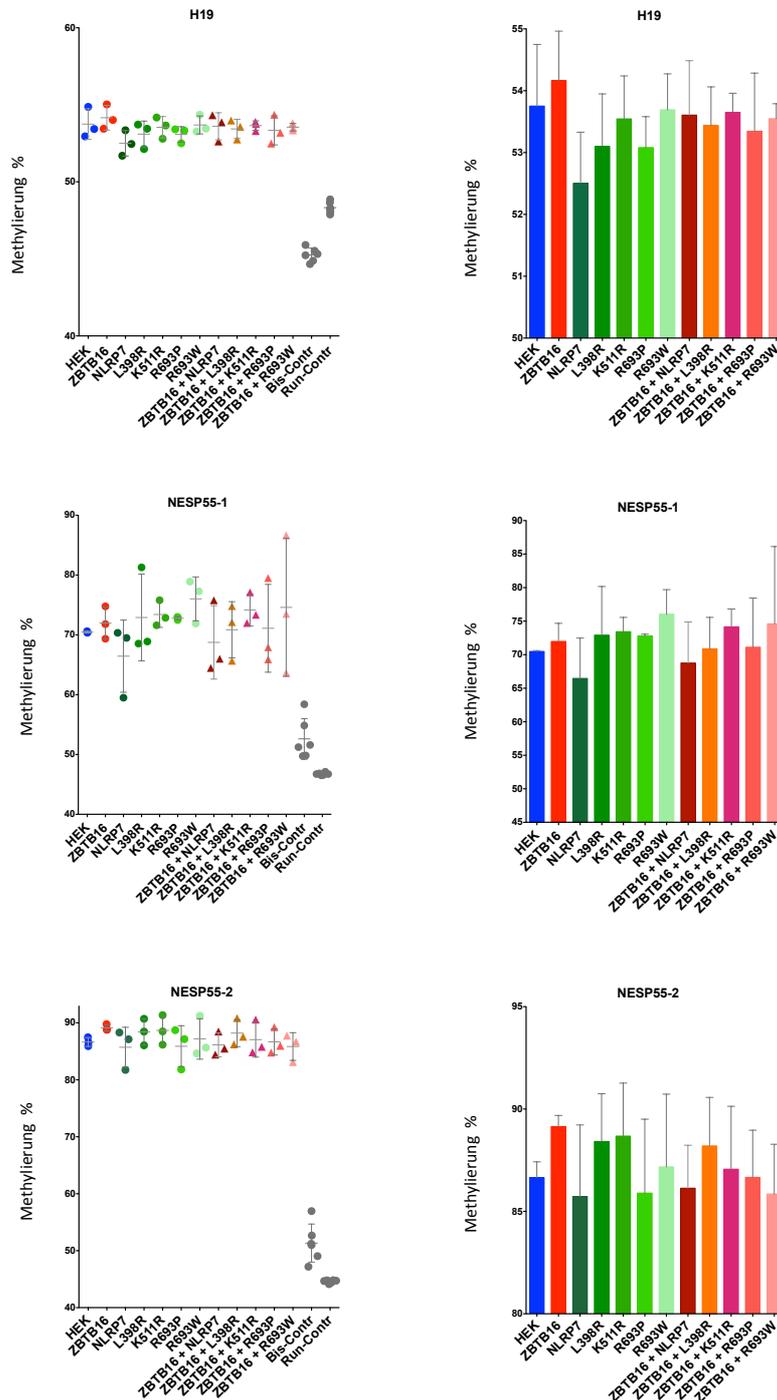


Abb. 3.30: SIRPH-Analysen der paternal methylierten Imprinting-Loci *H19* und *NESP55*. Nach dreifacher Einzeltransfektion der NLRP7-Konstrukte Wildtyp, L398R, K511R, R693P, R693W (alle in grün), ZBTB16 (in hellrot) und entsprechender Kotransfektion mit ZBTB16 (alle Rottöne), wurde die DNA-Methylierung auf den ausgewählten paternalen Imprinting-Loci *H19* und *NESP55* mit der SIRPH-Methode untersucht und nach einem Vergleich zu untransfizierten HEK293T-Zellen (blau) über einen ungepaarten t-test auf Signifikanz geprüft. Keine der Untersuchten CpGs zeigten signifikante Veränderungen.

Maternal Methyliert

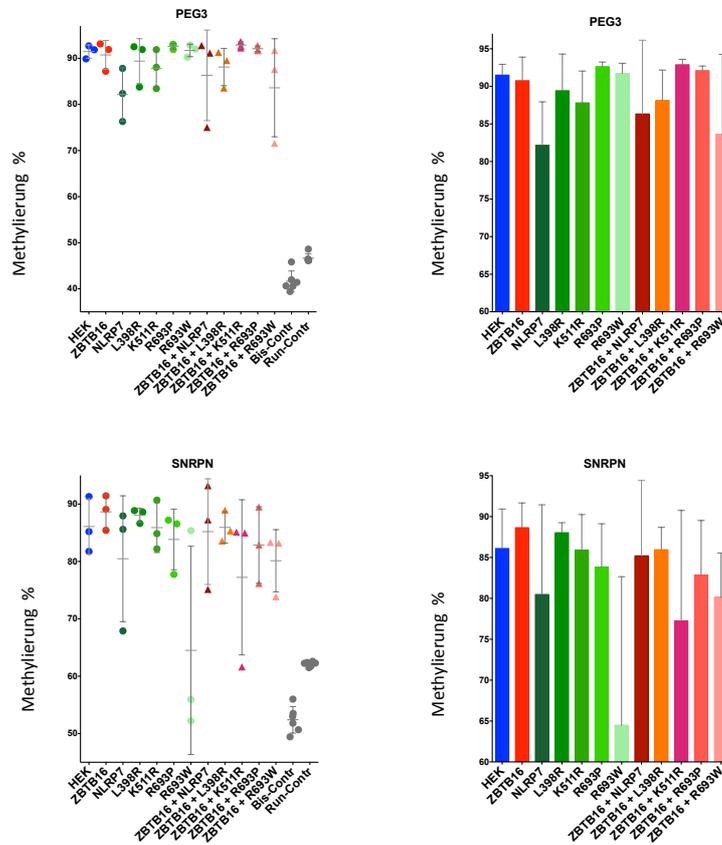


Abb 3.31: SIRPH-Analysen der maternal methylierten Imprinting-Loci *PEG3* und *SNRPN*. Nach dreifacher Einzeltransfektion der NLRP7-Konstrukte Wildtyp, L398R, K511R, R693P, R693W (alle in grün), ZBTB16 (in hellrot) und entsprechenden Kotransfektion mit ZBTB16 (alle Rottöne), wurde die DNA-Methylierung auf den ausgewählten maternalen Imprinting-Loci *PEG3* und *SNRPN* mit der SIRPH-Methode untersucht und nach einem Vergleich zu untransfizierten HEK293T-Zellen (blau) über einen ungepaarten t-test auf Signifikanz geprüft. Keine der Untersuchten CpGs zeigten signifikante Veränderungen.

Der maternal methylierte Locus *SNRPN* ist ein sekundärer Imprint und zeigt wie *PEG3* in allen Methylierungsanalysen biparentaler Blasenmolen eine signifikante Reduktion der Methylierung. Nach einer SIRPH-Analyse der hier transfizierten HEK293T-Zellen zeigte das untersuchte CpG in dem *PEG3*-Locus lediglich für die Einzeltransfektionen von NLRP7 Wildtyp und für die Mutation R693W eine Senkung der Methylierung von 6% und außergewöhnlichen 21% (Abb. 3.31; Tab. A.1c). Die mutierten Konstrukte L398R, K511R und R693P führten in allen drei Einzeltransfektionen zu minimalen Schwankungen von 1-2%. Bei den

Kotransfektionen mit ZBTB16 zeigten sich in dem *PEG3*-Locus tendenziell höhere Methylierungswerte als bei den Einzeltransfektionen. Einzige Ausnahmen waren die Mutationen K511R+ZBTB16 und R693W+ZBTB16 mit einer Reduktion um 8% und 6%. Insgesamt ließ sich für alle vier Loci kein eindeutiger Trend erkennen. Lediglich die „Hotspot“ Missense-Mutation R693W zeigte vereinzelte jedoch nicht signifikante Abweichungen der Methylierung auf den beiden maternal methylierten Loci *PEG3* und *SNRPN*.

3.2.10 Imprinting-Analyse der BiBM-assoziierten Mutationen R693P und R693W nach transienter Transfektion in HEK293T-Zellen mit der Pyrosequenzier-Methode

Aufgrund der geringen Anzahl an vergleichbaren Experimenten in dem ersten Methylierungsassay (drei unabhängige Transfektionen/Konstrukt) und der begrenzten Anzahl an untersuchten CpG-Nukleotiden, sollte eine zweite Analyse der beiden „Hotspot“-Mutationen R693P und R693W in einem größeren Ansatz mittels Pyrosequenzierung durchgeführt werden (Abb. 3.32; Tab A.1d).

Hierfür wurden das Wildtyp-Konstrukt NLRP7 und die beiden mutierten Konstrukte R693P und R693W in jeweils 10 unabhängigen Einzeltransfektionen in HEK293T-Zellen für 48h überexprimiert. Zudem wurden 10 Transfektionen des leeren Vektors pcDNA3.1 und native HEK293T-Zellen als Kontrolle mitgeführt. Eine Kotransfektion mit ZBTB16 wurde in diesem Experiment nicht mitgeführt.

Nach DNA-Isolation und Bisulfitkonversion erfolgte die Analyse der Imprinting-Loci *H19*, *NESP55*, *PEG3* und *SNRPN* mittels Pyrosequenzierung. Alle vier analysierten Imprinting-Loci zeigten keine signifikanten Änderungen in ihrem Methylierungsmuster (Abb. 3.32; Tab A.1d). Für den paternal methylierten Locus *H19* zeigte sich nur eine minimale Schwankung der Methylierungswerte von 1-2%, während der paternal methylierte Imprinting-Locus *NESP55* im Vergleich zu den unbehandelten HEK293T-Zellen und dem Wildtyp-Protein für die Mutation R693P gesteigerte Methylierungswerte von 4% bzw. 3% zeigte (siehe auch Anhang Tab. A.4). Dennoch zeigte der leere Vektor identische Schwankungen in den Methylierungswerten. Der maternal methylierte Locus *PEG3* variierte bei allen Proben um lediglich 1%. Bei dem maternal methylierten Locus *SNRPN* zeigte sich im Vergleich zu den HEK-Zellen eine Reduktion der Methylierung von 3% für das Wildtyp Protein, welche jedoch ebenfalls nach einer Transfektion des leeren Vektors gemessen wurde.

3. Ergebnisse

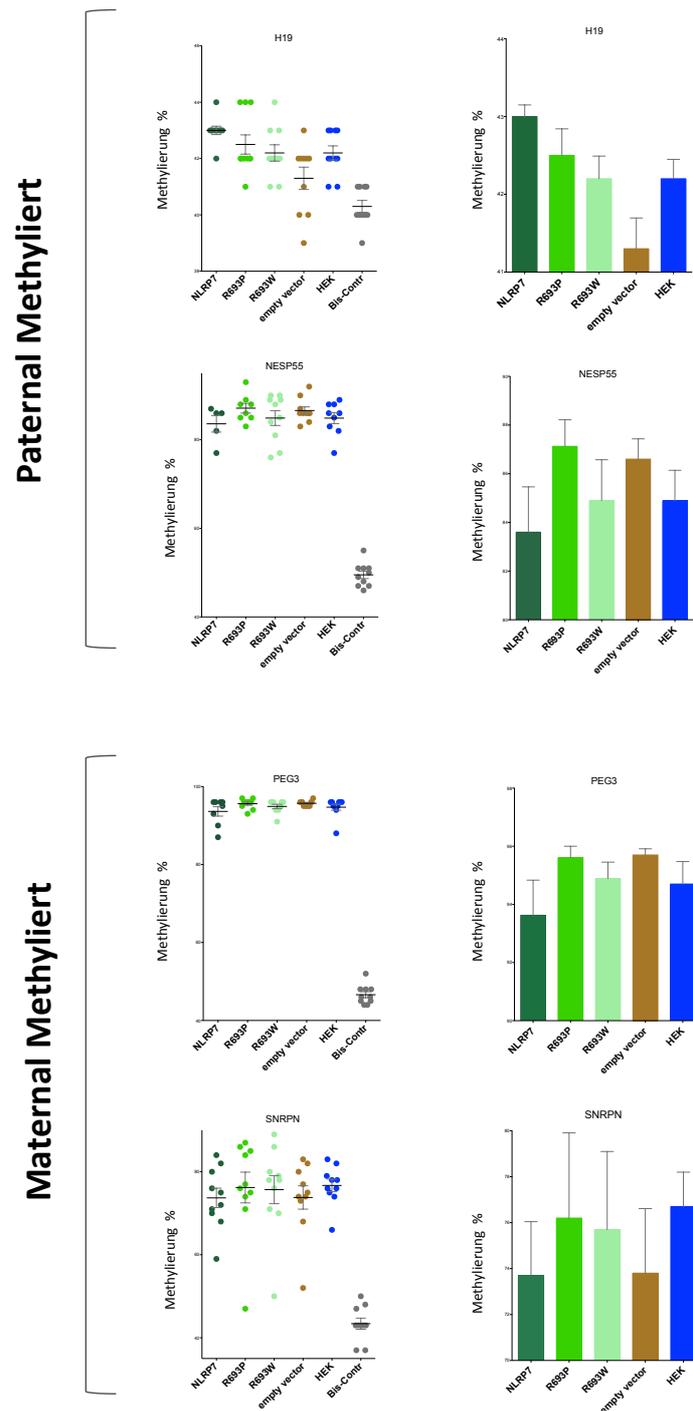


Abb. 3.32: Pyrosequenzierung der paternal und maternal methylierten Imprinting-Loci. Nach 10-facher Einzeltransfektion der NLRP7-Konstrukte Wildtyp, R693P, R693W (alle in grün) und einem leeren Vektor (in braun) wurde die DNA-Methylierung auf den ausgewählten paternalen und maternalen Imprinting-Loci *H19*, *NESP55*, *PEG3* und *SNRPN* mittels Pyrosequenzierung untersucht und nach einem Vergleich mit untransfizierten HEK293T Zellen (blau) über einen ungepaarten t-test auf Signifikanz geprüft. Keine der Untersuchten CpGs zeigte signifikante Veränderungen.

4 Diskussion

4.1 Aktivierung und Oligomerisierung von NLRP7

In dem ersten Teil dieser Arbeit wurde mit Hilfe von interdomän-spezifischen Hefe Di-Hybrid Interaktions-Analysen sowie mit *in silico*-Analysen, die NAD-Domäne von NLRP7 als physischer Mediator für die Oligomerisierung identifiziert. Des Weiteren inhibiert die LRR-Domäne von NLRP7 die interaktionsstarke NAD-Domäne. Das auf der Kristallstruktur von Apaf1 basierende *in silico*-Modell von NLRP7 demonstriert mögliche strukturelle Änderung während der Aktivierung und Oligomerisierung von NLRP7. Zuletzt zeigen konfokal-mikroskopische Untersuchungen von transient transfizierten Wildtyp- oder mutagenisierten NLRP7-Konstrukten unterschiedlich ausgeprägte Aggresom-Formationen im Zytoplasma von HEK293T-Zellen.

4.1.1 Die NAD-Domäne induziert die Oligomerisierung von NLRP7

Wie alle NLRs gehört NLRP7 zu der Proteinfamilie der STANDs innerhalb der AAA+ Proteinsuperfamilie [33]. Basierend auf den experimentellen Untersuchungen verschiedener STAND-ATPasen (z.B Apaf1), existiert für diese Proteinfamilie ein anerkanntes Aktivierungsmodell. STAND-ATPasen wechseln demnach zwischen einem monomeren, inaktiven Zustand und einem multimeren, aktiven Zustand hin und her. Durch das Binden von ATP kommt es zu einer Oligomerisierung des NLRs, wodurch sich eine aktivierte Plattform für nachfolgende Signalkaskaden ausbildet. Bislang galten die konservierten Sequenzmotive Walker A/P-loop und Walker B innerhalb der ATPase-Domäne als entscheidende Mediatoren für die Bindung von ATP und seine anschließende Hydrolyse [34]. Aufgrund der starken Ähnlichkeit zwischen der NACHT-Domäne in den NLRPs und der in Apaf1 befindlichen NB-ARC-Domäne konzentrierten sich bisher alle durchgeführten Struktur und Aktivierungsanalysen auf die NACHT-Domäne der NLRPs als potentielle Oligomerisierungsdomäne [32,33,47]. Nur selten wird die NAD-Domäne als eigenständige funktionale Domäne in dem Proteingerüst der NLRPs berücksichtigt. Lediglich eine Studie mit NLRP3 und NOD2 untersuchte bislang den strukturellen Effekt verschiedener Mutationen in der benachbarten NAD-Domäne [115].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Hefe Di-Hybrid-Analysen reflektieren das direkte Interaktionspotential eines NLRP7-Proteins. Die zusätzlich generierten *in silico*-Modelle zu dem Aktivierungsprozess und der darauf folgenden Oligomerisierung sollten die Ergebnisse der interdomän-spezifischen Hefe Di-Hybrid-Analyse verdeutlichen. In dem hier gezeigten inaktiven Proteinmodell von NLRP7 (Abb. 3.6) wird die NAD-Domäne komplett von der hydrophoben Innenseite der LRR-Domäne eingekesselt. Dies erklärt den inhibierenden Effekt der LRR-Domäne in den Hefe Di-Hybrid-Analysen. Die Präsenz der LRR-Domäne in den untersuchten Deletionskonstrukten verhinderte hier jegliche interdomän-spezifischen Interaktionen. Weiterhin identifizierte ein heptagonal symmetrisches Oligomerisierungs-Modell von NLRP7 (Abb. 3.7) die NAD-Domäne als entscheidende Interaktions-Schnittstelle, die bei einer Aktivierung von NLRP7 aus dem hydrophoben Inneren der LRR-Domäne heraus tritt und zusammen mit einem kleineren Abschnitt der LRR-Domäne an die NACHT-Domäne eines zweiten NLRP7-Moleküls andockt.

Die NAD-Domäne und das Deletionskonstrukt Δ LRR zeigten in den Hefe-Experimenten das stärkste Interaktionspotential (Abb. 3.2), was unter anderem aus dem hohen Anteil hydrophober Seitenketten innerhalb der NAD-Domäne resultieren könnte. Der *in silico*-Vergleich der NAD-Domäne in einem inaktiven und einem aktivierten NLRP7-Molekül veranschaulicht die prägnanten Änderungen in der Oberflächen-Hydrophobizität innerhalb der Domäne (Abb. 3.8). Die hydrophoben Seitenketten der NAD-Domäne werden hier bei einer Aktivierung nach außen getragen, und verstärken dadurch das Interaktionspotential zu den anderen Domänen und auch zu sich selbst. Dementsprechend zeigte jedes NLRP7-Konstrukt ohne eine LRR- aber mit einer NAD-Domäne eine hohe Interaktionsbereitschaft mit einem weiteren NAD-tragenden NLRP7-Konstrukt (Abb. 3.2: NAD mit NAD = rot, NAD mit Δ LRR = blau, Δ LRR mit Δ LRR = gelb, NAD mit Δ PYD/LRR = grün und Δ LRR mit Δ PYD/LRR = schwarz). Das *in silico*-Oligomerisierungsmodell basiert auf einer direkten Interaktion der NAD-Domäne mit der NACHT-Domäne. Neben der starken Eigeninteraktion zeigten sowohl die NAD-Domäne als auch das Deletionskonstrukt Δ LRR nur eine einfach positive Interaktion mit der einzelnen NACHT-Domäne (Abb. 3.2. gestrichelt violett) und dem NAD-deletierten Konstrukt Δ NAD/LRR (Abb. 3.2 gestrichelt braun). Es kann vorkommen, dass untersuchte Interaktionen in dem Hefe-System vektorabhängig sind, d.h. eine Interaktion zweier Proteine bzw. zweier Protein-Domänen zeigt sich nur wenn die eine Domäne in den

Beute-Vektor und die andere Domäne in den Köder-Vektor integriert wurde. Bei einem Austausch der Inserts in den jeweiligen anderen Vektor verschwindet diese Interaktion wieder. Dieser Interaktionsverlust kann hier z.B. durch sterische Hinderungen der beiden Fusionsproteine hervorgerufen werden [116].

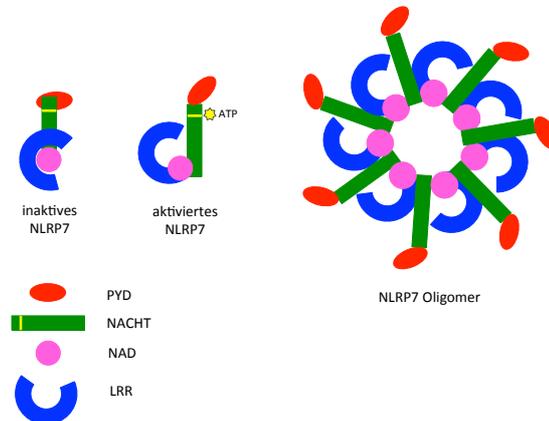


Abb. 4.1: Skizze eines hypothetischen Modells der NLRP7-Aktivierung und Oligomerisierung.

Bei dem inaktiven NLRP7-Molekül wird die NAD-Domäne (magenta) komplett von der hydrophoben Innenseite der LRR-Domäne (blau) eingekesselt. Durch das Binden von ATP an das Walker A/P-loop Motiv (gelb) kommt es zu einer Aktivierung und Konformationsänderung des Moleküls, bei dem die NAD-Domäne aus dem hydrophoben Inneren der LRR-Domäne schnell. Bei einer Oligomerisierung interagiert die NAD-Domäne und ein kleiner Teil der LRR-Domäne eines NLRP7-Moleküls mit der NACHT-Domäne eines zweiten NLRP7-Moleküls.

Sowohl das NLRP7 Wildtyp-Protein als auch die BiBM-assoziierten Missense-Mutationen/nsSNP zeigten in dem Hefe Di-Hybrid-System keine nachweisbaren interdomän-spezifischen Interaktionen. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den Säugerzellen mittels Immunopräzipitation eine klare Eigeninteraktion für das Vollängenkonstrukt (Abb. 3.5), was sich vermutlich mit einer fehlenden Aktivierung von NLRP7 in dem Hefe-System erklären lässt.

Eine der Hauptschlussfolgerungen aus den interdomän-spezifischen Hefe Di-Hybrid- und den *in silico*-Analysen ist, dass für eine Aktivierung von NLRP7 große Konformationsänderungen in den umliegenden Regionen der konservierten Sequenzmotive Walker A/P-Loop und Walker B erforderlich sind um dadurch zusätzlich Platz für die reaktive NAD-Domäne zu schaffen. Die NAD-Domäne dient schließlich während der Oligomerisierung als entscheidende funktionale Domäne, indem sie zusammen mit einem Teil der LRR-Domäne von einem NLRP7-Molekül mit der NACHT-Domäne eines zweiten NLRP7-Moleküls direkt interagiert (Abb. 4.1).

4.1.2 Eine *in silico*-Analyse BiBM-assoziierter Missense-Mutationen und ihre Auswirkungen auf die Proteinstruktur von NLRP7

Bei der Suche nach einem möglichen Einfluss BiBM-assoziierter Mutationen auf die Lokalisation des NLRP7-Proteins in einer Zelle, wurde das Wildtyp-Protein oder eine der vier Mutationen transient in HEK293T-Zellen transfiziert. Da bislang noch nicht bekannt ist, in welchen Zellen die Mutationen *in vivo* den für BiBM verantwortlichen Defekt auslösen, wurden die Lokalisationsanalysen unabhängig von einer immunassoziierten Antwort durchgeführt.

Sowohl der Wildtyp als auch die Mutationen zeigten drei unterschiedliche Typen der Proteinverteilung: Typ I = diffus verteilt, Typ II = angereichert am MTOC und Typ III = großes Aggresom. Der Anteil an „Typ III“-Zellen war bei den Missense-Mutationen L398R und R693W um bis zu 30% häufiger verglichen zum Wildtyp (Abb. 3.10). Von allen vier Sequenzvarianten wurde ein *in silico*-Modell generiert, welches hier im Hinblick auf den beobachteten Aggregations-Effekt beschrieben und diskutiert wird.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Mutationen bis auf den nsSNP K511R, führen zu einem nicht-konservativen Aminosäureaustausch, der sich in der Regel negativ auf die Struktur und damit auf die Funktion eines Proteins auswirkt.

Die in der NACHT-Domäne von NLRP7 lokalisierte Missense-Mutation L398R befindet sich innerhalb einer hydrophoben Oberfläche (Abb. 3.11). Die Eingliederung eines hoch hydrophilen Arginins führt vermutlich zu gravierenden Konformationsänderungen abhängig davon, ob sich der mutierte Seitenrest auf der hydrophoben Oberfläche oder innerhalb der Domäne positioniert. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *in silico*-Mutagenese deutet darauf hin, dass sich ein Teil des mutierten Arginins mit einer seiner geladenen Seitenketten zur Oberfläche hinwendet und dadurch möglicherweise potentielle Interaktionen mit den Seitenketten eines weiteren NLRP7-Moleküls induziert, welche dadurch den Aggregations-Effekt für NLRP7 verstärken.

Die beiden LRR-spezifischen Mutationen R693P und R693W repräsentieren ein interessantes Szenario, bei dem der Austausch von ein und derselben Aminosäure zu einem unterschiedlichen Aggregations-Effekt führt.

Die Mutation R693P zeigte einen zum Wildtyp vergleichbaren Aggregations-Effekt, während der Anteil der Zellen mit großen Aggresom-Formationen bei der Mutation R693W im Vergleich zum Wildtyp um bis zu 27% erhöht war (Abb. 3.10). Diese Diskrepanz erschien zunächst untypisch da beide Mutationen, sowohl ein Austausch von Arginin zu Tryptophan als auch ein Austausch von Arginin zu Prolin nicht-konservativ sind. Die *in silico*-Analysen verdeutlichen jedoch die unterschiedlichen Auswirkungen beider Mutationen auf die Proteinstruktur (Abb. 3.11). Im Gegensatz zu dem Austausch von Arginin zu Prolin verhält sich die Substitution zu Tryptophan als nicht-konservativ im Hinblick auf die Hydrophobizität. Das wildtypische Arginin befindet sich auf der vorrangig hydrophoben Oberfläche der LRR-Domäne, dessen Hydrophobizität nur vereinzelt von hydrophilen Arginin-Resten unterbrochen wird. Ein zusätzliches stark hydrophobes Tryptophan würde das hydrophobe Potential der gesamten Region und somit auch den Effekt der Aggregation verstärken. Zudem befindet sich die Aminosäure 693 direkt neben der für die Oligomerisierung wichtigen Interaktions-Schnittstelle und könnte durch das verstärkte hydrophobe Potential auch die Interaktion bzw. Aggregation der NAD-Domäne beeinflussen.

Der Austausch von Arginin zu Prolin verursacht hingegen eine Art Knoten in der Proteinsequenz, welcher zu einem strukturell falsch gefalteten Protein führt und sich negativ auf dessen Funktion auswirkt. Im Vergleich zu Tryptophan hat Prolin hier keinen Einfluss auf die Hydrophobizität der umliegenden Regionen. Da sich die Aminosäure neben und nicht direkt innerhalb der oligomeren Schnittstelle befindet beeinflusst Prolin hier auch nicht das Aggregationspotential des NLRP7-Proteins.

Der nsSNP K511R befindet sich in der NAD-Domäne und beeinflusst die Schnittstelle zwischen der NAD- und LRR-Domäne. Die Arginin-Substitution führte zu einem verminderten Aggregations-Effekt verglichen zum Wildtyp. Die Variante K511R ist semi-konservativ und fügt anstatt eines Lysins das im Umfang größere Arginin an Position 511 ein. Dadurch, dass die Seitenketten des größeren Arginin mehr Seitenketten-Bindungen ausbilden können als die des kleineren Lysins, stabilisieren die vermehrten Bindungen vermutlich die Interaktion zwischen den Domänen NAD und LRR in dem inaktiven NLRP7. Diese zusätzliche Rigidity in der Proteinstruktur könnte dadurch die für die Aktivierung und Aggregation nötigen Konformationsänderungen blockieren.

4.1.3 Die Regulation von NLRP7 über das Aggresom: Ein pathologischer oder physiologischer Mechanismus?

Das Aggresom entsteht bei einem Übermaß an falsch gefalteten und akkumulierten Proteinen und ist eine natürliche Reaktion der Zelle wenn die Kapazität des Proteasoms ausgeschöpft ist. Sicherlich führt allein die Überexpression eines leicht aggregierenden Proteins zu der Formation eines zellulären Aggresoms. Dennoch konnte eine Studie bereits zeigen, dass die Stimulation von peripheren Blutmonozyten (PBMCs) mit LPS zu einer Akkumulation des zuvor im Zytoplasma diffus verteilten endogenen NLRP7-Protein führt. Das polarisierte endogene NLRP7-Signal kolokalisierte mit dem MTOC und die Zerstörung des Mikrotubuli-Netzwerks mittels einer Nocodazol-Behandlung, führte zu einer Fragmentierung des NLRP7-Signals [40].

Solche zytoplasmatischen Proteinakkumulationen wie das Aggresom stehen in Zusammenhang mit der Pathogenese vieler neurodegenerativer Krankheiten wie Morbus Parkinson oder Chorea Huntington. Die Ursache und Entwicklung für diese Krankheiten sind dennoch völlig verschieden. Für die meisten Krankheiten mit zellulären Proteinaggregaten ist noch nicht geklärt, ob diese den Grund oder die Konsequenz einer zellulären Dysfunktion darstellen.

Chorea Huntington ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, deren Ursache eine Mutationen in dem auf Chr4p16.3 lokalisierten Gen *huntingtin* (*HTT*) ist. Die Mutation führt zu einer Verlängerung des repetitiven Basentriplett CAG in Exon 1. Enthält das Protein HTT mehr als 36 dieser repetitiven Glutaminreste führt dies zu einer Protein-Aggregation. Diese Aggregate kolokalisieren mit verschiedenen Proteinen aus dem Bereich der Proteolyse, Transkriptionsregulation, Vesikel-Transport und Ubiquitin-Proteasom-Komponenten von denen vermutet wird, dass sie von den HTT-Aggregaten beschlagnahmt werden und in dem normalen Zellmetabolismus fehlen [117].

Die Pathogenese für Morbus Parkinson ist hingegen viel komplexer und fasst mittlerweile bis zu 13 verschiedene Ursachen zusammen (PARK1-PARK13). Ein besonderes Augenmerk gilt den autosomal-dominant vererbten Mutationen in dem Gen *alpha-synuclein* (*SNCA*, *PARK1*) die zu einer gesteigerten Expression und dadurch zu einer falschen Faltung des Proteins führen. Die dadurch entstehenden Aggregate sind maßgeblich an der Entstehung von zellulären Einschlusskörperchen

den sog. „Lewy-Bodies“ beteiligt. Man geht davon aus, dass eine gestörte Degradierung der Proteinaggregate die Ursache für die Entstehung weiterer pathologischer Prozesse wie oxidativer Stress, mitochondriale und proteasomale Dysfunktion, Entzündungsreaktionen und Excitotoxizität in der Zelle ist [117].

Eine Studie mit dem in der Immunabwehr aktiven Protein induzierbare NO-Synthase (iNOS) identifizierte iNOS-spezifische Aggresom-Formationen als einen physiologisch regulatorischen Prozess [108]. Die mikroskopische Analyse des endogenen iNOS in verschiedenen Krebszell-Linien und murinen Makrophagen identifizierte nach einer Stimulation mit LPS oder anderen entzündungsspezifischen Zytokinen die Entstehung von juxtanukleären Aggregaten. Weitere Untersuchungen eines in HEK293T-Zellen überexprimierten GFP-markierten iNOS, führten zu den gleichen zellulären Proteinverteilungen (Typ I-III) wie die in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen mit NLRP7. Kolodziejaska et al. schlussfolgerten, dass die Entstehung eines iNOS-Aggresoms ein physiologisch regulatorischer Prozess ist, der nach einer übermäßigen Proteinexpression eingreift.

Auch im Rahmen von autoinflammatorischen Erkrankungen spielt die Entstehung von falsch gefalteten Proteinen oder deren Aggregation eine große Rolle [118]. Verschiedene autosomal dominante Mutationen in *NLRP3* induzieren unterschiedliche Ausprägungen des Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndroms (CAPS). Dazu zählen das Muckle Wells Syndrom (MWS), die familiäre Kälteurtikaria (FCAS) oder die sog. NOMID (neonatal onset multi-system inflammatory disease) [119]. Alle CAPS-assoziierten Mutationen sind in der NACHT-Domäne von NLRP3 lokalisiert wo sie die Oligomerisierung, Inflammasom-Aktivierung und dessen anschließende Produktion von IL-1 β verstärken [104].

In wie weit die Akkumulation eines falsch gefalteten oder stark aggregierenden NLRP7-Proteins die Aktivierung von inflammatorischen Zytokinen oder andere Oozyten-spezifische intrazelluläre Signalwege beeinflusst, bleibt hier noch offen. Dennoch erbrachte ein Vergleich der drei BiBM-assoziierten Mutationen R693P, R693W und D657V mit dem NLRP7 Wildtyp-Protein in einem sog. Inflammasom-Rekonstitutions-Assay erste Hinweise, dass die Mutationen eine Aktivierung des Inflammasoms begünstigen und die Sekretion von IL-1 β dadurch erhöht wird [42]. Eine aktuelle Studie zeigte erstmals einen Effekt von erhöhten IL-1 β Konzentrationen auf die DNA-Methylierung. Hier beeinflusste die Behandlung von primären Chondrozyten mit IL-1 β und TNF- α die Expression und Aktivität von TETs (Ten

Eleven Translocation) [120]. Die alleinige Gabe von IL-1 β führte zu einer signifikanten Reduktion der TET Enzymaktivität und der globalen 5hmC-Level. TETs (TET1-3) sind eine Gruppe von Enzymen, die die Methylgruppe an Position 5 der Nukleinbase Cytosin oxidieren (5mC zu 5hmC). Man geht davon aus, dass diese sog. sechste Nukleinbase eine Zwischenform in dem Prozess der aktiven DNA-Demethylierung ist [121]. DNA-Demethylierung spielt bereits in der frühen Gametogenese eine wichtige Rolle für die Reetablierung des geschlechtsspezifischen Imprints. So könnte eine von NLRP7 induzierte Erhöhung der IL-1 β -Sekretion auch Einfluss auf die anfängliche DNA-Demethylierung in den heranreifenden Oozyten haben. In Oozyten konnten bereits hohe Expressionslevel von TET3 nachgewiesen werden deren Funktion in der aktiven Demethylierung jedoch noch fragwürdig ist und vermutlich erst nach einer Befruchtung in der genomweiten Reprogrammierung der Zygote und während deren erster Zellteilungen vermutet wird [122].

Die endogene Expression von NLRP7 könnte durch die Entstehung eines NLRP7-Aggresoms in der Zelle physiologisch reguliert werden. Bei Anwesenheit einer Mutation, welche die Expression oder den Prozess der Aktivierung verstärkt erhöht sich der Prozess der Aggregation. Eine gestörte Degradierung der Proteinaggregate könnte den normalen Zellmetabolismus stören und die Entstehung weiterer pathologischer Prozesse in der Zelle induzieren oder eine Aktivierung der IL1 β -Sekretion verstärken bzw. inhibieren und dadurch die über TETs regulierte DNA-Demethylierung während der Oogenese beeinflussen.

Die Oligomerisierung/Aggregation liegt in der Natur des NLRP7-Proteins und ist unerlässlich für dessen Aktivierung. Der physiologische und pathologische Prozess der Aggregation ergründet sich höchstwahrscheinlich über den gleichen Mechanismus und wird bei Anwesenheit bestimmter Missense-Mutationen verstärkt.

4.2 ZBTB16 als neuer potentieller Interaktionspartner von NLRP7

Der zweite Teil dieser Arbeit präsentiert ZBTB16 als neuen potentiellen Interaktionspartner von NLRP7. ZBTB16 beeinflusst wichtige biologische und entwicklungspezifische Prozesse, die neue Hinweise für den für BiBM verantwortlichen Pathomechanismus geben könnten.

ZBTB16 verfügt über die Fähigkeit der Transkriptions-Repression, indem der Transkriptionsfaktor mit Hilfe von Histondeazetylasen (HDACs) und verschiedenen nukleären Ko-Repressoren eine Umstrukturierung des Chromatins induziert [114].

ZBTB16 bindet unter anderem an den Tyrosinkinase-Rezeptor *KIT* und kontrolliert durch dessen Repression den Wechsel zwischen Selbsterneuerung (*KIT* reprimiert) und Proliferation (aktive Expression von *KIT*) der Spermatogonien im adulten männlichen Organismus [123,124].

Desweiteren gilt ZBTB16 als ein wichtiger Faktor in der Entwicklung myeloider und lymphoider Zelllinien, wo er die Reifung von natürlichen Killer-T-Zellen (NKTs) reguliert [125,126].

Neben der repressiven Funktion von ZBTB16, zeigten zudem verschiedene Studien wie die N-terminale BTB-Domäne des Proteins als substratspezifischer Adaptor für eine CULLIN3-assoziierte Ubiquitinierung fungiert [127,128,129].

4.2.1 ZBTB16 interagiert nur mit der aktivierten Form von NLRP7

Eine externe LexA basierte Hefe Di-Hybrid-Analyse mit einer ovariellen Transkript-Bibliothek identifizierte die Zinkfinger-Domäne von ZBTB16 als interagierendes Köder-Konstrukt (Abb. 3.12). Die Interaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit mit einem GAL4-basierten Hefe Di-Hybrid System verifiziert. Nur die NLRP7-Deletionskonstrukte ohne die LRR-Domäne zeigten hier eine Interaktion mit ZBTB16, während sich mit Hilfe von Immunopräzipitations-Analysen in Säugerzellen auch eine Interaktion zwischen dem NLRP7 Wildtyp-Protein und ZBTB16 nachweisen ließ (Abb. 3.13 und 3.16). Der Grund für die Diskrepanz der beiden Untersuchungsmethoden könnte eine fehlende Aktivierung/Oligomerisierung des NLRP7 Wildtyp Konstruktes in dem Hefe-System sein. Ohne die für eine Aktivierung nötigen Konformationsänderungen des NLRP7 Proteins, könnten potentielle Interaktionsabschnitte mit ZBTB16 verborgen bleiben.

Weitere Immunopräzipitations-Analysen mit verschiedenen Deletionskonstrukten identifizierten die NACHT-Domäne von NLRP7 als wichtigste Interaktions-Schnittstelle, während ZBTB16 sowohl mit seiner N- als auch seiner C-terminalen Region an NLRP7 bindet (Abb. 3.18). Die *in silico*-Analysen zeigten bereits welche Auswirkungen die Aktivierung von NLRP7 auf die Struktur des Proteins hat (Abb. 3.6). Neben einer Freigabe der NAD-Domäne von der sie umgebenden LRR-Domäne sind die Konformationsänderungen der NACHT-Domäne während des Aktivierungsprozesses essentiell und sprechen daher für eine Proteininteraktion zwischen ZBTB16 und der aktivierten Form von NLRP7.

Zusätzlich Mutationsanalysen mit dem Hefe Di-Hybrid-System bestätigten die potentielle Affinität von ZBTB16 zur NACHT-Domäne von NLRP7. Während sowohl das Wildtyp-Protein als auch die mutagenisierten NLRP7-Vollängenkonstrukte K511R (NAD), R693P und R693W (LRR) keine Interaktion mit ZBTB16 zeigten, induzierte die in der NACHT-Domäne lokalisierte Mutation L398R eine nachweisbare Interaktion zwischen beiden Proteinen. Die in dem ersten Abschnitt durchgeführte *in silico*-Mutagenese der Mutation L398R zeigte bereits, dass sich ein Teil des mutierten Arginins mit einer seiner geladenen Seitenketten zu der Proteinoberfläche hinwendet und dadurch möglicherweise potentielle Interaktionen begünstigt (Abb. 3.11). So könnte die Mutation L398R in dem in der Hefe analysierten inaktiven Vollängenkonstrukt NLRP7 normalerweise verdeckte Regionen der NACHT-Domäne freilegen und dadurch zu der nachweisbaren Interaktion mit ZBTB16 führen.

KHDC3L wurde als das zweite für BiBM verantwortliche maternale Effektgen identifiziert. Patientinnen mit einem BiBM-Phänotyp ohne eine erkennbare Mutation in NLRP7, zeigten hingegen verschiedene proteinverkürzende Mutationen in *KHDC3L*. Aufgrund verschiedener Kolokalisations- und Expressionsanalysen geht man davon aus, dass beide Proteine Teil eines Multiproteinkomplex sein könnten. Die in dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsanalysen sollten prüfen, ob beide Proteine möglicherweise direkt miteinander interagieren. Sowohl die Analysen in der Hefe als auch die Immunopräzipitationen in Säugerzellen wurden als negativ bewertet (Abb. 3.14 und 3.18). Dennoch zeigten beide Proteine die bereits bekannte juxt nukleäre Kolokalisation in der Zelle (Abb 3.29).

Es bleibt noch ungeklärt, ob die nachgewiesene Kolo­kalisierung beider Proteine nicht ein Nebeneffekt der Überexpression und der NLRP7-Aggregation ist. KHDC3L wird spezifisch in Oozyten expremiert, wodurch eine endogene Lokalisationsanalyse in HEK293T-Zellen nicht möglich ist. Eine native Gelelektrophorese der beiden überexpremierten Proteine NLRP7 und KHDC3L und eine anschließende massenspektroskopische Analyse des gemeinsamen Multiproteinkomplex könnten zukünftig mehr Informationen über mögliche funktionale Zusammenhänge geben.

4.2.2 NLRP7 und ZBTB16 zeigen eine falsch positive Kolo­kalisierung in den nukleären Speckles

Die Überexpression der fluoreszenzmarkierten Proteine NLRP7 und ZBTB16 in HEK293T-Zellen zeigte eine falsch positive Kolo­kalisierung beider Proteine in den nukleären Speckles der Zelle. Diese nukleären Organellen sind der typische Aufenthaltsort von ZBTB16 in einer Zelle. NLRP7 ist hingegen ein zytoplasmatisches Protein. Zuletzt berichteten Mahadevan et al. über eine nukleäre Lokalisation von NLRP7 nach entsprechender Überexpression und zeigten dessen Interaktion mit dem Zinkfingerprotein YY1, sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma von HEK293-Zellen [43]. YY1 ist wie ZBTB16 ein transkriptioneller Repressor der über die Interaktion mit verschiedenen Histondeacetylasen seine repressive Funktion ausübt. Zudem bindet und kontrolliert YY1 an die differentiell methylierten Regionen (DMRs) der beiden Imprinting-Loci *PEG3* und *GNAS* [130]. Mahadevan et al. gehen davon aus, dass der endogene nukleäre Anteil von NLRP7 so gering ist, dass dieser dadurch bislang nicht nachgewiesen werden konnte.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen an einem konfokalen Mikroskop konnten sowohl nach einer alleinigen NLRP7-Überexpression mit dem N-terminal markierten EGFP, als auch mit dem immungefärbten Flag-markierten NLRP7 keine Lokalisation des Proteins im Nukleus nachweisen.

Eine Koexpression der beiden Fusionsproteine EGFP-NLRP7 und ZBTB16-DsRed2 suggerierte einen nukleären Import von NLRP7. Da jedoch eine Koexpression des grünfluoreszierenden Proteins EGFP mit einem DsRed2-markierten ZBTB16 ebenfalls zu einer Akkumulation von EGFP in den nukleären Speckles führte, wurde die nukleäre Kolo­kalisierung zwischen NLRP7 und ZBTB16 als falsch positiv gewertet. Ein terminaler Austausch der fluoreszierenden Proteine EGFP und DsRed2 (NLRP7-DsRed2 & EGFP-ZBTB16) sollte zusätzlich den möglichen nukleären Import von

NLRP7 überprüfen. Die C-terminale Markierung von NLRP7 mit einem DsRed2-Protein erwies sich jedoch als sehr instabil. DsRed2 ist ein 28kD großes rot fluoreszierendes Protein. Während das EGFP-Monomer (27kD) relativ schnell fluoresziert, bildet das wildtypische DsRed ein kompaktes Tetramer (ca 100 kD) welches erst nach 48h seine vollständige Fluoreszenzleistung erreicht. Das mutierte DsRed2 enthält hingegen sechs verschiedene Mutationen, von denen drei eine verstärkte Fluoreszenz induzieren (V105A, I161T, S197A) und drei weitere N-terminale Mutationen (R2A, K5E, K9T) die Tendenz einer DsRed-Aggregation deutlich verringern [131]. Die Fusion von DsRed2 mit einem aggregophilen Protein könnte die Aggregation des zu untersuchenden Proteins artifiziell verstärken. So zeigte NLRP7-DsRed2 erst nach 48 Stunden ein relativ schwaches juxt nukleäres Signal. Das DsRed2-markierte ZBTB16 führte hingegen bereits nach 24h zu einem starken nukleären Signal.

Daraufhin wurde ein N-terminal mit Flag markiertes NLRP7 zusammen mit dem DsRed2-markierten ZBTB16 in HEK293T-Zellen für 24h überexprimiert und anschließend mit einem spezifischen Anti-NLRP7 Erstantikörper und einem grün fluoreszierenden AlexaFluor488 Zweitantikörper angefärbt. Beide Proteine zeigten erneut eine falsch positive Kolo kalisation in den nukleären Speckles. In diesem Fall führte eine Kreuzreaktion des NLRP7-spezifischen Antikörper mit DsRed2 zu den verfälschten Ergebnissen.

Ein letztes Experiment bestätigte schließlich die falsch positive Lokalisation von NLRP7 in dem Nukleus von HEK293T-Zellen. Nach einer Koexpression des Flag-markierten NLRP7 und einem N-terminal EGFP-markierten ZBTB16, wurde NLRP7 spezifisch mit Anti-NLRP7 und einem rot fluoreszierenden AlexaFluor594 Zweitantikörper angefärbt. Beide Proteine kolo kalisiert in dem Zytoplasma und in einem juxt nukleären Aggregat.

Zusammengefasst widerlegen die hier in verschiedenen Experimenten durchgeführten mikroskopischen Analysen eine von Mahadevan et al. beobachtete nukleäre Lokalisation von NLRP7. Weiterhin basierten alle beobachteten nukleären Kolo kalisationen von NLRP7 und ZBTB16 auf einer falsch positiven Reaktion in der jeweils angewandten Methode.

4.2.3 NLRP7 und ZBTB16 kolokalisieren in juxt nukleären Aggregaten im Zytoplasma

Interessanterweise kam es immer ab einem gewissen Maß an Überexpression von NLRP7 und ZBTB16 zu einem nukleären Export von ZBTB16 welcher zu einer juxt nukleären Kolokalisation mit NLRP7 führte. Dies könnte ein normaler Nebeneffekt sein, bei dem die Überexpression des aggregophilen NLRP7 mit einem DsRed2-markierten Protein unwillkürlich ab einem gewissen Zeitpunkt zu deren Aggregation führt.

Andererseits konnte eine native Proteinextraktion mit Digitonin die hier Myc- und Flag-markierten Proteine (Flag-NLRP7 & ZBTB16-Myc) in einem 480 kD großen Multiproteinkomplex nachweisen. Die Fusion mit den beiden Peptiden Flag (1,01 kD) und Myc (1,2 kD) hat so gut wie keine Auswirkungen auf die Struktur und Funktion von Proteinen, solange man auf die Position des für die Proteine wichtigen Lokalisationssignal achtet [132]. Die Extraktion mit dem Detergenz Digitonin ist eine sehr sanfte Methode um zytosolische Proteine in ihrer nativen Form aus den Zellen herauszulösen, während die nukleären Bestandteile hierbei nicht mit extrahiert werden [133]. Die Ergebnisse der BN-Page präsentieren demnach beide Proteine im Zytoplasma. Während NLRP7 als immer größer werdendes Oligomer bei einer Größe von 480-1200 kD nachweisbar ist, wird ZBTB16 von der Oligomerisierung nicht mitgetragen sondern zeigt sich als scharfe Bande bei 480 kD.

HEK293T-Zellen zeigen keine endogene Expression von NLRP7. Im Gegensatz dazu konnte das endogene ZBTB16 mit einem spezifischen Antikörper gegen ZBTB16 in den für das Protein typischen nukleären Speckles nachgewiesen werden. Eine Überexpression des EGFP-markierten NLRP7 führte auch bei dem endogenen ZBTB16 zu einem nukleären Export und zu einer Kolokalisation beider Proteine im Zytoplasma und in einem juxt nukleären Aggregat.

Nachdem bereits in dem ersten Teil dieser Arbeit gezeigt wurde, dass es sich bei den zellulären Aggregaten um ein Aggresom handelt, könnte die zytoplasmatische Kolokalisation mit ZBTB16 mehrere Ursachen haben:

So führte z.B. eine Stimulierung myeloider Vorläuferzellen mit Interleukin-3 zu einem nukleären Export von ZBTB16. Durch die Relokalisierung in das Zytoplasma wurde die repressive Funktion von ZBTB16 aufgehoben und führte zu einer Differenzierung der Zellen [125].

Genauso konnte eine Behandlung von Zellen eines Fibrosarkoms mit TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat), einem Wirkstoff der in der Krebsdiagnostik verwendet wird, zeigen wie die lösliche Form der Metalloprotease H-BEGF-C (heparin-bindender EGF-like Growth Faktor) an die Zinkfingerdomäne von ZBTB16 bindet und dadurch dessen nukleären Export induziert [134].

Auf der anderen Seite zeigten bereits mehrere Studien wie verschiedene Proteine mit einer N-Terminalen BTB-Domäne als substratspezifischer Adaptor für eine Cullin-assoziierte Ubiquitinierung dienen [127,129]. So dient ZBTB16 als Substratspezifischer Adaptor für Cullin3. Cullin3 bindet an das Ringfingerprotein Roc1 und steuert dadurch die Rekrutierung des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) zu einem Ubiquitin-Ligase Komplex (E3). Matthew et al. zeigten jedoch wie ZBTB16 das zytoplasmatische Protein Cullin3 in den Nukleus von NKT-Zellen transportiert und dort über die Ubiquitinierung des mit ZBTB16 interagierenden Chromatin-modifizierenden Komplex deren Differenzierung und Entwicklung steuert [128].

Wäre NLRP7 das Substrat für ZBTB16, könnte die juxt nukleäre Kolokalisation das Resultat einer Ubiquitin-vermittelten Degradierung sein. In *Caenorhabditis elegans* wurde bereits das BTB enthaltende Protein MEL26 als Substrat-spezifischer Adaptor für die Cullin3 E3 Ligase identifiziert. MEL26 bindet hier an MEI-1 und induziert über Cullin3 dessen Abbau. Das MEI-1 Protein generiert die meiotische Spindel in der Oozyte und lokalisiert wie auch NLRP7 an den polaren Enden der Mikrotubuli [135].

4.2.4 BiBM: Ein defekter Imprintingmechanismus in *trans*?

Das pathologische Methylierungsmuster einer BiBM wird als Methylierungsdefekt *in trans* bezeichnet, d.h. mehrere Imprintingloci (auf dem maternalen Allel) sind gleichzeitig betroffen [136].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Methylierungsanalysen verschiedener Imprinting-Loci nach transienter Transfektion von NLRP7 und ZBTB16 zeigten bei einem Vergleich mit unbehandelten HEK293T-Zellen keine signifikanten Änderungen in ihrem Methylierungsprofil.

Der Imprintingstatus in somatischen Zellen wird stabil weitervererbt. Nur in den primordialen Keimzellen kommt es zu einer vollständigen Auslöschung und Reetablierung des geschlechtsspezifischen Imprintingmusters. Bis heute ist jedoch nicht klar, über welchen Mechanismus das richtige Imprintingmuster gesetzt wird.

Der Methylierungsassay sollte eine mögliche funktionale Verbindung zwischen der hier identifizierten Proteininteraktion und dem Phänotyp einer BiBM schaffen.

Ein großes Defizit in dem hier durchgeführten Test waren sicherlich die dafür verwendeten somatischen Zellen. Die von Mahadevan et al. durchgeführten Methylierungsanalysen in humanen embryonalen Stammzellen nach einem *NLRP7* Knock-out konnten jedoch ebenfalls keine Änderung auf imprinting-spezifischen DMRs nachweisen [43].

Sowohl die hier durchgeführte Überexpression von *NLRP7* in HEK293T-Zellen, als auch der *NLRP7* Knock-out in hESCs hatte somit keinen direkten Einfluss auf das maternale Imprintingmuster. Das Fehlen eines geeigneten Modellorganismus (kein Maus-Homolog) macht es schwierig die eigentlichen Funktionen von *NLRP7* während der weiblichen Gametogenese zu erschließen. Die Etablierung spezifischer Imprinting-Markierungen erfolgt während der Oogenese und bislang geht man davon aus, dass die entscheidenden Faktoren bei der Etablierung der Imprinting-Markierungen im Wachstum der Oozyte und durch eine aktive Transkription reguliert werden [84].

Die Rolle von *ZBTB16* während der Gametogenese fokussierte sich bislang lediglich auf die männlichen Keimzellen. Analysen der *KIT*-Expression während der Entwicklung männlicher Keimzellen, zeigten jedoch sowohl in männlichen als auch in weiblichen Keimzellen wie eine ansteigende Expression von *ZBTB16* gleichzeitig die Expression von *KIT* herunterreguliert [137]. *ZBTB16* kontrolliert durch eine spezifische Bindung an den *KIT*-Promotor und der daraus resultierenden Repression von *KIT* die Selbsterneuerung und Differenzierung von Spermatogonien [138].

KIT ist ein entscheidender Faktor für das Überleben und die Proliferation primordialer Keimzellen [139]. Sowohl in MI Oozyten als auch in den männliche Gonozyten kommt es zu einer Herunterregulierung von *KIT*. Nach der Geburt kommt es in den wachsenden Oozyten zu einer Reexpression von *KIT* und dessen Interaktion mit dem *Kit*-Liganden (*KL*). Die *KIT/KL* Interaktion ist neben der Aktivierung des primordialen Follikels auch für die Aufrechterhaltung des MI-Stadiums und für das Überleben und das Wachstum einer Oozyte notwendig [139,140,141].

Zusammenfassend präsentiert der zweite Teil dieser Arbeit *ZBTB16* als potentiellen Interaktionspartner von *NLRP7*. Ort und Funktion dieser Proteininteraktion bleiben jedoch noch ungeklärt und lassen sich zukünftig nur mit einem geeigneten Zellmodell

untersuchen. So könnte eine Differenzierung embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) in primordiale Keimzellen ein für die Erkrankung relevantes Zell-Modell sein. Sowohl Expressions- und Lokalisationsanalysen der endogenen Proteine NLRP7 und ZBTB16, als auch genomweite Methylierungsanalysen während der Differenzierung von ES-Zellen nach einem *NLRP7* Knock-out könnten helfen die Pathogenese einer BiBM zu verstehen.

5 Fazit und Ausblick

Ziel dieser Dissertation war es über eine interdomän-spezifische Hefe Di-Hybrid-Analyse potentielle Interaktionsschnittstellen während der NLRP7-Oligomerisierung ausfindig zu machen. Die Hefe Di-Hybrid- und zusätzlichen *in silico*-Analysen identifizierten die NAD-Domäne als den physischen Mediator für die Oligomerisierung und die LRR-Domäne als Inhibitor der interaktionsstarken NAD-Domäne.

Konfokal mikroskopische Untersuchungen von transient transfizierten NLRP7 Wildtyp-Protein oder mutagenisierten NLRP7-Varianten führten zu unterschiedlich ausgeprägten Aggresom-Formationen im Zytoplasma von HEK293T-Zellen. Die zwei Mutationen L398R und R693W führen verglichen zum Wildtyp zu einer gesteigerten Aggregation, welche mögliche nachfolgende Signalwege stören und damit einen für BiBM verantwortlichen pathophysiologischen Effekt verursachen könnte.

Der zweite Teil dieser Arbeit präsentiert ZBTB16 erstmals als einen potentiellen Interaktionspartner von NLRP7. ZBTB16 interagiert über mehrere Schnittstellen mit der NACHT-Domäne von NLRP7 und eine Überexpression von NLRP7 führt zu einem nukleären Export des endogenen ZBTB16. Beide Proteine kolokalisieren im Zytoplasma und in juxt nukleären Aggregaten. Ob und in welchen Zellen diese Proteininteraktion eine Auswirkung auf die Pathogenese der BiBM hat muss noch geklärt werden.

Für zukünftige Untersuchungen von NLRP7 ist ein geeignetes Zellmodell unverzichtbar. Da in der Maus kein Ortholog von *NLRP7* existiert, könnte eine Differenzierung von embryonalen Stammzellen in primordiale Keimzellen ein geeignetes Modell für weitere Analysen schaffen. Ein Knock-out von NLRP7 in embryonalen Stammzellen und deren kontrollierte genomweite DNA-Methylierungsanalyse während einer Differenzierung in primordiale Keimzellen könnten neue Einblicke in die Pathogenese der biparentalen Blasenmole geben. Weiterhin könnten Expressions- und Kolokalisationsanalysen des endogenen NLRP7 und ZBTB16 klären, welche Relevanz die Interaktion beider Proteine für eine BiBM hat.

Literaturverzeichnis

1. Morrish D, Dakour J, Li H (1998) Functional regulation of human trophoblast differentiation. *Journal of Reproductive Immunology* 39 (1-2): 179-195.
2. Potgens AJ, Schmitz U, Bose P, Versmold A, Kaufmann P, et al. (2002) Mechanisms of syncytial fusion: a review. *Placenta* 23 Suppl A: S107-113.
3. Szulman AE, Surti U (1978) The syndromes of hydatidiform mole. I. Cytogenetic and morphologic correlations. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 131: 665-671.
4. Szulman AE, Surti U (1978) The syndromes of hydatidiform mole. II. Morphologic evolution of the complete and partial mole. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 132: 20-27.
5. Vogel LC, Horn M (2004) Gestationsbedingte Trophoblasterkrankungen: Nichtvillöse Trophoblasterkrankungen. *Der Pathologe* 25: 281-291.
6. Savage P, Williams J, Wong SL, Short D, Casalboni S, et al. (2010) The demographics of molar pregnancies in England and Wales from 2000-2009. *Journal of Reproductive Medicine* 55 (7-8): 341-345.
7. Grimes DA (1984) Epidemiology of gestational trophoblastic disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 150: 309-318.
8. Bracken MB (1987) Incidence and aetiology of hydatidiform mole: an epidemiological review. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 94: 1123-1135.
9. Ohama K, Ueda K, Okamoto E, Takenaka M, Fujiwara A (1986) Cytogenetic and clinicopathologic studies of partial moles. *Obstetrics and Gynecology* 68: 259-262.
10. Vassilakos P, Riotton G, Kajii T (1977) Hydatidiform mole: two entities. A morphologic and cytogenetic study with some clinical consideration. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 127: 167-170.
11. Szulman AE, Surti U (1984) Complete and partial hydatidiform moles: cytogenetic and morphological aspects. *Advances in experimental medicine and biology* 176.
12. Kajii T, Ohama K (1977) Androgenetic origin of hydatidiform mole. *Nature* 268: 633-634.
13. Fisher RA, Hodges MD (2003) Genomic Imprinting in Gestational Trophoblastic Disease—A Review. *Placenta* 24: S111-S118.
14. Kovacs B, Shahbahrami B, Tast DE, Curtin JP (1991) Molecular genetic analysis of complete hydatidiform moles. *Cancer genetics and cytogenetics* 54: 143-152.
15. Slim R, Wallace EP (2013) NLRP7 and the Genetics of Hydatidiform Moles: Recent Advances and New Challenges. *Frontiers in immunology* 4: 242.
16. Moglabey YB, Kircheisen R, Seoud M, El Mogharbel N, Van den Veyver IB, et al. (1999) Genetic mapping of a maternal locus responsible for familial hydatidiform moles. *Human molecular genetics*.
17. Murdoch S, Djuric U, Mazhar B, Seoud M, Khan R, et al. (2006) Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. *Nature genetics* 38: 300-302.
18. Abdalla EM, Hayward BE, Shamseddin A, Nawar MM (2012) Recurrent hydatidiform mole: detection of two novel mutations in the NLRP7 gene in two Egyptian families [Case Reports]. 211-215 p.

19. Deveault C, Qian JH, Chebaro W, Ao A, Gilbert L, et al. (2009) NLRP7 mutations in women with diploid androgenetic and triploid moles: a proposed mechanism for mole formation [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 888-897 p.
20. Estrada H, Buentello B, Zenteno JC, Fiszman R, Aguinaga M (2013) The p.L750V mutation in the NLRP7 gene is frequent in Mexican patients with recurrent molar pregnancies and is not associated with recurrent pregnancy loss. 205-208 p.
21. Hayward BE, De Vos M, Talati N, Abdollahi MR, Taylor GR, et al. (2009) Genetic and epigenetic analysis of recurrent hydatidiform mole. *Human mutation* 30: E629-639.
22. Kou YC, Shao L, Peng HH, Rosetta R, del Gaudio D, et al. (2008) A recurrent intragenic genomic duplication, other novel mutations in NLRP7 and imprinting defects in recurrent biparental hydatidiform moles. *Molecular human reproduction* 14: 33-40.
23. Puechberty J, Rittore C, Philibert L, Lefort G, Burlet G, et al. (2009) Homozygous NLRP7 mutations in a Moroccan woman with recurrent reproductive failure. *Clinical genetics* 75: 298-300.
24. Slim R, Bagga R, Chebaro W, Srinivasan R, Agarwal N (2009) A strong founder effect for two NLRP7 mutations in the Indian population: an intriguing observation. *Clinical genetics* 76: 292-295.
25. Wang CM, Dixon PH, Decordova S, Hodges MD, Sebire NJ, et al. (2009) Identification of 13 novel NLRP7 mutations in 20 families with recurrent hydatidiform mole; missense mutations cluster in the leucine-rich region [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 569-575 p.
26. Messaed C, Chebaro W, Di Roberto RB, Rittore C, Cheung A, et al. (2011) NLRP7 in the spectrum of reproductive wastage: rare non-synonymous variants confer genetic susceptibility to recurrent reproductive wastage [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 540-548 p.
27. Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805-820.
28. Kufer TA, Sansonetti PJ (2011) NLR functions beyond pathogen recognition. *Nature immunology* 12: 121-128.
29. Tschopp J, Martinon F, Burns K (2003) NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nature reviews Molecular cell biology* 4: 95-104.
30. Radian AD, de Almeida L, Dorfleutner A, Stehlik C (2013) NLRP7 and related inflammasome activating pattern recognition receptors and their function in host defense and disease. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 15: 630-639.
31. Aravind L, Dixit VM, Koonin EV (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends in Biochemical Sciences* 24: 47-53.
32. Proell M (2008) The Nod-like receptors (NLR) family: a tale of similarities and differences. *PLoS ONE*.
33. Leipe DD, Koonin EV, Aravind L (2004) STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *Journal of molecular biology* 343: 1-28.
34. Danot O, Marqueten E, Vidal-Ingigliardi D, Richet E (2009) Wheel of Life, Wheel of Death: A Mechanistic Insight into Signaling by STAND Proteins. *Structure* 17: 172-182.
35. Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, Willingham SB, Ye Z, et al. (2007) Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding

- to mediate inflammatory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 8041-8046.
36. Bell JK, Mullen GED, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, et al. (2003) Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends in Immunology* 24: 528-533.
 37. Haberland J, Gerke V (1999) Conserved charged residues in the leucine-rich repeat domain of the Ran GTPase activating protein are required for Ran binding and GTPase activation. *The Biochemical Journal* 343: 653-662.
 38. Dickson KA, Haigis MC, Raines RT (2005) Ribonuclease Inhibitor: Structure and Function. 80: 349-374.
 39. Kinoshita T, Wang Y, Hasegawa M, Imamura R, Suda T (2005) PYPAF3, a PYRIN-containing APAF-1-like protein, is a feedback regulator of caspase-1-dependent interleukin-1beta secretion. *The Journal of biological chemistry* 280: 21720-21725.
 40. Messaed C, Akoury E, Djuric U, Zeng J, Saleh M, et al. (2011) NLRP7, a nucleotide oligomerization domain-like receptor protein, is required for normal cytokine secretion and co-localizes with Golgi and the microtubule-organizing center. *The Journal of biological chemistry* 286: 43313-43323.
 41. Okada K (2004) Oncogenic role of NALP7 in testicular seminomas. *Cancer Science*.
 42. Khare S, Dorfleutner A, Bryan NB, Yun C, Radian AD, et al. (2012) An NLRP7-containing inflammasome mediates recognition of microbial lipopeptides in human macrophages. *Immunity* 36: 464-476.
 43. Mahadevan S, Wen S, Wan YW, Peng HH, Otta S, et al. (2014) NLRP7 affects trophoblast lineage differentiation, binds to overexpressed YY1 and alters CpG methylation. *Human molecular genetics* 23: 706-716.
 44. Lupfer C, Kanneganti TD (2013) Unsolved Mysteries in NLR Biology. *Frontiers in immunology* 4: 285.
 45. Tian X, Pascal G, Monget P (2009) Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems. *BMC evolutionary biology* 9: 202.
 46. Petrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J (2007) The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Current opinion in immunology* 19: 615-622.
 47. Faustin B, Lartigue L, Bruey JM, Luciano F, Sergienko E, et al. (2007) Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Molecular cell* 25: 713-724.
 48. Boyden ED, Dietrich WF (2006) Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nature genetics* 38: 240-244.
 49. Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, et al. (2009) The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 30: 556-565.
 50. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, et al. (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440: 228-232.
 51. Martinon F, Agostini L, Meylan E, Tschopp J (2004) Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Current biology* : CB 14: 1929-1934.
 52. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, et al. (2007) Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death and Differentiation* 14: 1583-1589.

53. Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, et al. (2011) NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 145: 745-757.
54. Zaki MH, Vogel P, Malireddi RK, Body-Malapel M, Anand PK, et al. (2011) The NOD-like receptor NLRP12 attenuates colon inflammation and tumorigenesis. *Cancer cell* 20: 649-660.
55. Zhang (2009) Expression Analysis of the NLRP Gene Family suggests a role in human preimplantation development. *PLoS ONE*.
56. Tong Z-B, Gold L, Pfeifer KE, Dorward H, Lee E, et al. (2000) Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nature genetics* 26: 267-268.
57. Kojima A, Prehn R (1981) Genetic susceptibility to post-thymectomy autoimmune diseases in mice. *Immunogenetics* 14: 15-27.
58. Kim B, Kan R, Anguish L, Nelson LM, Coonrod SA (2010) Potential role for MATER in cytoplasmic lattice formation in murine oocytes. *PLoS ONE* 5: e12587.
59. Hamatani T, Falco G, Carter MG, Akutsu H, Stagg CA, et al. (2004) Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Human molecular genetics* 13: 2263-2278.
60. Meyer E, Lim D, Pasha S, Tee LJ, Rahman F, et al. (2009) Germline mutation in NLRP2 (NALP2) in a familial imprinting disorder (Beckwith-Wiedemann Syndrome). *PLoS genetics* 5: e1000423.
61. Peng H (2012) NLRP2, a maternal effect gene required for early embryonic development in the mouse. *PLoS ONE*.
62. Westerveld GH, Korver CM, van Pelt AM, Leschot NJ, van der Veen F, et al. (2006) Mutations in the testis-specific NALP14 gene in men suffering from spermatogenic failure. *Human reproduction* 21: 3178-3184.
63. Parry DA, Logan CV, Hayward BE, Shires M, Landolsi H, et al. (2011) Mutations causing familial biparental hydatidiform mole implicate c6orf221 as a possible regulator of genomic imprinting in the human oocyte. *American journal of human genetics* 89: 451-458.
64. Reddy R, Akoury E, Phuong Nguyen NM, Abdul-Rahman OA, Dery C, et al. (2013) Report of four new patients with protein-truncating mutations in C6orf221/KHDC3L and colocalization with NLRP7. *European journal of human genetics* : *EJHG* 21: 957-964.
65. Pierre A, Gautier M, Callebaut I, Bontoux M, Jeanpierre E, et al. (2007) Atypical structure and phylogenomic evolution of the new eutherian oocyte- and embryo-expressed KHDC1/DPPA5/ECAT1/OOEP gene family. *Genomics* 90: 583-594.
66. Surani MAH, Barton SC, Norris ML (1986) Nuclear Transplantation in the Mouse: Heritable Differences between Parental Genomes after Activation of the Embryonic Genome. *Cell* 45.
67. Coullin P (2005) [From human andro- and parthenogenesis (hydatidiform moles and benign ovarian teratomas) to cancer]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité* 33: 469-482.
68. Hermann A, Gowher H, Jeltsch A (2004) Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 2571-2587.
69. Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Human molecular genetics* 9: 2395-2402.
70. Adams RLP, Hanley A, Rinaldi A (1990) DNA demethylation in erythroleukaemia cells *FEBS Letters* 269: 29-31.

71. Wolffe AP, Jones PL, Wade PA (1999) DNA demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 5894-5896.
72. Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, et al. (2001) Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 104: 829-838.
73. Jurkowski TP, Shanmugam R, Helm M, Jeltsch A (2012) Mapping the tRNA binding site on the surface of human DNMT2 methyltransferase. *Biochemistry* 51: 4438-4444.
74. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99: 247-257.
75. Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics* 33 Suppl: 245-254.
76. Kim SM, Dubey DD, Huberman JA (2003) Early-replicating heterochromatin. *Genes & development* 17: 330-335.
77. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES (2007) The mammalian epigenome. *Cell* 128: 669-681.
78. McGrath J, Solter D (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37: 179-183.
79. Lawsen KA, Dunn R, Roelen BAJ, Zeinstra LM, Davis AM, et al. (1999) Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes & development* 13: 424-436.
80. Chang DH, Calame KL (2002) The dynamic expression pattern of B lymphocyte induced maturation protein-1 (Blimp-1) during mouse embryonic development. *Mechanisms of Development* 117: 305-309.
81. Saitou M, Barton SC, Surani MA (2002) A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418: 293-300.
82. Sasaki H, Matsui Y (2008) Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nature genetics* 9: 129-140.
83. Lee J, Inoue K, Ono R, Ogonuki N, Kohda T, et al. (2002) Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development* 129: 1807-1817.
84. Tomizawa S, Nowacka-Woszek J, Kelsey G (2012) DNA methylation establishment during oocyte growth: mechanisms and significance. *The International journal of developmental biology* 56: 867-875.
85. Hayashi K, Yoshida K, Matsui Y (2005) A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* 438: 374-378.
86. Akiyama T, Nagata M, Aoki F (2006) Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 7339-7344.
87. Judson H. HBE, Sheridan E., Bonthron D.T., (2002) A global disorder of imprinting in the human female germ line. *Nature* 416.
88. El-Maarri O, Seoud M, Coullin P, Herbiniaux U, Oldenburg J, et al. (2003) Maternal alleles acquiring paternal methylation patterns in biparental complete hydatidiform moles. *Human molecular genetics* 12: 1405-1413.
89. Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.

90. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
91. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77: 51-59.
92. Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP, Falkow S (1976) Simple Agarose Gel Electrophoretic Method for the Identification and Characterization of Plasmid Deoxyribonucleic Acid. *Journal of bacteriology* 127: 1529-1537.
93. Sanger F, Nicklen S, A.R. C (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467.
94. Zhu B, Cai G, Hall E, Freeman G (2007) In-Fusion™ assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations. *BioTechniques* 43: 354-359.
95. Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246.
96. Schägger H, Cramer WA, Jagow G (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical biochemistry* 217: 220-230.
97. Fiala GJ, Schamel WWA, Blumenthal B (2011) Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) for Analysis of Multiprotein Complexes from Cellular Lysates. *Journal of Visualized Experiments* 48: e2164
98. Singer H, Nüsgen N, El-Maarri O (2011) SIRPH: An HPLC-Based SNUPE for Quantitative Methylation Measurement at Specific CpG Sites. *Epigenetics Protocols* 791: 89-100.
99. Zhang Y (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9: 40.
100. Pinheiro AS, Proell M, Eibl C, Page R, Schwarzenbacher R, et al. (2010) Three-dimensional structure of the NLRP7 pyrin domain: insight into pyrin-pyrimidated effector domain signaling in innate immunity. *The Journal of biological chemistry* 285: 27402-27410.
101. Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, Block JN, Kapral GJ, et al. (2007) MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 35: W375-383.
102. Krieger E, Koraimann G, Vriend G (2002) Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA--a self-parameterizing force field. *Proteins* 47: 393-402.
103. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, et al. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25: 1605-1612.
104. Agostini L (2004) NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*.
105. Morales R, Moreno-Gonzales I, Soto C (2013) Cross-Seeding of Misfolded Proteins: Implications for Etiology and Pathogenesis of Protein Misfolding Diseases *PLoS pathogens* 9: e1003537.
106. Johnston JA, Ward CL, Kopito RR (1998) Aggresomes: A Cellular Response to Misfolded Proteins. *The Journal of Cell Biology* 143: 1883-1898.
107. Tyedmers J, Mogk A, Bukau B (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature reviews Molecular cell biology* 11: 777-788.

108. Kolodziejska KE, Burns AR, Moore RH, Stenoien DL, Eissa NT (2005) Regulation of inducible nitric oxide synthase by aggresome formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 4854-4859.
109. Bagola K, Sommer T (2008) Protein quality control: on IPODs and other JUNQ. *Current biology* : CB 18: R1019-1021.
110. Melnick A, Carlile G, Ahmad KF, Kiang CL, Corcoran C, et al. (2002) Critical Residues within the BTB Domain of PLZF and Bcl-6 Modulate Interaction with Corepressors. *Molecular and Cellular Biology* 22: 1804-1818.
111. Suliman BA, Xu D, Williams BR (2012) The promyelocytic leukemia zinc finger protein: two decades of molecular oncology. *Frontiers in oncology* 2: 74.
112. Koken MHM, Reid A, Quignon F, Chelbi-Alix MK, Davies JM, et al. (1997) Leukemia-associated retinoic acid receptor alpha fusion partners, PML and PLZF, heterodimerize and colocalize to nuclear bodies. *Proceeding of the National Academy of Science*
113. Lamond AI, Spector DL (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nature reviews Molecular cell biology* 4: 605-612.
114. Barna M, Merghoub T, Costoya JA, Ruggero D, Branford M, et al. (2002) Plzf Mediates Transcriptional Repression of HoxD Gene Expression through Chromatin Remodeling. *Developmental Cell* 3: 499-510.
115. Albrecht M, Domingues FS, Schreiber S, Lengauer T (2003) Structural localization of disease-associated sequence variations in the NACHT and LRR domains of PYPAF1 and NOD2. *FEBS Letters* 554: 520-528.
116. Sobhanifar S (2003) Yeast Two Hybrid Assay: A Fishing Tale. *BioTeach Journal* 1.
117. Chanez-Cardenas ME, Vazquez-Contreras E (2012) The Aggregation of Huntingtin and alpha-Synuclein. *Journal of biophysics* 2012: 606172.
118. Park H, Bourla AB, Kastner DL, Colbert RA, Siegel RM (2012) Lighting the fires within: the cell biology of autoinflammatory diseases. *Nature immunology*.
119. Ozkurede VU, Franchi L (2012) Immunology in clinic review series; focus on autoinflammatory diseases: role of inflammasomes in autoinflammatory syndromes. *Clinical and experimental immunology* 167: 382-390.
120. Haseeb A, Makki MS, Haqqi TM (2014) Modulation of Ten Eleven Translocation 1 (TET1), Isocitrate Dehydrogenases (IDHs) expression, α -ketoglutarate (α -KG) and DNA hydroxymethylation levels by IL-1 β in primary human chondrocytes. *Journal of biological chemistry* 289: 6877-6885.
121. Pfeifer GP, Kadam S, Jin S (2013) 5-hydroxymethylcytosine and its potential roles in development and cancer. *Epigenetics & Chromatin* 6: 10.
122. Gu TP, Guo F, Yang H, Wu HP, Xu GF, et al. (2011) The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* 477: 606-610.
123. Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, et al. (2004) Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nature genetics* 36: 647-652.
124. Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, et al. (2004) Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nature genetics* 36: 653-659.
125. Doulatov S, Notta F, Rice KL, Howell L, Zelent A, et al. (2009) PLZF is a regulator of homeostatic and cytokine-induced myeloid development. *Genes & development* 23: 2076-2087.

126. Savage AK, Constantinides MG, Han J, Picard D, Martin E, et al. (2008) The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity* 29: 391-403.
127. Furukawa M, He YJ, Borchers C, Xiong Y (2003) Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nature cell biology* 5: 1001-1007.
128. Mathew R, Seiler MP, Scanlon ST, Mao AP, Constantinides MG, et al. (2012) BTB-ZF factors recruit the E3 ligase cullin 3 to regulate lymphoid effector programs. *Nature* 491: 618-621.
129. Xu L, Wei Y, Reboul J, Vaglio P, Shin TH, et al. (2003) BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature* 425.
130. Kim JD, Hinz AK, Choo JH, Stubbs L, Kim J (2007) YY1 as a controlling factor for the Peg3 and Gnas imprinted domains. *Genomics* 89: 262-269.
131. Yarbrough D, Wachter RM, Kallio K, Matz MV, Remington SJ (2001) Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proceeding of the National Academy of Science* 98: 462-467.
132. Terpe K (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology* 60: 523-533.
133. Holden P, Horton WA (2009) Crude subcellular fractionation of cultured mammalian cell lines. *BMC research notes* 2: 243.
134. Nanba D, Mammoto A, Hashimoto K, Higashiyama S (2003) Proteolytic release of the carboxy-terminal fragment of proHB-EGF causes nuclear export of PLZF. *The Journal of cell biology* 163: 489-502.
135. Srayko M, Buster DW, Bazirgan OA (2000) MEI-1/MEI-2 katanin-like microtubule severing activity is required for *Caenorhabditis elegans* meiosis. *Genes & Development*.
136. Dias RP, Maher ER (2013) Genes, assisted reproductive technology and trans-illumination. *Epigenomics* 5: 331-340.
137. Barrios F, Filipponi D, Campolo F, Gori M, Bramucci F, et al. (2012) SOHLH1 and SOHLH2 control Kit expression during postnatal male germ cell development. *Journal of cell science* 125: 1455-1464.
138. Filipponi D, Hobbs RM, Ottolenghi S, Rossi P, Jannini EA, et al. (2007) Repression of kit expression by Plzf in germ cells. *Molecular and cellular biology* 27: 6770-6781.
139. Rossi P (2013) Transcriptional control of KIT gene expression during germ cell development. *The International journal of developmental biology* 57: 179-184.
140. Hutt KJ, McLaughlin EA, Holland MK (2006) Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Molecular human reproduction* 12: 61-69.
141. Packer AI, Chang Hsu Y, Besmer P, Bachvarova RF (1994) The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. *Developmental Biology*.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: Blasenmole und Partialmole: Histologische Präparate im Vergleich
- Abbildung 1.2: Makroskopische Morphologie einer Blasenmole
- Abbildung 1.3: NLRP7 Proteinstruktur mit beschriebene Mutationen
- Abbildung 1.4: Domänen-Struktur der NLRP Protein-Familie
- Abbildung 1.5: Hypothetischer Aktivierungsmechanismus eines NLRP-Inflammasoms
- Abbildung 1.6: KHDC3L Proteinstruktur mit beschriebenen Mutationen und nsSNPs
- Abbildung 1.7: Zusammenfassung BiBM-assoziiertes Imprinting-Analysen
- Abbildung 2.1: Prinzip der Mutagenese-PCR
- Abbildung 2.2: Gateway-Klonierung BP-Reaktion
- Abbildung 2.3 Gateway-Klonierung LR-Reaktion
- Abbildung 2.4 Schema zum restriktionsfreiem Klonieren (Restriction free cloning)
- Abbildung 2.5 Bisulfit Konversionsreaktion
- Abbildung 2.6 Bisulfitkonversion genomischer DNA
- Abbildung 2.7 Zwei-dimensionale BN-PAGE/SDS-PAGE
- Abbildung 2.8 Pyrosequenzier-Reaktionskaskade
- Abbildung 2.9 Pyrogramm
- Abbildung 2.10 Puffergradient der HPLC
- Abbildung 2.11 HPLC-Absorptionsdiagramm
- Abbildung 3.1: NLRP7-Konstrukte für die Hefe Di-Hybrid Analyse
- Abbildung 3.2: Interdomän-spezifische Hefe Di-Hybrid Analyse von NLRP7
- Abbildung 3.3: Positiv- und Negativkontrollen für die interdomän-spezifische Hefe Di-Hybrid Analyse
- Abbildung 3.4: Hefe Di-Hybrid Interaktionsanalyse BiBM-assoziiertes NLRP7 Mutationen
- Abbildung 3.5: Verifizierung der Interdomän-spezifischen Interaktionen von NLRP7 mittels Immunopräzipitation
- Abbildung 3.6: *In silico* Modell des nicht-aktivierten und aktivierten NLRP7-Proteins

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 3.7: *In silico* Modell eines NLRP7 Oligomers
- Abbildung 3.8: *In silico* Modell der NAD Domäne vor und nach Aktivierung von NLRP7
- Abbildung 3.9: Kolokalisations-Analysen von NLRP7 mit Aggresom-spezifischen Zellmarkern
- Abbildung 3.10: BiBM-assozierte Mutationen und ihr Einfluss auf die Aggresom-Formation
- Abbildung 3.11: *In silico* Analyse BiBM-assoziierter *NLRP7*-Mutationen
- Abbildung 3.12: Hefe Di-Hybrid Analysen von NLRP7 gegen eine ovarielle Transkriptbibliothek.
- Abbildung 3.13: Hefe Di-Hybrid Interaktions-Analyse zwischen ZBTB16 und verschiedenen NLRP7-Konstrukten
- Abbildung 3.14: Hefe Di-Hybrid Interaktions-Analyse von KHDC3L gegen verschiedenen NLRP7-Konstrukte
- Abbildung 3.15: Hefe Di-Hybrid Interaktions-Analyse zwischen ZBTB16 und vier BiBM-assozierten NLRP7-Mutationen
- Abbildung 3.16: Verifizierung der Hefe Di-Hybrid Interaktion von NLRP7 und ZBTB16 mittels Immunopräzipitation
- Abbildung 3.17: Positiv und Negativkontrollen der Flag-Immunopräzipitation
- Abbildung 3.18: Identifizierung der interagierenden Regionen zwischen NLRP7 und ZBTB16 mittels Immunopräzipitation
- Abbildung 3.19: Flag-Immunopräzipitation der Myc-markierten ZBTB16 Deletionskonstrukte
- Abbildung 3.20: Immunopräzipitationsanalysen der zwischen NLRP7, ZBTB16_del1-5 und KHDC3L (Vollständige Daten)
- Abbildung 3.21: Native Gelelektrophorese von NLRP7 und ZBTB16
- Abbildung 3.22: Kolokalisation von NLRP7 und ZBTB16 in juxt nukleären Aggregaten
- Abbildung 3.23: Kolokalisation von EGFP-NLRP7 und ZBTB16-DsRed2 in nukleären Speckles
- Abbildung 3.24: Zelluläre Verteilung des EGFP
- Abbildung 3.25: Kolokalisationsanalysen von EGFP mit ZBTB16-DsRed2
- Abbildung 3.26: Kolokalisationsanalysen von Flag-NLRP7 und ZBTB16-DsRed2
- Abbildung 3.27: Kolokalisationsanalysen von Flag-NLRP7 und EGFP-ZBTB16

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 3.28: Zytoplasmatische Kolokalisation von EGFP-NLRP7 mit dem endogenen ZBTB16
- Abbildung 3.29: Kolokalisationsanalysen von EGFP-NLRP7 mit KHDC3L-DsRed2
- Abbildung 3.30: SIRPH-Analysen der paternal methylierten Imprinting-Loci H19 und NESP55
- Abbildung 3.31: SIRPH-Analysen der maternal methylierten Imprinting-Loci PEG3 und SNRPN
- Abbildung 3.32: Pyrosequenzierung der paternal und maternal methylierten Imprinting-Loci
- Abbildung 4.1 Skizze eines hypothetischen Modells der NLRP7-Aktivierung und Oligomerisierung

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| % | Prozent |
| Abb. | Abbildung |
| Amp. | Ampicillin |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaar |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| cDNA | copy/ complementary DNA |
| CpG | Dinukleotid bestehend aus Cytidin, Phosphatbindung und Guanotin |
| C-terminal | Carboxy-terminal |
| dest. | destillatus |
| d. h. | das heißt |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxy NTP |
| ddNTP | Didesoxy NTP |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| et al. | et altera |
| g | Gramm |
| g | Erdbeschleunigung 9,81 m/s ² |
| h, min, s, d | Stunde, Minute, Sekunde, Tag |
| inkl. | inklusive |
| kD | Kilodalton |
| l | Liter |
| M | Molar, mol pro Liter |
| m, µ, n, p | milli-, mikro-, nano-, pico- |
| mRNA | Messenger RNA |
| N-terminal | Amino-terminal |
| NTP | Nukleotidtriphosphat |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| pH | pH = -log[H ⁺] |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | revolutions per minute (U/min) |
| RT | Raumtemperatur ~25 °C |
| ü.N. | über Nacht |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | volumen per volume |
| w/v | weight per volumen |
| z.B. | zum Beispiel |

Aminosäurencode

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

Anhang

A.1 Tabellen

| Sichtfelder (40er Objektiv) | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | Total | |
|-----------------------------|-------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|------|
| NLRP7wt | Exp-1 | Cells (total) | 159 | 286 | 331 | 359 | 280 | 241 | 1656 |
| | | large Aggresome | 20 | 9 | 9 | 10 | 14 | 15 | 77 |
| | | enriched at MTOC | 1 | 3 | 2 | 5 | 5 | 3 | 19 |
| | | diffusly distributed | 7 | 21 | 31 | 26 | 39 | 48 | 172 |
| | Exp-2 | Cells (total) | 212 | 293 | 293 | 281 | | | 1079 |
| | | large Aggresome | 20 | 10 | 11 | 10 | | | 51 |
| | | enriched at MTOC | 2 | 5 | 4 | 2 | | | 13 |
| | | diffusly distributed | 29 | 28 | 19 | 24 | | | 100 |
| | Exp-3 | Cells (total) | 293 | 386 | 329 | 278 | | | 1286 |
| | | large Aggresome | 18 | 23 | 14 | 17 | | | 72 |
| | | enriched at MTOC | 3 | 4 | 5 | 4 | | | 16 |
| | | diffusly distributed | 36 | 48 | 37 | 32 | | | 153 |

| Sichtfelder (40er Objektiv) | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | / | Total | |
|-------------------------------|-------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|------|
| NLRP7 L398R (NACHT-Domain) | Exp-1 | Cells (total) | 260 | 268 | 278 | 270 | 249 | | 1325 |
| | | large Aggresome | 20 | 37 | 16 | 29 | 28 | | 130 |
| | | enriched at MTOC | 5 | 2 | 5 | 1 | 4 | | 17 |
| | | diffusly distributed | 20 | 34 | 17 | 26 | 17 | | 114 |
| | Exp-2 | Cells (total) | 215 | 216 | 363 | 160 | | | 954 |
| | | large Aggresome | 27 | 15 | 22 | 17 | | | 81 |
| | | enriched at MTOC | 5 | 3 | 3 | 2 | | | 13 |
| | | diffusly distributed | 17 | 10 | 18 | 12 | | | 57 |
| | Exp-3 | Cells (total) | 257 | 200 | 202 | | | | 659 |
| | | large Aggresome | 13 | 18 | 15 | | | | 46 |
| | | enriched at MTOC | 2 | 1 | 4 | | | | 7 |
| | | diffusly distributed | 23 | 13 | 12 | | | | 48 |

| Sichtfelder (40er Objektiv) | | 1 | 2 | 3 | 4 | / | / | Total | |
|-----------------------------|-------|----------------------|-----|-----|-----|-----|---|-------|------|
| NLRP7 K511R (NAD-Domain) | Exp-1 | Cells (total) | 281 | 305 | 285 | | | | 871 |
| | | large Aggresome | 17 | 13 | 10 | | | | 40 |
| | | enriched at MTOC | 3 | 3 | 5 | | | | 11 |
| | | diffusly distributed | 56 | 57 | 40 | | | | 153 |
| | Exp-2 | Cells (total) | 321 | 332 | 320 | | | | 973 |
| | | large Aggresome | 7 | 14 | 14 | | | | 35 |
| | | enriched at MTOC | 3 | 5 | 5 | | | | 13 |
| | | diffusly distributed | 52 | 46 | 41 | | | | 139 |
| | Exp-3 | Cells (total) | 352 | 266 | 331 | 309 | | | 1258 |
| | | large Aggresome | 11 | 10 | 19 | 20 | | | 60 |
| | | enriched at MTOC | 7 | 2 | 3 | 5 | | | 17 |
| | | diffusly distributed | 58 | 51 | 53 | 56 | | | 218 |

| Sichtfelder (40er Objektiv) | | 1 | 2 | 3 | / | / | / | Total | |
|-----------------------------|-------|----------------------|-----|-----|-----|---|---|-------|-----|
| NLRP7 R693P (LRR-Domain) | Exp-1 | Cells (total) | 217 | 307 | 326 | | | | 850 |
| | | large Aggresome | 11 | 19 | 20 | | | | 50 |
| | | enriched at MTOC | 4 | 2 | 4 | | | | 10 |
| | | diffusly distributed | 16 | 33 | 21 | | | | 70 |
| | Exp-2 | Cells (total) | 251 | 324 | 322 | | | | 897 |
| | | large Aggresome | 12 | 17 | 18 | | | | 47 |
| | | enriched at MTOC | 3 | 6 | 3 | | | | 12 |
| | | diffusly distributed | 20 | 37 | 34 | | | | 91 |
| | Exp-3 | Cells (total) | 309 | 280 | 287 | | | | 876 |
| | | large Aggresome | 17 | 22 | 12 | | | | 51 |
| | | enriched at MTOC | 5 | 4 | 4 | | | | 13 |
| | | diffusly distributed | 26 | 25 | 31 | | | | 82 |

| Sichtfelder (40er Objektiv) | | 1 | 2 | 3 | 4 | / | / | Total | |
|-----------------------------|-------|----------------------|-----|-----|-----|-----|---|-------|------|
| NLRP7 R693W (LRR-Domain) | Exp-1 | Cells (total) | 255 | 206 | 263 | 333 | | | 1057 |
| | | large Aggresome | 26 | 33 | 32 | 17 | | | 108 |
| | | enriched at MTOC | 4 | 5 | 4 | 7 | | | 20 |
| | | diffusly distributed | 18 | 14 | 16 | 14 | | | 62 |
| | Exp-2 | Cells (total) | 222 | 308 | 248 | | | | 778 |
| | | large Aggresome | 14 | 20 | 24 | | | | 58 |
| | | enriched at MTOC | 4 | 5 | 8 | | | | 17 |
| | | diffusly distributed | 19 | 13 | 10 | | | | 42 |
| | Exp-3 | Cells (total) | 389 | 368 | 310 | | | | 1067 |
| | | large Aggresome | 15 | 20 | 25 | | | | 60 |
| | | enriched at MTOC | 3 | 3 | 1 | | | | 7 |
| | | diffusly distributed | 19 | 14 | 15 | | | | 48 |

Tab. A.1a: Zellzählung und Auswertung der Aggresom-Formation

Anhang

| Exp 1 counted cells | | NLRP7wt | L398R | K511R | R693P | R693W |
|---------------------------|-----------------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | diffusely distributed | 172 | 114 | 153 | 70 | 62 |
| | enriched at MTOC | 19 | 17 | 11 | 10 | 20 |
| | large Aggresome | 77 | 130 | 40 | 50 | 108 |
| | Cells total | 1656 | 1325 | 871 | 850 | 1057 |

| Exp 2 counted cells | | NLRP7wt | L398R | K511R | R693P | R693W |
|---------------------------|-----------------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | diffusely distributed | 100 | 57 | 139 | 91 | 42 |
| | enriched at MTOC | 13 | 13 | 13 | 12 | 17 |
| | large Aggresome | 51 | 81 | 35 | 47 | 58 |
| | Cells total | 1079 | 954 | 973 | 897 | 778 |

| Exp 3 counted cells | | NLRP7wt | L398R | K511R | R693P | R693W |
|---------------------------|-----------------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | diffusely distributed | 153 | 48 | 218 | 82 | 48 |
| | enriched at MTOC | 16 | 7 | 17 | 13 | 7 |
| | large Aggresome | 72 | 46 | 60 | 51 | 60 |
| | Cells total | 1286 | 659 | 1258 | 876 | 1067 |

| Exp 1 in % | | NLRP7wt | L398R | K511R | R693P | R693W |
|---------------|-----------------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | diffusely distributed | 64 | 44 | 75 | 54 | 33 |
| | enriched at MTOC | 7 | 6 | 5 | 8 | 10 |
| | large Aggresome | 29 | 50 | 20 | 38 | 57 |

| Exp 2 in % | | NLRP7wt | L398R | K511R | R693P | R693W |
|---------------|-----------------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | diffusely distributed | 61 | 38 | 74 | 61 | 36 |
| | enriched at MTOC | 8 | 8 | 7 | 8 | 14 |
| | large Aggresome | 31 | 54 | 19 | 31 | 50 |

| Exp 3 in % | | NLRP7wt | L398R | K511R | R693P | R693W |
|---------------|-----------------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | diffusely distributed | 63 | 47 | 74 | 56 | 42 |
| | enriched at MTOC | 7 | 7 | 6 | 9 | 6 |
| | large Aggresome | 30 | 46 | 20 | 35 | 52 |

Tab. A.1b Summe der gezählten Zellen mit Aggresom-Formation.

Anhang

| H19 SIRPH (SN1) Average | | | | | H19 (SN1) | |
|-------------------------|----|----|----|---------|-------------|----|
| Transfektion | 1 | 2 | 3 | Average | Bis-Contr.1 | 45 |
| HEK | 53 | 55 | 53 | 54 | Bis-Contr.2 | 45 |
| NLRP7 | 52 | 53 | 52 | 53 | Bis-Contr.3 | 45 |
| ZBTB16 | 54 | 55 | 53 | 54 | Bis-Contr.4 | 46 |
| L398R | 53 | 52 | 54 | 53 | Bis-Contr.5 | 46 |
| K511R | 54 | 54 | 53 | 54 | Bis-Contr.6 | 45 |
| R693P | 53 | 53 | 53 | 53 | Run-Contr.1 | 48 |
| R693W | 53 | 53 | 54 | 54 | Run-Contr.2 | 48 |
| ZBTB16+ NLRP7 wt | 54 | 54 | 53 | 54 | Run-Contr.3 | 48 |
| ZBTB16 + L398R | 53 | 54 | 54 | 53 | Run-Contr.4 | 49 |
| ZBTB16 + K511R | 53 | 54 | 54 | 54 | Run-Contr.5 | 48 |
| ZBTB16 + R693P | 52 | 54 | 53 | 53 | Run-Contr.6 | 49 |
| ZBTB16 + R693W | 54 | 53 | 53 | 54 | | |

| NESP55 SIRPH (SN1) Average | | | | | Nesp55 (SN1) | |
|----------------------------|----|----|----|---------|--------------|----|
| Transfektion | 1 | 2 | 3 | Average | Bis-Contr.1 | 52 |
| HEK | 70 | 70 | 71 | 70 | Bis-Contr.2 | 58 |
| NLRP7 | 69 | 70 | 59 | 66 | Bis-Contr.3 | 55 |
| ZBTB16 | 72 | 69 | 75 | 72 | Bis-Contr.4 | 50 |
| L398R | 81 | 69 | 69 | 73 | Bis-Contr.5 | 50 |
| K511R | 72 | 76 | 73 | 73 | Bis-Contr.6 | 51 |
| R693P | 73 | 73 | 72 | 73 | Run-Contr.1 | 47 |
| R693W | 72 | 77 | 79 | 76 | Run-Contr.2 | 47 |
| ZBTB16+ NLRP7 wt | 76 | 64 | 66 | 69 | Run-Contr.3 | 47 |
| ZBTB16 + L398R | 66 | 72 | 75 | 71 | Run-Contr.4 | 47 |
| ZBTB16 + K511R | 72 | 77 | 73 | 74 | Run-Contr.5 | 47 |
| ZBTB16 + R693P | 80 | 68 | 66 | 71 | Run-Contr.6 | 47 |
| ZBTB16 + R693W | 74 | 87 | 64 | 75 | | |

| NESP55 SIRPH (SN4) Average | | | | | Nesp55 (SN4) | |
|----------------------------|----|----|----|---------|--------------|----|
| Transfektion | 1 | 2 | 3 | Average | Bis-Contr.1 | 51 |
| HEK | 86 | 87 | 87 | 87 | Bis-Contr.2 | 57 |
| NLRP7 | 87 | 88 | 82 | 86 | Bis-Contr.3 | 53 |
| ZBTB16 | 89 | 90 | 89 | 89 | Bis-Contr.4 | 51 |
| L398R | 86 | 88 | 91 | 88 | Bis-Contr.5 | 47 |
| K511R | 89 | 86 | 91 | 89 | Bis-Contr.6 | 49 |
| R693P | 89 | 87 | 82 | 86 | Run-Contr.1 | 44 |
| R693W | 85 | 91 | 86 | 87 | Run-Contr.2 | 45 |
| ZBTB16+ NLRP7 wt | 85 | 88 | 84 | 86 | Run-Contr.3 | 44 |
| ZBTB16 + L398R | 86 | 88 | 91 | 88 | Run-Contr.4 | 45 |
| ZBTB16 + K511R | 85 | 86 | 91 | 87 | Run-Contr.5 | 45 |
| ZBTB16 + R693P | 85 | 86 | 89 | 87 | Run-Contr.6 | 45 |
| ZBTB16 + R693W | 88 | 87 | 83 | 86 | | |

| PEG3 SIRPH (SN1) Average | | | | | PEG3 (SN1) | |
|--------------------------|----|----|----|---------|-------------|----|
| Transfektion | 1 | 2 | 3 | Average | Bis-Contr.1 | 39 |
| HEK | 93 | 90 | 92 | 91 | Bis-Contr.2 | 41 |
| NLRP7 | 82 | 76 | 88 | 82 | Bis-Contr.3 | 41 |
| ZBTB16 | 87 | 93 | 92 | 91 | Bis-Contr.4 | 41 |
| L398R | 92 | 93 | 84 | 89 | Bis-Contr.5 | 46 |
| K511R | 83 | 92 | 88 | 88 | Bis-Contr.6 | 42 |
| R693P | 92 | 93 | 93 | 93 | Run-Contr.1 | 46 |
| R693W | 90 | 93 | 92 | 92 | Run-Contr.2 | 46 |
| ZBTB16+ NLRP7 wt | 93 | 75 | 91 | 86 | Run-Contr.3 | 46 |
| ZBTB16 + L398R | 84 | 91 | 90 | 88 | Run-Contr.4 | 46 |
| ZBTB16 + K511R | 94 | 93 | 92 | 93 | Run-Contr.5 | 46 |
| ZBTB16 + R693P | 93 | 92 | 92 | 92 | Run-Contr.6 | 49 |
| ZBTB16 + R693W | 88 | 72 | 92 | 84 | | |

| SNRPN SIRPH (SN6) Average | | | | | SNRPN (SN6) | |
|---------------------------|----|----|----|---------|-------------|----|
| Transfektion | 1 | 2 | 3 | Average | Bis-Contr.1 | 49 |
| HEK | 82 | 85 | 91 | 86 | Bis-Contr.2 | 51 |
| NLRP7 | 88 | 86 | 68 | 80 | Bis-Contr.3 | 52 |
| ZBTB16 | 89 | 91 | 85 | 89 | Bis-Contr.4 | 54 |
| L398R | 87 | 89 | 89 | 88 | Bis-Contr.5 | 53 |
| K511R | 85 | 82 | 91 | 86 | Bis-Contr.6 | 56 |
| R693P | 78 | 87 | 87 | 84 | Run-Contr.1 | 63 |
| R693W | 85 | 52 | 56 | 65 | Run-Contr.2 | 62 |
| ZBTB16+ NLRP7 wt | 93 | 75 | 87 | 85 | Run-Contr.3 | 62 |
| ZBTB16 + L398R | 89 | 85 | 84 | 86 | Run-Contr.4 | 62 |
| ZBTB16 + K511R | 85 | 85 | 62 | 77 | Run-Contr.5 | 62 |
| ZBTB16 + R693P | 76 | 83 | 90 | 83 | Run-Contr.6 | 61 |
| ZBTB16 + R693W | 83 | 83 | 74 | 80 | | |

Tab. A.1c: SIRPH-Analysen maternal und paternal methylierter Imprinting-Loci.

Anhang

| H19 PYRO (SN 1) Average CpG 1-5 | | | | | | |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | NLRP7 | R693P | R693W | MYC | HEK | Bis-Contr |
| 1 | 43 | 42 | 44 | 39 | 43 | 40 |
| 2 | 43 | 44 | 43 | 43 | 43 | 41 |
| 3 | 43 | 42 | 42 | 41 | 42 | 40 |
| 4 | 43 | 44 | 42 | 42 | 42 | 40 |
| 5 | 43 | 42 | 42 | 42 | 42 | 41 |
| 6 | 43 | 44 | 42 | 42 | 41 | 41 |
| 7 | 43 | 41 | 43 | 40 | 41 | 39 |
| 8 | 42 | 42 | 41 | 40 | 43 | 40 |
| 9 | 44 | 42 | 41 | 42 | 42 | 40 |
| 10 | 43 | 42 | 42 | 42 | 43 | 41 |
| Average | 43 | 42 | 42 | 41 | 42 | 40 |

| NESP55 PYRO (SN 1) Average CpG 1-5 | | | | | | |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | NLRP7 | R693P | R693W | MYC | HEK | Bis-Contr |
| 1 | 77 | 83 | 76 | 86 | 77 | 50 |
| 2 | 85 | 89 | 89 | 83 | 88 | 47 |
| 3 | 87 | 89 | 77 | 86 | 88 | 46 |
| 4 | | 86 | 88 | 90 | 83 | 49 |
| 5 | 86 | 88 | 85 | 92 | 82 | 48 |
| 6 | | 93 | 90 | 87 | 86 | 51 |
| 7 | 82 | | 81 | 86 | 89 | 51 |
| 8 | | | 89 | 86 | | 51 |
| 9 | 86 | 88 | 90 | 86 | 85 | 47 |
| 10 | | 85 | 84 | 84 | | 55 |
| Average | 84 | 88 | 85 | 87 | 85 | 49 |

| PEG3 PYRO (SN 1) Average CpG 1-5 | | | | | | |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | NLRP7 | R693P | R693W | MYC | HEK | Bis-Contr |
| 1 | 96 | 97 | 94 | 96 | 96 | 44 |
| 2 | 95 | 96 | 96 | 95 | 95 | 48 |
| 3 | 96 | 96 | 96 | 96 | 96 | 52 |
| 4 | | 93 | 91 | 96 | 96 | 48 |
| 5 | 96 | 96 | 96 | 96 | 95 | 44 |
| 6 | 96 | 96 | | 97 | 94 | 46 |
| 7 | 90 | 95 | 96 | 95 | 95 | 45 |
| 8 | 87 | 97 | 94 | 95 | 96 | 45 |
| 9 | 93 | 96 | 95 | 95 | 88 | 48 |
| 10 | 94 | 96 | 96 | 96 | 96 | 46 |
| Average | 94 | 96 | 95 | 96 | 95 | 47 |

| SNRPN PYRO (SN 0) Average CpG 1-5 | | | | | | |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | NLRP7 | R693P | R693W | MYC | HEK | Bis-Contr |
| 1 | 76 | 76 | 78 | 74 | 76 | 37 |
| 2 | 75 | 47 | 70 | 82 | 78 | 43 |
| 3 | 82 | 75 | 50 | 74 | 74 | 43 |
| 4 | 70 | 77 | 76 | 75 | 83 | 50 |
| 5 | 68 | 86 | 80 | 80 | 76 | 43 |
| 6 | 72 | 71 | 79 | 77 | 82 | 48 |
| 7 | 59 | 85 | 89 | 68 | 78 | 37 |
| 8 | 80 | 87 | 71 | 73 | 66 | 47 |
| 9 | 84 | 74 | 78 | 83 | 79 | 43 |
| 10 | 71 | 84 | 86 | 52 | 75 | 43 |
| Average | 74 | 76 | 76 | 74 | 77 | 43 |

Tab. A.1d: Pyrosequenzier-Daten maternal und paternal methylierter Imprinting-Loci.

A.2 Primersequenzen

Hefe-Di-Hybrid (Gateway-Primer):

Die vektorspezifische Sequenz ist in Kleinbuchstaben und die insertspezifische Sequenz ist in Großbuchstaben dargestellt.

| Bezeichnung | Sequenz 5´ - 3´ | Verwendung |
|-----------------|--|---|
| attB-NLRP7-F | gggg aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc ttt- ATG ACA TCG CCC CAG CTA | <i>NLRP7</i> in pDONR (AS 1-1037) |
| attB-NLRP7-R | gggg ac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtt- GCA AAA AAA GTC ACA GCA | <i>NLRP7</i> in pDONR (AS 1-1037) |
| attB-PYD-F | gggg aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc ttt- ATG ACA TCG CCC CAG CTA | <i>NLRP7</i> -PYD in pDONR (AS 1-171) |
| attB-PYD-R | gggg ac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtt- GCG GCT GAG CTC CTT GCA | <i>NLRP7</i> -PYD in pDONR (AS 172-501) |
| attB-NACHT-F | gggg aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc ttt- TAC ACG GTG GTG CTG CAC | <i>NLRP7</i> -NACHT in pDONR (AS 172-501) |
| attB-NACHT-R | gggg ac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtt- CTG TAC GTC CCC GAT GTC | <i>NLRP7</i> -NACHT in pDONR (AS 172-501) |
| attB-NAD-F | gggg aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc ttt- AAG CTG CTT TCC GGA GAA | <i>NLRP7</i> -NAD in pDONR (AS 502-623) |
| attB-NAD-R | gggg ac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtt- CTG CAG TGA GAG TTT CTG | <i>NLRP7</i> -NAD in pDONR (AS 502-623) |
| attB-LRR-F | gggg aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc ttt- GTA GCA AAG GGG GTG TTC | <i>NLRP7</i> -LRR in pDONR (AS 624-1037) |
| attB-LRR-R | gggg ac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtt- GCA AAA AAA GTC ACA GCA | <i>NLRP7</i> -LRR in pDONR (AS 624-1037) |
| attB-ΔNAD/LRR-F | gggg aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc ttt- ATG ACA TCG CCC CAG CTA | <i>NLRP7</i> -ΔNAD/LRR in pDONR (AS 1-501) |
| attB-ΔNAD/LRR-R | gggg ac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtt- CTG TAC GTC CCC GAT GTC | <i>NLRP7</i> -ΔNAD/LRR in pDONR (AS 1-501) |
| attB-ΔLRR-F | gggg aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc ttt- ATG ACA TCG CCC CAG CTA | <i>NLRP7</i> -ΔLRR in pDONR (AS 1-623) |
| attB-ΔLRR-R | gggg ac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtt- CTG CAG TGA GAG TTT CTG | <i>NLRP7</i> -ΔLRR in pDONR (AS 1-623) |
| attB-ΔPYD/LRR-F | gggg aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc ttt- TAC ACG GTG GTG CTG CAC | <i>NLRP7</i> -ΔPYD/LRR in pDONR (AS 172-623) |
| attB-ΔPYD/LRR-R | gggg ac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtt- CTG CAG TGA GAG TTT CTG | <i>NLRP7</i> -ΔPYD/LRR in pDONR (AS 172-623) |
| attB-ΔPYD-F | gggg aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc ttt- TAC ACG GTG GTG CTG CAC | <i>NLRP7</i> -ΔPYD in pDONR (AS 172-1037) |

Anhang

| | | |
|---------------|--|--|
| attB-ΔPYD-R | gggg ac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtt- GCA AAA AAA GTC ACA GCA | <i>NLRP7</i> -ΔPYD in pDONR (AS 172-1037) |
| attB-ΔNACHT-F | gggg aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc ttt- ATG ACA TCG CCC CAG CTA | <i>NLRP7</i> -ΔNACHT in pDONR (AS 1-171_492-1037) |
| attB-ΔNACHT-R | gggg ac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtt- GCA AAA AAA GTC ACA GCA | <i>NLRP7</i> -ΔNACHT in pDONR (AS 1-171_492-1037) |
| attB-ZBTB16-F | gggg aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc ttt- ATG GAT CTG ACA AAA ATG | <i>ZBTB16</i> in pDONR (AS 1-673) |
| attB-ZBTB16-R | gggg ac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtt- CAC ATA GCA CAG GTA GAG | <i>ZBTB16</i> in pDONR (AS 1-673) |
| attB-KHDC3L-F | gggg aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc ttt- ATG GAC GCT CCC AGG CGG | <i>KHDC3L</i> in pDONR (AS 1-) |
| attB-KHDC3L-R | gggg ac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtt- TAA TCT AGT AAC TGG GTC | <i>KHDC3L</i> in pDONR (AS 1-) |

Immunopräzipitation (Megaprimer):

Die vektorspezifische Sequenz ist in Kleinbuchstaben und die insertspezifische Sequenz ist in Großbuchstaben dargestellt.

Zusätzlich eingefügte Start- und Stopcodons sind hervorgehoben.

| Bezeichnung | Sequenz 5´- 3´ | Verwendung |
|--------------|---|--|
| Flag-NLRP7-F | gac tac aaa gac gac gat gac aag ggt acc-ATG ACA TCG CCC CAG CTA GA | <i>NLRP7</i> in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 1-1037) |
| Flag-NLRP7-R | gcg ggt tta aac ggg ccc tct aga ctc gag- TCA GCA AAA AAA GTC ACA GC | <i>NLRP7</i> in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 1-1037) |
| Flag-PYD-F | gac tac aaa gac gac gat gac aag ggt acc- ATG ACA TCG CCC CAG CTA GA | <i>NLRP7</i> -PYD in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 1-171) |
| Flag-PYD-R | gcg ggt tta aac ggg ccc tct aga ctc gag- TCA AGG TGT TAG CTT CCT GG | <i>NLRP7</i> -PYD in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 172-501) |
| Flag-NACHT-F | gac tac aaa gac gac gat gac aag ggt acc-TAC ACG GTG GTG CTG CAC GG | <i>NLRP7</i> -NACHT in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 172-501) |
| Flag-NACHT-R | gcg ggt tta aac ggg ccc tct aga ctc gag- TCA CTG TAC GTC CCC GAT GT | <i>NLRP7</i> -NACHT in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 172-501) |
| Flag-NAD-F | gac tac aaa gac gac gat gac aag ggt acc-AAG CTG CTT TCC GGA GAA GA | <i>NLRP7</i> -NAD in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 502-623) |
| Flag-NAD-R | gcg ggt tta aac ggg ccc tct aga ctc gag- TCA CTG CAG TGA GAG TTT CT | <i>NLRP7</i> -NAD in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 502-623) |
| Flag-LRR-F | gac tac aaa gac gac gat gac aag ggt acc-GTA GCA AAG GGG GTG TTC CT | <i>NLRP7</i> -LRR in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 624-1037) |
| Flag-LRR-R | gcg ggt tta aac ggg ccc tct aga ctc gag- TCA GCA AAA AAA GTC ACA GC | <i>NLRP7</i> -LRR in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 624-1037) |

Anhang

| | | |
|--------------------------|--|--|
| Flag- Δ NAD/LRR-F | gac tac aaa gac gac gat gac aag ggt acc-ATG ACA TCG CCC CAG CTA GA | <i>NLRP7-ΔNAD/LRR</i> in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 1-501) |
| Flag- Δ NAD/LRR-R | gcg ggt tta aac ggg ccc tct aga ctc gag- TCA CTG TAC GTC CCC GAT GT | <i>NLRP7-ΔNAD/LRR</i> in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 1-501) |
| Flag- Δ LRR-F | gac tac aaa gac gac gat gac aag ggt acc-ATG ACA TCG CCC CAG CTA GA | <i>NLRP7-ΔLRR</i> in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 1-623) |
| Flag- Δ LRR-R | gcg ggt tta aac ggg ccc tct aga ctc gag- TCA CTG CAG TGA GAG TTT CT | <i>NLRP7-ΔLRR</i> in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 1-623) |
| Flag- Δ PYD/LRR-F | gac tac aaa gac gac gat gac aag ggt acc-TAC ACG GTG GTG CTG CAC GG | <i>NLRP7-ΔPYD/LRR</i> in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 172-623) |
| Flag- Δ PYD/LRR-R | gcg ggt tta aac ggg ccc tct aga ctc gag- TCA CTG CAG TGA GAG TTT CT | <i>NLRP7-ΔPYD/LRR</i> in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 172-623) |
| Flag- Δ PYD-F | gac tac aaa gac gac gat gac aag ggt acc-TAC ACG GTG GTG CTG CAC GG | <i>NLRP7-ΔPYD</i> in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 172-1037) |
| Flag- Δ PYD-R | gcg ggt tta aac ggg ccc tct aga ctc gag- TCA GCA AAA AAA GTC ACA GC | <i>NLRP7-ΔPYD</i> in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 172-1037) |
| Flag- Δ NACHT-F | gac tac aaa gac gac gat gac aag ggt acc-ATG ACA TCG CCC CAG CTA GA | <i>NLRP7-ΔNACHT</i> in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 1-171_492-1037) |
| Flag- Δ NACHT-R | gcg ggt tta aac ggg ccc tct aga ctc gag- TCA GCA AAA AAA GTC ACA GC | <i>NLRP7-ΔNACHT</i> in pcDNA3.1- <i>flag</i> (AS 1-171_492-1037) |
| MYC-ZBTB16-F | aag ctt ggt acc gag ctc gga tcc act agt- ATG GAT CTG ACA AAA ATG GG | <i>ZBTB16</i> in pcDNA3.1-myc (AS 1-673) |
| MYC-ZBTB16-R | gcc ctc tag act cga gcg gcc gcc act gtg- CAC ATA GCA CAG GTA GAG GT | <i>ZBTB16</i> in pcDNA3.1-myc (AS 1-673) |
| MYC-ZBTB16_del1-F | aag ctt ggt acc gag ctc gga tcc act agt- ATG GAT CTG ACA AAA ATG GG | <i>ZBTB16_del1</i> in pcDNA3.1-myc (AS 1-164) |
| MYC-ZBTB16_del1-R | gcc ctc tag act cga gcg gcc gcc act gtg- CTC CTC GCT GGA ATG CTT CG | <i>ZBTB16_del1</i> in pcDNA3.1-myc (AS 1-164) |
| MYC-ZBTB16_del2-F | aag ctt ggt acc gag ctc gga tcc act agt- ATG AAG ATG CTG GAG ACC ATC | <i>ZBTB16_del2</i> in pcDNA3.1-myc (AS 120-483) |
| MYC-ZBTB16_del2-R | gcc ctc tag act cga gcg gcc gcc act gtg- ATG GGT CTG CCT GTG TGT CC | <i>ZBTB16_del2</i> in pcDNA3.1-myc (AS 120-483) |
| MYC-ZBTB16_del3-F | aag ctt ggt acc gag ctc gga tcc act agt- ATG GGA GAG CAG TGC AGC GTG | <i>ZBTB16_del3</i> in pcDNA3.1-myc (AS 403-673) |
| MYC-ZBTB16_del3-R | gcc ctc tag act cga gcg gcc gcc act gtg- CAC ATA GCA CAG GTA GAG GT | <i>ZBTB16_del3</i> in pcDNA3.1-myc (AS 403-673) |
| MYC-ZBTB16_del4-F | aag ctt ggt acc gag ctc gga tcc act agt- ATG GGG GAC AAG GTT GAG GA | <i>ZBTB16_del4</i> in pcDNA3.1-myc (AS 268-673) |
| MYC-ZBTB16_del4-R | gcc ctc tag act cga gcg gcc gcc act gtg- CAC ATA GCA CAG GTA GAG GT | <i>ZBTB16_del4</i> in pcDNA3.1-myc (AS 268-673) |
| MYC-ZBTB16_del5-F | aag ctt ggt acc gag ctc gga tcc act agt- ATG CCG ACT CGA AGC AGC GT | <i>ZBTB16_del5</i> in pcDNA3.1-myc (AS 283-489) |
| MYC-ZBTB16_del5-R | gcc ctc tag act cga gcg gcc gcc act gtg- GGC CAT GTC AGT GCC AGT AT | <i>ZBTB16_del5</i> in pcDNA3.1-myc (AS 283-489) |

Anhang

| | | |
|--------------|--|--|
| MYC-KHDC3L-F | aag ctt ggt acc gag ctc gga tcc act agt- ATG GAC GCT CCC AGG CGG | <i>KHDC3L</i> in pcDNA3.1- <i>myc</i> (AS 1-217) |
| MYC-KHDC3L-R | gcc ctc tag act cga gcg gcc gcc act gtg- TAA TCT AGT AAC TGG GTC | <i>KHDC3L</i> in pcDNA3.1- <i>myc</i> (AS 1-217) |
| MYC-NLRP7-F | aag ctt ggt acc gag ctc gga tcc act agt- ATG ACA TCG CCC CAG CTA GA | <i>NLRP7</i> in pcDNA3.1- <i>myc</i> (AS 1-1037) |
| MYC-NLRP7-R | gcc ctc tag act cga gcg gcc gcc act gtg- GCA AAA AAA GTC ACA GCA CG | <i>NLRP7</i> in pcDNA3.1- <i>myc</i> (AS 1-1037) |
| MYC-NAD-F | aag ctt ggt acc gag ctc gga tcc act agt- ATG AAG CTG CTT TCC GGA GAA | <i>NLRP7-NAD</i> in pcDNA3.1- <i>myc</i> (AS 502-623) |
| MYC-NAD-R | gcc ctc tag act cga gcg gcc gcc act gtg- CTG CAG TGA GAG TTT CTG CA | <i>NLRP7-NAD</i> in pcDNA3.1- <i>myc</i> (AS 502-623) |
| MYC-ΔLRR-F | aag ctt ggt acc gag ctc gga tcc act agt- ATG ACA TCG CCC CAG CTA GA | <i>NLRP7-ΔLRR</i> in pcDNA3.1- <i>myc</i> (AS 1-623) |
| MYC-ΔLRR-R | gcc ctc tag act cga gcg gcc gcc act gtg- CTG CAG TGA GAG TTT CTG CA | <i>NLRP7-ΔLRR</i> in pcDNA3.1- <i>myc</i> (AS 1-623) |

Konfokale Mikroskopie (Megaprimer):

Die vektorspezifische Sequenz ist in Kleinbuchstaben und die insertspezifische Sequenz ist in Großbuchstaben dargestellt.

Zusätzlich eingefügte Start- und Stopcodons sind hervorgehoben.

| Bezeichnung | Sequenz 5' - 3' | Verwendung |
|----------------|---|---|
| EGFP-NLRP7-F | cta gcg cta ccg gac tca gat ctc gag ctc- ATG ACA TCG CCC CAG CTA GA | <i>NLRP7</i> in pEGFP-C1 (AS 1-1037) |
| EGFP-NLRP7-R | ggc cat ggt ggc gac cgg tgg atc ccg ggc- TCA GCA AAA AAA GTC ACA GC | <i>NLRP7</i> in pEGFP-C1 (AS 1-1037) |
| DsRed-NLRP7-F | cta gcg cta ccg gac tca gat ctc gag ctc- ATG ACA TCG CCC CAG CTA GA | <i>NLRP7</i> in pDsRed2-N1 (AS 1-1037) |
| DsRed-NLRP7-R | ggc cat ggt ggc gac cgg tgg atc ccg ggc- GCA AAA AAA GTC ACA GCA CG | <i>NLRP7</i> in pDsRed2-N1 (AS 1-1037) |
| DsRed-ZBTB16-F | cta gcg cta ccg gac tca gat ctc gag ctc- ATG GAT CTG ACA AAA ATG GG | <i>ZBTB16</i> in pDsRed2-N1 (AS 1-673) |
| DsRed-ZBTB16-R | ggc cat ggt ggc gac cgg tgg atc ccg ggc- CAC ATA GCA CAG GTA GAG G | <i>ZBTB16</i> in pDsRed2-N1 (AS 1-673) |
| DsRed-KHDC3L-F | cta gcg cta ccg gac tca gat ctc gag ctc- ATG GAC GCT CCC AGG CGG | <i>KHDC3L</i> in pDsRed2-N1 (AS 1-217) |
| DsRed-KHDC3L-R | ggc cat ggt ggc gac cgg tgg atc ccg ggc- TAA TCT AGT AAC TGG GTC | <i>KHDC3L</i> in pDsRed2-N1 (AS 1-217) |

Mutagenese-Primer:

Die jeweiligen Punktmutationen sind hervorgehoben.

| Bezeichnung | Sequenz 5' - 3' |
|-------------|--|
| | BiBM-assoziierte NLRP7 Mutationen |
| L398R-F | CTG CGT TTC CGC TGC AGC CGG TTC CCG CAG |
| L398R-R | CCG GCT GCA GCG GAA ACG CAG GAA CAG CCC |
| K511R-F | GAA AGA CTC AGG AAC CCC GAC CTG ATT CAA |
| K511R-R | GTC GGG GTT CCT GAG TCT TTC TTC TCC GGA |
| R693P-F | TCT TCT GTG CCG ATT CTT TGT GAC CAC GTA |
| R693P-R | ACA AAG AAT CGG CAC AGA AGA GTC ACT CAG |
| R693W-F | TCT TCT GTG TGG ATT CTT TGT GAC CAC GTA |
| R693W-R | ACA AAG AAT CCA CAC AGA AGA GTC ACT CAG |

Sequenzierprimer (Vektor):

| Bezeichnung | Sequenz 5' - 3' |
|-------------|---------------------------------|
| | pDONR |
| pDONR-F | TAC TCT CGC GTT AAC GCT AG |
| pDONR-R | ATT TTG AGA CAC GGG CCA GA |
| | pGBKT7 |
| pGBKT7-F | TCG CCG GAA TTT GTA ATA CG |
| pGBKT7-R | AGA AAT TCG CCC GGA ATT AG |
| | pGADT7 |
| pGADT7-F | TGA AGA TAC CCC ACC AAA CC |
| pGADT7-R | ACT TGC GGG GTT TTT CAG TA |
| | pcDNA3.1-myc & -flag |
| pcDNA3.1-F | GTA CGG TGG GAG GTC TAT ATA AGC |

Anhang

| | |
|------------|-----------------------------------|
| pcDNA3.1-R | C AGA ATA GAA TGA CAC CTA CTC AGA |
| | pEGFP-C1 |
| pEGFP-C1-F | CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G |
| pEGFP-C1-R | GTA ACC ATT ATA AGC TGC AAT |
| | pDsRed2-N1 |
| pDsRed2-F | TAG GCG TGT ACG GTG GGA GGT CTA T |
| pDsRed2-R | TGC ATG TGG AAC CTCGGC ATG ACC T |

Sequenzierprimer (Insert):

| Bezeichnung | Sequenz 5' - 3' |
|-------------|----------------------------|
| | NLRP7 |
| NLRP7-F2 | TAC ACG GTG GTG CTG CAC |
| NLRP7-R2 | GCG GCT GAG CTC CTT GCA |
| NLRP7-F3 | TAT TTC CTG AGA CAC TTT |
| NLRP7-R3 | CAT CTG CAG CTT CAG AGT |
| NLRP7-F4 | GGC CAC GCC TGG GAC ATC |
| NLRP7-R4 | AGT GGC CTC CAA CTC CTT |
| NLRP7-F5 | AAC TGG GCT CGG CAG GAT |
| NLRP7-R5 | GTC ACA AAG AAT CCG CAG |
| NLRP7-F6 | ACC ATG ACA CGC CCA AAA |
| NLRP7-R6 | GGG GTT CTT GGC CAA GCA |
| | ZBTB16 |
| ZBTB16-F1 | ATG GAT CTG ACA AAA ATG GG |
| ZBTB16-R1 | CTG GAT GGT CTC CAG CAT |
| ZBTB16-F2 | ATG CTG GAG ACC ATC CAG |
| ZBTB16-R2 | CTC CTC GCT GGA ATG CTT |
| ZBTB16-F3 | AAG CAT TCC AGC GAG GAG |
| ZBTB16-R3 | GAT GAC GCT GCT TCG AGT |

Anhang

| | |
|-----------|----------------------------|
| ZBTB16-F4 | ACT CGA AGC AGC GTC ATC |
| ZBTB16-R4 | ACA CAC GCT GCA CTG CTC |
| ZBTB16-F5 | GAG CAG TGC AGC GTG TGT |
| ZBTB16-R5 | CAC ATA GCA CAG GTA GAG G |
| | KHDC3L |
| KHDC3L-F | GAT CAT GAA CCT GGC TGA CT |
| KHDC3L-R | AGT CAG CCA GGT TCA TGA TC |

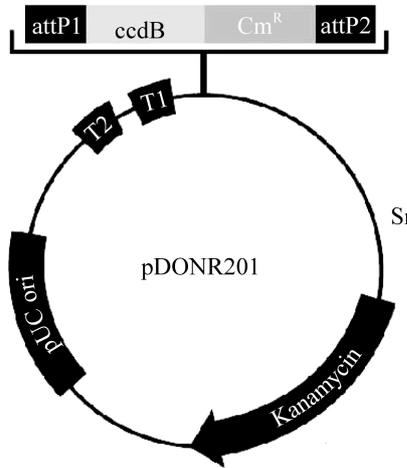
Methylierungsassay-Primer:

| Bezeichnung | Sequenz 5' - 3' | Locus |
|-----------------------|---|---|
| | Bi-Hot PCR | |
| Bi-H19-F1 (Outer) | TTT TTG GTA GGT ATA GAG TT | H19 (11p15) Paternal methyliert |
| Bi-H19-R1 (Outer) | AAA CCA TAA CAC TAA AAC CC | H19 (11p15) Paternal methyliert |
| Bi-H19-F2 (Nested) | TGT ATA GTA TAT GGG TAT TTT TGG AGG TTT | H19 (11p15) Paternal methyliert |
| Bi-H19-R2 (Nested) | TCC TAT AAA TAT CCT ATT CCC AAA TAA CC (5' Biotin) | H19 (11p15) Paternal methyliert |
| Bi-NESP55-F1 (Outer) | TTT TTT ATT TTA TAG GGT GTA TTT | NESP55 (20q13.2-3) Paternal methyliert |
| Bi-NESP55-R1 (Outer) | AAA ATA AAA TAC TTA AAC ACC AC | NESP55 (20q13.2-3) Paternal methyliert |
| Bi-NESP55-F2 (Nested) | TTT TTG TAG AGT TAG AGG GTA GGT | NESP55 (20q13.2-3) Paternal methyliert |
| Bi-NESP55-R2 (Nested) | AAA AAA AAC AAC TCA AAA TCT ACC (5' Biotin) | NESP55 (20q13.2-3) Paternal methyliert |
| Bi-PEG3-F1 (Outer) | GGA GAT TTT GTA GTA GTT TTT TAG ATT T | PEG3 (19q13.4) Maternal methyliert |
| Bi-PEG3-R1 (Outer) | CCC TTT TCC AAA CCT AAC TTT AAA A | PEG3 (19q13.4) Maternal methyliert |
| Bi-PEG3-F2 (Nested) | AAA AGG TAT TAA TTA TTT ATA GTT TGG T | PEG3 (19q13.4) Maternal methyliert |
| Bi-PEG3-R2 (Nested) | AAA ACT ACT AAT TAA CTA ACA CAA AAA CC (5' Biotin) | PEG3 (19q13.4) Maternal methyliert |

Anhang

| | | |
|----------------------|---|--|
| Bi-SNRPN-F1 (Outer) | TCC AAA ACA AAA AAC TTT AAA ACC CAA ATT C | SNRPN (15q11.2) Maternal methyliert |
| Bi-SNRPN-R1 (Outer) | AGG TTT TTT TTT ATT GTA ATA GTG TTG TGG GG | SNRPN (15q11.2) Maternal methyliert |
| Bi-SNRPN-F2 (Nested) | TCA ATA CTC CAA ATC CTA AAA ACT TAA AAT ATC | SNRPN (15q11.2) Maternal methyliert |
| Bi-SNRPN-R2 (Nested) | TGT GGG GTT TTA GGG GTT TAG TAG TTT TTT TTT TTT AGG (5'Biotin) | SNRPN (15q11.2) Maternal methyliert |
| | SNuPE | |
| H19-SN1 | TGG TTG TAG TTG TGG AAT | |
| NESP55-SN1 | GTG TTT AAG AGG ATG GAT | |
| NESP55-SN4 | GGT ATT TTT TGA GTT TTT | |
| PEG3-SN1 | GTT ATT TTG GTT TAG AGT | |
| SNRPN-SN6 | TAA GGT TAG TTG TGT | |
| | Pyrosequenzierung | |
| Pyro-H19 (SN1) | TGG TTG TAG TTG TGG AAT | |
| Pyro-NESP55 (SN1) | GTG TTT AAG AGG ATG GAT | |
| Pyro-PEG3 (SN1) | GTT ATT TTG GTT TAG AGT | |
| Pyro-SNRPN | GGG ATT TTT GTA TTG | |

A.3 Vektorkarten



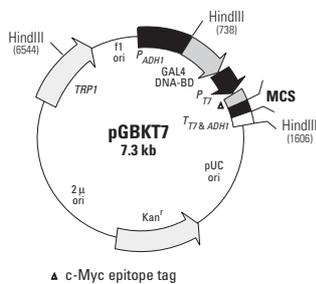
Comments for:

pDONR™201
4470 nucleotides

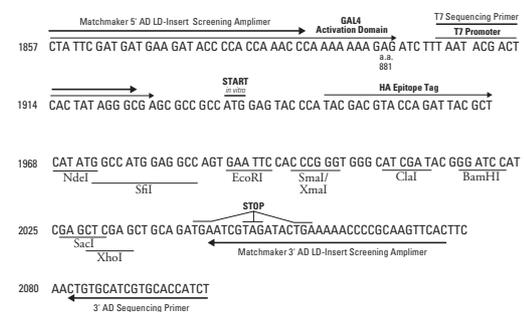
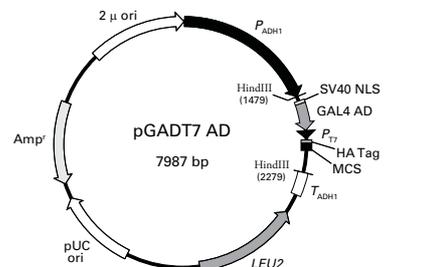
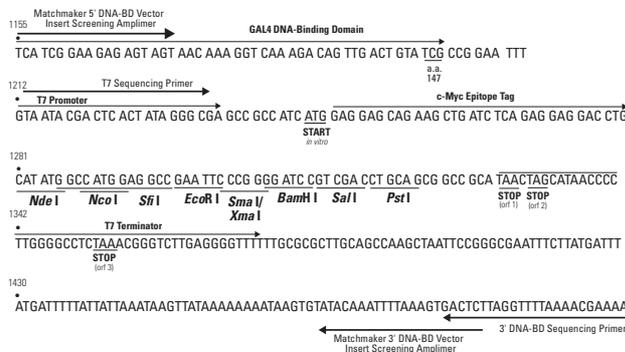
| | |
|---|-----------|
| rrnB T2 transcription termination sequence (c): | 73-100 |
| rrnB T1 transcription termination sequence (c): | 232-275 |
| Recommended forward priming site: | 300-324 |
| attP1: | 332-563 |
| ccdB gene (c): | 959-1264 |
| Chloramphenicol resistance gene (c): | 1606-2265 |
| attP2 (c): | 2513-2744 |
| Recommended reverse priming site: | 2769-2792 |
| Kanamycin resistance gene: | 2868-3677 |
| pUC origin: | 3794-4467 |
| (c) = complementary strand | |

Vektorkarte pDONR201.

Die cDNA aller in dieser Arbeit verwendeten Hefe Di-Hybrid-Konstrukte (*NLRP7*, *ZBTB16*, *KHDC3L*) wurde über die Gateway-Klonierungsmethode in den Vektor eingefügt.

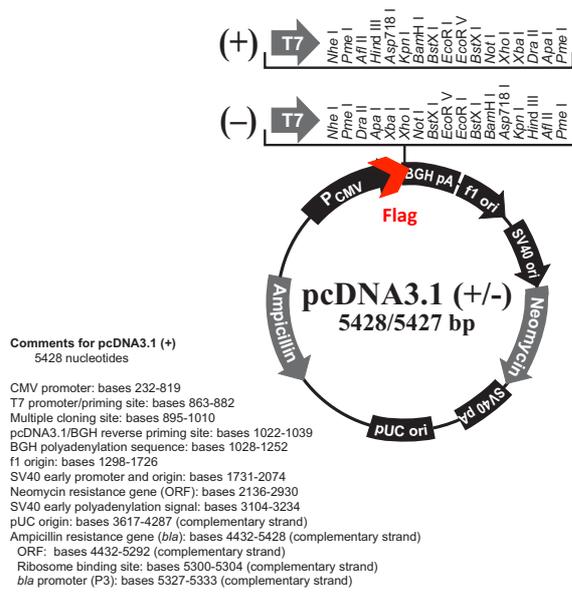


▲ c-Myc epitope tag



Vektorkarten pGBK7 und pGADT7.

Die cDNA aller in dieser Arbeit verwendeten Hefe Di-Hybrid-Konstrukte (*NLRP7*, *ZBTB16*, *KHDC3L*) wurde über den pDONR-Vektor (Gateway-Klonierung) jeweils in den Köder-Vektor pGBK7 und in den Beute-Vektor pGADT7 kloniert.



enhancer region (3' end)

689 CATTGACGTC AATGGGAGTT TGTTTGGCA CCAAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTCC

749 TAACAACCTCC GCCCCATTGA CGCAAAATGGG CGGTAGCGCT GTACGGTGGG AGGTCATAT

3' end of hCMV CAAT TATA

809 AAGCAGAGCT CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTT **Flag: DYKDDDDK** TTAATAC

putative transcriptional start

T7 promoter/primer binding site Nhe I Pme I Afl II Hind III Asp718 Kpn I

869 GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTGGCTA GCGTTTAAAC TTAAGCTTGG TACCGAGCTC

BamH I BstX I* EcpR I EcoR V BstX I* Not I Xho I

929 GGATCCACTA GTCACAGTGG GTGGAAATCT GCAGATATCC AGCACAATGG CGGCCGCTCG

Xba I Apa I Pme I pcDNA3.1/BGH reverse priming site

989 AGTCTAGAGG GCCCGTTTAA ACCCGTGAT CAGCCTGAC TGGCCTTCT AGTTGCCACG

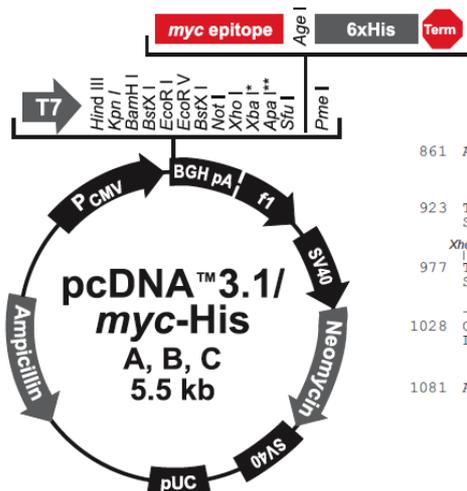
1049 CATCTGTTGT TTGCCCTCC CCGTGCCCTT CCTTGACCCT GGAAGTGCC ACTCCCACTG

BGH poly (A) site

1109 TCCTTTCCTA ATAAAATGAG GAAATTGCAT

Vektorkarte pcDNA3.1 mit N-terminalen Flag-Epitop.

In die MCS wurde die cDNA aller in dieser Arbeit verwendeten *NLRP7*-Konstrukte kloniert.



T7 promoter/primer binding site Hind III Kpn I BamH I

861 ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGT TAAG CTT GGT ACC GAG CTC GGA
Leu Gly Thr Glu Leu Gly

BstX I EcoR I EcoR V BstX I Not I

923 TCC ACT AGT CCA GTG TGG TGG AAT TCT GCA GAT ATC CAG CAC AGT GGC GGC CGC
Ser Thr Ser Pro Val Trp Trp Asn Ser Ala Asp Ile Gln His Ser Gly Gly Arg

Xho I Xba I Apa I Sac II Sfu I myc epitope

977 TCG AGT CTA GAG GGC CCG CGG TTC GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT
Ser Ser Leu Glu Gly Pro Arg Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp

Age I Polyhistidine tag Pme I

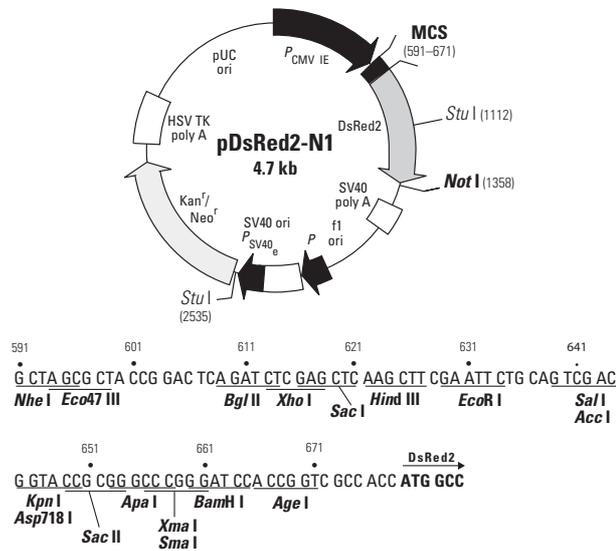
1028 CTG AAT ATG CAT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT TGA GTTT AAACCCGCTG
Leu Asn Met His Thr Gly His His His His His His ***

BGH Reverse priming site

1081 ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA

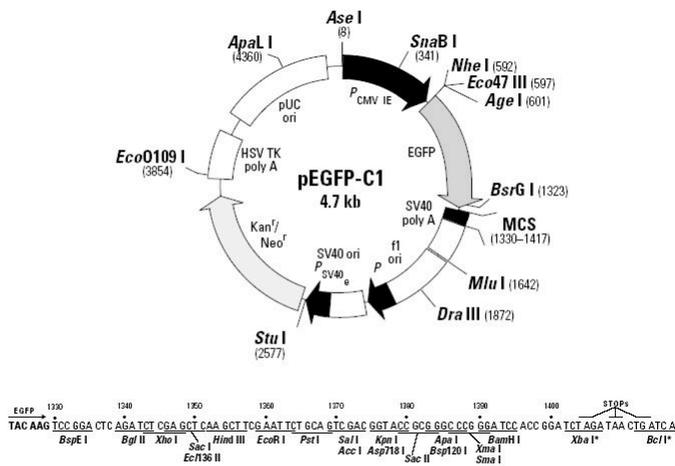
Vektorkarte pcDNA3.1 mit C-terminalen Myc- und 6xHis Epitop.

In die MCS wurde die cDNA aller *ZBTB16*-Konstrukte (*ZBTB16wt* und *ZBTB16_del1-5*), *KHDC3L* und die *NLRP7*-Konstrukte *NLRP7wt*, *NAD* und Δ *LRR* kloniert.



Vektorkarte pDsRed2-N1 mit C-terminalem DsRed2.

In die MCS wurde die cDNA von *NLRP7*, *ZBTB16* und *KHDC3L* kloniert.



Vektorkarte pEGFP-C1 mit N-terminalem EGFP.

In die MCS wurde die cDNA von *NLRP7* kloniert.

Publikationsverzeichnis

Publikationen:

1. Singer H, Nüsgen N, El-Maarri O. SIRPH: an HPLC-based SNuPE for quantitative methylation measurement at specific CpG sites. *Methods Mol Biol.* 2011;791:89-100.
2. Singer H, Walier M, Nüsgen N, Meesters C, Schreiner F, Woelfle J, Fimmers R, Wienker T, Kalscheuer VM, Becker T, Schwaab R, Oldenburg J, El-Maarri O. Methylation of L1Hs promoters is lower on the inactive X, has a tendency of being higher on autosomes in smaller genomes and shows inter-individual variability at some loci. *Hum Mol Genet.* 2012 Jan 1;21(1):219-35.
3. Singer H, Biswas A, Zimmer N, Messaed C, Oldenburg J, Slim R, El-Maarri O. NLRP7 inter-domain interactions: The NACHT-associated domain (NAD) is the physical mediator for oligomeric assembly. *Molecular Human Reproduction.* *Mol Hum Reprod.* 2014 Oct;20(10):990-1001
4. Singer H, Biswas A, Zimmer N., Oldenburg J, El-Maarri O. NLRP7, involved in hydatidiform molar pregnancy (HYDM1), interact with the transcriptional repressor ZBTB16 (In Vorbereitung).